

Aus der Klinik für Augenheilkunde

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Salvatore Grisanti

**Einfluss von Bestrahlung auf den DNA-Schaden
in uvealen Melanomzellen mit Monosomie 3**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Yingda Zhu

aus Huangshi

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Aysegül Tura

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Janssen

Tag der mündlichen Prüfung: 2.2.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 2.2.2022

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Anatomie des Auges	1
1.2. Epidemiologie des uvealen Melanoms	3
1.3. Histologische Einteilung des uvealen Melanoms	4
1.4. Risikofaktoren des uvealen Melanoms	5
1.5. Klinisches Erscheinungsbild des uvealen Melanoms	5
1.6. Diagnostik des uvealen Melanoms	6
1.7. Behandlungsmöglichkeiten	7
1.7.1. Chirurgische Therapie der primären Tumore	8
1.7.2. Konservative Therapie der primären Tumore	8
1.7.3. Therapie der Fernmetastasen	12
1.8. Prognose des uvealen Melanoms	12
1.8.1. Chromosom 3 Status	15
1.8.2. Mutation des BAP1-Gens	16
1.9. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Probenmaterial und Patientenkollektiv	20
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	23
2.2. Allgemeine Methoden	27
2.2.1. Verschlüsselung der Patientendaten	27

2.2.2. Beobachter.....	27
2.2.3. Entparaffinierung und Rehydratation der Gewebeschnitte.....	28
2.3. Untersuchung des DNA-Schadens mittels TUNEL-Assays.....	29
2.3.1. Durchführung des TUNEL-Assays.....	29
2.3.2. Computergestützte, quantitative Auswertung der TUNEL-Intensität an lichtmikroskopischen Bildern.....	32
2.4. Immunhistochemie.....	35
2.4.1. Protokoll der BAP1-Immunhistochemie für Lichtmikroskopie.....	35
2.4.2. Semi-quantitative Auswertung der BAP1-Immunhistochemie.....	36
2.5. Nachweis von Chromosom 3 in immungefärbten Zellen mittels Fluoreszenz-In Situ- Hybridisierung (FISH).....	37
2.5.1. Immuno-FISH Assay.....	37
2.5.2. Bestimmung der Kopienzahl von Chromosom 3 in den uvealen Melanomzellen	39
2.6. Statistische Analyse.....	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Auswertung der Kopienzahl von Chromosom 3 und der Intensität von BAP1.....	43
3.1.1. Auswertung der Kopienzahl von Chromosom 3.....	43
3.1.2. Auswertung der Intensität von BAP1.....	46
3.2. Vergleich des DNA-Schadens der bestrahlten und nicht bestrahlten Tumore.....	47
3.3. DNA-Schaden bei unterschiedlichem Chromosom 3- und BAP1 Status.....	48
3.3.1. Vergleich des DNA-Schadens bei Monosomie 3 und Disomie 3.....	48

3.3.2. Vergleich des DNA-Schadens bei niedriger und hoher BAP1 Expression im Zytoplasma.....	53
3.3.3. Vergleich des DNA-Schadens bei niedriger und hoher BAP1 Expression im Zellkern.....	55
3.4. Korrelation des DNA-Schadens mit weiteren Parametern.....	58
3.4.1. Korrelation des DNA-Schadens mit weiteren Parametern bei bestrahlten Tumoren.....	58
3.4.2. Korrelationen des DNA-Schadens mit weiteren Parametern bei nicht bestrahlten Tumoren.....	60
4. Diskussion	63
4.1. Korrelation der Strahlentherapie mit dem Chromosom 3 Status.....	63
4.2. Korrelation der Strahlentherapie mit dem BAP1 Status.....	67
4.3. Korrelation der Strahlentherapie mit anderen Faktoren.....	68
4.4. Einschränkungen der Arbeit.....	69
4.5. Ausblick.....	72
5. Zusammenfassung	75
Literatur	77
Abkürzungsverzeichnis	85
Danksagung	88
Lebenslauf	89

Kapitel 1.

Einleitung

1.1. Anatomie des Auges

Das Auge ist ein Sinnesorgan zur Wahrnehmung des Lichtreizes.^{1,2} Der fast kugelige Augapfel steht in der Augenhöhle und besteht aus mehreren Schichten (Abbildung 1.1).¹

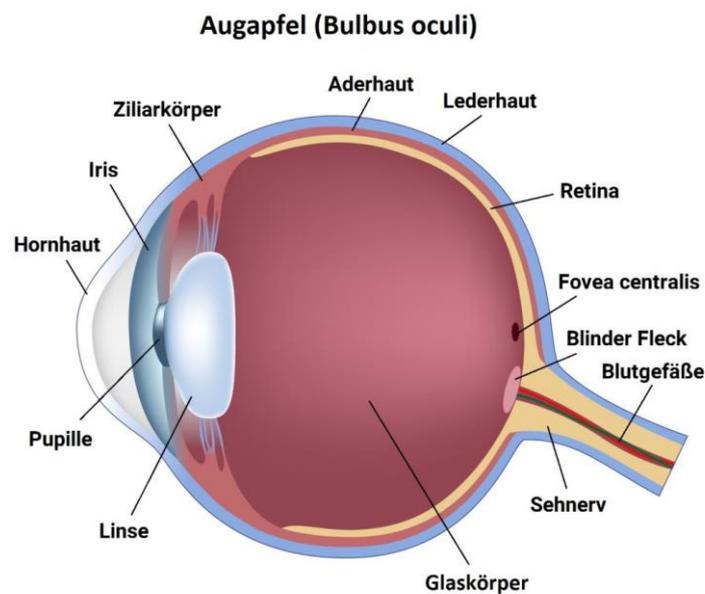


Abbildung 1.1. Aufbau des Augapfels.³

Die äußere Augenhaut (Tunica externa fibrosa) setzt sich aus der undurchsichtigen Lederhaut (Sklera) und der transparenten Hornhaut (Cornea) zusammen. Sie bieten dem Auge äußeren Schutz und halten es in seiner Form.¹

Die mittlere Augenhaut (Uvea) ist gefäßreich und stark pigmentiert, weshalb sie auch als Gefäßhaut bezeichnet wird. Die Regenbogenhaut (Iris) und der

Ziliarkörper (Corpus ciliare) bilden gemeinsam mit der Aderhaut (Choroidea) die Uvea.¹

Das von der Iris eingefasste Sehloch wird als Pupille bezeichnet. Durch die Veränderung des Pupillendurchmessers ist die Iris verantwortlich für die Anpassungsfähigkeit des Sehorgans an sich ändernde Lichtverhältnisse.^{1,4}

Die Aderhaut, die einen aus Läppchen bestehenden, schwammartigen Gefäßkomplex zwischen der Netzhaut und der Lederhaut bildet, geht am vorderen Auge in den Ziliarkörper und die Regenbogenhaut über. Der Blutfluss durch die Aderhaut ist der stärkste im gesamten Körper. Die Versorgung der äußeren Netzhautschichten (Fotorezeptoren) und die Regulierung der Temperatur des Auges erfolgen durch die Aderhaut. Außerdem ist die Aderhaut durch den elastischen vorderen Teil, der in den Ziliarkörper übergeht, an der Akkommodation beteiligt.^{1,5-7}

Der Ziliarkörper grenzt kreisförmig an den peripheren Rand der Iris (Iriswurzel) an. Seine Aufgaben sind die Aufhängung der Linse, die Akkommodation und die Produktion des Kammerwassers.¹

Die innere Augenhaut ist die Netzhaut (Retina), die aus einem blinden (Pars caeca retinae) und einem sehenden Teil (Pars optica retinae) besteht. Die Aufgabe der Netzhaut ist die Umwandlung der am Auge ankommenden Lichtstrahlen in Nervenimpulse.^{1,6}

Die Augenhäute umgeben erstens die Augenkammern (Camera oculi), die mit Kammerwasser gefüllt sind, zweitens die Augenlinse (Lens cristallina), die an der

Akkommodation beteiligt ist, und drittens das gallertartige und durchsichtige Augennere, den Glaskörper, der durch seinen Quellungsdruck die gesamte Hautkonstruktion des Augapfels stabilisiert.^{1,6} Die Bewegung des Augapfels wird durch sechs Augenmuskeln möglich.¹

1.2. Epidemiologie des uvealen Melanoms

Das uveale Melanom ist mit der jährlichen Inzidenz von 6-10:1.000.000 in Deutschland der häufigste primär bösartige Tumor des Augenneren (85% der okulären Melanome) beim Erwachsenen. Am häufigsten kommt es mit bis zu 85% in der Aderhaut vor, gefolgt vom Ziliarkörper mit 5–8% und am seltensten in der Iris mit 3–5%.^{5,8} Die jährliche Inzidenz nach der Altersanpassung zeigt eine Korrelation mit der Abstammung: Betroffen sind 0,31 Afroamerikaner, 0,39 Asiaten, 1,67 Hispanoamerikaner und 6,02 nicht-hispanische Weiße pro Million.⁹ In Europa steigt die Inzidenz mit der geografischen Breite zu 2:1.000.000 in Spanien und Süditalien, 4–5:1.000.000 in Frankreich und der Schweiz sowie >6:1.000.000 im Vereinigten Königreich.¹⁰ Nahezu 95% der Patienten sind Kaukasier, besonders betroffen sind Kaukasier mit heller Haut und hellen Irisfarben.⁹ Das sporadische uveale Melanom ist selten. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose liegt bei Weißhäutigen bei 60 Jahren und bei Asiaten niedriger.^{11,12} Das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten ist 1,1 : 1.¹³

Ungefähr die Hälfte der Patienten entwickelt Fernmetastasen über eine hämatogene Streuung, v.a in der Leber und seltener in der Lunge, den

Lymphknoten oder in anderen Organen. Die Überlebenszeit wird deutlich verringert, wenn es zu Lebermetastasen kommt: die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 75% und nur die Hälfte der Betroffenen überlebt das erste Jahr nach der Diagnose von Lebermetastasen.^{14,15}

1.3. Histologische Einteilung des uvealen Melanoms

In der Uvea befinden sich zahlreiche Melanozyten, die durch Entartung zur Entwicklung des malignen uvealen Melanoms führen können.¹⁶ Die gängigste histologische Einteilung, die modifizierte Callender-Klassifikation, teilt die uvealen Melanome in drei Gruppen ein: in Spindelzell-, Epitheloidzell- und Gemischtzell-Melanome (Abbildungen 1.2-1.4), wobei die letztgenannten die beiden erstgenannten Zelltypen enthalten. Die Spindelzellen werden in zwei Untergruppen eingeteilt, in Spindel-A- und Spindel-B-Zellen. Reine Spindelzell-A-Melanome sind nicht bösartig und werden zu den benignen Nävi gezählt. Die Spindelzellen wachsen kompakt kohäsiv, zeigen eine fusiforme Morphologie, sind von weniger scharfen Zellgrenzen umrissen und haben im Allgemeinen ein dichtes Gerüst aus Retikulinfasern. Die Epitheloidzellen wachsen weniger kohäsiv als die Spindelzellen. Charakteristisch für die Epitheloidzellen sind die plumpe, ovale Form mit öfter mitotischen Figuren und größeren Nukleoli im Zellkern. Die Epitheloidzellen sind nicht von einem Netz aus Retikulin umgeben, sind schlechter differenziert als die Spindelzellen und haben eine Metastasierungsrate von mehr als 50%. Außerdem hat das Epitheloidzellmelanom

eine schlechtere Prognose als das Spindelzellmelanom. Die Prognose ist besser, wenn die Epitheloidzellen noch klein sind.¹⁷⁻²⁰

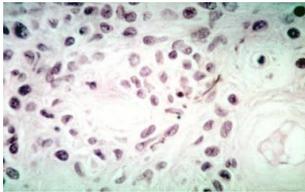


Abbildung 1.2. Spindel-A-Zellen in einem Nävus.²¹

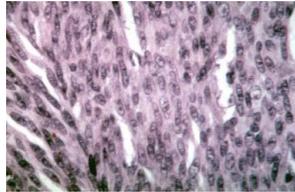


Abbildung 1.3. Spindel-B-Zellen in einem uvealen Melanom.²¹

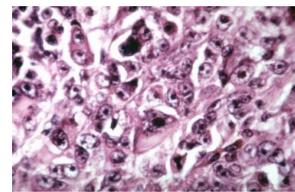


Abbildung 1.4. Epitheloidzellen in einem uvealen Melanom.²¹

1.4. Risikofaktoren des uvealen Melanoms

Die Ätiologie des uvealen Melanoms ist bisher noch nicht eindeutig erforscht. Prädisponierende Faktoren sind helle Haut, helle Irisfarbe und zusätzlich chronische Sonneneinstrahlung.^{5,22} Eine UV-B-Strahlenexposition und die fehlende Verwendung von Sonnenbrillen sind möglicherweise auch mit einem erhöhten Risiko für ein uveales Melanom assoziiert.²³ Außerdem sind das Schweißen, das Melanozytom, die okuläre Melanozytose, das dysplastische Nävus-Syndrom und das Vorhandensein von BAP1-Keimbahnmutationen Risikofaktoren für ein uveales Melanom.²⁴⁻²⁷

1.5. Klinisches Erscheinungsbild des uvealen Melanoms

Die klinischen Beschwerden hängen davon ab, wo der Tumor lokalisiert ist und wie er wächst. Frühsymptome sind beim uvealen Melanom tendenziell selten. Symptome treten bei Tumoren vom hinteren Pol früher auf, als bei Tumoren vom vorderen Pol. Die Patienten bemerken häufig zuerst eine Gesichtsfeldeinschränkung bzw. eine Sehverschlechterung, sobald es zu einer

exsudativen Abhebung der Netzhaut kommt, die möglicherweise eine Netzhautablösung auslöst. Weitere Symptome sind z.B. verschwommenes Sehen, Photopsie, Mouches volantes, ein sichtbarer Tumor und Schmerzen. Außerdem kommen als sekundäre Tumorkomplikation das durch entzündliche Exsudationen verursachte Offenwinkelglaukom, eine Katarakt oder eine Linsensubluxation vor. Fast 30% der Patienten zeigen keine Symptome bei der Erstdiagnose und es besteht eine eher geringe Wahrscheinlichkeit, dass bei diesen Patienten eine Enukleation notwendig wird.^{5,28,29}

1.6. Diagnostik des uvealen Melanoms

Die Diagnose eines uvealen Melanoms kann im Gegensatz zu anderen malignen Erkrankungen häufig durch eine, im Rahmen einer Routineuntersuchung durchgeführte, klinische Fundoskopie gestellt werden. Diese Untersuchung eignet sich ebenfalls zur Verlaufskontrolle, ohne dass eine histopathologische Bestätigung erforderlich ist.³⁰ Zur Erkennung kleinerer uvealer Melanome sind eine höhere Läsionsdicke, eine subretinale Flüssigkeitsansammlung, Sehstörungen, orangefarbene Ablagerungen bei der fundoskopischen Untersuchung und eine Läsionsstelle, die weniger als 3 mm vom Sehnerv entfernt ist, von Belang.³¹ Zur weiteren Charakterisierung der Krankheit und Prognose wird häufig eine spezialisierte Augenbildgebung durchgeführt, einschließlich Sonographie, Fluoreszenzangiographie, Farbfundusfotografie, Indozyaningrün-Angiographie, optische Kohärenztomographie, Fundus-Autofluoreszenz und

Ultraschallbiomikroskopie.³⁰

Die Sonografie trägt zur klinischen Diagnose bei und ist die am häufigsten verwendete Untersuchungsmethode zur Messung der Größe und des Wachstums des Tumors, was wichtig für die Nachuntersuchung ist. Außerdem ermöglicht die Sonografie die Unterscheidung von Metastasen und Hämangiomen, die in der Regel ein hohes Reflexionsvermögen aufweisen. Mit der Ultraschallbiomikroskopie kann die Ausdehnung von uvealen Melanomen, die ursprünglich aus dem Ziliarkörper stammen, beurteilt werden.³⁰ Die für die molekulare Analyse des Tumors ausschlaggebende Biopsie wird nicht routinemäßig durchgeführt, da sie ein hohes Komplikationsrisiko birgt und die Ergebnisse sich selten auf den Behandlungsplan auswirken.³²

1.7. Behandlungsmöglichkeiten

Das Behandlungsziel des primären uvealen Melanoms ist die Erhaltung des Auges und des Visus sowie die eventuelle Verhinderung einer Metastasierung.³³ In den letzten Jahrzehnten wurden wegweisende Fortschritte in der Therapie erzielt, einschließlich der Strahlentherapie, der Phototherapie und der lokalen Resektion. Diese Therapien können bei kleinen Tumoren öfter genutzt und eine Enukleation umgangen werden. In mehreren Studien wurde belegt, dass die Patienten ohne oder mit nur einem bis zwei Risikofaktoren mehr von der primären Lokalthherapie profitieren können.^{2,6,33,34} Trotzdem ist noch unklar, mit welcher Behandlungsmöglichkeit die Überlebenszeit der Patienten verlängert werden kann,

besonders bei bereits stattgefundenener Metastasierung.^{15,35}

1.7.1. Chirurgische Therapie der primären Tumore

Die chirurgische Therapie wird in zwei Typen unterteilt: die Enukleation und die bulbuserhaltende Exzision. Die letztgenannte wird vor allem bei Tumoren mit einer anterior-posterioren Ausdehnung über 8 mm genutzt, da ein toxisches Tumorsyndrom und ein sekundäres Glaukom bei Exzision, im Vergleich zur konservativen Therapie, besser vermieden werden können. Für die Enukleation werden keine statistisch signifikanten Vorteile für das Überleben der Patienten berichtet. Trotzdem wird diese Methode heutzutage bei größeren Aderhautmelanomen, die in den Nervus Opticus einwachsen oder den Tumoren mit schlechter Sehprognose, immer noch durchgeführt.^{36,37}

1.7.2. Konservative Therapie der primären Tumore

Zu den konservativen Methoden gehören die Strahlen- und Thermotheapie.³⁶

1.7.2.1. Strahlentherapie

Studien belegten, dass mit der Strahlentherapie, im Vergleich zur chirurgischen Therapie, eine gleich gute oder sogar bessere Überlebensrate erreicht wurde.^{13,36}

Die meisten Patienten werden heutzutage mit Strahlentherapie behandelt, dafür kommen die Brachytherapie, Teletherapie oder stereotaktische Strahlentherapie infrage.^{30,36}

Die Brachytherapie wird mit einer untertassenförmigen Plakette durchgeführt. Diese enthält meistens die Radioisotopen Jod-125 oder Ruthenium-106, die die Gamma- bzw. Betastrahlung emittieren. Ruthenium Plaques sind effektiver bei Tumoren mit einer Dicke von bis zu 6 mm und Gammastrahlen haben eine größere Reichweite. Auf diese Weise können dickere Tumore behandelt werden. Kollateralschäden von Papille, Makula und Linse kommen bei Gammastrahlen aber häufiger vor. Der Applikator wird an die Sklera neben den Tumor genäht und nach einer Dosis von mindestens 85 Gy an der Tumorspitze wieder entfernt. Die Größe der Plakette wird herkömmlicherweise so ausgewählt, dass sie physiologisch den gesamten Tumorrand um mindestens 2 mm überlappt. Trotz der hohen Wahrscheinlichkeit einer Optikusneuropathie und eines Sehverlustes werden gekerbte Plaques bei juxtapapillären Tumoren verwendet. Die lokale Tumorkontrolle und das visuelle Ergebnis nach der Brachytherapie erfolgen am besten für kleine Tumore, die sich noch nicht in die Nähe der Papille oder Fovea erstrecken. Es gibt jedoch zahlreiche Tumore, die nicht in diese Kategorie fallen.^{30,38}

Die Teletherapie mit der Teilchenstrahlung, bestehend aus Protonen oder Heliumionen, ermöglicht hohe und gleichmäßige Strahlendosierungen mit weniger Schädigung des Oberflächengewebes. Der Sicherheitsabstand wird kleiner gewählt, wenn sich der Tumor in die Nähe der Papille erstreckt, um eine Optikusneuropathie zu vermeiden. Bei diffusen Melanomen werden größere Sicherheitsabstände vorgeschrieben, um die Rezidivwahrscheinlichkeit zu

verringern. Normalerweise sollte ein Sicherheitsabstand von ca. 2 mm eingehalten werden. Die optimalen Ergebnisse nach einer Protonenstrahlung werden, wie auch bei der Brachytherapie, bei kleinen Tumoren erreicht.³⁸

Bei der stereotaktischen Strahlentherapie wird die Strahlung aus mehreren Richtungen gleichzeitig mit dem Leksell-Gammamesser auf den Tumor gerichtet. Alternativ stehen der Linearbeschleuniger (LINAC) und das "Cyberknife" zur Verfügung.^{6,38} Zuerst wird den Patienten eine stereotaktische Maske angepasst, um die Bewegung des Kopfes während der Bestrahlung zu minimieren. Dann wird eine Bildgebung mittels CT, MRT oder PET durchgeführt, um einen individuellen Bestrahlungsplan für die Größe, Form und Lokalisation des Tumors zu erstellen. Der Vorteil dieser Therapie ist, dass der Tumor mit hohen Strahlendosen behandelt wird. Gleichzeitig werden die umliegenden Gewebe wenig beeinträchtigt, da die einzelnen, das gesunde Gewebe durchdringenden Strahlen einen geringen Anteil der Gesamtdosis ausmachen. Diese Therapie kann eingesetzt werden wenn der Tumor wegen der anatomischen Lokalisation oder aus anderen Gründen inoperabel ist.³³ Für Tumore mit einer Dicke über 6,5 mm, die für die Brachytherapie nicht geeignet sind, kommt gegebenenfalls die stereotaktische Strahlentherapie infrage.³⁸

1.7.2.1.1. Rezidiv nach der Strahlentherapie

Trotz der relativ guten Kontrolle der primären Tumore zeigt sich bei jedem zehnten bestrahlten Patienten ein Tumorrezidiv.³⁹ In solchen Fällen könnte eine sekundäre

Enukleation erforderlich sein oder die Patienten entwickeln Metastasen. Die sekundäre Enukleation ist bei etwa jedem sechsten bis zehnten Patienten nach einer Strahlentherapie notwendig und die Metastasen entwickeln sich bei fast 10% der Patienten; das geht aus einer fünfjährigen Studie hervor.^{40,41} Zudem kann die sekundäre Enukleation schwieriger sein als die primäre, da sie meistens wegen des neovaskulären Glaukoms, der Tumorprogression oder des fehlenden Therapieansprechens notwendig ist.⁴⁰⁻⁴² Das Fehlen des Tumoransprechens korreliert mit der juxtapapillären Lokalisation der Tumore, wobei die Metastasen häufiger bei Non-Respondern vorkommen.⁴¹ In einigen Studien wurde festgestellt, dass die Tumordicke ein Risikofaktor für die sekundäre Enukleation nach der Strahlentherapie ist und das neovaskuläre Glaukom auch häufiger bei größeren Tumoren auftritt.^{41,43-45} Außerdem haben die Patienten mit Monosomie 3 eine schlechtere Prognose nach der Strahlentherapie.⁴⁶

Um ein Tumorrezidiv nach der Strahlentherapie zu vermeiden, sollte ein weiterer Sicherheitsabstand eingehalten werden. Jedoch kann dies häufiger die Schädigung der umliegenden Strukturen verursachen und die okularbezogene Morbidität erhöhen.³⁹

1.7.2.2. Transpupilläre Thermotherapie

Die transpupilläre Thermotherapie ist vor allem bei kleinen Tumoren indiziert, die am hinteren Pol liegen. Ein Infrarot-Laser sorgt für die Hyperthermie des hitzelabilen Tumorgewebes und zerstört es.^{2,36}

1.7.3. Therapie der Fernmetastasen

Zu den Behandlungsmethoden der Fernmetastasen gehören die Chemo- und Immuntherapie.³⁶

1.7.3.1. Chemotherapie

Die Chemotherapie wird vor allem bei Fernmetastasen genutzt. Bei Patienten mit Tumorrezidiven wird oft eine Chemotherapie mit z.B. Dacarbazin oder Gemcitabin/Treosulfan versucht, trotz des meist ungenügenden Effekts.⁴⁷

1.7.3.2. Immuntherapie

Außerdem sind zurzeit die Immuntherapeutika Nivolumab und Pembrolizumab in den USA zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen. Diese Immuntherapeutika sind vollständig humane monoklonale Antikörper, die für den programmierten Zelltodprotein 1 (PD-1) -Rezeptor spezifisch sind. Jedoch führten diese PD-1-Inhibitoren mit einem medianen progressionsfreien Überleben von nur 3 Monaten und einer Gesamtansprechrate von 3,6% nicht zu höheren Überlebenschancen für Patienten mit uvealen Melanomen.^{48,49}

1.8. Prognose des uvealen Melanoms

Das uveale Melanom als der häufigste primäre bösartige Tumor des Augeninneren hat eine schlechte Prognose: Auch wenn es erfolgreich behandelt wird, entwickeln fast 50% der Patienten eine systemische metastatische Erkrankung.^{14,15} Die

mediane Gesamtüberlebensdauer beträgt 4 bis 15 Monate bei der Diagnose von Metastasen.^{50,51} Die 10-Jahres-Metastasierungsrate beträgt insgesamt 40%, unabhängig von der Behandlungsmethode. Fast 50% der Patienten sterben schließlich an Metastasen, die häufig die Leber befallen.⁵⁰ Dieses Organ ist das häufigste Metastasierungsgebiet (89%), gefolgt von der Lunge (29%), den Knochen (17%), der Haut (12%) und den Lymphknoten (11%).⁵² Auch wenn eine Enukleation durchgeführt wurde und zum Zeitpunkt der Therapie bei diesen Patienten noch keine Metastasen festgestellt wurden, treten bei einem Teil der Patienten trotzdem Fernmetastasen auf. Eine mögliche Erklärung ist das Vorhandensein von zuvor undetektierbaren Mikrometastasen.³⁰ Die mediane Überlebensdauer von Patienten, die eine Behandlung erhalten, ist jedoch länger als die von Patienten ohne Therapie.⁵³

Die Prognose eines uvealen Melanoms kann durch klinische, histopathologische und zytogenetische Faktoren geschätzt werden. Wenn der Tumor bei der Erkennung noch klein ist und ein geringes Risiko für eine Metastasierung besteht, ist die Prognose am besten. Aus diesem Grund verbessert die Früherkennung am wirksamsten die Prognose.⁵³ Es wird empfohlen, bei Patienten mit uvealem Melanom halbjährlich die Leberfunktion mittels Sonografie oder MRT zu untersuchen. Denn die Früherkennung der Metastasen hat erheblichen Einfluss auf die Überlebenszeit.³⁰

Studien haben durchweg gezeigt, dass die Überlebenszeit nach der Behandlung großer Tumore kürzer ist als bei kleinen Melanomen.⁵⁴ The AJCC

Ophthalmic Oncology Group berichtete, je größer und tiefer der Tumor ist, desto größer ist das Risiko der Metastasierung.⁵⁵ Außerdem hatten die Tumore, die rezidivieren, einen signifikant größeren Durchmesser und ein deutlich fortgeschrittenes Stadium im Vergleich zu den nicht rezidivierenden Tumoren.³⁴ Neben der Größe des Tumors sind die Beteiligung des Ziliarkörpers und die extraokuläre Extension relevante klinische Faktoren für die Prognose, die häufig zu einem Parameter kombiniert werden, der in der TNM-Klassifikation verwendet wird. Diese Kombination liefert einen besseren Prognoseabschätzungswert als jeder einzelne Parameter.⁵⁶

Abgesehen von anderen Risikofaktoren haben junge Patienten eine bessere Prognose als ältere.⁵⁷ Bei älteren Patienten ist der Tumor bei Behandlung tendenziell größer, ausgedehnter und hat einen höheren Grad an histologischer Malignität. Außerdem zeigt sich ein höheres metastatisches Potenzial aufgrund der häufiger vorkommenden Risikofaktoren für Metastasen, z.B. ein Verlust des Chromosoms 3. Das deutet darauf hin, dass eine Augenbehandlung das Tumorwachstum, die Entdifferenzierung und das durch die Metastasen verursachte Sterben verhindern kann, wenn sie frühzeitig durchgeführt wird.^{58,59}

In aktuellen Studien wird darauf hingewiesen, dass die Anomalien der Chromosomen 3, 6 und 8 relevant für die Überlebensrate sind.^{60,61} Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen Mutationen der Gene, wie BAP1, SF3B1 und EIF1AX und der Prognose berichtet.⁶²

1.8.1. Chromosom 3-Status

Der Status des Chromosoms 3 hat eine erhebliche Bedeutung für die Prognose des uvealen Melanoms. Patienten mit Monosomie 3 haben eine schlechtere Prognose und eine höhere Wahrscheinlichkeit, an Metastasen zu sterben.^{46,63} Hinsichtlich des Genexpressionsprofils werden die Tumore in zwei Klassen eingeteilt: Die Tumore der Klasse 1 haben ein niedriges Risiko für die Metastasenbildung, die Tumore der Klasse 2 hingegen ein hohes. Dementsprechend werden die Tumore mit Monosomie 3 der Klasse 2 zugeordnet, während die Tumore mit Disomie 3 zur Klasse 1 gehören.⁶³⁻⁶⁶ Zudem wird die Monosomie 3 mit weiteren Faktoren assoziiert, die die Prognose beeinflussen, wie der größere Tumordurchmesser, die Epitheloidzellen, die hohe Mitoserate und die extraokuläre Extension.⁵³ Außerdem wurde herausgefunden, dass Patienten mit allelischer Imbalance auf Chromosom 3 bei Microsatellite Analyzer, eine ähnlich schlechte Prognose wie Patienten mit Monosomie 3 haben.⁶⁶ Eine partielle Deletion oder die Isodisomie des Chromosoms 3 erhöhen ebenfalls das Metastasierungsrisiko.⁵³

Nicht nur die großen sondern auch die kleineren Tumore mit Monosomie 3 zeigen eine schlechte Prognose, obwohl die Patienten eine augenerhaltende Therapie, wie die Brachytherapie, erhalten.⁴⁶ Der Chromosom 3 Status kann innerhalb des gleichen Tumors variieren.⁵³ Die größeren Tumore besitzen auch einen größeren Anteil an Tumorzellen mit Monosomie 3 als die kleineren. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Tumor mit dem höheren Anteil an Zellen mit

Monosomie 3 schneller wächst und ein größerer Tumor auch eine längere Zeit für die Transformation von Disomie 3 zu Monosomie 3 zur Verfügung hat. Darum wird vorgeschlagen, möglichst früh eine Therapie zu beginnen, um die mögliche Vermehrung der Monosomie 3 und nachfolgende Metastasierung zu vermeiden.⁴⁶

Außer der Monosomie 3 zeigt der Gewinn vom Chromosomenarm 8q eine starke Korrelation mit der Metastasierung, dagegen zeigt der Gewinn vom Chromosomenarm 6p ein niedrigeres Risiko.⁶² Die Amplifikation des Protoonkogens c-MYC, das auf dem Chromosom 8q lokalisiert ist, korreliert auch mit der Monosomie 3 und dürfte mit der Progression der Tumore assoziiert werden.⁶⁷ Zudem ist die Monosomie 3 möglicherweise mit den inaktivierenden Mutationen des Tumorsuppressorgens verbunden, das das BRCA1-assoziierte Protein 1 (BAP1) kodiert.²⁶ In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Monosomie 3 stark mit einer niedrigen BAP1-Genexpression assoziiert wird.⁶⁸

1.8.2. Mutation des BAP1-Gens

BAP1 gehört zu den Deubiquitylierungsenzymen der Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase (UCH)-Familie und dient als ein Tumorsuppressor. BAP1 ist die erste im Zellkern identifizierte UCH und ein viel größeres Protein (90 kDa) als die anderen Proteine der UCH-Familie (25 – 30 kDa). Die Halbwertszeit dieses Proteins ist kurz, da es außerhalb der aminoterminalen katalytischen UCH-Domäne eine kurze, stark saure Region und eine carboxyterminale Verlängerung enthält, die reich an Prolin, Serin und Threonin ist.^{69,70}

Die Deubiquitylierungsenzyme spielen eine Rolle bei der Krebsentstehung durch die Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen, einschließlich DNA-Reparatur, Gentranskription, Zellmembranhandel, Fortschreiten des Zellzyklus, Stressreaktion, Zellkommunikation, Differenzierung und Apoptose. Insgesamt zeigen die Daten, dass BAP1 mehrere Zellwege beeinflussen kann, wobei manchmal das Zellwachstum unterdrückt und manchmal gefördert wird. Die BAP1-Aktivität kann in verschiedenen Zellen variieren, weil der BAP1-Kernkomplex wahrscheinlich mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren in Beziehung steht und daher zelltypspezifisch verschiedene Wege beeinflussen kann.^{69,70}

Das BAP1-Gen befindet sich auf dem Chromosom 3p21.1. Diese Genomregion zeigt eine Deletion bei mehreren malignen Erkrankungen des Menschen.^{69,71} Es gibt 47% der Aderhautmelanome, die eine inaktivierende somatische Mutation von BAP1 besitzen und die Mehrheit dieser mutierenden Tumore (85–96%) neigt später zur Metastasierung. Koopmans et al. haben erforscht, dass diese somatische Mutation stark relevant für die BAP1 Expression ist. Bei Tumorpatienten mit einer negativen oder mutierten BAP1 Expression wurde ein achtfacher Anstieg des Metastasierungsrisikos beobachtet.⁷² Der BAP1-Spiegel könnte deshalb das Überleben beeinflussen.^{69,73,74}

Die BAP1-Mutationen kommen häufig in den metastasierenden Aderhautmelanomen (84%) vor. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass sowohl die Kernlokalisierung als auch die Deubiquitylierungsaktivität für die BAP1-vermittelte Tumorsuppressoraktivität relevant sind. Die Kernlokalisierung von

BAP1 wird in den Tumoren mit den Keimzell-Mutationen von BAP1 beeinträchtigt, entweder wegen der Inaktivierung beider Allelen oder des fehlenden Kernlokalisierungssignals des BAP1-Proteins.⁶⁹

1.9. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Trotz der erfolgreichen Behandlung und Kontrolle des primären uvealen Melanoms entwickelt etwa die Hälfte der Patienten tödliche Metastasen. Der wesentlichste zytogenetische Risikofaktor für Metastasen ist die Monosomie 3, die zu einem besonders aggressiven Krankheitsverlauf führt und die Überlebensrate verkürzt.⁶³ Daher ist die Erforschung der passenden Therapie nach dem Chromosom 3 Status wegweisend, damit die Überlebenszeit möglichst verlängert wird. Außerdem ist eine erhöhte Metastasierungsrate bei mutiertem BAP1-Gen bewiesen. BAP1 reguliert verschiedene zelluläre Prozesse einschließlich der DNA-Schadenskontrolle.^{69,70}

Die häufigste Behandlungsform ist die Strahlentherapie. Jedoch gibt es bisher keine Studien, die das Ausmaß der DNA-Brüche nach der Bestrahlung mit Bezug auf den Monosomie 3 Status untersucht haben. Die histologischen Folgen von Monosomie 3 nach der Bestrahlung sind daher noch nicht bekannt.

Die Zielsetzung der Arbeit besteht darin, zu eruieren, ob sich der Einfluss der Bestrahlung auf die DNA-Schädigung hinsichtlich des Chromosom 3 Status der primären uvealen Melanome unterscheidet. Dazu wurden die Stärke des DNA-Schadens und die Kopienzahl des Chromosoms 3 in Paraffinschnitten von

primären uvealen Melanomen untersucht. Die Tumorproben in unserer Studie stammten von den Patienten, die an der Universitätsaugenklinik Lübeck oder Tübingen operiert wurden. Ein Teil der Patienten hat vor der Operation eine Strahlentherapie erhalten. Die bestrahlten Patienten aus Lübeck wurden mit einer fraktionierten, wiederholten, gering dosierten Bestrahlung behandelt, während die bestrahlten Patienten aus Tübingen eine einzeitige, hochdosierte Bestrahlung erhielten. Die Stärke der DNA-Schädigung in den Tumoren wurde durch den „Terminal desoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling“ (TUNEL)-Assay nachgewiesen, während die Kopienzahl des Chromosoms 3 mit der Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung (FISH) detektiert wurde. Anhand dieser Methoden wurde die Korrelation zwischen dem Chromosom 3 Status und der DNA-Schädigung mit oder ohne Strahlentherapie untersucht. Zudem wurde der Zusammenhang des DNA-Schadens mit dem BAP1-Status und anderen Prognoseparametern mit oder ohne Strahlentherapie bewertet.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1. Probenmaterial und Patientenkollektiv

Für diese Arbeit standen insgesamt 55 Paraffinschnitte von primären uvealen Melanomen zur Verfügung, die histopathologisch und immunologisch untersucht wurden. Es handelte sich um die Präparate von Augen, die an der Universitätsaugenklinik Tübingen (n=29 Augen) und der Universitätsaugenklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (n=26 Augen), operiert wurden. Unter den Fällen in Tübingen wurden n=7 (24,1%) Tumore erst mit einer einzeitigen, hoch-dosierten Bestrahlung behandelt und n=22 (75,9%) Tumore ohne Bestrahlung enukleiert. Unter den Lübeck-Fällen wurden n=16 (61,5%) Tumore bestrahlt und n=10 (38,5%) nicht bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mittels fraktionierter, niedrig dosierter stereotaktischer Radiotherapie bei n=14 (87,5%) der 16 Patienten in der Lübecker Kohorte. Es gab insgesamt 27 Frauen und 28 Männer im Kollektiv. Der Altersmedian lag bei 66 Jahren (Spannweite: 31–90). Die Untersuchung von menschlichen Gewebeproben wurde von den örtlichen Ethikkommissionen des Universitätsklinikums Tübingen (Aktenzeichen: 90/2003V, Datum: 09.04.2003) und der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen: 10-200, Datum: 17.12.2010) genehmigt.

In Tabelle 2.1 sind alle weiteren klinischen Daten der untersuchten Tumore erfasst und Tabelle 2.2 enthält alle klinischen Daten, die nur von Fällen aus Lübeck vorhanden waren. In Tabelle 2.3 sind die Daten nur für Fälle aus Tübingen eingeschrieben.

Tabelle 2.1. Klinische und histopathologische Daten der Patienten

Variabel	Insgesamt n=55 (100%)	nicht bestrahlt n=32 (58,2%)	bestrahlt n=23 (41,8%)	p-Wert
Alter (Jahre)				
Median	66,0	69,5	65,0	0,891*
Spannweite	31-90	31-90	51-83	
Geschlecht (n (%))				
Weiblich	27 (49,1%)	19 (59,4%)	8 (34,8%)	0,072
Männlich	28 (50,9%)	13 (40,6%)	15 (65,2%)	
Histologischer Subtyp (n (%))				
Spindelzellig	16 (29,1%)	10 (31,3%)	6 (26,1%)	0,551
Gemischtzellig	29 (52,7%)	15 (46,9%)	14 (60,9%)	
Epitheloid	10 (18,2%)	7 (21,9%)	3 (13,0%)	
Chromosom 3 Status (n (%))^{††}	^{††}	^{††}		
Disomie 3	26 (49,1%)	14 (46,7%)	12 (52,2%)	0,691
Monosomie 3	27 (50,9%)	16 (53,3%)	11 (47,8%)	
BAP1 im Zytoplasma (n (%))^{†††}	^{†††}	^{††}	[†]	
positiv	35 (67,3%)	21 (70,0%)	14 (63,6%)	0,629
negativ	17 (32,7%)	9 (30,0%)	8 (36,4%)	
BAP1 im Zellkern (n (%))^{†††}	^{†††}	^{††}	[†]	
positiv	21 (40,4%)	11 (36,7%)	10 (45,5%)	0,523
negativ	31 (59,6%)	19 (63,3%)	12 (54,5%)	
Ziliarkörperinvasion (n (%))				
nein	37 (67,3%)	16 (50,0%)	21 (91,3%)	0,001
ja	18 (32,7%)	16 (50,0%)	2 (8,7%)	
Optikusinvasion (n (%))				
nein	51 (92,7%)	31 (96,9%)	20 (87,0%)	0,162
ja	4 (7,3%)	1 (3,1%)	3 (13,0%)	
Metastasen (n (%))				
nein	24 (43,6%)	12 (37,5%)	12 (52,2%)	0,279
ja	31 (56,4%)	20 (62,5%)	11 (47,8%)	

n: Anzahl; p-Wert nach Pearson's Chi-Square-Test; *p-Wert nach Mann-Whitney-U Test.

[†]Daten fehlen bei einem Patienten; ^{††}Daten fehlen bei zwei Patienten; ^{†††}Daten fehlen bei drei Patienten.

Tabelle 2.2. Klinische Daten der untersuchten Tumore aus Lübeck

Variabel	Insgesamt n=26 (100%)	Nicht bestrahlt n=10 (38,5%)	Bestrahlt n=16 (61,5%)	p-Wert
Basis 1 (mm)				
Median	13,11	12,28	13,34	0,399
Spannweite	1,40-18,55	1,40-18,55	5,00-18,31	
Basis 2 (mm)				
Median	12,64	16,43	12,24	0,292
Spannweite	1,40-21,75	1,40-21,75	6-15,70	
Prominenz (mm)				
Median	7,50	10,49	6,52	0,102
Spannweite	0,50-12,89	0,90-12,89	0,50-8,72	

mm: Millimeter; n: Anzahl; p-Wert nach Mann-Whitney-U Test.

Tabelle 2.3. Klinische Daten der untersuchten Tumore aus Tübingen

Variabel	Insgesamt n=29 (100%)	Nicht bestrahlt n=22 (75,9%)	Bestrahlt n=7 (24,1%)	p-Wert
GTD (mm)[†]	†		†	
Median	15,0	15,5	13,5	0,339
Spannweite	7,0-28,0	7,0-28,0	8,0-23,0	
Höhe (mm)^{†††}	†††	††	†	
Median	8,0	8,0	7,0	0,224
Spannweite	2,0-22,0	2,0-22,0	3,0-9,0	
Invasion (n (%)) der Bruchmembran				
nein	14 (48,3%)	8 (36,4%)	6 (85,7%)	0,023
ja	15 (51,7%)	14 (63,6%)	1 (14,3%)	
der Sklera				
nein	2 (6,9%)	1 (4,5%)	1 (14,3%)	0,376
ja	27 (93,1%)	21 (95,5%)	6 (85,7%)	
Extrabulbäre Extension (n (%))				
nein	26 (89,7%)	20 (69,0%)	6 (85,7%)	0,694
ja	3 (10,3%)	2 (6,9%)	1 (14,3%)	

GTD: Größter Tumordurchmesser; mm: Millimeter; n: Anzahl.
p-Wert nach Pearson's Chi-Square-Test für die kategorischen und
nach Mann-Whitney-U Test für die numerischen Parameter.

†Daten fehlen bei einem Patienten; ††Daten fehlen bei drei Patienten; †††Daten fehlen bei vier Patienten.

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.1.1.1. Chemikalien

- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Merck, Darmstadt, Deutschland
- ApopTag® Peroxidase In Situ ApoptosisDetection Kit (Katalog-Nummer: S7100; bestehend aus dem Anti Digoxigenin conjugate, Equilibration Buffer, Reaction Buffer, Stop/Wash Buffer und Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) Enzyme)
Millipore, Burlington, MA, USA
- Aqua tridest
Eigenherstellung, Labor der Klinik für Augenheilkunde, UKSH Lübeck
- Bovines Serumalbumin (BSA) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Entellan Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Horseradish Peroxidase (HRP) Green Chromogen
42 Is, Bremerhaven, Deutschland
- HRP Green Buffer 42 Is, Bremerhaven, Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) Fluka Chemie Buchs, St. Gallen, Schweiz

- Kernechtrot Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mowiol Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid (NaOH) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Nonidet-P40 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- N-Butanol Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Paraformaldehyd Merck, Darmstadt, Deutschland
- Polysorbat-20 Merck, Darmstadt, Deutschland
- Proteinase K Merck, Darmstadt, Deutschland
- Salzlösung-Natriumcitrat (SSC), 20X Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tris-HCl Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton X-100 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Vysis CEP 3 (D3Z1) SpectrumOrange Chromosom3 Sonde
(Katalognummer: 06J36-003) Abbott, Wiesbaden, Deutschland
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Xylol Mullinkordt Barker, Holland

2.1.1.2. Primäre Antikörper

- Kaninchen anti-BAP1, polyklonal (Katalognummer: ab199396)
Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
- Kaninchen anti-Melan-A, monoklonal (Katalognummer: ab210546)
Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

- Maus anti-HMB45, monoklonal (Katalognummer: ab787)

Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

2.1.1.3. Sekundäre Antikörper

- Ziege Anti-Kaninchen IgG, Alexa 488-konjugiert (Katalognummer: ab150077)

Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

- Ziege Anti-Kaninchen IgG, Cy5-konjugiert (Katalognummer:111-175-144)

Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

- Ziege Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert (Katalognummer: 111-035-003)

Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich

- Ziege Anti-Maus IgG, Alexa 488-konjugiert (Katalognummer: A-11001)

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.1.4. Rezepte für angesetzte Lösungen:

1X phosphate buffered saline (PBS):	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,20 g KH ₂ PO ₄
	8,00 g NaCl
	0,20 g KCl
	1000 ml Aqua tridest

HRP Green Solution Set:	60 µl HRP Green Chromogen
-------------------------	---------------------------

	1 ml HRP Green Buffer
--	-----------------------

Working Strength TdT enzyme:

2 Objektträger: 77 µl Reaction Buffer

33 µl TdT Enzyme

2.1.1.5. Verbrauchsartikel

Deckgläser 20x40 mm

Gerhard Menzel GmbH,

Braunschweig, Deutschland

Objektträger

Th. Geyer, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen

Greiner Bio-One GmbH,

Frickenhausen, Deutschland

Platik Coverslips

Millipore, Burlington, USA

Wischtücher

Kimberly Clark, Koblenz, Deutschland

2.1.1.6. Laborgeräte

Feinwaage (BP 121S)

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Inkubator

Werner Hassa GmbH, Lübeck,

Deutschland

Kühlschrank 4°C (Liebherr Comfort)

Liebherr International GmbH, Bierbach,

Deutschland

Kühlschrank -20°C (Liebherr No Frost)

Liebherr International GmbH, Bierbach,

Deutschland

Laborwaage (Sartorius portable)

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Mikroskopkamera (DFC295)

Leica, Wetzlar, Deutschland

Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wirbelmischer	Scientific Industries, Inc, New York, USA

2.1.1.7. Elektronische Datenverarbeitung

Bildauswertung (Fiji)	National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA
Mikroskopische Bildaufnahme	Leica, Wetzlar, Deutschland
Statistik	NCSS 2020, Kaysville, Utah, USA

2.2. Allgemeine Methoden

2.2.1. Verschlüsselung der Patientendaten

Alle in dieser Studie verwendeten Gewebeproben wurden beim Eingang ins Labor mit einer fortlaufenden Nummer verschlüsselt. Die Untersuchungsdaten wurden mit diesen Nummern verknüpft und anonym für die statistischen Analysen verwendet.

2.2.2. Beobachter

Der TUNEL-Assay auf den Paraffinschnitten der Tübinger Kohorte (n=29) wurde von Yingda Zhu durchgeführt. Die quantitative Auswertung der

Lichtmikroskopiebilder vom TUNEL-Assay wurde von Yingda Zhu (Tübinger Kohorte) und von Ayseguel Tura (Lübecker Kohorte) durchgeführt. Die Beobachterin Yingda Zhu erhielt im Vorfeld eine Schulung in der experimentellen Arbeit, zu den Grundlagen der Mikroskopiertechnik und des Bildauswertungsprogrammes Fiji.

Die Beobachterinnen waren hinsichtlich der klinischen und histologischen Daten der untersuchten Tumore verblindet. Erst nach dem Abschluss der quantitativen Auswertung wurden die Tumordaten an Yingda Zhu gegeben.

2.2.3. Entparaffinierung und Rehydratation der Gewebeschnitte

Die Paraffinschnitte wurden vor den weiteren Untersuchungen zuerst durch die absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden bis zu 11 Küvetten verwendet, die, wie in Tabelle 2.4 erfasst ist, gefüllt waren. Die Inkubationszeiten der Paraffinschnitte in diesen Küvetten unterschieden sich je nach der nachfolgenden Untersuchung und sind ebenfalls in Tabelle 2.4 aufgelistet. Nach der Entparaffinierung und Rehydratation wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS inkubiert.

Tabelle 2.4. Lösungen und Inkubationszeiten

für die Entparaffinierung und Rehydratation

Küvetten- Nummer	Füllung	Inkubationszeit (Minuten)	
		Paraffinschnitte für den TUNEL-Assay	Paraffinschnitte für Immunhistochemie
1	Xylol	5	5
2	Xylol	5	5
3	Xylol	5	5
4	Absolut Ethanol	5	5
5	Absolut Ethanol	5	5
6	95% Ethanol	3	entfällt
7	90% Ethanol	entfällt	5
8	80% Ethanol	entfällt	5
9	70% Ethanol	3	5
10	50% Ethanol	entfällt	5
11	Aqua tridest	entfällt	5

2.3. Untersuchung des DNA-Schadens mittels TUNEL-Assays

2.3.1. Durchführung des TUNEL-Assays

Der TUNEL-Assay wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, soweit nicht anders beschrieben. Die hier verwendeten Reagenzien wurden ebenfalls nach den Anweisungen der verschiedenen Hersteller vorbereitet und gelagert.

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden mit 60 µl Proteinase K bedeckt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Proteinase K wurde je 20 µg in PBS mithilfe eines Wirbelmischers verdünnt. Bei diesem Schritt werden die Proteine abgebaut und die Nukleinsäuren freigesetzt.

Danach wurden die Schnitte jeweils 2 Minuten in 2 Küvetten gewaschen, die mit Aqua tridest gefüllt wurden. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in 3% H₂O₂ in PBS gestillt, dann jeweils 5 Minuten in 2 Küvetten gewaschen, die mit PBS gefüllt wurden.

Die Schnitte wurden leicht abgeklopft und die Flüssigkeit um die Präparate herum mit Papiertüchern aspiriert, um die überschüssige Flüssigkeit darauf zu entfernen. Anschließend wurde jeder Schnitt mit 75 µl Equilibration Buffer für 10 Sekunden inkubiert.

Die Schnitte wurden danach erneut leicht abgeklopft und die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Tüchern aspiriert. Danach wurde jedes Präparat mit 75 µl Working Strength TdT Enzyme bedeckt, mit einem Plastikcoverslip versiegelt und in einem Inkubator bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Im Anschluss wurden die Schnitte in Küvetten eingetaucht, die mit Working Strength Stop/Wash Buffer gefüllt waren, und 15 Sekunden geschüttelt, dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte das Waschen der Schnitte in 3 Küvetten, die mit PBS gefüllt waren, für jeweils 1 Minute. Danach wurden die Schnitte erneut leicht abgeklopft und die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Tüchern aspiriert. Dann wurden 65 µl Anti-Digoxigenin Konjugat auf jedem Schnitt aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirken gelassen, damit die mittels Digoxigenin konjugierten DNAs mit den HRP-gekoppelten Anti-Digoxigenin Antikörpern gebunden werden konnten.

Danach wurden die Schnitte wieder in 4 Küvetten, die mit PBS gefüllt waren, jeweils 2 Minuten gewaschen. Gleichzeitig wurde das HRP Green Substrat vorbereitet. Dafür wurden 66 µl HRP Green Chromogen mit 1 ml HRP Green Buffer gemischt.

Nach dem Waschen wurde jeder Schnitt mit 75 µl HRP Green Substrat bedeckt und 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte wieder mit Aqua tridest abgespült und 1 Minute in Aqua tridest gewaschen.

Daran schloss sich eine 10-minütige Zellkernfärbung der Schnitte mit Kernechtrot an. Danach wurden die Farblösung abgekippt und die Schnitte wieder für 1 Minute in Aqua tridest gewaschen.

Die Schnitte wurden in 2 Küvetten, die beide mit 100% N-Butanol gefüllt waren, zehnmal eingetaucht, um die Färbung zu fixieren. In einer weiteren, mit 100% N-Butanol gefüllten Küvette wurden die Schnitte 30 Sekunden getaucht und danach nochmals für jeweils 2 Minuten in 3 Küvetten, die mit Xylol gefüllt waren, inkubiert. Am Ende wurden die Schnitte nochmals leicht abgeklopft und die überschüssige Flüssigkeit mit Tüchern leicht aspiriert. Danach wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt und luftblasenfrei mit einem Deckglas versiegelt.

Als Kontrolle wurden in jeder Färbung ein positives und ein negatives Kontrollpräparat mitgeführt. Für beide Kontrollen wurde ein bestrahltes uveales Melanom, das ein starkes TUNEL-Signal zeigte, wiederholt verwendet (Patientin 36/11b aus der Lübecker Kohorte). Mit den wiederholten positiven Kontrollen konnte die Intensität der TUNEL-Reaktion zwischen den unabhängigen

Experimenten verglichen werden. Die negativen Kontrollen wurden ohne das TdT-Enzym verarbeitet.

2.3.2. Computergestützte, quantitative Auswertung der TUNEL-Intensität an lichtmikroskopischen Bildern

Das Ziel der Auswertung war es, die Intensität der TUNEL-Reaktion und deren Unterschied bei den Präparaten möglichst objektiv und reproduzierbar zu beurteilen. Alle Paraffinschnitte wurden unter einem inversen Lichtmikroskop betrachtet und dokumentiert. Die Aufnahme der lichtmikroskopischen Bilder sowie die Bilddatenspeicherung erfolgten über das Programm Leica Application Suite, Version 4.13.0.

Alle Präparate wurden zunächst in 40-facher Vergrößerung angeschaut, um den Bereich des uvealen Melanoms festzustellen. Der gesamte Tumorbereich wurde unter 200-facher Vergrößerung fotografiert. Von den Tumoren aus der Tübinger Kohorte wurden insgesamt $n=4958$ Bilder aufgenommen, mit durchschnittlich $n=171$ Bildern pro Tumor. Diesen Teil der Untersuchung führte Yingda Zhu durch.

Für jeden Tumor wurden 3 fortlaufende Bilder aus einem Bereich evaluiert und ein Bild als repräsentativ für die TUNEL-Intensität ausgewählt. Die Anzahl der repräsentativen Bilder pro Tumor betrug durchschnittlich $n=57$.

Diese Bilder, insgesamt waren es 1653 für $n=29$ Tumore aus der Tübinger Kohorte, wurden wie folgt für die objektive Auswertung verarbeitet (durchgeführt

von Yingda Zhu). Zunächst wurde mit dem Bildauswertungsprogramm Fiji eine Farbdekonvolution durchgeführt, um die TUNEL-Signale (blau-grün), die Zellkernfärbung (rosa) und die Pigmentierung (braun) voneinander zu trennen. Für die Dekonvolution wurden die folgenden Einstellungen gewählt (R: Rot, G: Grün, B: Blau):

- R1: 0,482, G1: 0,719, B1: 0,501;
- R2: 0,776, G2: 0,501, B2: 0,382;
- R3: 0,446, G3: 0,616, B3: 0,649.

Durch diese Einstellung wurden die Farben getrennt und drei neue Bilder für die verschiedenen Strukturen erzeugt. Im blauen Bild konnte sich der Gutachter auf das TUNEL-Signal fokussieren, während die beiden anderen Bilder die rote Zellkernfärbung bzw. die braune Pigmentierung mit minimaler Überlappung zwischen diesen Strukturen zeigten (Abbildungen 2.1–2.5).

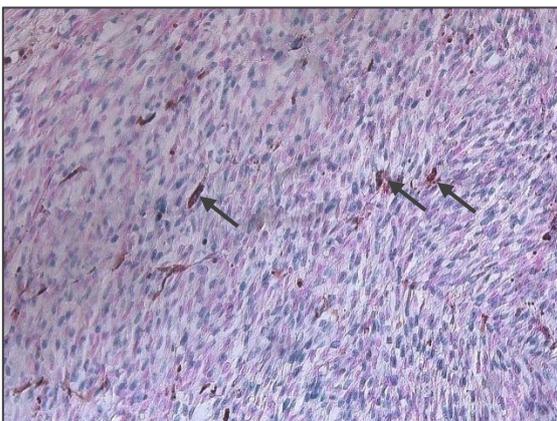


Abbildung 2.1. Aufnahme eines uvealen Melanoms in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild. Die TUNEL-Reaktion wurde mit einem blau-grünen Chromogen detektiert. Die Zellkerne wurden in rosa mit dem Kernechtrot-Farbstoff gefärbt. Pfeile deuten auf die braune Pigmentierung.

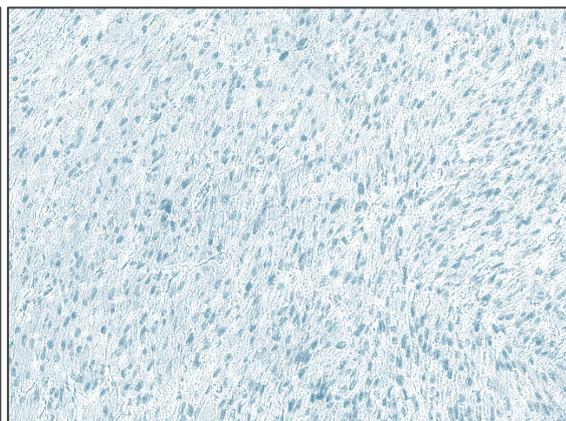


Abbildung 2.2. Aufnahme eines uvealen Melanoms in 200-facher Vergrößerung; Blaukanalbild. Auf diesem Bild sind die rosa- und braunen Farben gefiltert, um die blau-grüne TUNEL-Reaktion getrennt darzustellen.



Abbildung 2.3. Aufnahme eines uvealen Melanoms in 200-facher Vergrößerung; Umkehr des Blaukanalbilds. Auf diesem Bild leuchten die TUNEL-Signale in weiss gegen einen dunkleren Hintergrund. Dadurch würden die stark-positiven Bereiche eine höhere Lichtintensität (in Grauwert) zeigen.

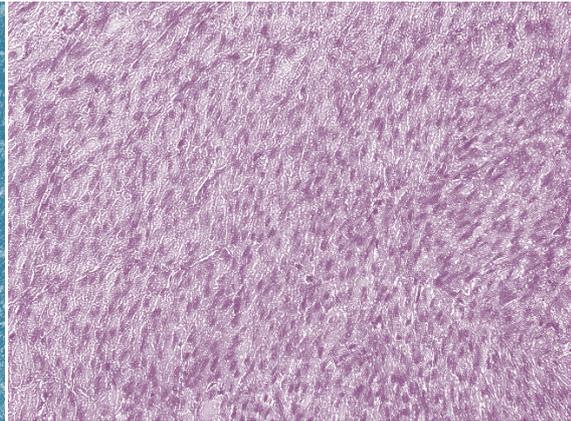


Abbildung 2.4. Aufnahme eines uvealen Melanoms in 200-facher Vergrößerung; Rosakanalbild. Auf diesem Bild sind die blau-grünen und braunen Farben gefiltert, um die Zellkerne getrennt darzustellen.



Abbildung 2.5. Aufnahme eines uvealen Melanoms in 200-facher Vergrößerung; Braunkanalbild. Auf diesem Bild sind die blau-grünen und rosa-Farben gefiltert, um die braune Pigmentierung (Pfeile) getrennt darzustellen.

Danach wurde die Farbe der blauen-Bilder umgekehrt eingestellt, um die TUNEL-Reaktion leuchtend gegen einen dunkleren Hintergrund darzustellen. Dadurch korrelierte die Stärke der TUNEL-Reaktion positiv mit dem gemessenen Grauwert der Lichtintensität (Abbildung 2.3). Die Flächen mit den Tumorzellen wurden markiert und die TUNEL-Intensität wurde auf dem invertierten

Blaukanalbild gemessen. Für jedes repräsentative Bild wurde das „*Integrated density*“ (Fläche*Intensität) gerechnet. Um den Mittelwert der TUNEL-Intensität in den einzelnen Tumoren zu ermitteln, wurde die Summe aus „Integrated density“ durch die Gesamtfläche des entsprechenden Tumors dividiert. Die durchschnittliche TUNEL-Intensität der negativen Kontrolle wurde als Hintergrund von allen Tumoren abgezogen. Die Beobachterin Yingda Zhu war hinsichtlich der Metastasierung und der weiteren klinischen und histologischen Daten verblindet.

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. Protokoll der BAP1-Immunhistochemie für Lichtmikroskopie

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden in den vorgewärmten 10 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH= 6,0) mit 0,025% Polysorbat-20 für 30 Minuten in einem Dampfkocher inkubiert, um die Zugänglichkeit zu den Antigenen zu gewährleisten. Dann wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt, dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und im steril-filtrierte Blockierungspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blockierungspuffer wurde aus 3% BSA in 10 mM Tris-HCl (pH=7,5), 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 5 mM EDTA und 0,1% Triton X-100 hergestellt.

Die Schnitte wurden dann mit den primären Kaninchen-Antikörpern gegen BAP1 (1:20 Verdünnung im Blockierungspuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert. Ein zusätzlicher Schnitt, der nur mit dem Blockierungspuffer inkubiert wurde, diente als

ein negatives Kontrollpräparat.

Nach dreimaligem Spülen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte in frisch hergestellter 3%iger Wasserstoffperoxidlösung in PBS für 15 Minuten inkubiert, danach zweimal mit PBS gespült und mit HRP-konjugierten Ziegen-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpern (1:500 Verdünnung in Blockierungspuffer) für 1 Stunde inkubiert. Die Schnitte wurden dann dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gespült, danach für 10 Minuten mit dem frisch hergestellten HRP Green Substrat inkubiert, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, und für 5 Minuten in Aqua tridest gewaschen. Die Zellkerne wurden mit Kernechtrot für 10 Minuten gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte kurz für 1 Minute in Aqua tridest gespült, für je 30 Sekunden in einer aufsteigenden Serie von Ethanol (75%–96% 2 × 100%), zweimal für je 5 Minuten in Xylol dehydriert und dann mit Entellan-beschichteten Deckgläsern versiegelt.

2.4.2. Semi-quantitative Auswertung der BAP1-Immunhistochemie

Das Ziel dieser Auswertung war es zu bestimmen, ob die Tumorgewebe eine niedrige oder hohe BAP1 Expression im Zytoplasma und im Zellkern besaßen. Die Bilder wurden unter 200-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop von Leica aufgenommen.

Die Expression für BAP1 im Zytoplasma oder im Zellkern wurde auf einer Skala von 0 bis 3 eingestuft, wobei galt: 0: positive Färbung in weniger als 10% der Zellen; 1: positive Färbung in 11%–33% der Zellen; 2: positive Färbung in 34%–66%

der Zellen; 3: positive Färbung in mehr als 67% der Zellen.

2.5. Nachweis von Chromosom 3 in immungefärbten Zellen mittels Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH)

2.5.1. Immuno-FISH Assay

Für den gleichzeitigen Nachweis von Chromosom 3 mit den Proteinen von Interesse wurde die Immunhistochemie, wie oben beschrieben, mit den folgenden Änderungen durchgeführt: Die Paraffinschnitte aus der Lübecker Kohorte wurden mit den primären Kaninchen-Antikörpern gegen Melan-A (1:100 Verdünnung im Blockierungspuffer) über Nacht bei 4 ° C inkubiert, gefolgt von den sekundären Alexa 488-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpern (1:100 im Blockierungspuffer verdünnt) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Aufgrund der begrenzten Anzahl der Paraffinschnitte aus der Tübinger Kohorte wurden sie mit der Mischung von primären Kaninchen-Antikörpern gegen BAP1 (1:20 Verdünnung im Blockierungspuffer) und Maus-Antikörpern gegen HMB45 (1:100 Verdünnung im Blockierungspuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von einer Mischung aus sekundären Alexa 488-konjugierten Anti-Maus-Antikörpern (1:100 Verdünnung im Blockierungspuffer) und Cy5-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpern (1:50 Verdünnung im Blockierungspuffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern und alle nachfolgenden Schritte wurden unter Lichtschutz in Dunkelheit durchgeführt.

Für die anschließende FISH-Analyse wurden die immungefärbten Schnitte dreimal jeweils für 5 Minuten in PBS gewaschen, danach 10 Minuten lang in Methanol und dann 1 Minute in 2% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Anschließend wurden sie wieder dreimal in PBS gewaschen und dreimal für 5 Minuten in 2xSSC inkubiert. Anschließend erfolgte die Dehydratation in 4 Küvetten, von denen je zwei mit 70% und 96% Ethanol gefüllt waren, jeweils für 5 Minuten. Die Schnitte wurden 4 Minuten luftgetrocknet, in eine mit 2xSSC gefüllte Küvette bei Raumtemperatur getaucht und in ein Wasserbad bei 70°C gestellt. Nach einer 45-minütigen Inkubation im Wasserbad wurden die Schnitte wie oben beschrieben dehydriert und luftgetrocknet. Nach einer 10-minütigen Denaturierung in 0,1 M NaOH wurden die Schnitte jeweils zweimal für 1 Minute und einmal für 5 Minuten in 2xSSC gewaschen. Danach wurden sie 2 Minuten auf einen Objektträgerwärmer bei 46°C gestellt. Die CEP3 Probe wurde, wie vom Hersteller beschrieben, verdünnt (1 µl CEP3 Probe, 2 µl Aqua tridest, 7 µl Verdünnungspuffer pro cm²), 5 Minuten bei 73°C denaturiert und bis zum Gebrauch auf dem Objektträgerwärmer bei 46°C gehalten. Nach dem Auftragen der CEP3 Sonde (10 µl/cm²) wurde jedes Präparat mit einem mit 70% Ethanol gewaschenen Deckglas bedeckt. Die Negativkontrolle, die ähnlich wie die Probe hergestellt wurde (3 µl Aqua tridest, 7 µl Verdünnungspuffer pro cm²), wurde nur mit dem verdünnten Puffer bedeckt. Die Schnitte wurden dann in einer vorgewärmten feuchten Kammer gelagert und für 3 Tage bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Deckgläser entfernt und die Zellen erst in 0,4xSSC / 0,3% Nonidet-P40, pH 7,0–7,5 bei 73 ± 1 ° C für 2 Minuten

gewaschen, gefolgt von der 2xSSC / 0,1%Nonidet-P40, pH 7,0 ± 0,2 für 1 Minute bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden für 10 Minuten mit 0,5 µg/ml DAPI in PBS gegengefärbt. Die Schnitte wurden dann in PBS gewaschen und zum Schluss mit Mowiol-beschichteten Deckgläsern gedeckt.

Die Schnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI6000B) analysiert. Die Bilder wurden unter 400-facher Vergrößerung mit einer monochromen Digitalkamera (DFC 350 FX; Leica) aufgenommen, die an das Mikroskop angeschlossen war. Die Bildaufnahme erfolgte durch die Leica Application Software (Advanced Fluorescence 2.3.0, Build 5131). Die folgenden Filtersätze wurden für die Beobachtung der unten genannten Strukturen verwendet:

- A4 Anregung: 360/40 nm, Emission: 470/40 nm (Zellkern)
- L5 Anregung 460/40 nm, Emission: 527/30 nm (HMB45 oder Melan-A)
- Y3 Anregung: 545/30 nm, Emission: 610/75 nm (Chromosom 3)
- Y5 Anregung: 620/60 nm, Emission: 700/75 nm (BAP1)

2.5.2. Bestimmung der Kopienzahl von Chromosom 3 in den uvealen Melanomzellen

Die Kopienzahl von Chromosom 3 wurde in den Überlagerungsbildern von Zellen bestimmt, die positiv für die Melanommarkerproteine HMB45 oder Melan-A waren. Falls es nur ein einzelnes Signal für die CEP-3-Sonde im Kern gab, bedeutete es, dass die Zellen Monosomie 3 aufwiesen. Ein Signalpaar, das nahe beieinander lag (durch einen Abstand von weniger als dem doppelten Durchmesser eines Signals

getrennt), wurde als Dublett definiert. Zellen mit Dublettsignalen für das Chromosom 3 wurden ebenfalls als Monosomie 3 Zellen angesehen, da ein Dublettsignal die replizierten und getrennten Schwesterchromatiden darstellte.⁷⁵ Zellen mit zwei unterschiedlichen Singular- oder Dublettsignalen für das Chromosom 3 im Kern wurden als Disomie 3 klassifiziert. Der Kern wurde vollständig entlang der z-Achse gescannt, um sicherzustellen, dass alle positiven Signale für Chromosom 3 erfasst wurden, die auf verschiedenen Ebenen liegen könnten.

Für die Bestimmung des Chromosom 3 Status wurden, wie beschrieben zwei Parameter bestimmt: der Prozentsatz der Zellen mit Monosomie 3 innerhalb eines Gebiets sowie der Chromosomenindex.⁷⁶ Für das erste Verfahren wurde der Prozentsatz von Zellen mit Monosomie 3 innerhalb eines Bereichs nur in den nicht überlappenden Zellkernen berechnet (n=mindestens 203 Zellkerne), außer bei einem sehr kleinen Tumor (n=88 quantifizierte Kerne). Für die Bestimmung des Chromosomenindex wurden zunächst die Gesamtsignale für Chromosom 3 sowie alle Zellkerne in einem bestimmten Bereich gezählt. Danach wurde die Anzahl der Chromosom 3 Signale durch die Gesamtzahl der Zellkerne dividiert. Beide Parameter wurden nach dem Medianwert sortiert und wie folgt bewertet:

- Prozentsatz der Zellen mit Monosomie 3:
 - 0: <Median
 - 1: ≥Median

- Chromosomenindex:

0: >Median

1: ≤Median

Die für beide Parameter mit ‚1‘ bewerteten Tumore wurden als ‚Monosomie 3‘ bezeichnet, während die Proben, die mit beiden Methoden die Bewertung ‚0‘ erhielten, als ‚Disomie 3‘ klassifiziert wurden. Tumoren, die mit nur einer Methode die Bewertung ‚1‘ erhielten, wurden zunächst als „gemischt“ definiert. Für eine gleichmäßigere Verteilung der begrenzten Probengröße wurden die gemischten Tumore weiter wie folgt geordnet:

- Monosomie 3: gemischte Tumore mit einem Prozentzahl >40% oder einem Chromosomenindex <0.9
- Disomie 3: gemischte Tumore mit einem Prozentzahl <40% und einem Chromosomenindex >0.9

Die Sortierung der Tumore aus der Tübinger und Lübecker Kohorte nach dem Medianwert erfolgte separat für jede Kohorte aufgrund der Unterschiede in der Aufbewahrungszeit dieser Gewebeproben, die die Qualität der FISH-Signale beeinflussen könnten.^{77,78}

2.6. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik Software NCSS (Version 2020, Kaysville, Utah, USA). Als deskriptive Statistik wurden der Median, der Mittelwert, die Spannweite und die Standardabweichung (SA) ermittelt. Die Proportionen von

zwei kategorischen Variablen wurde mittels Pearson's Chi-Square Tests untersucht. Die Korrelation von binären kategorischen Faktoren mit kontinuierlichen (numerischen) Werten wurde mit dem Mann-Whitney-U Test evaluiert, während die kategorischen Variablen mit drei Werten anhand des Kruskal-Wallis Tests analysiert wurden. Die P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant angesehen.

Kapitel 3.

Ergebnisse

3.1. Auswertung der Kopienzahl von Chromosom 3 und der Intensität von BAP1

3.1.1. Auswertung der Kopienzahl von Chromosom 3

Alle untersuchten Tumore mit Ausnahme von zwei aus der Augenklinik Tübingen, die während der Denaturierung für die FISH-Analyse abgeschwommen waren, besaßen Zellen mit einem Singularsignal der CEP3-Sonde. Der Prozentanteil der Zellen mit einem Singularsignal in den Tumoren aus der Augenklinik Tübingen hatte einen Mittelwert von 21,46% (SA: 9,94%). Die Spannweite lag bei 7,30–44,51%. Je größer der Prozentanteil war, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor Monosomie 3 besitzt. Darüber hinaus wurde ein Chromosom-Index mit einem Mittelwert von 1,30 (SA: 0,26) untersucht. Die Spannweite lag bei 0,59-1,84. Der Index wurde aus dem Verhältnis der Anzahl der Chromosom 3 Signale zur Anzahl der Zellkerne berechnet. Je kleiner der Index, desto wahrscheinlicher war es, dass der Tumor Monosomie 3 besitzt.

Mit den beiden Parametern konnte zusammengefasst werden, dass es in der Tübinger Kohorte n=14 Tumore gab, die der Gruppe ‚Monosomie 3‘ zugeschrieben wurden. Die restlichen 13 Tumore wurden in die Gruppe ‚Disomie 3‘ eingeordnet.

Bei den Tumoren aus der Augenklinik UKSH Lübeck gab es jeweils 13, die in

die Gruppen ‚Monosomie 3‘ bzw. ‚Disomie 3‘ eingeteilt wurden. Monosomie 3 zeigte eine positive signifikante Korrelation mit der Entwicklung von Metastasen in der gesamten Kohorte ($p < 0.001$; Pearson Chi-Square Test; Tabelle 3.1). Keine signifikante Assoziation wurde zwischen dem Chromosom 3 Status und den weiteren untersuchten prognostischen Faktoren detektiert (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1. Chromosom 3-Status der primären Tumore mit Bezug auf die klinischen und histologischen Faktoren

Faktoren	Alle Tumore n=53 (100%)	Disomie 3 n=26 (49,1%)	Monosomie 3 n=27 (50,9%)	p-Wert
Geschlecht (n, (%))				
weiblich	26 (49,1%)	12 (46,2%)	14 (51,9%)	0,678
männlich	27 (50,9%)	14 (53,8%)	13 (48,1%)	
Alter (Jahre)				
Median (Min-Max)	66,0 (37,0-90,0)	64,5 (38,0-85,0)	69,0 (37,0-90,0)	0,637
GTD* (mm)				
Median (Min-Max)	15,5 (7,0-28,0)	15,0 (7,0-28,0)	17,0 (9,0-23,0)	0,425
Höhe* (mm)				
Median (Min-Max)	7,5 (2,0-22,0)	8,0 (3,0-12,0)	7,0 (2,0-22,0)	0,748
Basis1** (mm)				
Median (Min-Max)	13,1 (1,4-18,6)	12,5 (5,0-18,6)	13,4 (1,4-17,5)	0,817
Basis2** (mm)				
Median (Min-Max)	12,6 (1,4-21,8)	12,8 (6,0-21,8)	11,8 (1,4-19,0)	0,700
Prominenz** (mm)				
Median (Min-Max)	7,5 (0,5-12,9)	7,9 (0,5-12,9)	6,6 (0,9-12,8)	0,817
Ziliarkörperbeteiligung (n, (%))				
nein	36 (67,9%)	19 (73,1%)	17 (63,0%)	0,430
ja	17 (32,1%)	7 (26,9%)	10 (37,0%)	
Invasion				
der Sklera* (n, (%))				
nein	2 (7,4%)	1 (7,7%)	1 (7,1%)	0,957
ja	25 (92,6%)	12 (92,3%)	13 (92,9%)	
der Bruchmembran* (n, (%))				
nein	13 (48,1%)	5 (38,5%)	8 (57,1%)	0,332
ja	14 (51,9%)	8 (61,5%)	6 (42,9%)	

des Sehnervens (n, (%))				
nein	49 (92,5%)	25 (96,2%)	24 (88,9%)	0,317
ja	4 (7,5%)	1 (3,8%)	3 (11,1%)	
Extrabulbäre Extension* (n, (%))				
nein	24 (88,9%)	11 (84,6%)	13 (92,9%)	0,496
ja	3 (11,1%)	2 (15,4%)	1 (7,1%)	
Bestrahlung (n, (%))				
nein	30 (56,6%)	14 (53,8%)	16 (59,3%)	0,691
ja	23 (43,4%)	12 (46,2%)	11 (40,7%)	
Zeitraum zwischen der letzten Bestrahlung und Tumorentnahme (Monate)**, †††				
Median (Min-Max)	2 (1-23)	2 (1-23)	2 (1-8)	0,662
Histologischer Subtyp (n, (%))				
Spindel	10 (18,9%)	6 (23,1%)	4 (14,8%)	0,612
Gemischt	28 (52,8%)	14 (53,8%)	14 (51,9%)	
Epitheloid	15 (28,3%)	6 (23,1%)	9 (33,3%)	
BAP1 im Zytoplasma (n, (%))†	†	†		
ja	35 (67,3%)	20 (80,0%)	15 (55,6%)	0,061
nein	17 (32,7%)	5 (20,0%)	12 (44,4%)	
BAP1 im Zellkern (n, (%))†	†	†		
ja	21 (40,4%)	13 (52,0%)	8 (29,6%)	0,101
nein	31 (59,6%)	12 (48,0%)	19 (70,4%)	
ZMZ** (n, (%))				
nein	2 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	>0,999
ja	24 (92,3%)	12 (92,3%)	12 (92,3%)	
Monosomie 3 in ZMZ** (n, (%))††	††	†	†	
nein	8 (33,3%)	6 (50,0%)	2 (16,7%)	0,083
ja	16 (66,7%)	6 (50,0%)	10 (83,3%)	
Metastasen (n, (%))				
nein	24 (45,3%)	19 (73,1%)	5 (18,5%)	<0,001
ja	29 (54,7%)	7 (26,9%)	22 (81,5%)	

p-Wert nach Pearson's Chi-Square Test für die kategorischen und nach Mann-Whitney-U Test für die numerischen Parameter.

ZMZ: zirkulierende Melanomzellen; GTD: größter Tumordurchmesser;

Max: Maximum; Min: Minimum; n: Anzahl.

†Daten fehlen bei einem Patienten. ††Daten fehlen bei zwei Patienten. †††Daten fehlen bei drei Patienten.

*Die Analysen beinhalteten nur die Daten von Patienten aus Tübingen.

**Die Analysen beinhalteten nur die Daten von Patienten aus Lübeck.

3.1.2. Auswertung der Intensität von BAP1

Alle untersuchten Tumore mit Ausnahme von zwei, bei denen die Präparate in der Färbung abgeschwommen waren, exprimierten BAP1 im Zytoplasma und im Zellkern. Der Mittelwert der subjektiv eingeschätzten zytoplasmatischen Expression bei den Tumoren aus Tübingen lag bei 2,27 (subjektive Skala von 0–3; SA: 0,74; Spannweite: 0–3). Der Mittelwert der Expression im Zellkern lag bei 1,87 (SA: 0,68; Spannweite: 0–3). Die Information über den subjektiven Expressionswert der Lübecker Kohorte war nicht erhältlich und die Tumore wurden bereits nach der unten beschriebenen Methode in die BAP1-positiven oder BAP1-negativen Gruppen eingeteilt.

Die Tumore mit einem subjektiven Wert, der größer als der Median war, wurden als BAP1-zytoplasmatisch-positiv oder BAP1-Zellkern-positiv eingeteilt, die eine intensivere Expression zeigten. Die restlichen Tumore wurden den BAP1-negativen Gruppen zugeordnet. Es gab insgesamt 35 Tumore in der Gruppe BAP1-zytoplasmatisch-positiv, 17 Tumore in der Gruppe BAP1-zytoplasmatisch-negativ, 21 Tumore in der Gruppe BAP1-Zellkern-positiv und 31 Tumore in der Gruppe BAP1-Zellkern-negativ. Trotz der stärkeren BAP1 Expression in dem Zytoplasma der Disomie 3 Tumore und des Fehlens von BAP1 im Zellkern der Monosomie 3 Tumore konnten diese Tendenzen das Signifikanzniveau nicht erreichen ($p=0,061$ für zytoplasmatisches BAP1; $p=0,101$ für BAP1 im Zellkern; Pearson's Chi-Square Test; Tabelle 3.1).

3.2. Vergleich des DNA-Schadens der bestrahlten und nicht bestrahlten Tumore

Die objektive Intensität der Zellkernfärbung mit dem TUNEL-Assay wurde als Indikator des DNA-Schadens der Tumore betrachtet. Die Intensität der negativen Kontrolle wurde von den TUNEL-Werten abgezogen, damit die Differenz zwischen jeder Färbung abgeglichen werden konnte.

Bei den untersuchten Tumoren (n=55) lag der Mittelwert der TUNEL-Intensität bei 18,31 (SA: 13,72; Spannweite: 0,00–52,16). Der Mittelwert der bestrahlten Tumore lag bei 19,69 (SA: 13,17; Spannweite: 0,00–44,27; n=23) und der nicht bestrahlten Tumore lag bei 17,32 (SA: 14,22; Spannweite: 0,00–52,16; n=32). Die nicht bestrahlten uvealen Melanome nahmen weniger Schaden. Der Unterschied war auf die ganze Kohorte betrachtet nicht signifikant (p-Wert: 0,437; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.1; Tabelle 3.2). Separat betrachtet zeigte sich jedoch, dass der Unterschied bei Tumoren der Lübecker Kohorte statistisch signifikant war (p-Wert: 0,011) während er bei Tumoren der Tübinger Kohorte nicht signifikant war (p-Wert: 0,114; Abbildung 3.1).

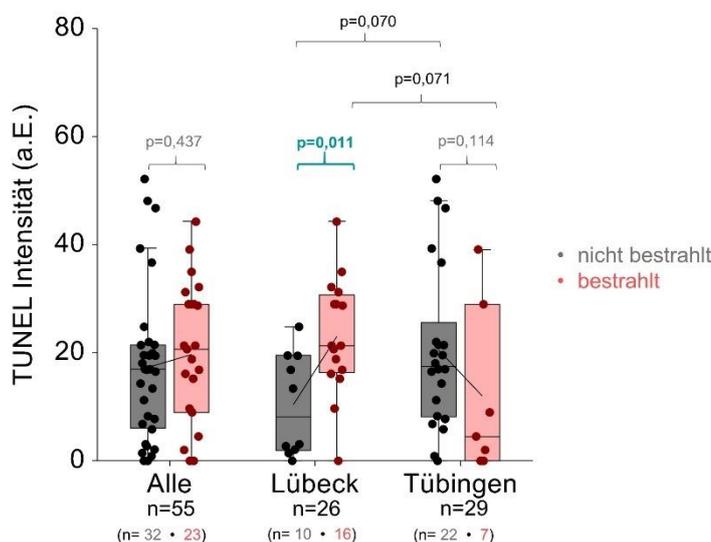


Abbildung 3.1. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den bestrahlten und nicht bestrahlten Tumoren. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten, n: Anzahl der Tumore.

3.3. DNA-Schaden bei unterschiedlichem Chromosom 3- und BAP1 Status

3.3.1. Vergleich des DNA-Schadens bei Monosomie 3 und Disomie 3

Für die untersuchten Tumore mit Monosomie 3 lag der Mittelwert der TUNEL-Intensität bei 13,19 (SA: 12,20; Spannweite: 0,00-52,16; n=27). Davon lag der Mittelwert bei Tumoren aus Lübeck bei 11,25 (SA: 8,35; Spannweite: 0,00-21,33; n=13) und aus Tübingen bei 14,98 (SA: 15,03; Spannweite: 0,00-52,16; n=14). Der Mittelwert von Tumoren mit Disomie lag bei 24,09 (SA: 13,56; Spannweite: 0,00-48,10; n=26). Davon lag der Mittelwert bei Tumoren aus Lübeck bei 25,10 (SA: 10,97; Spannweite: 0,00-44,27; n=13) und aus Tübingen bei 23,09 (SA: 16,15; Spannweite: 0,00-48,10; n=13; Abbildung 3.2).

Über die gesamte Kohorte hinweg zeigte sich ein geringerer DNA-Schaden bei Tumoren mit Monosomie 3, wobei der Unterschied statistisch signifikant war (p-Wert: 0,003; Mann-Whitney-U Test, Abbildung 3.2 und Tabelle 3.2). Dies galt auch für die Lübecker Kohorte für sich betrachtet, wo der Unterschied ebenfalls statistisch signifikant war (p-Wert: 0,004); im Gegensatz dazu war er bei der Tübinger Kohorte nicht statistisch signifikant (p-Wert: 0,159). Bei Tumoren mit Disomie 3 war der Unterschied der DNA-Schädigung zwischen der Lübecker und Tübinger Kohorte nicht signifikant (p-Wert: 0,644). Ebenso zeigten die Tumore mit Monosomie 3 keinen signifikanten Unterschied zwischen der Lübecker und Tübinger Kohorte (p-Wert: 0,734; Abbildung 3.2).

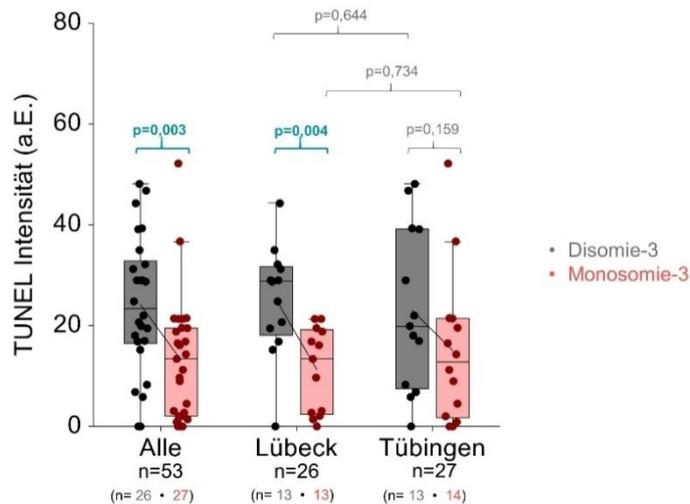


Abbildung 3.2. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den Tumoren mit Disomie 3 und Monosomie 3. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten. Daten fehlen bei zwei Patienten aus der Tübinger Kohorte.

3.3.1.1. Vergleich des DNA-Schadens bei Monosomie 3 und Disomie 3 in bestrahlten Tumoren

Bei den bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3 lag der Mittelwert der TUNEL-Intensität bei 9,34 (SA: 8,73; Spannweite: 0,00-21,33; n=11). Davon lag der Mittelwert bei Tumoren aus Lübeck bei 14,54 (Spannweite:0,00-21,33; n=6) und aus Tübingen bei 3,10 (Spannweite: 0,00-8,97; n=5). Der Mittelwert von Tumoren mit Disomie lag bei 29,18 (SA: 8,49; Spannweite: 15,20-44,27; n=12, Abbildung 3.3). Davon ergab sich der Mittelwert bei Tumoren aus Lübeck von 28,20 (Spannweite: 15,20-44,27; n=10), aus Tübingen von 34,04 (Spannweite: 28,98-39,11; n=2).

Für die bestrahlten Tumore mit Monosomie 3 war ein geringerer DNA-Schaden zu verzeichnen. Dieser Unterschied war sowohl bei der gesamten Kohorte (p-Wert<0,001; Mann-Whitney-UTest; Abbildung 3.3; Tabelle 3.2) als auch bei der

Lübecker Kohorte (p-Wert=0,023) statistisch signifikant während die Signifikanz bei der Tübinger Kohorte nicht erreicht wurde (p-Wert=0,051). Bei den bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3 war ein statistisch signifikant geringerer DNA-Schaden bei Tumoren der Tübinger Kohorte (Mittelwert \pm SA: 3,10 \pm 3,77; n=5) als bei Tumoren der Lübecker Kohorte (Mittelwert \pm SA: 14,54 \pm 8,34; n=6) zu verzeichnen (p-Wert=0,043; Abbildung 3.3).

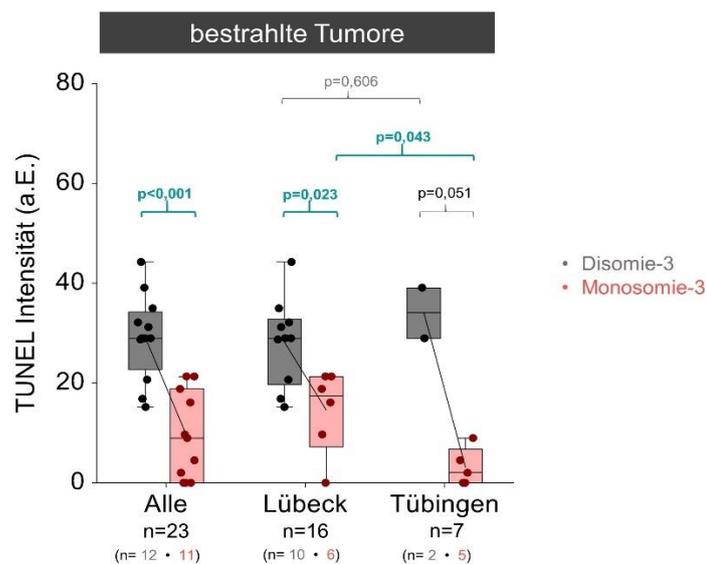


Abbildung 3.3. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den bestrahlten Tumoren mit Disomie 3 und Monosomie 3. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten.

3.3.1.2. Vergleich des DNA-Schadens bei Monosomie 3 und Disomie 3 in nicht bestrahlten Tumoren

Bei den nicht bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3 lag der Mittelwert der TUNEL-Intensität bei 15,83 (SA: 13,74; Spannweite: 0,88-52,16; n=16). Davon lag der Mittelwert bei Tumoren aus Lübeck bei 8,43 (Spannweite:1,43-19,5; n=7) und

bei denen, aus Tübingen bei 21,58 (Spannweite: 0,88-52,16; n=9). Der Mittelwert von Tumoren mit Disomie war 19,73 (SA: 15,76; Spannweite: 0,00-48,10; n=14, Abbildung 3.4), davon bei Tumoren aus Lübeck bei 14,75 (Spannweite: 15,20-44,27; n=3) und aus Tübingen bei 21,09 (Spannweite:0,00-46,77; n=11). Es zeigte sich, in Bezug auf die gesamte Kohorte, eine geringere TUNEL-Intensität bei den nicht bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3. Jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (p-Wert=0,454; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.4). Gleichfalls waren die Unterschiede bei der Lübecker und Tübinger Kohorte für sich betrachtet nicht signifikant (p-Wert=0,667 und 0,882).

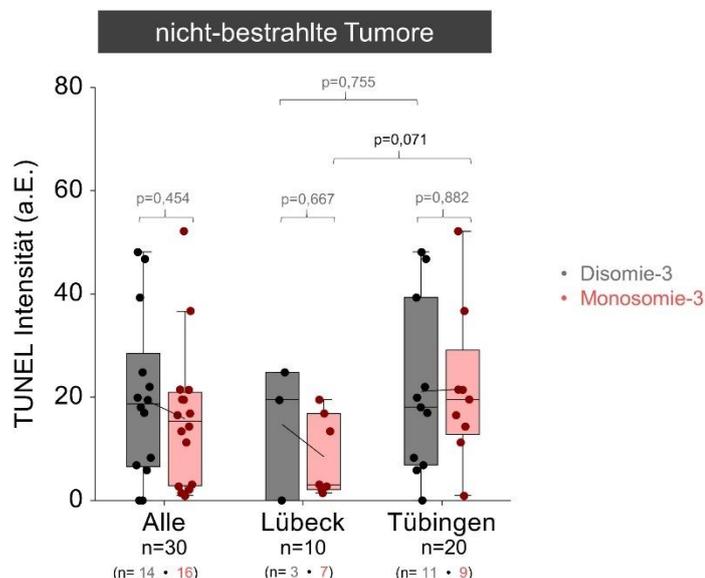


Abbildung 3.4. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den nicht bestrahlten Tumoren mit Disomie 3 und Monosomie 3. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten. Daten fehlen bei zwei Patienten aus der Tübinger Kohorte.

3.3.1.3. Vergleich des DNA-Schadens der Tumore mit Disomie 3 und Monosomie 3 mit Bezug auf den Bestrahlungsstatus

Die nicht bestrahlten Tumore mit Disomie 3 wiesen weniger DNA-Schäden auf

(Mittelwert \pm SA: 19,73 \pm 15,76; n=14), im Vergleich zu den bestrahlten Tumoren mit Disomie 3 (Mittelwert \pm SA: 29,18 \pm 8,49; n=12). Jedoch war diese Differenz statistisch nicht signifikant (p-Wert: 0,072; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.5.A).

Bei den Tumoren mit Monosomie 3 zeigte die bestrahlte Gruppe eine geringere TUNEL-Intensität (Mittelwert \pm SA: 9,34 \pm 8,73; n=11) im Vergleich zur nicht bestrahlten Gruppe (Mittelwert \pm SA: 15,83 \pm 13,74; n=16). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant in der gesamten Kohorte (p-Wert: 0,152; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.5.A). Jedoch zeigten bei der Tübinger Kohorte die bestrahlten Monosomie 3 Tumore eine signifikant geringere TUNEL-Intensität als die nicht bestrahlten Monosomie 3 Tumore (p-Wert: 0,009; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.5.C).

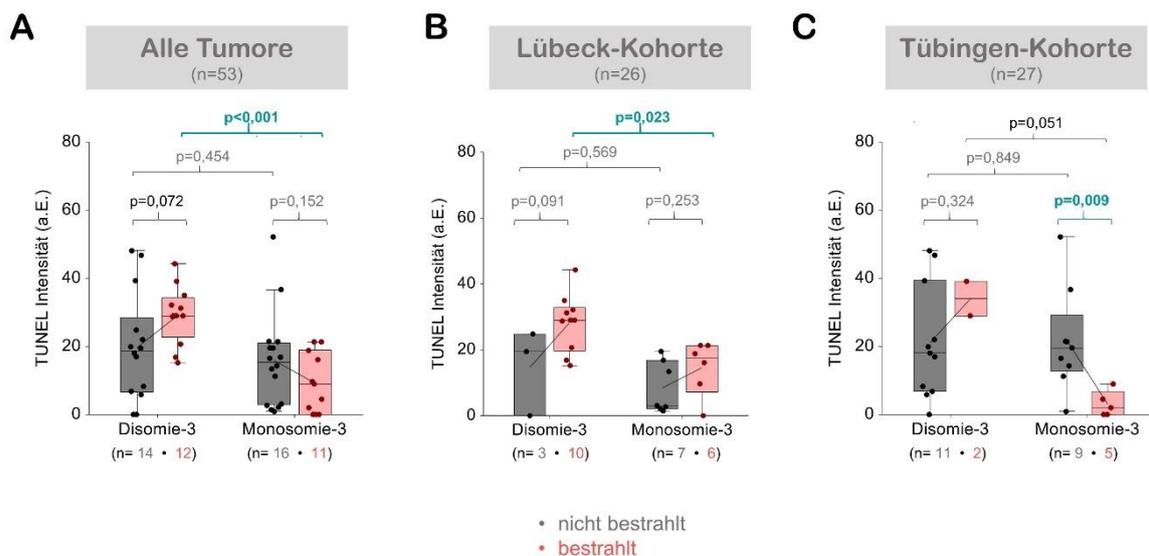


Abbildung 3.5. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens mit Bezug auf den Chromosom 3 Status in den bestrahlten und nicht bestrahlten Tumoren. (A) Alle Tumore (n=53), (B) Tumore aus der Lübecker Kohorte (n=26), (C) Tumore aus der Tübinger Kohorte (n=27, Daten fehlen bei zwei Patienten). Die Mittelwerte wurden durch die geeignete Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.e.: Arbiträre Einheiten.

3.3.2. Vergleich des DNA-Schadens bei niedriger und hoher BAP1 Expression im Zytoplasma

Der Mittelwert der TUNEL-Intensität von BAP1-positiven Tumoren lag bei 19,87 (SA: 14,05; Spannweite: 0,00-52,16; n=35) und von BAP1-negativen Tumoren bei 15,18 (SA: 13,62; Spannweite: 0,00-48,10; n=17). Für Tumore mit niedriger zytoplasmatischer BAP1 Expression war die DNA-Schädigung geringer als bei denen mit hoher BAP1 Expression, aber dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant bei Betrachtung der gesamten Kohorte (p-Wert: 0,266; Mann-Whitney-U Test). Auch separat betrachtet war der Unterschied weder bei der Lübecker noch bei der Tübinger Kohorte signifikant (p-Wert=0,056 bzw. 0,868; Abbildung 3.6).

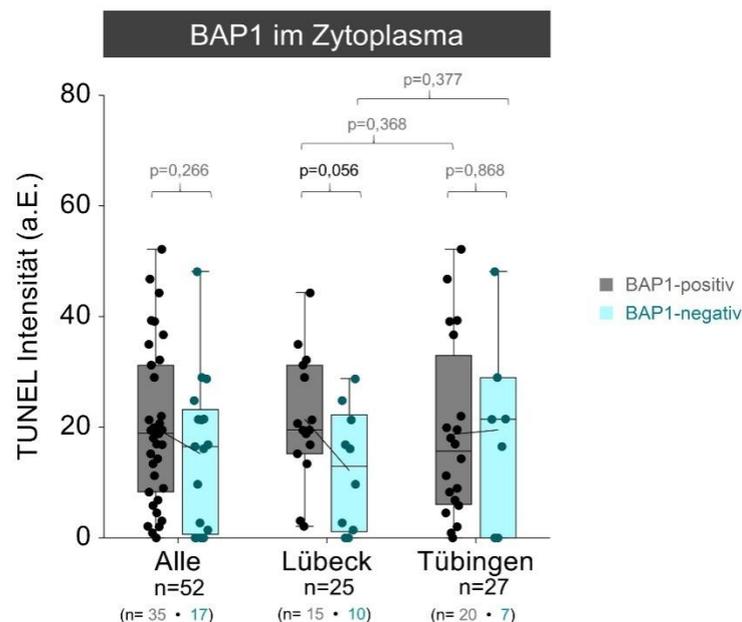


Abbildung 3.6. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den BAP1-zytoplasmatisch-positiven und BAP1-zytoplasmatisch-negativen Tumoren. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten. Daten fehlen bei einem und zwei Patienten aus der Lübecker bzw. Tübinger Kohorte.

3.3.2.1. Vergleich des DNA-Schadens bei bestrahlten und nicht-bestrahlten Tumoren mit Bezug auf die BAP1 Expression im Zytoplasma

Für die nicht bestrahlten BAP1-zytoplasmatisch-positiven Tumore lag der Mittelwert der TUNEL-Intensität bei 17,92 (SA: 14,78; Spannweite: 0,00-52,16; n=21), für die BAP1-negativen Tumore bei 17,03 (SA: 15,02; Spannweite: 0,00-48,10; n=9). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden nicht bestrahlten Gruppen in Bezug auf die gesamte Kohorte (p-Wert=0,999; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.7.A). Ebenso wurde kein signifikanter Unterschied bei der Lübecker wie auch bei der Tübinger Kohorte für sich betrachtet festgestellt (p-Wert=0,465 bzw. 0,257; Mann-Whitney-U Test; Abbildungen 3.7.B und C).

Für die bestrahlten Tumore lag die TUNEL-Intensität der BAP1-positiven Tumore im Mittel bei 22,79 (n=14) mit einer Spannweite von 2,01-44,27 und einer SA von 12,85. Die TUNEL-Intensität der BAP1-negativen, bestrahlten Tumore ergab 13,10 (n=8), bei einer Spannweite von 0,00-28,98 und einer SA von 12,53. Dieser Unterschied mit Bezug auf die zytoplasmatische BAP1 Expression war statistisch nicht signifikant (p-Wert: 0,076; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.7.A). Ebenfalls wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Lübecker und Tübinger Kohorte separat betrachtet festgestellt (p-Wert=0,666 bzw. 0,285; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.7.B und C). In der Lübecker Kohorte wiesen die bestrahlten, BAP1-positiven Tumore signifikant mehr DNA-Schaden (Mittelwert \pm SA: 26,44 \pm 9,36; n=10) im Vergleich zu den nicht bestrahlten, BAP1-positiven Tumoren

(Mittelwert \pm SA: 11,50 \pm 8,52; n=5; p-Wert=0,020; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.7.B) auf. Dieser Unterschied war in der Tübinger Kohorte nicht signifikant (p-Wert=0,345; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.7.C).

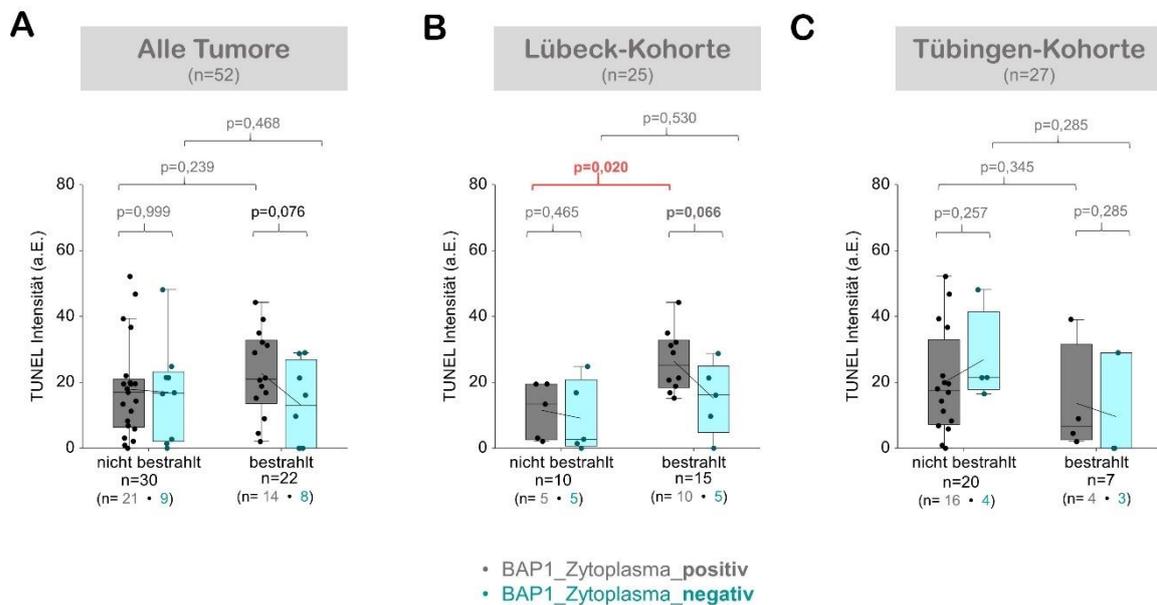


Abbildung 3.7. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens mit Bezug auf die Bestrahlung und die BAP1 Expression im Zytoplasma. (A) Alle Tumore (n=53), (B) Tumore aus der Lübecker Kohorte (n=26, Daten fehlen bei einem Patienten), (C) Tumore aus der Tübinger Kohorte (n=27, Daten fehlen bei zwei Patienten). Die Mittelwerte wurden durch die geeigneten Linien verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten.

3.3.3. Vergleich des DNA-Schadens bei niedriger und hoher BAP1 Expression im Zellkern

Die TUNEL-Intensität der Tumore mit hoher BAP1 Expression im Nukleus lag im Mittel bei 18,82 (SA: 12,00; Spannweite: 2,00-46,77; n=21) und mit niedriger BAP1 Expression im Nukleus bei 18,01 (SA: 15,32; Spannweite: 0,00-52,16; n=31). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ableiten (p-Wert: 0,709; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.8). Bei der Lübecker und Tübinger Kohorte war der Unterschied auch jeweils statistisch nicht signifikant (p-Wert=0,308 und 0,846; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.8).

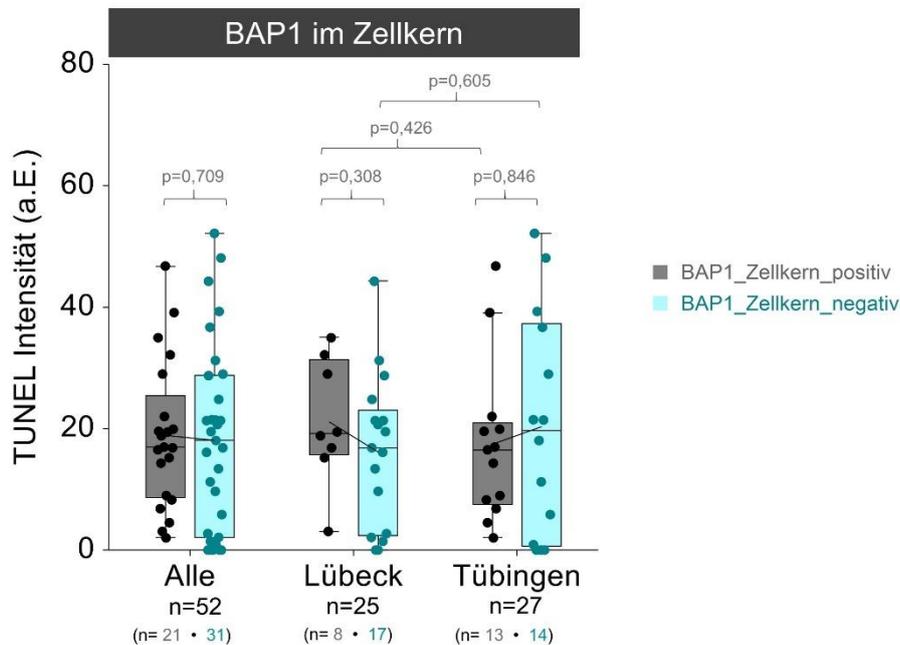


Abbildung 3.8. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den BAP1-Zellkern-positiven und BAP1-Zellkern-negativen Tumoren. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten. Daten fehlen bei einem und zwei Patienten aus der Lübecker bzw. Tübinger Kohorte.

3.3.3.1. Vergleich des DNA-Schadens bei bestrahlten und nicht bestrahlten Tumoren mit Bezug auf die BAP1 Expression im Zellkern

Im Mittel lag die TUNEL-Intensität der nicht bestrahlten Tumore mit einer hohen BAP1 Expression im Nukleus bei 17,60 (SA: 11,44; Spannweite: 3,67-46,77; n=11) und die der nicht bestrahlten Tumore mit niedriger BAP1 Expression im Nukleus bei 17,68 (SA: 16,44; Spannweite: 0,00-52,16; n=19). Die TUNEL-Intensität zeigte keinen signifikanten Unterschied bei den nicht bestrahlten Tumoren zwischen beiden Gruppen mit Bezug auf die BAP1 Expression im Zellkern (p-Wert: 0,683; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.9.A). Ebenso wurde keinen signifikanten

Unterschied bei den nicht bestrahlten Tumoren der Lübecker und Tübinger Kohorte für sich betrachtet festgestellt ($p=0,602$ bzw. $0,676$; Mann-Whitney-U Test; Abbildungen 3.9.B und C).

Bei den bestrahlten Tumoren mit einer hohen BAP1 Expression im Zellkern lag der Mittelwert der TUNEL-Intensität bei 20,16 (SA: 13,07; Spannweite: 2,00-39,11; $n=10$). Das Mittel der TUNEL-Intensität bei den BAP1-Zellkern-negativen Tumoren ergab 18,52 (SA: 14,05; Spannweite: 0,00-44,27; $n=12$). Es lag weder in der Gesamtgruppe (p -Wert: $0,692$; Mann-Whitney-U Test; Abbildung 3.9.A) noch in der Lübecker bzw. Tübinger Kohorte (p -Wert: $0,637$ bzw. $0,285$; Mann-Whitney-U Test; Abbildungen 3.9.B und C) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

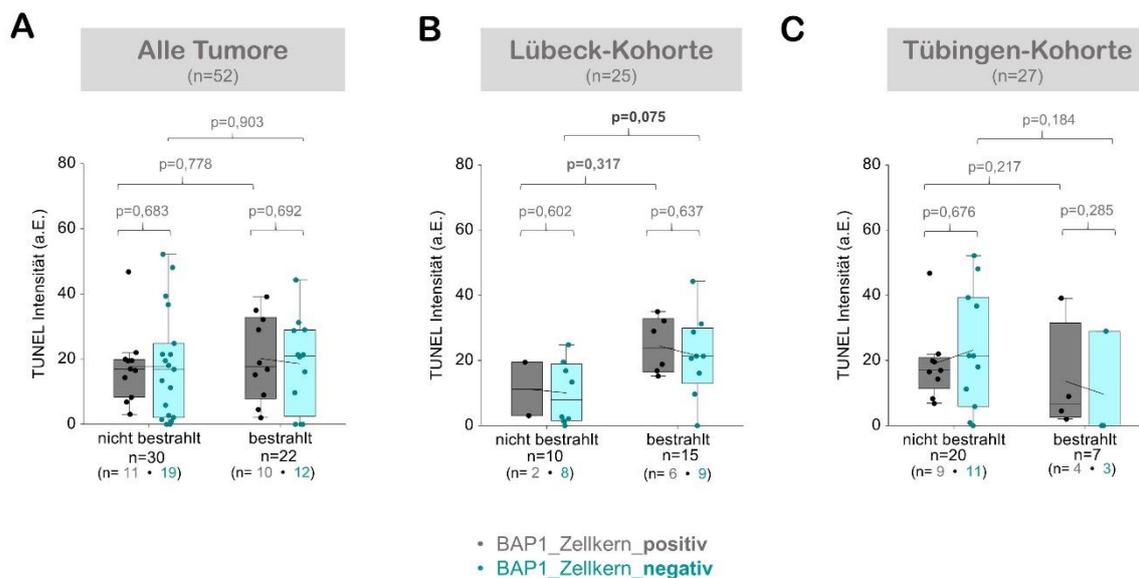


Abbildung 3.9. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens mit Bezug auf die Bestrahlung und die BAP1 Expression im Zellkern. (A) Alle Tumore ($n=52$), (B) Tumore aus der Lübecker Kohorte ($n=25$, Daten fehlen bei einem Patienten), (C) Tumore aus der Tübinger Kohorte ($n=27$, Daten fehlen bei zwei Patienten). Die Mittelwerte wurden durch die geeigneten Linien verbunden. p -Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten.

3.4. Korrelation des DNA-Schadens mit weiteren Parametern

Ebenfalls analysiert wurde die Korrelation des DNA-Schadens mit weiteren klinischen und histologischen Parametern, wie Alter; Geschlecht; Höhe, Basis, Prominenz und GTD der Tumore; Ziliarkörperbeteiligung; Invasion der Sklera, der Bruchmembran und des Sehnervens; extrabulbäre Extension; histologische Subtypen; Präsenz und Monosomie 3 Status der zirkulierenden Melanomzellen und die Metastasierung.

Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen dem DNA-Schaden und den obengenannten Parametern in der gesamten Kohorte mit bestrahlten und nicht-bestrahlten Tumoren. Alle Werte für die Korrelationen zwischen den Parametern und der Intensität des DNA-Schadens sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

3.4.1. Korrelation des DNA-Schadens mit weiteren Parametern bei bestrahlten Tumoren

Bei den bestrahlten Tumoren zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem DNA-Schaden einerseits und den Metastasen sowie dem Basisdurchmesser andererseits. Die Patienten, die trotz der Bestrahlung Metastasen entwickelten, hatten eine niedrigere DNA-Fragmentierung (Mittelwert \pm SA: $11,22 \pm 8,74$; $n=11$), im Vergleich zu den Patienten ohne Metastasen (Mittelwert \pm SA: $27,45 \pm 11,82$; $n=12$; $p=0,004$; Abbildung 3.10; Tabelle 3.2). Bei der Lübecker Kohorte war dieser Unterschied ebenfalls signifikant (p -Wert= $0,017$) während bei der Tübinger Kohorte keine Signifikanz erreicht wurde (p -Wert= $0,372$; Abbildung 3.10). Die

TUNEL-Intensität der metastasierten bestrahlten Tumore lag bei der Lübecker Kohorte bei 15,42 (SA: 7,96; Spannweite: 0,00-21,33; n=7) und bei der Tübinger Kohorte bei 3,87 (SA: 3,87; Spannweite: 0,00-8,97; n=4). Dieser Unterschied war statistisch signifikant (p-Wert=0,047; Abbildung 3.10). Ebenso war die DNA-Fragmentierung bei den Tumoren mit größerem Basisdurchmesser niedriger (Mittelwert \pm SA: 17,25 \pm 8,87; n=9) als bei den Tumoren mit kleinerem Basisdurchmesser (Mittelwert \pm SA: 30,57 \pm 8,21; n=7; p=0,016; Abbildung 3.11; Tabelle 3.2). Die anderen Faktoren erreichten das Signifikanzniveau nicht (Tabelle 3.2).

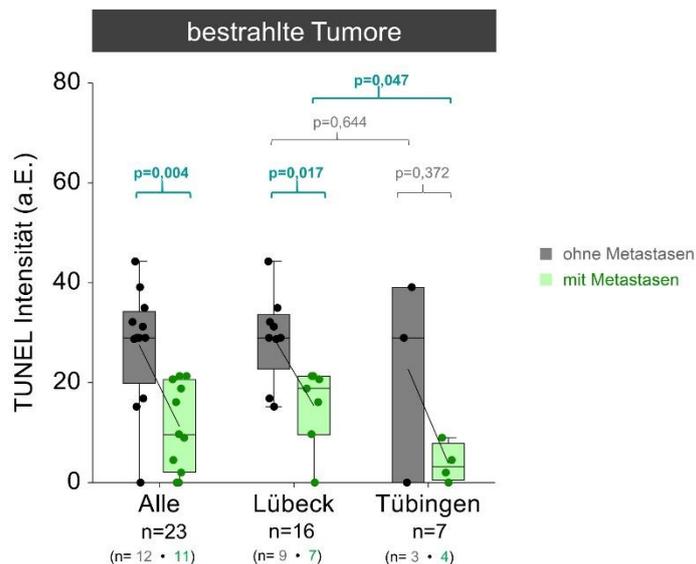


Abbildung 3.10. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den bestrahlten Tumoren ohne und mit Metastasen. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten.

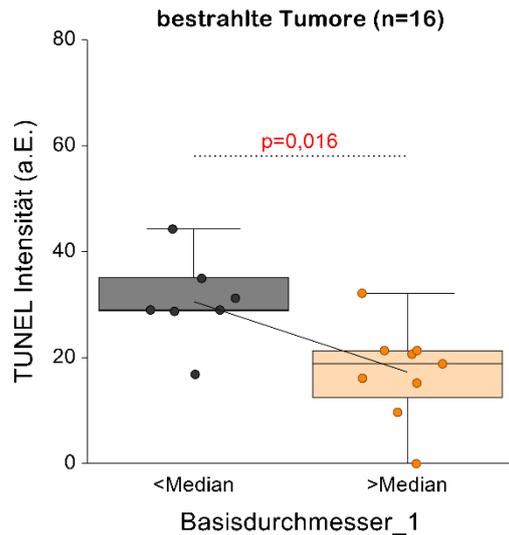


Abbildung 3.11. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den Tumoren mit einem kleineren Basisdurchmesser_1 (<Median; n=7) und einem größeren Basisdurchmesser_1 (>Median; n=9). Der Medianwert für den Basisdurchmesser_1 betrug 13,11 mm. Dieser Parameter war erhältlich nur bei den Patienten der Lübecker Kohorte. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten.

3.4.2. Korrelationen des DNA-Schadens mit weiteren Parametern bei nicht bestrahlten Tumoren

Die Invasion der Bruchmembran zeigte eine signifikante, negative Korrelation mit dem DNA-Schaden bei den nicht-bestrahlten Tumoren. Die DNA-Fragmentierung war bei den Patienten mit der Invasion der Bruchmembran niedriger (Mittelwert \pm SA: $15,26 \pm 13,61$; n=14), im Gegensatz zu denen ohne die Invasion (Mittelwert \pm SA: $29,67 \pm 13,62$; n=8; p-Wert=0,006; Abbildung 3.12; Tabelle 3.2). Die restlichen Parameter konnten das Signifikanzniveau nicht erreichen (Tabelle 3.2).

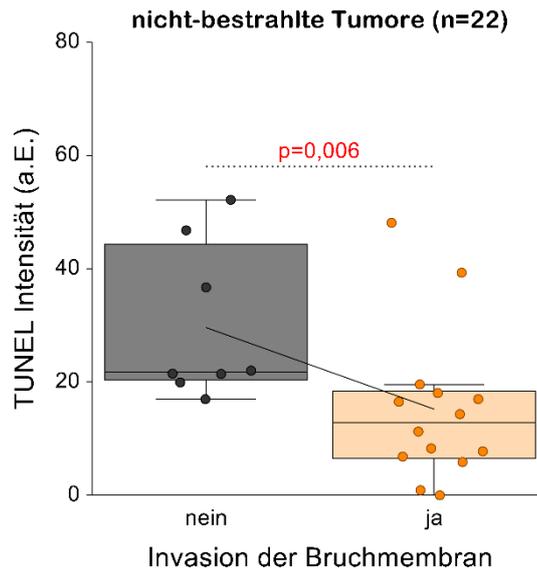


Abbildung 3.12. Boxplot Diagramm für die TUNEL-Intensität als Ausmaß des DNA-Schadens bei den Tumoren ohne (n=8) und mit (n=14) Invasion der Bruchmembran. Dieser Parameter war erhältlich nur bei den Patienten der Tübinger Kohorte. Die Mittelwerte wurden durch die geneigte Linie verbunden. p-Wert nach Mann-Whitney-U Test; a.E.: Arbiträre Einheiten.

Tabelle 3.2. Korrelation des DNA-Schadens mit prognostischen Faktoren

Faktoren		Intensität des DNA-Schadens		
		Mittelwert ± SA (n; %)		
		insgesamt	bestrahlt	nicht bestrahlt
Alter	<Median	20,06 ± 12,87 (27; 49,1%)	21,44 ± 15,16 (12; 52,2%)	18,95 ± 11,14 (15; 46,9%)
	≥Median	16,63 ± 14,52 (28; 50,9%)	17,78 ± 10,99 (11; 47,8%)	15,88 ± 16,69 (17; 53,1%)
	p	0,285	0,538	0,249
Geschlecht	weiblich	18,31 ± 15,46 (27; 49,1%)	19,11 ± 12,46 (8; 34,8%)	17,98 ± 16,87 (19; 59,4%)
	männlich	18,31 ± 12,08 (28; 50,9%)	20,00 ± 13,95 (15; 65,2%)	16,36 ± 9,70 (13; 40,6%)
	p	0,724	0,948	0,687
GTD*†	≤Median	18,74 ± 17,03 (15; 53,6%)	13,15 ± 17,69 (4; 66,7%)	20,77 ± 17,18 (11; 50,0%)
	>Median	19,34 ± 13,81 (13; 46,4%)	14,49 ± 20,49 (2; 33,3%)	20,23 ± 13,47 (11; 50,0%)
	p	0,800†	0,814†	0,922
Höhe* †††	<Median	20,74 ± 18,99 (12; 48,0%)	16,03 ± 20,49 (3; 50,0%)	22,31 ± 19,50 (9; 47,4%)
	≥Median	15,53 ± 10,85 (13; 52,0%)	11,16 ± 15,59 (3; 50,0%)	16,84 ± 9,73 (10; 52,6%)
	p	0,586	0,658†	0,604††
Basis1**	<Median	20,97 ± 13,49 (13; 50,0%)	30,57 ± 8,21 (7; 43,8%)	9,76 ± 8,72 (6; 60,0%)
	>Median	15,38 ± 9,75 (13; 50,0%)	17,25 ± 8,87 (9; 56,3%)	11,18 ± 11,67 (4; 40,0%)
	p	0,259	0,016	0,914
Basis2**	<Median	19,12 ± 10,60 (13; 50,0%)	23,58 ± 8,17 (9; 56,3%)	9,10 ± 8,84 (4; 40,0%)
	>Median	17,23 ± 13,40 (13; 50,0%)	22,44 ± 14,11 (7; 43,8%)	11,15 ± 10,48 (6; 60,0%)
	p	0,573	0,758	0,762

Prominenz**	<Median	18,96 ± 9,12 (12; 46,2%)	21,46 ± 8,06 (9; 56,3%)	11,44 ± 9,19 (3; 30,0%)
	≥Median	17,51 ± 14,14 (14; 53,8%)	25,16 ± 13,90 (7; 43,8%)	9,85 ± 10,16 (7; 70,0%)
	p	0,857	0,408	>0,999
Ziliarkörper- beteiligung	nein	17,79 ± 13,23 (37; 67,3%)	21,35 ± 12,52 (21; 91,3%)	13,12 ± 13,03 (16; 50,0%)
	ja	19,38 ± 15,00 (18; 32,7%)	2,26 ± 3,19 (2; 8,7%)	21,52 ± 14,51 (16; 50,0%)
	p	0,726	0,063	0,083
Invasion der Sklera*	nein	9,96 ± 14,08 (2; 6,9%)	0,00 ± 0,00 (1; 14,3%)	19,91 ± 0,00 (1; 4,5%)
	ja	19,06 ± 15,54 (27; 93,1%)	13,93 ± 16,19 (6; 85,7%)	20,53 ± 15,43 (21; 95,5%)
	p	0,438	0,207	0,693
der Bruch- membran*	nein	22,60 ± 16,74 (14; 48,3%)	13,18 ± 16,80 (6; 85,7%)	29,67 ± 13,62 (8; 36,4%)
	ja	14,54 ± 13,41 (15; 51,7%)	4,51 ± 0,00 (1; 14,3%)	15,26 ± 13,61 (14; 63,6%)
	p	0,121	>0,999	0,006
des Sehnervens	nein	18,10 ± 13,65 (51; 92,7%)	20,28 ± 13,12 (20; 87,0%)	16,70 ± 14,00 (31; 96,9%)
	ja	21,00 ± 16,49 (4; 7,3%)	15,77 ± 15,61 (3; 13,0%)	36,70 ± 0,00 (1; 3,1%)
	p	0,770	0,584	0,213
Extrabulbäre Extension*	nein	17,34 ± 15,69 (26; 89,7%)	9,10 ± 15,08 (6; 85,7%)	19,81 ± 15,37 (20; 90,9%)
	ja	27,91 ± 9,37 (3; 10,3%)	28,98 ± 0,00 (1; 14,3%)	27,37 ± 13,19 (2; 9,1%)
	p	0,173	0,313	0,424
Histologischer Subtyp	Spindel	19,40 ± 15,91 (10; 18,2%)	27,79 ± 24,21 (3; 13,0%)	15,80 ± 11,59 (7; 21,9%)
	Gemischt	17,64 ± 13,44 (29; 52,7%)	17,84 ± 10,93 (14; 60,9%)	17,47 ± 15,82 (15; 46,9%)
	Epitheloid	18,84 ± 13,63 (16; 29,1%)	19,96 ± 12,97 (6; 26,1%)	18,17 ± 14,66 (10; 31,3%)
	p	0,997	0,587	0,932
Monosomie 3 in primärem Tumor ††	nein	24,09 ± 13,56 (26; 49,1%)	29,18 ± 8,49 (12; 52,2%)	19,73 ± 15,76 (14; 46,7%)
	ja	13,19 ± 12,20 (27; 50,9%)	9,34 ± 8,73 (11; 47,8%)	15,83 ± 13,74 (16; 53,3%)
	p	0,003††	<0,001	0,454††
ZMZ**	nein	16,03 ± 18,33 (2; 7,7%)	28,99 ± 0,00 (1; 6,3%)	3,07 ± 0,00 (1; 10,0%)
	ja	18,35 ± 11,76 (24; 92,3%)	22,69 ± 11,00 (15; 93,8%)	11,14 ± 9,58 (9; 90,0%)
	p	0,923	0,625	>0,999
Monosomie 3 in ZMZ***††	nein	22,08 ± 15,24 (8; 33,3%)	28,58 ± 11,05 (6; 42,9%)	2,58 ± 0,69 (2; 20,0%)
	ja	15,87 ± 10,58 (16; 66,7%)	19,47 ± 10,87 (8; 57,1%)	12,27 ± 9,58 (8; 80,0%)
	p	0,257††	0,181††	0,533
Metastasen	nein	21,10 ± 15,79 (24; 43,6%)	27,45 ± 11,82 (12; 52,2%)	14,75 ± 17,13 (12; 37,5%)
	ja	16,15 ± 11,68 (31; 56,4%)	11,22 ± 8,74 (11; 47,8%)	18,86 ± 12,38 (20; 62,5%)
	p	0,212	0,004	0,276

p Wert nach Mann-Whitney-Test für binäre Parameter und

nach Kruskal-Wallis Test für die kategorischen Parameter mit drei Subgruppen.

GTD: größter Tumordurchmesser; n: Anzahl; SA: Standardabweichung; ZMZ: zirkulierende Melanomzellen.

*Die Analysen beinhalteten nur die Daten von Patienten aus Tübingen.

**Die Analysen beinhalteten nur die Daten von Patienten aus Lübeck.

†Daten fehlen bei einem Patienten. ††Daten fehlen bei zwei Patienten; †††Daten fehlen bei drei Patienten.

Kapitel 4.

Diskussion

4.1. Korrelation der Strahlentherapie mit dem Chromosom 3 Status

Mit der Entwicklung der modernen Medizin wurden Leitlinien für die Diagnostik und Behandlung des uvealen Melanoms etabliert, damit der Tumor rechtzeitig kontrolliert werden kann. Zudem haben Damato et al. ein Programm erstellt und validiert, mit dem die anatomischen, histologischen und genetischen Prädiktoren zusammen mit dem Alter und Geschlecht analysiert werden, damit die Prognose der Patienten individuell bestimmt werden kann.^{79,80}

Dennoch ist es schwierig, die Überlebenszeit zu verlängern, wenn ein uveales Melanom diagnostiziert wird, denn fast die Hälfte der Patienten entwickelt nach den erfolgreichen Kontrollen tödliche Metastasen. Monosomie 3 ist ein wesentlicher Risikofaktor der Metastasierung. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit stimmt mit den Resultaten anderer Studien überein, dass Monosomie 3 in mehr als 50% der Fälle mit dem uvealen Melanom detektiert wurde und dass Monosomie 3 mit dem Risiko von Metastasen statistisch korreliert.^{63,81} Bei Metastasen der uvealen Melanome korreliert die Monosomie 3 mit einer höheren Aggressivität und einer kürzeren Überlebenszeit als die Disomie 3. Außerdem ergab der Gewinn von Chromosom 8q ein höheres Metastasierungsrisiko; im Gegensatz dazu wurde es niedriger bei dem Gewinn von Chromosom 6p.⁶²

In den vorangegangenen Studien wurde die Korrelation zwischen der Prognose und dem Chromosom 3 Status nicht nur bei größeren Tumoren nachgewiesen, sondern auch bei kleineren bulbuserhaltenden Tumoren, die mit der Brachytherapie behandelt wurden.^{46,66} Die Wahl der Therapie richtet sich nach der Tumorgöße und -lokalisation; die Strahlentherapie ist eine wesentliche Behandlungsmethode.

In einer vorausgegangenen Studie wurde keine signifikante Korrelation zwischen der Rate der Regression nach der Strahlentherapie und dem Chromosom 3 Status durch den Vergleich der Tumorphöhe vor und nach der Strahlentherapie detektiert.⁸² Im Gegenteil wurde in einer weiteren Studie über die erfolgreiche Behandlung eines uvealen Melanoms mit Monosomie 3 durch die Gammamesser-Radiochirurgie nach einer erfolglosen Brachytherapie berichtet.⁸³

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stärke der DNA-Schädigung nach der Strahlentherapie analysiert. In der Lübecker Kohorte war die DNA-Schädigung signifikant geringer bei den nicht bestrahlten Tumoren als bei bestrahlten. Dies beweist die Wirksamkeit der fraktionierten, niedrig-dosierten Strahlentherapie, die bei den Lübecker Patienten angewendet wurde. In der Gesamtgruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied in der DNA-Schädigung bei Patienten mit Monosomie 3 und Disomie 3. Die Tumore von Patienten mit einer höheren Prozentzahl der Monosomie 3 zeigten eine geringere DNA-Schädigung und entsprachen einer schlechteren Regression der Tumore.

Aus einer Studie von Robertson et al. ging ein signifikant höherer DNA

Damage Response (DDR) Signalweg-Score in den uvealen Melanomen mit Monosomie 3 hervor, im Gegensatz zu den Tumoren mit Disomie 3.⁸⁴ In einer späteren Studie bewiesen Dogrusöz et al, dass die Expression verschiedener DDR Gene zwischen den uvealen Melanomen mit Disomie 3 und Monosomie 3 differierte. Beispielsweise zeigten die Tumore mit Monosomie 3 eine niedrigere Expression von WDR48 und XPC während das PRKDC-Gen signifikant hochreguliert war.⁸⁵ Weitere Untersuchungen könnten mehr Aufschluss darüber geben und dazu anregen, die Expression dieser DNA-Reparatur-Gene nach der Bestrahlung der uvealen Melanome mit Monosomie 3 und Disomie 3 zu vergleichen.

Bei den Patienten mit Strahlentherapie zeigte das Ausmaß der DNA-Schädigung einen noch signifikanteren Unterschied in Bezug auf den Chromosom 3 Status. Die Strahlentherapie war effektiver bei den Patienten mit einer niedrigeren Prozentzahl der Monosomie 3. Das entsprach auch der schlechteren Prognose der Patienten mit Monosomie 3.

Interessanterweise wurde jedoch mithilfe von TUNEL-Assays auch bei den nicht bestrahlten Tumoren eine DNA-Schädigung beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Apoptose-abhängige DNA-Schädigung durch verschiedene Stressfaktoren. Beispiele hierfür sind die Hypoxie und der Nährstoffmangel wegen unzureichender Blutversorgung in großen Tumoren⁸⁶ oder eine toxische Mikroumgebung mit zellulären Abfällen wegen der Störung der okulären Homöostase (Bruchmembraninvasion oder Netzhautablösung wegen

Tumorwachstum).⁸⁷ Außerdem kann der TUNEL-Assay auch die früheren Phasen der Apoptose reflektieren, die möglicherweise rückgängig gemacht werden können.⁸⁸ Zudem kann er manchmal bei den Chromosomen mit aktiver Gen-Transkription auch falsch-positive Signale ergeben.⁸⁹ Deshalb sollte in zukünftigen Studien das Ausmaß der Apoptose mittels alternativer Methoden, wie z.B. des immunhistochemischen Nachweises von aktivierten Caspasen, untersucht werden, um die TUNEL-Signale in den nicht-bestrahlten Tumoren besser interpretieren zu können.

Über die gesamte Kohorte hinweg zeigten die mit Strahlentherapie behandelten Tumore mit Monosomie 3 durchschnittlich eine leichtere DNA-Schädigung im Vergleich zu den nicht bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3. Dieser Unterschied war signifikant bei der Tübinger Kohorte, die eine einzeitige, hochdosierte Bestrahlung erhielt (Abbildung 3.5). Zudem zeigten die bestrahlten Monosomie 3 Tumore aus Tübingen eine signifikant geringere TUNEL-Intensität im Vergleich zu den bestrahlten Monosomie 3 Tumoren aus Lübeck (Abbildung 3.3). Die bestrahlten Tumoren aus Lübeck wurden mit einer fraktionierten, wiederholten, gering dosierten Bestrahlung behandelt. Die bestrahlten Monosomie 3 Tumore der Lübecker Kohorte zeigten eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der TUNEL-Intensität im Vergleich zu den nicht bestrahlten Tumoren. Diese Tendenz war ebenfalls bei den Patienten mit Disomie 3 zu beobachten: Sie litten unter einer schwereren DNA-Schädigung nach der Strahlentherapie; dieser Effekt war jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.5).

Aus der vorliegenden Arbeit lässt sich die höhere Effektivität der Strahlentherapie bei Patienten mit einem besseren Chromosom 3 Status schlussfolgern. Zudem könnte eine einzeitige, hochdosierte Bestrahlung weniger DNA-Schaden als die fraktionierte, gering dosierte, wiederholte Bestrahlung bei den Monosomie 3 Tumoren verursachen. Daher ist anzunehmen, dass bei der Auswahl der Strahlentherapie auch der Chromosom 3 Status berücksichtigt werden sollte.

4.2. Korrelation der Strahlentherapie mit dem BAP1 Status

BAP1 ist eine Deubiquitinase, die an der Regulation des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung, am Zelltod, der Glukoneogenese und DNA-Schadensantwort beteiligt ist.⁶⁹ Weil BAP1 als ein Tumorsupressor fungiert, korrelieren seine Mutationen mit verschiedenen Tumorarten, wie Mesotheliom, Nierenzellkarzinom, Cholangiokarzinom und uvealem Melanom.^{26,90-92} Beim Lungenkarzinom wurden auch Mutationen des BAP1-Gens gefunden.⁷⁰

Das BAP1-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 3p21.1.⁶⁹ Harbour et al zeigten, dass die somatische Mutation dieses Gens häufig (47,4%) im uvealen Melanom vorkommt.²⁶ Diese Mutation korreliert auch mit der Prognose, dass ein höheres Risiko von tödlichen Metastasen bei den Patienten mit Mutationen besteht.⁹³ Die Keimbahnmutation des BAP1 wurde zwar nicht als Risikofaktor der Metastasierung gesehen, korrelierte dennoch mit dem größeren Tumordurchmesser und dem höheren Risiko der Ziliarkörperbeteiligung.⁹³ Beide gelten als Risikofaktoren der

Metastasierung.³⁸

Aus der vorliegenden Arbeit kann die Tendenz zu einer stärkeren DNA-Schädigung in den uvealen Melanomen mit einer erhöhten BAP1 Expression im Zytoplasma abgeleitet werden. Dieses Ergebnis war jedoch statistisch nicht signifikant in der gesamten Kohorte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Anzahl der Tumore in den Subgruppen eher gering und nicht gleichmäßig verteilt war (BAP1-negativ n=17, BAP1-positiv n=35). Dennoch war der DNA-Schaden bei den bestrahlten gegenüber den unbestrahlten Tumoren der Lübecker Kohorte, die eine höhere Expression von zytoplasmatischem Bap1 aufwiesen, signifikant stärker (Abbildung 3.7). Die BAP1 Expression im Zellkern ergab keine deutliche Tendenz in Bezug auf die TUNEL-Intensität. Deshalb ist anzunehmen, dass besonders der zytoplasmatische BAP1-Status bei der Auswahl der Strahlentherapie berücksichtigt werden sollte. Weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten werden erforderlich, um die Korrelation möglicherweise zu verifizieren.

4.3. Korrelation der Strahlentherapie mit anderen Faktoren

Die bestrahlten Tumore zeigten eine signifikant niedrigere Inzidenz von Ziliarkörperinvasion im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Tumoren ($p=0,001$; Tabelle 2.1). Interessanterweise wurde in dieser Studie fundiert, dass die bestrahlten Tumore mit Ziliarkörperinvasion eine geringere TUNEL-Intensität zeigten, im Vergleich zu den bestrahlten Tumoren ohne Ziliarkörperbeteiligung.

Jedoch erreichte diese Tendenz keine Signifikanz bei der untersuchten Probengröße ($p=0,063$; Tabelle 3.2).

In dieser Arbeit wurde auch nachgewiesen, dass die bestrahlten Patienten mit metastasierten uvealen Melanomen oder größeren Tumoren eine signifikant geringere DNA-Schädigung trugen als Patienten ohne Metastasierung oder mit kleineren Tumoren. Diese Entwicklungsrichtung entsprach auch der negativen Korrelation zwischen der Monosomie 3 und dem Ausmaß des DNA-Schadens in dieser Studie. Die Befunde verwiesen deshalb auf die Monosomie 3, die als ein wesentlicher Faktor die Wirksamkeit der Strahlung verringern könnte.

4.4. Einschränkungen der Arbeit

Erstens war die Anzahl der Proben in dieser Studie relativ begrenzt. Dieses Problem zeigt sich in den meisten Studien über das uveale Melanom, weil dieser Tumor eher selten vorkommt. Auch bei den großen Studien, wie z.B. „The Cancer Genome Atlas“, gab es nur 80 Patienten mit uvealem Melanom aus mehreren Zentren.⁸⁴ In der vorliegenden Studie erreichte die Anzahl der Proben durch die Kombination von zwei Kohorten eine angemessene Probengröße von insgesamt $n=55$ Tumoren. Trotzdem gab es manchmal eine geringe Probengröße in einigen Subgruppen, besonders in den Gruppen, die nur Daten aus einer der beiden Kohorten enthielten.

Zudem war die Methode der Bestrahlung in unserer Studie nicht uniform. Bei den Lübecker Patienten wurde eine fraktionierte, wiederholte, gering dosierte

Bestrahlung durchgeführt, während die Patienten aus Tübingen eine einzeitige, hochdosierte Bestrahlung erhielten. Dies könnte zu Unterschieden im Ausmaß des DNA-Schadens geführt haben. Die bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3 aus Lübeck zeigten eine signifikant stärkere DNA-Schädigung als die bestrahlten Monosomie 3 Tumore aus Tübingen. Ebenso zeigten die bestrahlten metastasierten Tumoren aus Lübeck eine signifikant stärkere DNA-Schädigung als die aus Tübingen. In einer vorausgegangenen in-vitro Studie war die DNA-Schädigung stärker nach der einzeitigen, hochdosierten Bestrahlung als nach der fraktionierten, gering dosierten Bestrahlung. Eine mögliche Erklärung dafür war, dass die Tumorzellen resistenter gegenüber der fraktionierten, gering dosierten Bestrahlung geworden waren.⁹⁴ Die Ergebnisse in unserer Studie schienen das Gegenteil nahezu legen. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist, dass das Erholungsintervall nach der Bestrahlung unbekannt für die Tumore aus Tübingen war. Diese Proben könnten nach der einzeitigen Bestrahlung mehr Zeit zur Erholung gehabt haben. In einer Studie von van den Aardweg et al. wurde gezeigt, dass die Auswirkung der Dosisfraktionierung sich bei der intrinsischen Radiosensitivität der Tumorzellen unterscheidet und die Radiosensitivität durch unterschiedliche histologische Tumormarker beeinflusst wurde.⁹⁵ Außerdem war die Probengröße der bestrahlten Tumore aus Tübingen sehr gering (n=7). Weitere Studien mit größerem Probenumfang wären notwendig, um zu klären, welche Dosis und Art der Bestrahlung einen stärkeren DNA-Schaden induziert.

Der Zeitraum zwischen der letzten Bestrahlung und E nukleation oder

Endoresektion zeigte auch eine gewisse, jedoch nicht signifikante Variation zwischen den Tumoren mit Disomie 3 und Monosomie 3 ($p=0,662$, Tabelle 3.1). Manche Tumore hatten deshalb vermutlich mehr Zeit für die Erholung nach der Bestrahlung, was wiederum das Ausmaß des DNA-Schadens beeinflussen könnte. Zudem können die bestrahlten Zellen mehr Chromosomaberrationen zeigen, was die Ergebnisse der Tumor-Karyotypisierung beeinflussen würde.⁹⁶ In dieser Studie wurde keine Biopsie vor der Bestrahlung durchgeführt. Biopsien gehören im Allgemeinen nicht zu den routinemäßigen Verfahren beim uvealen Melanom, da es ein Risiko für die Streuung der Tumorzellen gibt. Überdies haben Biopsien ihre Begrenztheit aufgrund der Tumorerheterogenität und könnten deswegen nicht immer repräsentative Informationen über die Kopienzahl der Chromosomen liefern. Außerdem wurden andere häufige Chromosomenanomalien, die ebenfalls die Prognose beeinflussen könnten, in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, z.B. der Gewinn von Chromosom 8q oder Chromosom 6p.⁶²

Mit dem TUNEL-Assay konnten der strahleninduzierte direkte DNA-Schaden nicht vom Apoptose-abhängigen sekundären DNA-Schaden unterschieden werden. Deshalb wurde es in der vorliegenden Arbeit vorgezogen, anstatt Apoptose die Intensität der TUNEL-Reaktion als Ausmaß der DNA-Schädigung zu interpretieren.

Der TUNEL-Assay wurde ursprünglich für den Nachweis von doppelsträngigen DNA-Brüchen entwickelt, die in späteren Apoptosephasen vorkommen. Jedoch zeigte dieser Assay auch positive Signale in nicht apoptotischen Zellen mit möglicherweise leichteren DNA-Schäden, die eine DNA-Repair-Response

induzierten.⁹⁷ Da ein Teil der strahleninduzierten DNA-Brüche einzelsträngig sein kann,⁹⁸ wäre es sehr interessant weitere Studien durchzuführen, um die Natur des DNA-Schadens und das Ausmaß der Apoptose in den bestrahlten uvealen Melanomen mit Monosomie 3 zu erforschen.

4.5. Ausblick

Aus der vorliegenden Arbeit geht die Bedeutung des Chromosom 3 Status bei der Auswahl der Strahlentherapie hervor. Nur die Hälfte der Patienten überlebt das erste Jahr nach der Diagnose von Metastasen und das Risiko der Metastasierung wird stark mit der Monosomie 3 assoziiert. Deshalb sollte die Effektivität der Therapie bei Monosomie 3 bekannt sein, um eine erfolgsversprechende Behandlungsmethode für Patienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko zu wählen.

Die negative Korrelation zwischen der Präsenz von Monosomie 3 und der Wirksamkeit der Strahlentherapie in dieser Arbeit deutet darauf hin, dass die Einstellung des Therapieplans in Abhängigkeit vom Chromosom 3 Status von Vorteil sein kann. Optionen sind beispielsweise eine angepasste Dosierung der Strahlentherapie bei Monosomie 3 oder engere Kontrollen der Tumore. Die größere Effektivität der fraktionierten, niedrigdosierten Bestrahlung bei Monosomie 3 in dieser Arbeit könnte möglicherweise auch bei der Einstellung von Bestrahlung berücksichtigt werden. Die Abschätzung des Chromosom 3 Status durch nicht invasive Methoden würde ebenfalls als ein wertvoller Ansatz dienen, der weiter

untersucht werden sollte. Beispiele dafür sind die Untersuchung der zirkulierenden Tumorzellen und die Bestimmung der metabolischen Aktivität durch die FDG-Positron-Emissions-Tomographie.⁹⁹⁻¹⁰¹

Die Nukleoli von Monosomie 3-positiven Zellen und von epitheloiden Zellen sind größer, im Vergleich zu den Disomie 3 Zellen und Spindelzellen. Die Nukleoli enthalten die genetischen Informationen für die Herstellung von Ribosomen, speichern die DNA-Schadensantwort-Proteine und bilden ribosomale Untereinheiten.¹⁰² Für die energieverbrauchenden Prozesse, z.B. die Ribosomen-Synthese, sind die größeren Nukleoli dann vorteilhafter.¹⁰³

Die Energieversorgung der uvealen Melanome mit Monosomie 3 funktioniert möglicherweise effizienter als bei den Disomie 3 Tumoren. Zum Beispiel berichteten Maaßen et al. neulich, dass die uvealen Melanome mit Monosomie 3 einen höheren Anteil des Glucosetransporters 1 (GLUT1) zeigten, der eine stärkere Affinität zu Glucose als GLUT2 (Locus: 3q26.2) besitzt. Ebenso korrelierte die Entwicklung von Metastasen mit einem höheren Anteil von GLUT1. Die Hochregulation von GLUT1 könnte dann möglicherweise die basale Glucoseaufnahme in den uvealen Melanomzellen mit Monosomie 3 erhöhen und den Tumorzellen einen Vorteil bei den energieverbrauchenden Prozessen verschaffen.⁷⁶

Außerhalb von GLUT1 und größeren Nukleoli zeigte sich bei der Insulinresistenz auch eine schlechtere Prognose im uvealen Melanom. In der vorliegenden Arbeit gab es keine klinische Information über die systemischen

Erkrankungen der Patienten. In einer vorausgegangenen Studie wiesen die uvealen Melanome mit Monosomie 3 jedoch eine insulinresistente Genexpression während die lokale Insulinresistenz bei den bestrahlten Tumoren geringer ausfiel.¹⁰⁴

Die Prävention von Hyperglykämie und die Einstellung der Insulinresistenz könnten deshalb wertvolle Ansätze für die Behandlung von uvealen Melanomen sein, um die tödlichen Metastasen zu verzögern. Daher wäre es sehr interessant, zukünftige Studien durchzuführen, um die Wirksamkeit der Bestrahlung unter Einstellung der Insulinresistenz und Hyperglykämie zu beurteilen.

Kapitel 5.

Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der histologischen Untersuchung des DNA-Schadens mittels TUNEL-Assays in den Paraffinschnitten von n=55 primären uvealen Melanomen. Davon wurden 23 Patienten mit Strahlentherapie behandelt.

In der untersuchten Tumorserie wurde für alle Tumore ein unterschiedlicher Grad der DNA-Schädigung nachgewiesen. Eine stärkere DNA-Schädigung korrelierte mit einer niedrigeren Prozentzahl der Monosomie 3 (p-Wert=0,003; Mann-Whitney-U Test). Besonders bei den Patienten mit Strahlentherapie war diese Korrelation noch signifikanter (p-Wert<0,001; Mann-Whitney-U Test). Bei den Patienten ohne Strahlentherapie wurde keine Korrelation zwischen dem Chromosom 3 Status und der DNA-Schädigung detektiert (p-Wert=0,454; Mann-Whitney-U Test). Im Gegensatz dazu zeigten die bestrahlten Tumore mit Disomie 3 eine stärkere DNA-Schädigung als die nicht-bestrahlten Disomie 3 Tumoren, jedoch war diese Korrelation nicht signifikant bei der untersuchten Probengröße (p-Wert=0,072; Mann-Whitney-U Test). Bei den bestrahlten Tumoren mit Monosomie 3 wurde eine stärkere DNA-Schädigung nach einer fraktionierten, gering dosierten Bestrahlung als nach einer einzeitigen, hochdosierten Radiotherapie beobachtet (p-Wert=0,043; Mann-Whitney-U Test). Bei den Tumoren mit hoher zytoplasmatischer BAP1 Expression war die DNA-Schädigung

stärker nach einer fraktionierten, gering dosierten Bestrahlung als ohne Bestrahlung (p-Wert=0,020; Mann-Whitney-U Test). Zudem ergab sich eine signifikante und inverse Assoziation zwischen der DNA-Schädigung und den Metastasen sowie der Tumorgroße bei den Patienten mit Strahlentherapie.

Insofern ist die Strahlentherapie besonders effektiv bei den Patienten mit Disomie 3. Die Patienten mit Monosomie 3 haben eine schlechtere Prognose und es erscheint weniger erfolgversprechend, sie mit Strahlentherapie zu behandeln. Die Dosis und die Art der Strahlentherapie beeinflussen möglicherweise die Effektivität bei den Patienten mit Monosomie 3, was weitere Untersuchungen in einem größeren Patientenkollektiv verdient.

Literatur

- (1) Maidowsky, W. *Anatomie des Auges: mit einer Einführung in die allgemeine Zellen- und Gewebelehre*, 6., unveränd. Aufl.; DOZ-Verl: Heidelberg, 2003.
- (2) Burk, A.; Burk, R. *Checkliste Augenheilkunde*, 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.; Checklisten der aktuellen Medizin; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2018.
- (3) Aufbau Des Augapfels. August 2019.
- (4) *Sobotta - Atlas der Anatomie*, 24. Auflage.; Paulsen, F., Waschke, J., Sobotta, J., Eds.; Elsevier: München, 2017.
- (5) Walter, P.; Plange, N. *Basiswissen Augenheilkunde*; Springer-Lehrbuch; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-52801-3>.
- (6) *Augenheilkunde*, 6., überarbeitete Auflage.; Lang, G. K., Ed.; Thieme: Stuttgart, 2019.
- (7) Nickla, D. L.; Wallman, J. The Multifunctional Choroid. *Prog. Retin. Eye Res.* **2010**, *29* (2), 144–168. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.12.002>.
- (8) Chang, A. E.; Karnell, L. H.; Menck, H. R. The National Cancer Data Base Report on Cutaneous and Noncutaneous Melanoma: A Summary of 84,836 Cases from the Past Decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* **1998**, *83* (8), 1664–1678. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19981015\)83:8<1664::aid-cnrc23>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19981015)83:8<1664::aid-cnrc23>3.0.co;2-g).
- (9) Hu, D.-N.; Yu, G.-P.; McCormick, S. A.; Schneider, S.; Finger, P. T. Population-Based Incidence of Uveal Melanoma in Various Races and Ethnic Groups. *Am. J. Ophthalmol.* **2005**, *140* (4), 612.e1-612.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.05.034>.
- (10) Virgili, G.; Gatta, G.; Ciccolallo, L.; Capocaccia, R.; Biggeri, A.; Crocetti, E.; Lutz, J.-M.; Paci, E.; EURO CARE Working Group. Incidence of Uveal Melanoma in Europe. *Ophthalmology* **2007**, *114* (12), 2309–2315. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.01.032>.
- (11) Singh, A. D.; Topham, A. Incidence of Uveal Melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* **2003**, *110* (5), 956–961. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(03\)00078-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(03)00078-2).
- (12) Yue, H.; Qian, J.; Yuan, Y.; Zhang, R.; Bi, Y.; Meng, F.; Xuan, Y. Clinicopathological Characteristics and Prognosis for Survival after Enucleation of Uveal Melanoma in Chinese Patients: Long-Term Follow-Up. *Curr. Eye Res.* **2017**, *42* (5), 759–765. <https://doi.org/10.1080/02713683.2016.1245422>.
- (13) Mahendraraj, K.; Lau, C. S.; Lee, I.; Chamberlain, R. S. Trends in Incidence, Survival, and Management of Uveal Melanoma: A Population-Based Study of 7,516 Patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database (1973-2012). *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **2016**, *10*, 2113–2119. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S113623>.
- (14) Kujala, E.; Mäkitie, T.; Kivelä, T. Very Long-Term Prognosis of Patients with Malignant Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44* (11), 4651–4659. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0538>.
- (15) Singh, A. D.; Turell, M. E.; Topham, A. K. Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival. *Ophthalmology* **2011**, *118* (9), 1881–1885. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.01.040>.
- (16) Patzelt, J. *BASICS Augenheilkunde*, 2., vollständig überarbeitete Auflage.; Basics; Elsevier, Urban & Fischer: München, 2009.
- (17) McLean, I. W.; Foster, W. D.; Zimmerman, L. E.; Gamel, J. W. Modifications of Callender's

- Classification of Uveal Melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am. J. Ophthalmol.* **1983**, *96* (4), 502–509. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)77914-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)77914-0).
- (18) Yanoff, M.; Fine, B. S. *Ocular Pathology: A Color Atlas*, 2nd ed.; Gower Medical Publ: New York, NY, 1992.
- (19) Histopathologic Characteristics of Uveal Melanomas in Eyes Enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study COMS Report No. 6. *Am. J. Ophthalmol.* **1998**, *125* (6), 745–766. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(98)00040-3).
- (20) Bowling, B. *Kanski's Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*; 2016.
- (21) Garcia-Valenzuela, E. Which Histologic Findings Are Characteristic of Choroidal Melanoma?
- (22) Schmidt-Pokrzywniak, A.; Jöckel, K.-H.; Bornfeld, N.; Sauerwein, W.; Stang, A. Positive Interaction between Light Iris Color and Ultraviolet Radiation in Relation to the Risk of Uveal Melanoma: A Case-Control Study. *Ophthalmology* **2009**, *116* (2), 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2008.09.040>.
- (23) Mainster, M. A.; Turner, P. L. Ultraviolet-B Phototoxicity and Hypothetical Photomelanomagenesis: Intraocular and Crystalline Lens Photoprotection. *Am. J. Ophthalmol.* **2010**, *149* (4), 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2009.11.028>.
- (24) Shields, C. L.; Kaliki, S.; Livesey, M.; Walker, B.; Garoon, R.; Bucci, M.; Feinstein, E.; Pesch, A.; Gonzalez, C.; Lally, S. E.; Mashayekhi, A.; Shields, J. A. Association of Ocular and Oculodermal Melanocytosis with the Rate of Uveal Melanoma Metastasis: Analysis of 7872 Consecutive Eyes. *JAMA Ophthalmol.* **2013**, *131* (8), 993–1003. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.129>.
- (25) Weis, E.; Shah, C. P.; Lajous, M.; Shields, J. A.; Shields, C. L. The Association between Host Susceptibility Factors and Uveal Melanoma: A Meta-Analysis. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **2006**, *124* (1), 54–60. <https://doi.org/10.1001/archophth.124.1.54>.
- (26) Harbour, J. W.; Onken, M. D.; Roberson, E. D. O.; Duan, S.; Cao, L.; Worley, L. A.; Council, M. L.; Matatall, K. A.; Helms, C.; Bowcock, A. M. Frequent Mutation of BAP1 in Metastasizing Uveal Melanomas. *Science* **2010**, *330* (6009), 1410–1413. <https://doi.org/10.1126/science.1194472>.
- (27) Abdel-Rahman, M. H.; Pilarski, R.; Cebulla, C. M.; Massengill, J. B.; Christopher, B. N.; Boru, G.; Hovland, P.; Davidorf, F. H. Germline BAP1 Mutation Predisposes to Uveal Melanoma, Lung Adenocarcinoma, Meningioma, and Other Cancers. *J. Med. Genet.* **2011**, *48* (12), 856–859. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100156>.
- (28) Damato, E. M.; Damato, B. E. Detection and Time to Treatment of Uveal Melanoma in the United Kingdom: An Evaluation of 2,384 Patients. *Ophthalmology* **2012**, *119* (8), 1582–1589. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.01.048>.
- (29) Shields, C. L.; Manalac, J.; Das, C.; Ferguson, K.; Shields, J. A. Choroidal Melanoma: Clinical Features, Classification, and Top 10 Pseudomelanomas. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2014**, *25* (3), 177–185. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000041>.
- (30) *Noncutaneous Melanoma*; Scott, J. F., Gerstenblith, M. R., Eds.; Codon Publications: Brisbane (AU), 2018.
- (31) Kivelä, T. Diagnosis of Uveal Melanoma. *Dev. Ophthalmol.* **2012**, *49*, 1–15. <https://doi.org/10.1159/000330613>.
- (32) Rusňák, Š.; Hecová, L.; Kasl, Z.; Sobotová, M.; Hauer, L. UVEAL MELANOMA BIOPSY A REVIEW. *Ceska Slov. Oftalmol. Cas. Ceske Oftalmol. Spolecnosti Slov. Oftalmol. Spolecnosti* **2020**, *1* (Ahead of print), 1–6. <https://doi.org/10.31348/2020/9>.
- (33) Rusňák, Š.; Hecová, L.; Kasl, Z.; Sobotová, M.; Hauer, L. Therapy of Uveal Melanoma A Review.

- Ceska Slov. Oftalmol. Cas. Ceske Oftalmol. Spolecnosti Slov. Oftalmol. Spolecnosti* **2020**, *77* (1), 1–13. <https://doi.org/10.31348/2020/10>.
- (34) Kim, J. H.; Shin, S.-J.; Heo, S. J.; Choe, E.-A.; Kim, C. G.; Jung, M.; Keum, K. C.; Yoon, J. S.; Lee, S. C.; Shin, S. J. Prognoses and Clinical Outcomes of Primary and Recurrent Uveal Melanoma. *Cancer Res. Treat.* **2018**, *50* (4), 1238–1251. <https://doi.org/10.4143/crt.2017.534>.
- (35) Rantala, E. S.; Hernberg, M.; Kivelä, T. T. Overall Survival after Treatment for Metastatic Uveal Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Melanoma Res.* **2019**, *29* (6), 561–568. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000575>.
- (36) Pereira, P. R.; Odashiro, A. N.; Lim, L.-A.; Miyamoto, C.; Blanco, P. L.; Odashiro, M.; Maloney, S.; De Souza, D. F.; Burnier, M. N. Current and Emerging Treatment Options for Uveal Melanoma. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **2013**, *7*, 1669–1682. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S28863>.
- (37) Gündüz, K.; Bechrakis, N. E. Exoresection and Endoresection for Uveal Melanoma. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* **2010**, *17* (3), 210–216. <https://doi.org/10.4103/0974-9233.65494>.
- (38) Dogrusöz, M.; Jager, M. J.; Damato, B. Uveal Melanoma Treatment and Prognostication. *Asia-Pac. J. Ophthalmol. Phila. Pa* **2017**, *6* (2), 186–196. <https://doi.org/10.22608/APO.201734>.
- (39) Damato, B. Ocular Treatment of Choroidal Melanoma in Relation to the Prevention of Metastatic Death - A Personal View. *Prog. Retin. Eye Res.* **2018**, *66*, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.004>.
- (40) Zahorjanová, P.; Sekáč, J.; Babál, P.; Štubňa, M. Enucleation after Stereotactic Radiosurgery in Patients with Uveal Melanoma. *Ceska Slov. Oftalmol. Cas. Ceske Oftalmol. Spolecnosti Slov. Oftalmol. Spolecnosti* **2020**, *76* (1), 46–51. <https://doi.org/10.31348/2020/6>.
- (41) Fabian, I. D.; Tomkins-Netzer, O.; Stoker, I.; Arora, A. K.; Sagoo, M. S.; Cohen, V. M. L. Secondary Enucleations for Uveal Melanoma: A 7-Year Retrospective Analysis. *Am. J. Ophthalmol.* **2015**, *160* (6), 1104–1110.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.08.034>.
- (42) Shields, C. L.; Shields, J. A.; Karlsson, U.; Markoe, A. M.; Brady, L. W. Reasons for Enucleation after Plaque Radiotherapy for Posterior Uveal Melanoma. Clinical Findings. *Ophthalmology* **1989**, *96* (6), 919–923; discussion 924. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(89\)32806-5](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(89)32806-5).
- (43) Egan, K. M.; Gragoudas, E. S.; Seddon, J. M.; Glynn, R. J.; Munzenreider, J. E.; Goitein, M.; Verhey, L.; Urie, M.; Koehler, A. The Risk of Enucleation after Proton Beam Irradiation of Uveal Melanoma. *Ophthalmology* **1989**, *96* (9), 1377–1382; discussion 1382–1383. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(89\)32738-2](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(89)32738-2).
- (44) Shields, C. L.; Naseripour, M.; Cater, J.; Shields, J. A.; Demirci, H.; Youseff, A.; Freire, J. Plaque Radiotherapy for Large Posterior Uveal Melanomas (> or =8-Mm Thick) in 354 Consecutive Patients. *Ophthalmology* **2002**, *109* (10), 1838–1849. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(02\)01181-8](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(02)01181-8).
- (45) van den Bosch, T.; Vaarwater, J.; Verdijk, R.; Muller, K.; Kiliç, E.; Paridaens, D.; de Klein, A.; Naus, N. Risk Factors Associated with Secondary Enucleation after Fractionated Stereotactic Radiotherapy in Uveal Melanoma. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **2015**, *93* (6), 555–560. <https://doi.org/10.1111/aos.12731>.
- (46) Le Guin, C. H. D.; Metz, K. A.; Lehmann, N.; Kreis, S. H.; Bornfeld, N.; Rudolf Lohmann, D.; Zeschnigk, M. Chromosome 3 Is a Valid Marker for Prognostic Testing of Biopsy Material from Uveal Melanoma Later Treated by Brachytherapy. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* **2019**, *24* (2), 134–140. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1517827>.
- (47) Buder, K.; Gesierich, A.; Gelbrich, G.; Goebeler, M. Systemic Treatment of Metastatic Uveal

- Melanoma: Review of Literature and Future Perspectives. *Cancer Med.* **2013**, 2 (5), 674–686. <https://doi.org/10.1002/cam4.133>.
- (48) Yamazaki, N.; Takenouchi, T.; Fujimoto, M.; Ihn, H.; Uchi, H.; Inozume, T.; Kiyohara, Y.; Uhara, H.; Nakagawa, K.; Furukawa, H.; Wada, H.; Noguchi, K.; Shimamoto, T.; Yokota, K. Phase 1b Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Japanese Patients with Advanced Melanoma (KEYNOTE-041). *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79 (4), 651–660. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3237-x>.
- (49) Kottschade, L. A.; McWilliams, R. R.; Markovic, S. N.; Block, M. S.; Villasboas Bisneto, J.; Pham, A. Q.; Esplin, B. L.; Dronca, R. S. The Use of Pembrolizumab for the Treatment of Metastatic Uveal Melanoma. *Melanoma Res.* **2016**, 26 (3), 300–303. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000242>.
- (50) Augsburger, J. J.; Corrêa, Z. M.; Shaikh, A. H. Effectiveness of Treatments for Metastatic Uveal Melanoma. *Am. J. Ophthalmol.* **2009**, 148 (1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2009.01.023>.
- (51) Postow, M. A.; Kuk, D.; Bogatch, K.; Carvajal, R. D. Assessment of Overall Survival from Time of Metastasis in Mucosal, Uveal, and Cutaneous Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32 (15_suppl), 9074–9074. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9074.
- (52) Diener-West, M.; Reynolds, S. M.; Agugliaro, D. J.; Caldwell, R.; Cumming, K.; Earle, J. D.; Hawkins, B. S.; Hayman, J. A.; Jaiyesimi, I.; Jampol, L. M.; Kirkwood, J. M.; Koh, W.-J.; Robertson, D. M.; Shaw, J. M.; Straatsma, B. R.; Thoma, J.; Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Development of Metastatic Disease after Enrollment in the COMS Trials for Treatment of Choroidal Melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **2005**, 123 (12), 1639–1643. <https://doi.org/10.1001/archophth.123.12.1639>.
- (53) Kaliki, S.; Shields, C. L.; Shields, J. A. Uveal Melanoma: Estimating Prognosis. *Indian J. Ophthalmol.* **2015**, 63 (2), 93–102. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.154367>.
- (54) Damato, B.; Coupland, S. E. A Reappraisal of the Significance of Largest Basal Diameter of Posterior Uveal Melanoma. *Eye Lond. Engl.* **2009**, 23 (12), 2152–2160; quiz 2161–2162. <https://doi.org/10.1038/eye.2009.235>.
- (55) AJCC Ophthalmic Oncology Task Force. International Validation of the American Joint Committee on Cancer’s 7th Edition Classification of Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol.* **2015**, 133 (4), 376–383. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.5395>.
- (56) Kivelä, T.; Kujala, E. Prognostication in Eye Cancer: The Latest Tumor, Node, Metastasis Classification and Beyond. *Eye Lond. Engl.* **2013**, 27 (2), 243–252. <https://doi.org/10.1038/eye.2012.256>.
- (57) Shields, C. L.; Kaliki, S.; Furuta, M.; Mashayekhi, A.; Shields, J. A. Clinical Spectrum and Prognosis of Uveal Melanoma Based on Age at Presentation in 8,033 Cases. *Retina Phila. Pa* **2012**, 32 (7), 1363–1372. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e31824d09a8>.
- (58) Khattak, M. A.; Fisher, R.; Hughes, P.; Gore, M.; Larkin, J. Ipilimumab Activity in Advanced Uveal Melanoma. *Melanoma Res.* **2013**, 23 (1), 79–81. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32835b554f>.
- (59) Damato, B. E.; Heimann, H.; Kalirai, H.; Coupland, S. E. Age, Survival Predictors, and Metastatic Death in Patients With Choroidal Melanoma: Tentative Evidence of a Therapeutic Effect on Survival. *JAMA Ophthalmol.* **2014**, 132 (5), 605.

- <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.77>.
- (60) van den Bosch, T.; van Beek, J. G. M.; Vaarwater, J.; Verdijk, R. M.; Naus, N. C.; Paridaens, D.; de Klein, A.; Kiliç, E. Higher Percentage of FISH-Determined Monosomy 3 and 8q Amplification in Uveal Melanoma Cells Relate to Poor Patient Prognosis. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2012**, *53* (6), 2668. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8697>.
- (61) White, V. A.; Chambers, J. D.; Courtright, P. D.; Chang, W. Y.; Horsman, D. E. Correlation of Cytogenetic Abnormalities with the Outcome of Patients with Uveal Melanoma. *Cancer* **1998**, *83* (2), 354–359.
- (62) Dogrusöz, M.; Jager, M. J. Genetic Prognostication in Uveal Melanoma. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **2018**, *96* (4), 331–347. <https://doi.org/10.1111/aos.13580>.
- (63) Prescher, G.; Bornfeld, N.; Hirche, H.; Horsthemke, B.; Jöckel, K. H.; Becher, R. Prognostic Implications of Monosomy 3 in Uveal Melanoma. *Lancet Lond. Engl.* **1996**, *347* (9010), 1222–1225. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90736-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90736-9).
- (64) Damato, B.; Dopierala, J. A.; Coupland, S. E. Genotypic Profiling of 452 Choroidal Melanomas with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2010**, *16* (24), 6083–6092. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2076>.
- (65) Shields, C. L.; Ganguly, A.; Bianciotto, C. G.; Turaka, K.; Tavallali, A.; Shields, J. A. Prognosis of Uveal Melanoma in 500 Cases Using Genetic Testing of Fine-Needle Aspiration Biopsy Specimens. *Ophthalmology* **2011**, *118* (2), 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.05.023>.
- (66) Thomas, S.; Pütter, C.; Weber, S.; Bornfeld, N.; Lohmann, D. R.; Zeschnigk, M. Prognostic Significance of Chromosome 3 Alterations Determined by Microsatellite Analysis in Uveal Melanoma: A Long-Term Follow-up Study. *Br. J. Cancer* **2012**, *106* (6), 1171–1176. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.54>.
- (67) Parrella, P.; Caballero, O. L.; Sidransky, D.; Merbs, S. L. Detection of C-Myc Amplification in Uveal Melanoma by Fluorescent in Situ Hybridization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42* (8), 1679–1684.
- (68) van Essen, T. H.; van Pelt, S. I.; Versluis, M.; Bronkhorst, I. H. G.; van Duinen, S. G.; Marinkovic, M.; Kroes, W. G. M.; Ruivenkamp, C. A. L.; Shukla, S.; de Klein, A.; Kiliç, E.; Harbour, J. W.; Luyten, G. P. M.; van der Velden, P. A.; Verdijk, R. M.; Jager, M. J. Prognostic Parameters in Uveal Melanoma and Their Association with BAP1 Expression. *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98* (12), 1738–1743. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305047>.
- (69) Carbone, M.; Yang, H.; Pass, H. I.; Krausz, T.; Testa, J. R.; Gaudino, G. BAP1 and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (3), 153–159. <https://doi.org/10.1038/nrc3459>.
- (70) Jensen, D. E.; Proctor, M.; Marquis, S. T.; Gardner, H. P.; Ha, S. I.; Chodosh, L. A.; Ishov, A. M.; Tommerup, N.; Vissing, H.; Sekido, Y.; Minna, J.; Borodovsky, A.; Schultz, D. C.; Wilkinson, K. D.; Maul, G. G.; Barlev, N.; Berger, S. L.; Prendergast, G. C.; Rauscher, F. J. BAP1: A Novel Ubiquitin Hydrolase Which Binds to the BRCA1 RING Finger and Enhances BRCA1-Mediated Cell Growth Suppression. *Oncogene* **1998**, *16* (9), 1097–1112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201861>.
- (71) Testa, J. R.; Cheung, M.; Pei, J.; Below, J. E.; Tan, Y.; Sementino, E.; Cox, N. J.; Dogan, A. U.; Pass, H. I.; Trusa, S.; Hesdorffer, M.; Nasu, M.; Powers, A.; Rivera, Z.; Comertpay, S.; Tanji, M.; Gaudino, G.; Yang, H.; Carbone, M. Germline BAP1 Mutations Predispose to Malignant Mesothelioma. *Nat. Genet.* **2011**, *43* (10), 1022–1025. <https://doi.org/10.1038/ng.912>.
- (72) Koopmans, A. E.; Verdijk, R. M.; Brouwer, R. W. W.; van den Bosch, T. P. P.; van den Berg, M. M. P.; Vaarwater, J.; Kockx, C. E. M.; Paridaens, D.; Naus, N. C.; Nellist, M.; van IJcken, W. F. J.; Kiliç,

- E.; de Klein, A. Clinical Significance of Immunohistochemistry for Detection of BAP1 Mutations in Uveal Melanoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **2014**, *27* (10), 1321–1330. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.43>.
- (73) Aoude, L. G.; Vajdic, C. M.; Krickler, A.; Armstrong, B.; Hayward, N. K. Prevalence of Germline BAP1 Mutation in a Population-Based Sample of Uveal Melanoma Cases. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2013**, *26* (2), 278–279. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12046>.
- (74) Laurent, C.; Gentien, D.; Piperno-Neumann, S.; Némati, F.; Nicolas, A.; Tesson, B.; Desjardins, L.; Mariani, P.; Rapinat, A.; Sastre-Garau, X.; Couturier, J.; Hupé, P.; de Koning, L.; Dubois, T.; Roman-Roman, S.; Stern, M.-H.; Barillot, E.; Harbour, J. W.; Saule, S.; Decaudin, D. Patient-Derived Xenografts Recapitulate Molecular Features of Human Uveal Melanomas. *Mol. Oncol.* **2013**, *7* (3), 625–636. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.004>.
- (75) Yang, F.; Shao, C.; Vedanarayanan, V.; Ehrlich, M. Cytogenetic and Immuno-FISH Analysis of the 4q Subtelomeric Region, Which Is Associated with Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Chromosoma* **2004**, *112* (7), 350–359. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0280-x>.
- (76) Maaßen, T.; Vardanyan, S.; Brosig, A.; Merz, H.; Ranjbar, M.; Kakkassery, V.; Grisanti, S.; Tura, A. Monosomy-3 Alters the Expression Profile of the Glucose Transporters GLUT1-3 in Uveal Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249345>.
- (77) Reichard, K. K.; Hall, B. K.; Corn, A.; Foucar, M. K.; Hozier, J. Automated Analysis of Fluorescence in Situ Hybridization on Fixed, Paraffin-Embedded Whole Tissue Sections in B-Cell Lymphoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **2006**, *19* (8), 1027–1033. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800630>.
- (78) Andersen, C. L.; Hostetter, G.; Grigoryan, A.; Sauter, G.; Kallioniemi, A. Improved Procedure for Fluorescence in Situ Hybridization on Tissue Microarrays. *Cytometry* **2001**, *45* (2), 83–86. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20011001\)45:2<83::aid-cyto1149>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20011001)45:2<83::aid-cyto1149>3.0.co;2-p).
- (79) Eleuteri, A.; Damato, B.; Coupland, S. E.; Taktak, A. F. G. Enhancing Survival Prognostication in Patients with Choroidal Melanoma by Integrating Pathologic, Clinical and Genetic Predictors of Metastasis. *Int. J. Biomed. Eng. Technol.* **2012**, *8* (1), 18. <https://doi.org/10.1504/IJBET.2012.045355>.
- (80) DeParis, S. W.; Taktak, A.; Eleuteri, A.; Enanoria, W.; Heimann, H.; Coupland, S. E.; Damato, B. External Validation of the Liverpool Uveal Melanoma Prognosticator Online. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2016**, *57* (14), 6116. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19654>.
- (81) Sisley, K.; Rennie, I. G.; Parsons, M. A.; Jacques, R.; Hammond, D. W.; Bell, S. M.; Potter, A. M.; Rees, R. C. Abnormalities of Chromosomes 3 and 8 in Posterior Uveal Melanoma Correlate with Prognosis. *Genes. Chromosomes Cancer* **1997**, *19* (1), 22–28. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(199705\)19:1<22::aid-gcc4>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(199705)19:1<22::aid-gcc4>3.0.co;2-2).
- (82) Salvi, S. M.; Aziz, H. A.; Dar, S.; Singh, N.; Hayden-Loreck, B.; Singh, A. D. Uveal Melanoma Regression after Brachytherapy: Relationship with Chromosome 3 Monosomy Status. *Ocul. Oncol. Pathol.* **2017**, *3* (2), 87–94. <https://doi.org/10.1159/000451001>.
- (83) Sorour, O. A.; Mignano, J. E.; Duker, J. S. Gamma Knife Radiosurgery for Locally Recurrent Choroidal Melanoma Following Plaque Radiotherapy. *Int. J. Retina Vitre.* **2018**, *4*, 23. <https://doi.org/10.1186/s40942-018-0123-1>.
- (84) Robertson, A. G.; Shih, J.; Yau, C.; Gibb, E. A.; Oba, J.; Mungall, K. L.; Hess, J. M.; Uzunangelov, V.; Walter, V.; Danilova, L.; Lichtenberg, T. M.; Kucherlapati, M.; Kimes, P. K.; Tang, M.; Penson, A.; Babur, O.; Akbani, R.; Bristow, C. A.; Hoadley, K. A.; Iype, L.; Chang, M. T.; TCGA Research

- Network; Cherniack, A. D.; Benz, C.; Mills, G. B.; Verhaak, R. G. W.; Griewank, K. G.; Felau, I.; Zenklusen, J. C.; Gershenwald, J. E.; Schoenfield, L.; Lazar, A. J.; Abdel-Rahman, M. H.; Roman-Roman, S.; Stern, M.-H.; Cebulla, C. M.; Williams, M. D.; Jager, M. J.; Coupland, S. E.; Esmali, B.; Kandoth, C.; Woodman, S. E. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **2017**, *32* (2), 204-220.e15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.003>.
- (85) Dogrusöz, M.; Ruschel Trasel, A.; Cao, J.; Çolak, S.; van Pelt, S. I.; Kroes, W. G. M.; Teunisse, A. F. A. S.; Alsafadi, S.; van Duinen, S. G.; Luyten, G. P. M.; van der Velden, P. A.; Amaro, A.; Pfeffer, U.; Jochemsen, A. G.; Jager, M. J. Differential Expression of DNA Repair Genes in Prognostically-Favorable versus Unfavorable Uveal Melanoma. *Cancers* **2019**, *11* (8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081104>.
- (86) Mehmet, H.; Edwards, A. D. Hypoxia, Ischaemia, and Apoptosis. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **1996**, *75* (2), F73-75. <https://doi.org/10.1136/fn.75.2.f73>.
- (87) Gregory, C. D.; Pound, J. D. Cell Death in the Neighbourhood: Direct Microenvironmental Effects of Apoptosis in Normal and Neoplastic Tissues: Cell Death in the Neighbourhood. *J. Pathol.* **2011**, *223* (2), 178–195. <https://doi.org/10.1002/path.2792>.
- (88) Mirzayans, R.; Murray, D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239090>.
- (89) Kockx, M. M.; Muhring, J.; Knaapen, M. W.; de Meyer, G. R. RNA Synthesis and Splicing Interferes with DNA in Situ End Labeling Techniques Used to Detect Apoptosis. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152* (4), 885–888.
- (90) Bott, M.; Brevet, M.; Taylor, B. S.; Shimizu, S.; Ito, T.; Wang, L.; Creaney, J.; Lake, R. A.; Zakowski, M. F.; Reva, B.; Sander, C.; Delsite, R.; Powell, S.; Zhou, Q.; Shen, R.; Olshen, A.; Rusch, V.; Ladanyi, M. The Nuclear Deubiquitinase BAP1 Is Commonly Inactivated by Somatic Mutations and 3p21.1 Losses in Malignant Pleural Mesothelioma. *Nat. Genet.* **2011**, *43* (7), 668–672. <https://doi.org/10.1038/ng.855>.
- (91) Guo, G.; Gui, Y.; Gao, S.; Tang, A.; Hu, X.; Huang, Y.; Jia, W.; Li, Z.; He, M.; Sun, L.; Song, P.; Sun, X.; Zhao, X.; Yang, S.; Liang, C.; Wan, S.; Zhou, F.; Chen, C.; Zhu, J.; Li, X.; Jian, M.; Zhou, L.; Ye, R.; Huang, P.; Chen, J.; Jiang, T.; Liu, X.; Wang, Y.; Zou, J.; Jiang, Z.; Wu, R.; Wu, S.; Fan, F.; Zhang, Z.; Liu, L.; Yang, R.; Liu, X.; Wu, H.; Yin, W.; Zhao, X.; Liu, Y.; Peng, H.; Jiang, B.; Feng, Q.; Li, C.; Xie, J.; Lu, J.; Kristiansen, K.; Li, Y.; Zhang, X.; Li, S.; Wang, J.; Yang, H.; Cai, Z.; Wang, J. Frequent Mutations of Genes Encoding Ubiquitin-Mediated Proteolysis Pathway Components in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Nat. Genet.* **2011**, *44* (1), 17–19. <https://doi.org/10.1038/ng.1014>.
- (92) Jiao, Y.; Pawlik, T. M.; Anders, R. A.; Selaru, F. M.; Streppel, M. M.; Lucas, D. J.; Niknafs, N.; Guthrie, V. B.; Maitra, A.; Argani, P.; Offerhaus, G. J. A.; Roa, J. C.; Roberts, L. R.; Gores, G. J.; Popescu, I.; Alexandrescu, S. T.; Dima, S.; Fassan, M.; Simbolo, M.; Mafficini, A.; Capelli, P.; Lawlor, R. T.; Ruzzenente, A.; Guglielmi, A.; Tortora, G.; de Braud, F.; Scarpa, A.; Jarnagin, W.; Klimstra, D.; Karchin, R.; Velculescu, V. E.; Hruban, R. H.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W.; Papadopoulos, N.; Wood, L. D. Exome Sequencing Identifies Frequent Inactivating Mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in Intrahepatic Cholangiocarcinomas. *Nat. Genet.* **2013**, *45* (12), 1470–1473. <https://doi.org/10.1038/ng.2813>.
- (93) Gupta, M. P.; Lane, A. M.; DeAngelis, M. M.; Mayne, K.; Crabtree, M.; Gragoudas, E. S.; Kim, I. K. Clinical Characteristics of Uveal Melanoma in Patients With Germline BAP1 Mutations. *JAMA Ophthalmol.* **2015**, *133* (8), 881. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.1119>.

- (94) Logani, S.; Cho, A. S.; Ali, B. H.; Withers, H. R.; McBride, W. H.; Kozlov, K. L.; Hall, M. O.; Lee, D. A.; Straatsma, B. R. Single-Dose Compared with Fractionated-Dose Radiation of the OM431 Choroidal Melanoma Cell Line. *Am. J. Ophthalmol.* **1995**, *120* (4), 506–510. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(14\)72665-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(14)72665-0).
- (95) van den Aardweg, G. J. M. J.; Kiliç, E.; de Klein, A.; Luyten, G. P. M. Dose Fractionation Effects in Primary and Metastatic Human Uveal Melanoma Cell Lines. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44* (11), 4660–4664. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0151>.
- (96) Dogrusöz, M.; Kroes, W. G. M.; van Duinen, S. G.; Creutzberg, C. L.; Versluis, M.; Bleeker, J. C.; Marinkovic, M.; Luyten, G. P. M.; Jager, M. J. Radiation Treatment Affects Chromosome Testing in Uveal Melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56* (10), 5956–5964. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17092>.
- (97) Hornsby, P. J.; Didenko, V. V. In Situ Ligation: A Decade and a Half of Experience. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2011**, *682*, 49–63. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_5.
- (98) Lankinen, M. H.; Vilpo, L. M.; Vilpo, J. A. UV- and Gamma-Irradiation-Induced DNA Single-Strand Breaks and Their Repair in Human Blood Granulocytes and Lymphocytes. *Mutat. Res.* **1996**, *352* (1–2), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00172-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00172-7).
- (99) Tura, A.; Merz, H.; Reinsberg, M.; Lüke, M.; Jager, M. J.; Grisanti, S.; Lüke, J. Analysis of Monosomy-3 in Immunomagnetically Isolated Circulating Melanoma Cells in Uveal Melanoma Patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2016**, *29* (5), 583–589. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12507>.
- (100) McCannel, T. A.; Reddy, S.; Burgess, B. L.; Auerbach, M. Association of Positive Dual-Modality Positron Emission Tomography/Computed Tomography Imaging of Primary Choroidal Melanoma with Chromosome 3 Loss and Tumor Size. *Retina Phila. Pa* **2010**, *30* (1), 146–151. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181b32f36>.
- (101) Papastefanou, V. P.; Islam, S.; Szyszko, T.; Grantham, M.; Sagoo, M. S.; Cohen, V. M. L. Metabolic Activity of Primary Uveal Melanoma on PET/CT Scan and Its Relationship with Monosomy 3 and Other Prognostic Factors. *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98* (12), 1659–1665. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305304>.
- (102) Tura, A.; Thieme, C.; Brosig, A.; Merz, H.; Ranjbar, M.; Vardanyan, S.; Zuo, H.; Maassen, T.; Kakkassery, V.; Grisanti, S. Lower Levels of Adiponectin and Its Receptor Adipor1 in the Uveal Melanomas With Monosomy-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2020**, *61* (5), 12. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.5.12>.
- (103) Correll, C. C.; Bartek, J.; Dunder, M. The Nucleolus: A Multiphase Condensate Balancing Ribosome Synthesis and Translational Capacity in Health, Aging and Ribosomopathies. *Cells* **2019**, *8* (8). <https://doi.org/10.3390/cells8080869>.
- (104) Vardanyan, S.; Brosig, A.; Merz, H.; Ranjbar, M.; Kakkassery, V.; Grisanti, S.; Tura, A. Metastasis of Uveal Melanoma with Monosomy-3 Is Associated with a Less Glycogenetic Gene Expression Profile and the Dysregulation of Glycogen Storage. *Cancers* **2020**, *12* (8). <https://doi.org/10.3390/cancers12082101>.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
a.E.	Arbiträre Einheiten
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BAP1	BRCA1 associated protein-1
BRCA1	breast cancer type 1 susceptibility protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CEP	centromere enumeration probes
cm ²	Quadratcentimeter
CMC	zirkulierende Melanomzellen
CT	Computertomographie
Cy5	Cyanine5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA Damage Response
DNA	desoxyribonucleic acid
dpt	Dioptrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal
FISH	Fluoreszenz-In situ-Hybridisierung
g	Gramm
GLUT	Glucosetransporters 1

GTD	größter Tumordurchmesser
Gy	Gray
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish Peroxidase
HMB45	Human Melanoma Black
IgG	Immunoglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LINAC	Linearbeschleuniger
M	Molar
Max	Maximum
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7
Melan-A	Melanozyten-Antigen
Min	Minimum
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Potential des Wasserstoffs
PRKDC	Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit
SA	Standardabweichung
SF3B1	Splicing factor 3B subunit 1
SSC	Salzlösung-Natriumcitrat
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TTT	transpupilläre Thermotherapie
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UCH	Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase
UTP	uridine triphosphate
WDR48	WD40 repeat protein 48
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei dem Direktor der Klinik für Augenheilkunde der Universität zu Lübeck Herrn Prof. Dr. Grisanti dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit habe, an diesem spannenden Thema teilnehmen zu können.

Dann möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Aysegül Tura danken. Unter ihrer Anleitung und Hilfe war ich in der Lage, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen. Ihr reiches Fachwissen und ihre Geduldigkeit haben mir viel Kraft gebracht. Bei ihr habe ich ein konkreteres Verständnis von Wissenschaft bekommen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Christine Örün bedanken. Sie war diejenige, die mich zu meinen ersten Schritten im Labor geführt hat.

Einen weiteren Dank möchte ich auch an meiner Freundin Johanna Neitmann richten, die sich viel Mühe für die sprachliche Korrektur meiner Arbeit gegeben hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer die größte Unterstützung für mich waren und mir ermöglicht haben, meine Arbeit ohne Sorgen zu verfolgen.

Lebenslauf

Yingda Zhu



Persönliche Angaben

Name: Yingda Zhu
Geburtsdatum und –ort: 21.12.1994 in Huangshi, China(VR)
Staatsangehörigkeit: chinesisch

Ausbildung

09/2013 bis 09/2014 Studium der Humanmedizin an der Huazhong
Universität für Wissenschaft und Technologie
10/2014 bis 11/2020 Studium der Humanmedizin an der
Universität zu Lübeck
11/2020 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und
Approbation als Ärztin

Wissenschaftliche Karriere

12/2018 bis jetzt Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat.
Aysegül Tura, Klinik für Augenheilkunde,
Universität zu Lübeck

Beruflicher Werdegang

04/2021 bis jetzt Assistenzärztin der Augenheilkunde an der
Augenarztpraxis Dr. med. Jörg Fischer und Dr.
med. Serife Citak