

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik für Hautkrankheiten

-Direktor: Univ. –Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. A. Luger-

# **PACE4-Expression in Uveamelanomen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Plachouri, Kerasia-Maria

aus Cholargos Attikis, Griechenland

-2017-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Böhm

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Theodosios Bisdas

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Hautkrankheiten  
-Direktor: Univ. –Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. A. Luger-

Referent: Prof. Dr. Markus Böhm  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Theodosios Bisdas

**ZUSAMMENFASSUNG:**

PACE4-Expression in Uveamelanomen  
Plachouri, Kerasia-Maria

Zum besseren Verständnis der pathogenetischen Mechanismen des Uveamelanoms, mit dem Ziel der Entwicklung von wirksamen Therapieoptionen, wurde die Rolle der Proproteinkonvertase PACE4 bei diesen Tumoren untersucht. PACE4 ist ein Protein, welches bei der Prozessierung von Vorläuferproteinen beteiligt ist. Es spielt eine wichtige Rolle sowohl bei normalen Zellfunktionen als auch bei der Onkogenese in diversen Tumoren, inklusiv kutanen Melanomen.

Es wurden 34 enukleierte Uveamelanome mittels Immunhistochemie auf die Expression von PACE4 untersucht. Die PACE4 Expression wurde mit histopathologischen Charakteristika der Tumoren, wie der Tumorzellmorphologie, der Tumorlokalisation, dem Vorhandensein von Nekrosen und Mitosen, der Beteiligung des Ziliarkörpers und der extraokulären Beteiligung und mit dem klinischen Verlauf der Patienten, insbesondere der Metastasierung, korreliert. Es wurde gezeigt, dass PACE4 bei den Uveamelanomen, zum Teil mit großen quantitativen Unterschieden und verschiedenen Expressionsmustern, exprimiert wird. Eine Korrelation der PACE4-Expression mit den histopathologischen Parametern oder dem klinischen Verlauf wurde nicht gesehen. Entsprechend ist eine prognostische Aussage aufgrund der PACE4-Expression nicht zu treffen.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2017

# ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

## **PACE4-Expression in Uveamelanomen**

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

**Universitätsklinikum Münster**

**Klinik für Hautkrankheiten**

unter der Anleitung von:

**Prof. Dr. Markus Böhm und Dr. Carsten Weishaupt**

1. selbständig angefertigt
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name, Unterschrift

From the University Clinic of Münster  
Department of Dermatology  
-Director: Univ. –Prof. Dr. med. Dr. h. c. T. A. Luger-

Censor: Prof. Dr. Markus Böhm  
Cosensor: Priv.-Doz. Dr. Theodosios Bisdas

**Summary:**

PACE4 expression in uveal melanoma  
Plachouri, Kerasia-Maria

In order to better understand the pathogenetic mechanisms of uveal melanoma, with the purpose to develop new and effective therapies, the role of proproteinconvertase PACE4 in these tumors was examined. PACE4 is a protein which is involved in the processing of precursor proteins and plays an important part in cellular homeostasis as well as in the oncogenesis of various tumors, including cutaneous melanoma.

In a first step it was examined whether or not PACE4 was expressed in 34 enucleated uveal melanomas by immunohistochemical staining. Then the expression of PACE4 was correlated with several histopathological characteristics of uveal melanoma, such as the morphology of tumor cells, the localisation of the tumor, necrosis and mitoses, the involvement of the ciliary body and extraocular involvement, as well as with the clinical course and especially with the development of metastatic disease. PACE4 expression in uveal melanomas showed significant variation in quantity and different expression-patterns between the tumors. However, PACE4 expression did not correlate with any of the histopathological criteria nor was it associated with the development of metastases. Therefore, these findings do not implicate a role in uveal melanoma pathogenesis. As PACE4 expression did not correlate with clinical course, a prognostic relevance of PACE4 expression cannot be assumed.

*Για τον πατέρα μου*

# Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	i
II. Abkürzungsverzeichnis.....	iii
III. Abbildungsverzeichnis.....	v
IV. Tabellenverzeichnis.....	vi
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Grundlegende Anatomie des menschlichen Auges.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Histopathologie der Aderhaut .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Uveamelanom .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 Epidemiologie.....	7
1.3.2 Histopathologie des Uveamelanoms.....	8
1.3.3 Pathogenese des Uveamelanoms .....	12
1.3.4 Prognostische Faktoren.....	16
1.3.5 Therapiemöglichkeiten .....	20
<b>1.4 Prohormonkonvertasen .....</b>	<b>23</b>
1.4.1 Entdeckung und Definition.....	23
1.4.2 Struktur .....	25
1.4.3 Gewebe- und Zellverteilung .....	26
1.4.4 Rolle der Prohormonkonvertasen bei der malignen Transformation, Tumorprogression und Metastasierung.....	30
1.4.5 Prohormonkonvertasen beim malignen Melanom.....	33
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>34</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Patientenkollektiv und histologisches Material .....	35
2.1.2 Verwendete Antikörper .....	35
2.1.3 Kontrolle-Gewebe .....	36
2.1.4 Liste der verwendeten Materialien .....	36
2.1.5 Häufig verwendete Software .....	37
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.2.1 Immunhistochemie-Prinzip.....	38
2.2.2 Vorbereitung des histologischen Materials.....	38
2.2.3 Erarbeitung der Färbeprotokolle.....	38
2.2.4 Färbeprotokoll PCSK6/ PACE4 .....	39
2.2.5 Quantifizierung.....	40
2.2.6 Erhebung der klinischen Daten.....	42
2.2.7 Statistische Analyse.....	43
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Histopathologische Befundung.....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Morphologie: Spindelzell-, Epitheloidzell- oder gemischtzellige Melanome .....	45
3.1.2 Mitosen pro 10 HPF .....	46
3.1.3 Nekrosen.....	47



3.1.4	Extraokuläre Beteiligung.....	48
3.1.5	Lokalisation im Verhältnis zum Äquator .....	49
3.1.6	Lokalisation des Primarius: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut .....	50
3.1.7	Sekundäre Infiltration des Ziliarkörpers .....	51
<b>3.2</b>	<b>Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von PCSK6/PACE4 .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von PACE4... 53</b>	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>Korrelation der PACE4-Expression mit histopathologischen Charakteristika der Uveamelanome.....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Korrelation mit Morphologie (Spindelzellmelanome, Epitheloidzell- oder gemischtzellige Melanome) .....	57
3.4.2	Korrelation mit Mitosen pro 10 HPF .....	58
3.4.3	Korrelation mit Nekrosen .....	59
3.4.4	Korrelation mit Extraokulärer Beteiligung .....	60
3.4.5	Korrelation mit Lokalisation in Referenz zum Äquator (Vorderer/Hinterer Augenabschnitt) .....	61
3.4.6	Korrelation mit Lokalisation: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut .....	62
3.4.7	Korrelation mit Ziliarkörperinfiltration .....	63
3.4.8	Korrelation mit Metastasierung .....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

AFIP	<i>Armed Forces Institute of Pathology</i>
BAP1	<i>BRCA1-associated protein-1</i>
BARD1	<i>BRCA1-associated Ring domain protein 1</i>
BRAF	<i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf protooncogene</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
Ca	<i>Carcinoma</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
GNA11	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11</i>
GNAQ	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha</i>
HCFC1	<i>Host Cell Factor C1</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	<i>High Power Field</i>
HSPG	Heparansulfatproteoglykanen
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
kDa	Kilo-Dalton
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LZTS1	<i>Leucin Zipper Tumorsuppressor-1</i>

MC1R	<i>Melanocortin-1 receptor</i>
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MT1-MMP	<i>Membrane type 1-matrix metalloproteinase</i>
MT2-MMP	<i>Membrane type 2-matrix metalloproteinase</i>
NARC-1	<i>Neural apoptosis-regulated convertase-1</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
ONH	<i>Optic nerve head</i>
PACE4	<i>Paired basic amino acid cleaving enzyme 4</i>
PC	Proteinkonvertase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin-kexin 9
PDT	Photodynamische Therapie
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PTEN	<i>Tumorsuppressorgen Phosphatase und Tensin Homolog</i>
SCC	Spinozelluläres Karzinom
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SKI-1	Subtilisin-Kexin Isozym 1
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TTT	Transpupilläre Thermotherapie
UCH	Ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase
UKM	Universitätsklinikum Münster
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

### III. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Aufbau des menschlichen Auges
- Abb. 2:** Model der Aderhaut
- Abb. 3:** Aderhautgefäße
- Abb. 4:** Histologische Darstellung der Retina und Chorioidea
- Abb. 5:** Schematische Darstellung der Bruch-Membran
- Abb. 6:** Spindelzelliges Uveamelanom
- Abb. 7:** Epitheloidzelliges Uveamelanom
- Abb. 8:** Uveamelanom, Gemischter Zelltyp
- Abb. 9:** Primäre Struktur der Proproteinkonvertasen
- Abb. 10:** Morphologische Kategorisierung der Uveamelanome mit Angabe der Häufigkeit
- Abb. 11:** Anzahl der Mitosen im Uveamelanom pro 10 HPF
- Abb. 12:** Anzahl der Präparate mit Nekrosen
- Abb. 13:** Anteil der Uveamelanome mit oder ohne extraokuläre Beteiligung
- Abb. 14:** Lokalisation im Verhältnis zum Äquator
- Abb. 15:** Lokalisation der Uveamelanome: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut
- Abb. 16:** Anteil der Uveamelanome mit Ziliarkörperinfiltration
- Abb. 17A-D:** Exemplarische Beispiele der Kontrollfärbungen für PACE4
- Abb. 18A-C:** Beispiele des Färbemusters der PACE4-Expression
- Abb. 19A-I:** PACE4-Färbung von Uveamelanomen
- Abb. 20:** Prozentuale Expression von PACE4 bezogen auf die Präparatfläche
- Abb. 21:** Korrelation der PACE4-Expression mit Zellenmorphologie

- Abb. 22:** Korrelation mit Mitosen pro 10 HPF
- Abb. 23:** Korrelation der PACE4-Expression mit Nekrosen
- Abb. 24:** Korrelation der PACE4-Expression mit extraokulärer Beteiligung
- Abb. 25:** Korrelation mit Lokalisation im Referenz zum Äquator (Vorderer/Hinterer Augenabschnitt)
- Abb. 26:** Korrelation mit Lokalisation: Ziliarkörper, Iris, oder Aderhaut
- Abb. 27:** Korrelation mit Ziliarkörperinfiltration
- Abb. 28:** Korrelation mit Metastasierung

## **IV. Tabellenverzeichnis**

- Tab. 1:** TNM-Klassifikation des Uveamelanoms
- Tab. 2:** Liste der verwendeten Materialien
- Tab. 3:** Häufig verwendete Software
- Tab. 4:** Quantifizierung der PACE4-Expression

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlegende Anatomie des menschlichen Auges

Der Augapfel (Bulbus oculi) befindet sich in der Augenhöhle des Schädels (Orbita), wo er vor Verletzungen geschützt und von den Augenmuskeln bewegt wird. Die Anhangsgebilde des Auges bestehen aus den Augenmuskeln, Faszien der Orbita, Augenbrauen, Augenlidern, der Bindehaut und dem Tränenapparat (Graumann, 2004).

Das Auge wird von drei Schichten gebildet (Abb.1). Die äußere Augenhaut besteht aus der Hornhaut (Cornea) und der Lederhaut (Sklera). Im vorderen Augenabschnitt ist sie von der Bindehaut (Conjunctiva) bedeckt. Die mittlere Augenhaut (Uvea) besteht aus der gefäßreichen Aderhaut (Choroidea), aus dem Ziliarkörper und aus der Iris. Die innere Augenhaut wird von der Netzhaut (Retina) gebildet (Pol, 2014).

### Der vordere Augenabschnitt:

Der Teil des Auges, der für den Betrachter sichtbar ist, wird als das vordere Segment des Auges bezeichnet. Die meisten Strukturen, die zur Fokussierung von Bildern auf der Retina des Auges verantwortlich sind, befinden sich hier. Die Hornhaut ist die Hauptfokussierungsstruktur und stellt ca. 75% der Brechkraft des Auges dar. Die Linse bietet die verbleibende variable Fokussierungsleistung an, und dient dazu, weiter den Fokus zu verfeinern, so dass das Auge Objekte in unterschiedlichen Entfernungen erfassen kann. Die Iris kontrolliert den Lichteinfall ins Auge durch Einstellung der Pupillengröße. Die Iris ist eine Erweiterung des Ziliarkörpers. Dieser erfüllt mehrere Funktionen im vorderen Augenabschnitt, z. B. die Produktion der Flüssigkeit, die den vorderen Abschnitt (Kammerwasser, Humor aquosus) zur Aufhängung und Steuerung der Form der kristallinen Linse des Auges füllt (Pol, 2014).

### *Die Hornhaut:*

Die Hornhaut ist ein einzigartiges Gewebe, welches für Licht transparent ist und keine Blutgefäße enthält. Diese kleine transparente Kuppel im vorderen Teil des Auges ist etwa 11 mm groß im Durchmesser und 500 µm dick in der Mitte. In der Peripherie kann die Dicke bis 700 µm erreichen. Ganz am Rand der Hornhaut ist die Transparenz graduell über einen 1-mm Bereich verringert, ein Gebiet, das als "Limbus" bezeichnet wird, und wo sich die Hornhaut in die opake Lederhaut integriert. Ca. 90% der Hornhaut besteht aus gleichmäßig angeordneten Kollagenfibrillen. Diese Schicht wird "Stroma" genannt und bietet nicht nur Transparenz, sondern auch Festigkeit. Vier Schichten bilden die restlichen 10% der Hornhaut: Das Epithel

und die Bowman-Schicht auf der Vorderseite der Hornhaut, die Descemet-Membran und das Endothel an der Rückseite der Hornhaut (Pol, 2014).

#### *Das Kammerwasser:*

Die vordere Augenkammer ist der Raum zwischen der Hornhaut und der vorderen Oberfläche der Linse. Sie ist mit einer Flüssigkeit gefüllt, die vom Ziliarkörper produziert wird und als Kammerwasser bezeichnet wird. Das Kammerwasser gelangt vom Ziliarkörper über die Pupille in die vordere Augenkammer und hat zwei Funktionen: Einerseits liefert es Nährstoffe an die Hornhaut und andererseits stellt es einen Teil des optischen Wegs des Auges dar (Pol, 2014).

#### *Die Iris:*

Die Iris ist durch die Hornhaut sichtbar. Sie ist die Struktur, die dem Auge seine Farbe gibt. Jede Iris hat eine hintere Schicht, die dunkel pigmentiert ist. Es ist die Menge an Pigment in der vorderen Schicht, die unterschiedliche Farben erzeugt. Der Hauptzweck der Iris ist es, die Menge des in das Auge eintretenden Lichts zu regulieren. Es gibt zwei gegenüberliegende Muskeln in der Iris: die Schließmuskeln, die zur Pupillen-Konstriktion dienen, und die Dilatatoren, die zur Dilatation der Pupille dienen (Pol, 2014).

#### *Die Augenlinse und der Ziliarmuskel:*

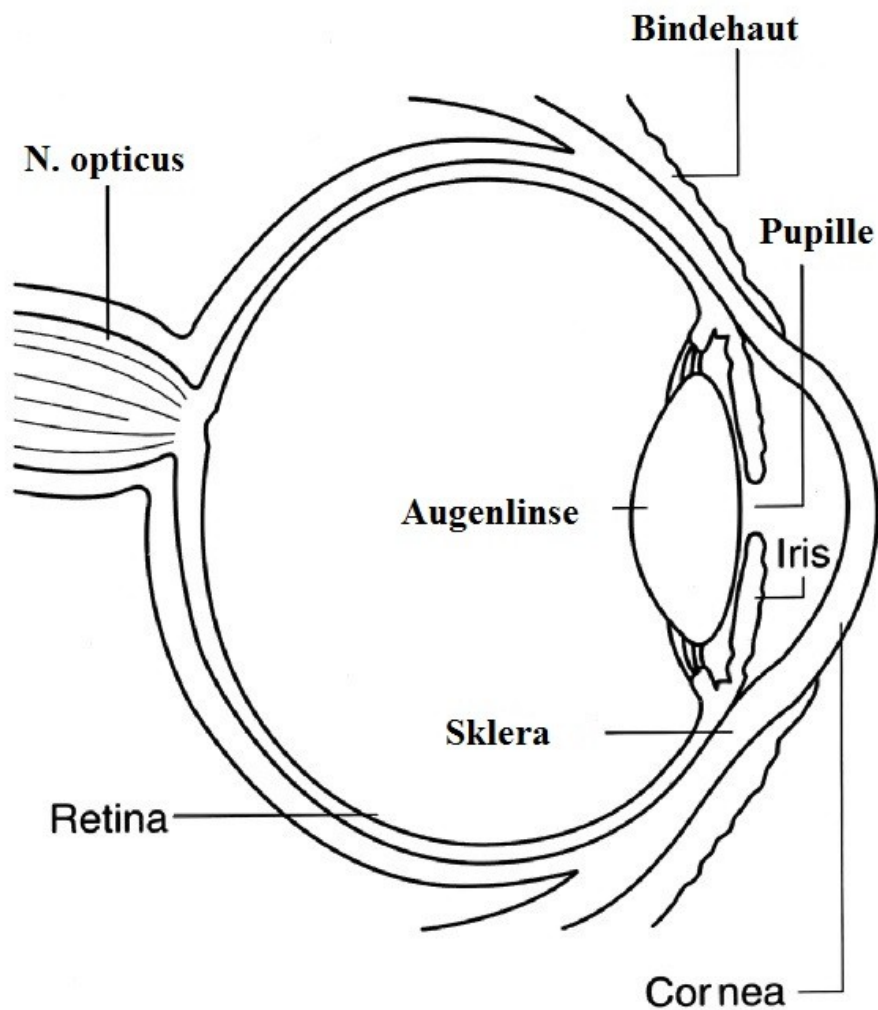
Die Augenlinse ist genau wie die Hornhaut auch eine transparente Struktur. Im Gegensatz zu der Hornhaut hat sie die Fähigkeit ihre Form zu ändern, um die Brechkraft des Auges zu regulieren. Die Linse wird von einer elastischen extrazellulären Matrix, der so genannten "Kapsel", umgeben. Die Kapsel bietet sowohl eine glatte optische Oberfläche als auch einen Anker für die Aufhängung der Linse innerhalb des Auges (Pol, 2014).

#### Der hintere Augenabschnitt:

Die Netzhaut kleidet den hinteren Abschnitt des Bulbus aus. Sie ist ein transparentes dünnes Gewebe, das dazu dient, die Photonen des Lichts zu erfassen und die Verarbeitung des Bildes zu initiieren. Die durchschnittliche Dicke der Netzhaut ist 250 µm und sie besteht aus 10 Schichten. Es gibt zwei Arten von Rezeptoren in der Netzhaut, die Stäbchen und die Zapfen. Die Zapfen bieten die Möglichkeit, Farben zu erkennen und die Fähigkeit, feine Details zu unterscheiden. Sie sind in der zentralen Netzhaut lokalisiert. Die Stäbchen sind vor allem für das periphere Sehen, insbesondere auch das Sehen bei Dunkelheit verantwortlich. Sie sind

häufiger in der Peripherie der Netzhaut anzutreffen. In der Macula lutea, dem dorsalsten Punkt der Netzhaut wird das Licht fokussiert (Pol, 2014).

Der hintere Augenabschnitt wird vom Glaskörper ausgefüllt. Seine Funktion liegt in der Lichtbrechung. Der Glaskörper besteht aus Kollagenfibrillen in einem Netzwerk von Hyaluronsäure und ist ein klares Gel. Der Glaskörper liegt locker an der Netzhaut, dem Sehnervenkopf und der Makula und ist fest mit der Netzhaut an der Ora serrata befestigt (Pol, 2014).



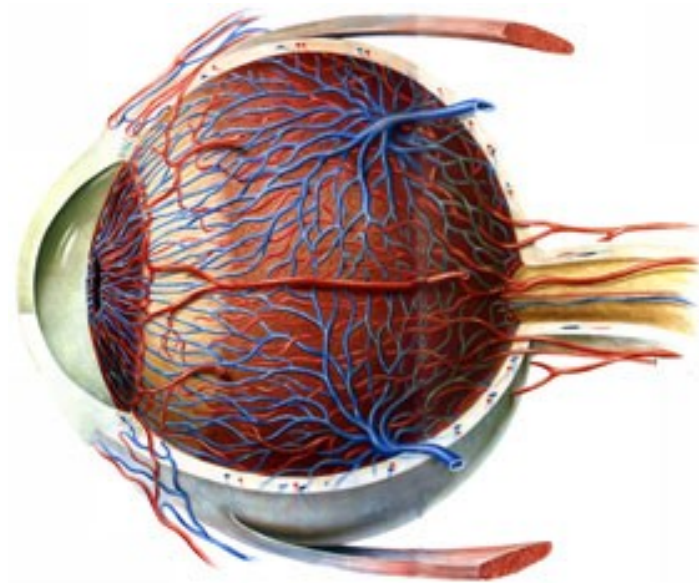
**Abb. 1:** Aufbau des menschlichen Auges (nach Erlaubnis von National Eye Institut, NEI <https://nei.nih.gov/photo/anatomy-of-eye>)



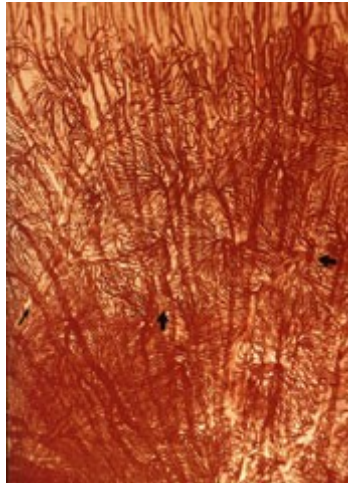
## 1.2 Histopathologie der Aderhaut

Die Aderhaut (Chorioidea) ist der größte Abschnitt der mittleren Augenhaut und bildet die Mittelschicht zwischen der Netzhaut (Retina) und der Sklera in der hinteren Hälfte des Augapfels. Die Aderhaut liefert Sauerstoff und Nahrung zu den äußeren Schichten der Netzhaut. Zusammen mit dem Ziliarkörper und der Iris, bildet die Aderhaut die Uvea (Graumann, 2004).

Die Aderhaut (Abb. 2, 3) dient der äußeren Blutversorgung des Auges und wird vorwiegend von den hinteren kurzen Ziliararterien versorgt. Die zu- und abführenden Blutgefäße treten durch die Sklera in das Auge ein (Graumann, 2004).

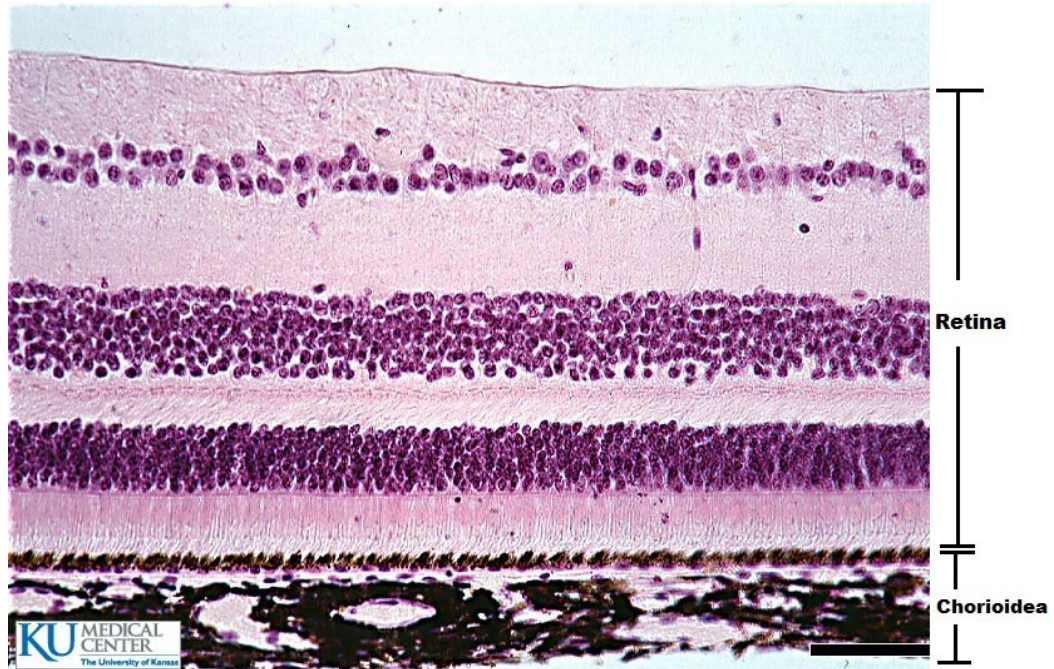


**Abb. 2:** Model der Aderhaut (Nach Erlaubnis vom ‘‘Initiativkreis zur Glaukomfrüherkennung‘‘, <http://www.glaukom.de/glaukom-wissen-und-vorbeugen/anatomie-und-funktion-des-auges/>)



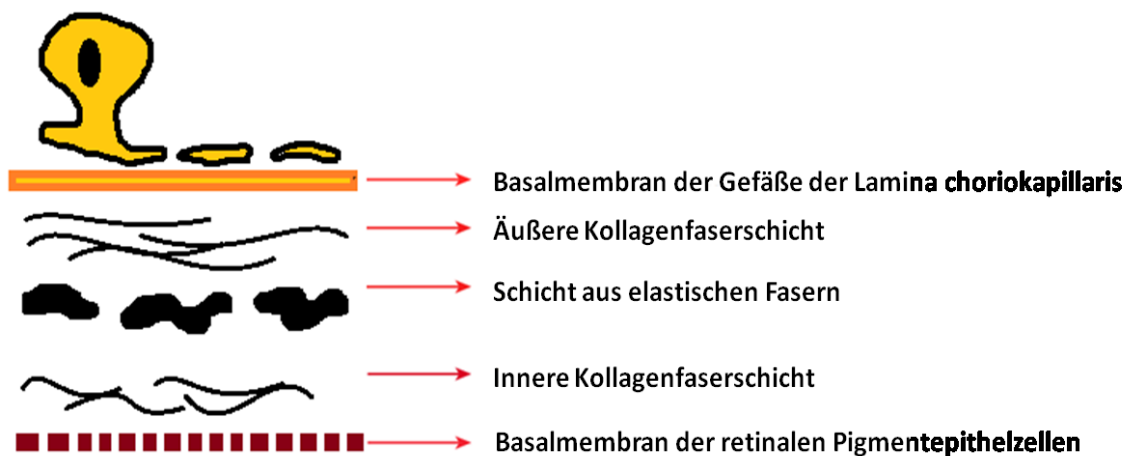
**Abb. 3:** Aderhautgefäße (Nach Erlaubnis vom ‘‘Initiativkreis zur Glaukomfrüherkennung‘‘, <http://www.glaukom.de/glaukom-wissen-und-vorbeugen/anatomie-und-funktion-des-ages/>)

Die Aderhaut haftet mit dem größten Teil ihrer Oberfläche locker an der Sklera und besteht aus folgende Schichten: Lamina suprachoroidea, Lamina vasculosa, Lamina choroidocapillaris, (Graumann, 2004).



**Abb. 4:** Histologische Darstellung der Retina und Chorioidea (Nach Erlaubnis von ‘The University of Kansas Medical Center’, <http://www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb/>)

Die äußerste Schicht heißt Lamina suprachoroidea. Hier liegen die größeren Arterienstämme (Graumann, 2004). In der Lamina vasculosa verzweigen sich die Gefäße in ein weitmaschiges Netzwerk. Die Lamina choroidocapillaris ist die tiefe Gefäßschicht, die an der Retina grenzt. Sie enthält ein feines Kapillarnetz, das für die Ernährung der äußeren Schichten der Retina verantwortlich ist. Die Bruch-Membran liegt zwischen der Lamina choroidocapillaris und der Pigmentschicht der Retina und besteht aus folgenden Schichten: Äußere und innere Kollagenfaserschicht, Schicht aus elastischen Fasern, und Basalmembran der retinalen Pigmentepithelzellen (Abb. 4, 5) (Graumann, 2004).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Bruch-Membran (Modifiziert nach Parthoprattim, [www.eoptha.com/eoptha/anatomy/anatomyofuvea4.html](http://www.eoptha.com/eoptha/anatomy/anatomyofuvea4.html))

## 1.3 Uveamelanom

### 1.3.1 Epidemiologie

Das Aderhautmelanom ist eine seltene Entität. Eine Studie, die im *National Cancer Data Base* (USA) durchgeführt wurde, hat 84.836 Fälle von kutanen und extra-kutanen Melanomen zwischen 1985 und 1994 dokumentiert (Chang et al., 1998). Die okularen Melanome umfassten 5,2% der Fälle. Von den dokumentierten 4522 Augenmelanomen, waren 3846 (85,0%) Aderhautmelanome. In einer Analyse des *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)*-Programms vom *National Cancer Institute* (USA), wurden ca. 4070 Uveamelanom-Fälle zwischen 1973 und 2008 dokumentiert (Singh et al., 2011). Die durchschnittliche Inzidenz in den USA wurde auf 5,1 pro Millionen Einwohnern pro Jahr berechnet. Ähnlichkeiten sind bei der Inzidenz des Uveamelanoms in Europa zu sehen (Singh et al., 2005).

Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose des Uveamelanoms beträgt ca. 60 Jahre (Chang et al., 1998) (Singh et al., 2011). Pädiatrische Fälle kommen noch seltener vor. Shields et al. berichten, dass in einer Serie von 8033 Patienten mit Aderhautmelanom 106 (1%)  $\leq 20$  Jahre alt, 4287 (53%) zwischen 21-60 Jahre alt und 3640 (45%)  $> 60$  Jahre alt waren (Shields et al., 2012). Ähnliche Raten konnten auch in anderen Studien dokumentiert werden (Singh et al., 2000) (Vavvas et al., 2010). Im Vergleich zu älteren Patienten besteht bei jüngeren Patienten ein eher größeres Risiko für Iris-Melanome und ein geringeres Risiko für eine Metastasierung (Shields et al., 2001). Es sind Einzelfälle von angeborenen Uveamelanomen beschrieben worden, kommen aber eher selten vor (Reese, 1973).

Bezüglich der Geschlechtsinzidenz sind die Daten unterschiedlich. Daten aus der SEER-Studie zeigen, dass die Inzidenz (altersadaptiert) etwas höher bei Männern war (5,8 pro Million für die Männer und 4,4 pro Million für Frauen) (Singh et al., 2011). Jedoch wurde bei einer Review-Analyse von 8033 Augenmelanomen durch das *Wills Eye Institute* kein Unterschied festgestellt (Shields et al., 2012).

Das Uveamelanom betrifft vor allem die weiße Bevölkerung. In der aktuellsten SEER Studie waren 97,8% der betroffenen Patienten weiß (Singh et al., 2011). In einer kleineren Analyse der SEER-Datenbank vom 1992 bis 2000 berichten Hu und Kollegen, dass von 1352 Uveamelanomen die jährliche altersadaptierte Inzidenz pro Million 0,31 in der schwarzen Bevölkerung, 0,38 in der asiatischen/pazifischen Bevölkerung, 1,67 in hispanischen weißen Patienten und 6,02 in nicht-hispanischen weißen Patienten betrug (Hu et al., 2005). Das

Uveamelanom ist selten in der asiatischen Bevölkerung, es kann aber in einem jüngeren Alter auftreten (Dhupper et al., 2012) (Kuo et al., 1982) (Sakamoto et al., 1996).

Bei der weißen Bevölkerung erscheint die Herkunft aus nördlichen Breitengraden ein Risikofaktor für die Entwicklung von Uveamelanom zu sein (Seddon et al., 1990). Ähnliche Ergebnisse wurden in der *European-Cancer-Registry-based-Studie* zum Überleben von Krebspatienten (EUROCARE), die 67 Krebsregister aus 22 europäischen Ländern untersucht hat, berichtet (Virgili et al., 2007). Hier konnte festgestellt werden, dass die standardisierten Inzidenzraten von Süden nach Norden zunehmen, mit einem Minimum von weniger als 2 Fälle pro Million in Spanien und Süditalien und bis zu mehr als 8 pro Million in Norwegen und Dänemark.

Neben der ethnischen Zugehörigkeit gehören zu den intrinsischen Wirtsfaktoren, die eine Prädisposition bei weißen Patienten zeigen, helle Augenfarbe sowie helle Hautfarbe. Eine Meta-Analyse von 10 Fallkontrollstudien von weißen Populationen hat festgestellt, dass blaue oder graue Augenfarbe, helle Hautfarbe und eine Neigung zum Sonnenbrand statistisch signifikante Risikofaktoren waren (Weis et al., 2006).

### **1.3.2 Histopathologie des Uveamelanoms**

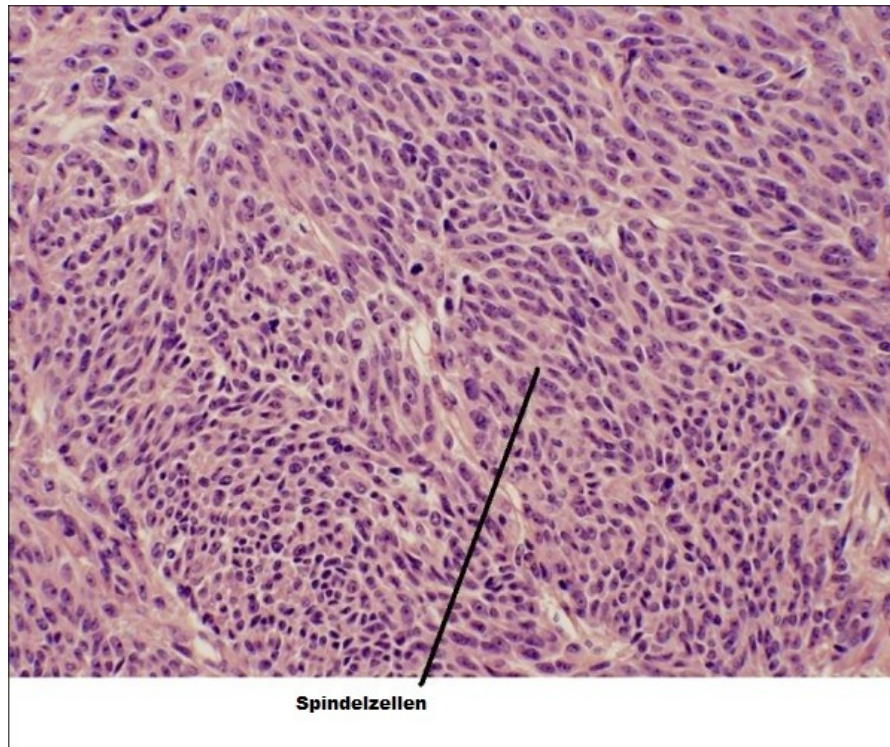
Über 90% der Uveamelanome entstehen in der Aderhaut. Die Mehrheit der Tumore ist entweder vollständig oder teilweise posterior zum Äquator lokalisiert. Von den übrigen Tumoren, sind die meisten entweder direkt am Äquator oder zwischen der Ora serrata und dem Äquator lokalisiert (COMS report no. 6, 1998). Eine Beteiligung der Iris und des Ziliarkörpers wird in weniger als 10 % der Tumoren gesehen (Griewank and Murali, 2013) (Char et al., 1996).

Die überwiegende Mehrheit von Tumoren zeigten eine Verschiebung (durch vertikales Wachstum) oder ein Zerbrechen der Bruch-Membran. Ein seitliches Wachstum innerhalb der Aderhaut mit oder ohne minimale Verschiebung der Bruch-Membran wird in weniger als 5% der Tumoren gesehen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Inzidenz dieser Charakteristika zwischen den verschiedenen Zelltypen. Die Vaskularität ist prominenter bei Tumoren, die die Bruch-Membran durchbrechen (65,4%) als bei den anderen Tumoren (43,0%) (COMS report no. 6, 1998). Bei der Enukleation ist eine Invasion der Sklera durch den Tumor in bis zu der Hälfte aller mittleren und großen Tumoren vorhanden. Eine Sehnervinfiltration wird weniger häufig beobachtet. Diese kommt bei großen Tumoren (10,2%) häufiger als bei mittelgroßen Tumoren (0,7%) vor (COMS report no. 6, 1998).

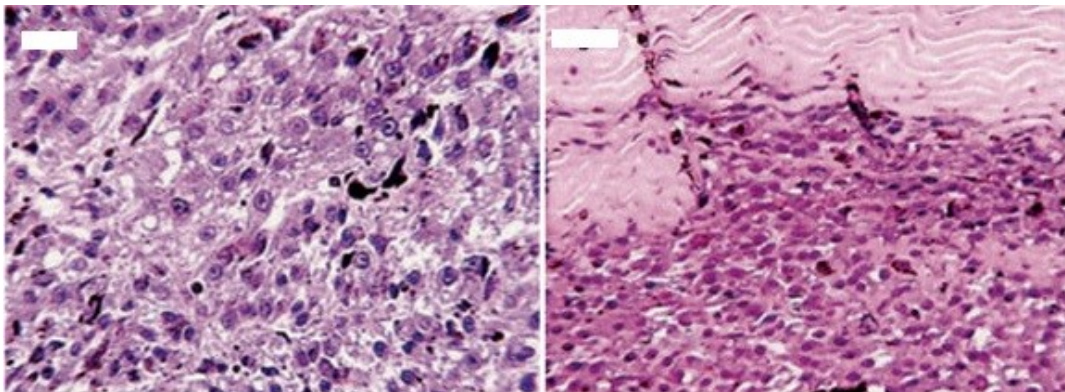
Die Uveamelanome sind überwiegend aus epitheloidzellen (Abb. 7), Spindelzellen (Abb. 6) oder aus einer Kombination aus Epitheloidzellen und Spindelzellen zusammengesetzt (Abb. 8) (Shammas and Blodi, 1977) (Davidorf and Lang, 1975) (COMS report no. 6, 1998) (McLean et al., 1982). Die Einstufung als spindelzelliges Melanom oder epitheloidzelliges Melanom basiert auf der Zellgröße und Zellform, zytoplasmatischen Charakteristika, nuklearen und nukleolären Eigenschaften sowie dem Nachweis der Verlust von Kohäsion. Die Uveamelanome wurden ursprünglich von Callender als Spindel A-, Spindel B-, Mischzell-, Epitheloidzell-, faszikuläre und nekrotischen Typen charakterisiert (McLean et al., 1983). Spindel A-Zellen sind länglich, mit wenig Zytoplasma und undeutlichen Zellgrenzen. Sie enthalten längliche Kerne mit feinem Chromatin und Mitosen sind sehr selten. Spindel B-Zellen sind praller in Form, mit relativ geringen Mengen an Zytoplasma und unscharfen Zellgrenzen. Gelegentlich sind Mitosen vorhanden. Epitheloidzellen sind größer als Spindelzellen, mit polygonaler Zellform, reichlichem Zytoplasma und deutlichen Zellgrenzen. Ihre Kerne sind rund in Form und eher pleomorph. Sie enthalten häufig ein oder mehrere große, eosinophile Nucleoli und Mitosen sind relativ häufig gesehen. Die Zellkohäsion ist am größten in Spindel A Zellen (Syncytiale Anordnung), weniger in Spindel B-Zellen (Syncytiale und faszikuläre Anordnung), und am wenigsten in Epitheloidzellen, die oft ein folienartiges Muster mit erheblichen zellulären Dissoziation zeigen (COMS report no. 6, 1998). Es wurde gezeigt, dass diese Klassifizierung eine prognostische Bedeutung hatte, obwohl eine relevante Variabilität in den Observationen vorhanden war (Mudhar et al., 2004) (Gamel and McLean, 1977). Später wurde die Callender Klassifizierung von Uveamelanomen durch das *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) überarbeitet und vereinfacht. In der AFIP-Klassifizierung sind auch Spindelzellen und gemischte Zelltypen vorhanden (McLean et al., 1983). In dieser Klassifikation sind Spindel-Tumoren diejenigen, die ausschließlich aus Spindelzellen zusammengesetzt sind. Wenn mehr als die Hälfte des Tumors zum Teil aus größeren, runden Zellen mit einem großen Kern, einem prominenten eosinophilen Nukleolus, reichlich Zytoplasma besteht und sich ein Verlust der Kohäsion zeigt, wird der Tumor als epitheloid eingestuft. Wenn weniger als die Hälfte des Tumors aus Epitheloidzellen besteht, ist der Tumor dem gemischten Zelltyp einzustufen. Die meisten Uveamelanome zeigen ein gemischtzelliges Profil (86,0%), gefolgt von spindelzelligen Tumoren (9,0%) und epitheloidzelligen Tumoren (5,0%) (COMS report no. 6, 1998). Spindelzellige Tumoren haben eine sehr gute Prognose, während die Prognose der gemischten Zelltumoren schlechter ist, wenn das Verhältnis der Epitheloidzellen erhöht ist (McLean et al., 1983). Große Tumoren sind häufiger als kleine Tumoren aus Epitheloidzellen zusammengesetzt (Flocks et al., 1955) (COMS report no. 6, 1998).

Melanin fehlt oder befindet sich in minimalen Mengen in der Hälfte der Uveamelanome. Große Tumoren sowie Tumoren mit Epitheloidzellen zeigen häufiger eine deutliche Pigmentierung sowie das Vorhandensein von Makrophagen (Callender Colonel et al., 1942) (COMS report no. 6, 1998). Die Anzahl der Makrophagen nimmt zusätzlich mit dem Grad der Pigmentierung und mit dem Grad der Nekrose zu. Tumornekrosen sind häufiger bei größeren Tumoren zu sehen, und insbesondere bei den epitheloidzelligen Bestandteilen dieser Tumoren. Es konnte eine Korrelation zwischen Nekrosen und Pigmentierung gesehen werden: ca. 66,2% der Tumoren mit hoher Pigmentierung zeigte eine gewisse Rate von Nekrose im Vergleich zu 57,6% der Tumoren mit mäßiger Pigmentierung und 38,7% der Tumore mit minimaler Pigmentierung. Diese Korrelation wurde sowohl für mittelgroße als auch für große Tumoren beobachtet (COMS report no. 6, 1998). Iris-Neovaskularization wurde in ca. 6,1% der Fälle insgesamt beobachtet, mit einer Dominanz eher in großen Tumoren (8,3%) im Vergleich zu mittelgroßen Tumoren (2,0%). Die assoziierte Entzündung ist noch ausgeprägter bei epitheloidzelligen Tumoren (COMS report no. 6, 1998).

Uveamelanome metastasieren in 90% der Fälle in die Leber (Al-Jamal et al., 2010) (Mariani et al., 2009). Die Metastasen zeigen histologische Eigenschaften ähnlich wie die primären Tumore und können aus epitheloiden Zellen, aus Spindelzellen oder aus einer Kombination von beiden bestehen (Griewank and Murali, 2013).

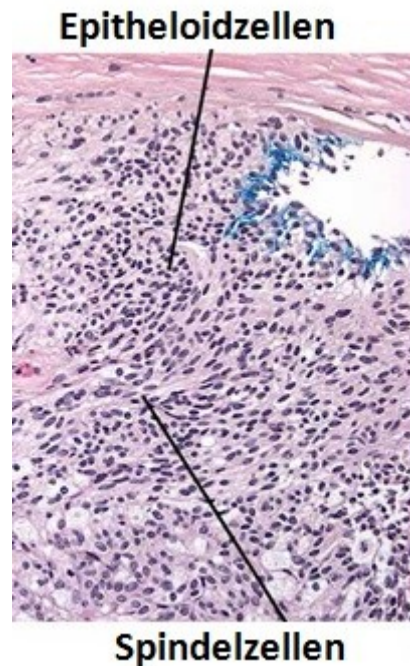


**Abb. 6:** Spindelzelliges Uveamelanom (<http://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7819-9-61>, © Anne and Pallapothu, *Intra-ocular melanoma metastatic to an axillary lymph node: A case report*, *World Journal of Surgical Oncology* 2011, 9:61)



**Abb. 7:** Epitheloidzelliges Uveamelanom (Modifiziert nach Filho et al., *Choroidal melanoma in a patient with congenital bilateral chorioretinal coloboma: a case report of an extremely rare association of ocular comorbidities*, *Arq. Bras.Oftalmol.* vol.73 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2010)





**Abb. 8:** Uveamelanom, Gemischter Zelltyp (<http://www.eyerounds.org/cases/104-Iris-Ciliary-Body-Melanoma.htm> , modifiziert nach Rogers et al., *The author(s)/editor(s) and publishers acknowledge The University of Iowa and EyeRounds.org for permission to reproduce this copyrighted material*)

### 1.3.3 Pathogenese des Uveamelanoms

Der aktuelle Fortschritt in der Tumorgenetik hat zu einem deutlich verbesserten Verständnis der Ereignisse, die an der Entwicklung von Uveamelanomen beteiligt sind, geführt. Es wurden wichtige Unterschiede im Vergleich zu den genetischen Veränderungen der kutanen Melanome entdeckt (Bastian et al., 2003) (Curtin et al., 2005). Die Unterschiede in der Molekularbiologie reflektieren die Unterschiede in der Pathogenese und Biologie dieser Tumoren.

#### Chromosomenanomalien:

Uveamelanome zeigen eine relativ geringe genomische Instabilität und Aneuploidie im Vergleich zu vielen anderen Krebstypen (Kaur et al., 2014). Zu den häufigsten Anomalien, die bei den Uveamelanomen gefunden wurden, gehören der Verlust von 1p, 3, 6q, 8p und 9p und Gewinn auf 1q, 6p und 8q (Kaur et al., 2014).

*-Chromosom 1:*

Die p53-Homologen p73 und p63 sind auf den Chromosomen 1p und 3q lokalisiert. Beide aktivieren p53-Zielgene, was zu Wachstumsarrest, Apoptose und Differenzierung führt. Verlust von 1p ist mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate in Aderhautmelanom-Patienten assoziiert, unabhängig vom Chromosom 3-Status (Kaur et al., 2014).

*-Chromosom 3:*

Monosomie 3 korreliert mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Uveamelanom. In einer Studie von van den Bosch et al. (van den Bosch et al., 2012) wurden 220 Aderhaut- und Ziliarkörper-Melanome analysiert. Monosomie 3 hat sich als ein signifikanter Prognosemarker für das gesamte Überleben nachgewiesen.

*-Chromosom 6:*

Gewinn von 6p und Verlust von 6q treten in etwa einem Viertel der Uveamelanome auf. Interessanterweise können beide Anomalien in dem gleichen Tumor vorliegen, was auf die Bildung eines Isochromosoms 6p hinweist (Aalto et al., 2001). Gewinn des 6p ist mit einer besseren Prognose als Monosomie 3 assoziiert (Kaur et al., 2014).

*-Chromosom 8:*

8p Verlust tritt bei etwa 25% und 8q Gewinn in etwa 40% der Uveamelanome auf. Es wird angemerkt, dass ein Verlust von 8p ein wichtigerer prognostischer Faktor als der Gewinn des 8q ist. Ein Gen, *Leucin-Zipper-Tumorsuppressor-1* (LZTS1), innerhalb einer minimalen deletierten Region auf 8p wurde als potentiell Tumorsuppressorgen identifiziert (Onken et al., 2008).

*-Chromosom 9:*

Ein Verlust von 9p-Chromosom ist in fast einem Viertel der Uveamelanome anwesend (Kaur et al., 2014). Methylierung und Inaktivierung des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors 2A (CDKN2A) in 9p21 wurde in bis zu 30% von Aderhautmelanomen gefunden (Merbs and Sidransky, 1999). CDKN2-Gen ist ein Melanom-Empfänglichkeitsmarker. Durch dieses Gen wird der G1-S-Übergang im Zellzyklus kontrolliert (Kaur et al., 2014).

### RNA-Expressionsprofile:

Über RNA-Expressionsprofile können die Uveatmelanome in zwei Gruppen unterteilt werden, die zu einem sehr hohen Grad auch mit dem Chromosom 3-Status sowie mit der Prognose korrelieren (Tschentscher et al., 2003) (Onken et al., 2004). Zur Klasse 1 gehören die Uveamelanome mit guter Prognose. Sie sind in der Regel diploid bezüglich Chromosom 3. Klasse 2 hat eine schlechte Prognose und zeigt einen Verlust von Chromosom 3 (Onken et al., 2004). Im Verlauf wurde eine optimierte Version dieser RNA-Expressionsprofile vorgeschlagen (Onken et al., 2010), bei der die unterschiedliche Expression von 15 Genen zur Unterteilung der Tumoren Klasse 1 und Klasse 2 verwendet wurde. Diese Ergebnisse konnten durch eine prospektive multizentrische klinische Studie validiert werden. Die Gen-Expressionsprofil-Analyse war der genaueste prognostischer Marker bei allen untersuchten Faktoren. Sie hat eine hochsignifikante Verbesserung der Prognosegenauigkeit im Vergleich zur TNM-Klassifikation und zum Chromosom-3-Status gebracht (Onken et al., 2012).

### *GNAQ/GNA11:*

Bei den Uveamelanomen sind BRAF- und NRAS-Mutationen (Spendlove et al., 2004), die bei etwa 50% bzw. 20% der kutanen Melanome gesehen werden, nicht zu finden (Sekulic et al., 2008). Mutationen in GNAQ und GNA11 sind die häufigsten onkogenen Mutationen der Uveamelanome, und treten in 80-90% der Tumoren auf, in einem sich gegenseitig ausschließenden Muster (Van Raamsdonk et al., 2009) (Van Raamsdonk et al., 2010).

Diese Mutationen sind frühe Ereignisse in der neoplastischen Transformation der Uveamelanozyten, jedoch sind diese allein unzureichend für die Progression zum Melanom. Weitere Mutationen wie z.B. eine BAP1 (*BRCA1-associated protein-1*) Mutation sind notwendig (Griewank and Murali, 2013). Die höchste Prävalenz von GNAQ-Mutationen ist in Aderhautmelanomen (33%), blaue Nävi (32%), und kutanen Melanomen (1,4%) zu sehen. GNA11-Mutationen sind bei 39% der Aderhautmelanome, 3-5% der blauen Nävi, und 1,3% der kutanen Melanome zu sehen (Shoushtari and Carvajal, 2014). GNAQ- und GNA11-Mutationen betreffen entweder den Glutaminrest an der Position 209 (Q209) oder den Argininrest an Position 183 (R183). Beide Mutationen hemmen die GTPase-Aktivität des entsprechenden Proteins. Das Endergebnis der Mutationen ist eine konstitutive GTP-Bindung und Aktivierung von Proliferationswegen (Karnoub and Weinberg, 2008).

### *BAP1:*

Die hohe Inzidenz des Chromosom 3-Verlustes bei Uveamelanomen hat auf die mögliche Anwesenheit von einem oder mehreren Tumorsuppressorgenen in diesem Chromosom hingewiesen. Sequenzierungsversuche des gesamten Protein-kodierenden DNA-Bereiches von Chromosom 3 hatte zur Identifizierung von Mutationen im BAP1-Gen geführt (Griewank and Murali, 2013). Diese Mutationen waren vorzugsweise in metastasierenden Uveamelanomen (> 80%) anzutreffen (Harbour et al., 2010). Das Gen BAP1 kodiert eine nukleäre ubiquitin-carboxyterminale Hydrolase (UCH) (Jensen et al., 1998). Zusätzlich zu der UCH-katalytischen Domäne enthält BAP1 Bindungsdomänen für BRCA1 (*Breast Cancer 1*) und BARD1 (*BRCA1-associated Ring domain protein 1*), die somit einen Tumor-Suppressor-Komplex (Nishikawa et al., 2009) bilden. Zusätzlich enthält sie eine Bindungsdomäne für den HCFC1 (*Host Cell Factor C1*), die mit histon-modifizierenden Komplexen während der Zellteilung interagiert (Machida et al., 2009). BAP1 zeigt Tumorsuppressor-Aktivität in Tumorzellen (Jensen et al., 1998). BAP1 wurde zunächst mit der Inhibierung des Zellwachstums in Verbindung mit BRCA1 assoziiert und war in Lungenkrebs-Zelllinien depletiert (Jensen et al., 1998).

### *Phosphatidylinositol 3'-Kinase-Signalweg –Akt:*

Dieses ist ein wichtiger Vermittler von Zellwachstum, Zellzyklus-Progression, und von Zell-Überleben (Couturier and Saule, 2012). Das Tumorsuppressorgen Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) ist ein negativer Regulator der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)-Akt (Proteinkinase B) und ist in vielen Uveamelanomen herunterreguliert oder komplett inaktiviert (Abdel-Rahman et al., 2006). PTEN Inaktivierung oder Herunterregulation ist vor allem bei Tumoren mit einer Zunahme der Aneuploidie aufgrund einer Monosomie 10 beschrieben, da dieses bei 10q23 zu finden ist (Griewank and Murali, 2013).

### 1.3.4 Prognostische Faktoren

Das Uveamelanom wird oft zu spät im Laufe der Krankheit diagnostiziert, und somit ist seine Prognose generell eher schlecht, mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von rund 40% (Kujala et al., 2009). Trotz der Verfügbarkeit von verschiedenen Behandlungsmethoden ist die Mortalität bei diesen Tumoren relativ unverändert geblieben (Singh et al., 2001). Sobald eine Metastasierung festgestellt ist, wird die Prognose noch schlechter, mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 3,6 bis 7,0 Monaten (Diener-West et al., 2005) (Gragoudas et al., 1991) (Bedikian et al., 1995). In ca. 90% der Fälle ist eine Metastasierung in die Leber vorhanden (Kujala et al., 2003) (Singh and Borden, 2005).

Als prognostische Faktoren dienen klinische, pathologische und genetische Tumorcharakteristika (Gill and Char, 2012). Die Größe des Tumors bei der Diagnose ist ein wichtiges prognostisches Kriterium. Verschiedene Parameter wurden verwendet, um die Tumorgöße zu definieren. Dazu gehören das größte Tumorausmaß (Seddon et al., 1983), das Tumolvolumen (McLean et al., 1977), der größte Tumordurchmesser mit Sklerakontakt (Shammas and Blodi, 1977) und der Bereich der Tumorbasis. Die prognostische Relevanz der Tumorgöße konnte in mehreren Studien bewiesen werden (Diener-West et al., 1992).

Die Tumorlokalisation innerhalb des Auges spielt ebenfalls eine wichtige prognostische Rolle. Laut mehreren Studien haben Irismelanome eine bessere Prognose als Melanome der Aderhaut und des Ziliarkörpers (Ashton, 1964) (Shields et al., 2001) (McLean et al., 1982). Irismelanome sind bei Erstdiagnose kleiner (Shields et al., 2001) und häufiger spindelzellig (Davidorf, 1981).

Statistisch signifikante klinische Faktoren, die für eine spätere Metastasierung der Irismelanome prädiktiv sind, sind fortgeschrittenes Alter bei Diagnosestellung, erhöhter Augeninnendruck, extraokuläre Invasion und chirurgische Eingriffe in der Vorgeschichte (Shields et al., 2001). Die Melanome des Ziliarkörpers haben die schlechteste Prognose, mit einer 5-Jahres-Mortalität von ca. 53% (Seddon et al., 1983). Patienten mit Ziliarkörpermelanomen dicker als 7 mm haben ein 2,5fach höheres Risiko für Metastasierung als Patienten mit kleinerer Tumordicke (Singh et al., 2001). Obwohl Ziliarkörpermelanome in der Regel größer als Aderhautmelanome zum Zeitpunkt der Diagnose sind, ist durch detaillierte statistische Analysen festgestellt worden, dass die schlechte Prognose der Ziliarkörpermelanome unabhängig von der Tumorgöße und Zelltyp ist (Seddon et al., 1983) (Shammas and Blodi, 1977).

Uveamelanome, bei denen eine Lederhautinvasion zu sehen ist, haben eine signifikant schlechtere Prognose als Uveamelanome ohne transklere Invasion. Die transklere Invasion

ist nicht so häufig und betrifft ca. 8% der Fälle (COMS report no. 6, 1998). In diesen Fällen kann die 10-Jahre-Mortalitätsrate bis zu 75% hoch sein (Seddon et al., 1983).

Als pathologische prognostische Faktoren dienen zusätzlich die Zellmorphologie, die Mitoserate, das Gefäßmuster und die Mikrogefäßdichte (COMS report no. 6, 1998).

Wie bereits diskutiert, hat die Zellmorphologie eine wichtige prognostische Bedeutung. Spindelzellige Tumoren haben eine bessere Prognose als gemischtzellige und epitheloidzellige Uveamelanome (McLean et al., 1982). Insgesamt verschlechtert sich die Prognose, wenn der Anteil von Epitheloidzellen höher wird (McLean et al., 1983). In einer Reihe von 267 Patienten war die 10-Jahre-Mortalitätsrate für Tumoren mit 0,1 bis 0,49 Epitheloidzellen pro HPF (*High Power Field*) bei 14%, verglichen mit 70% für Tumoren mit mehr als 0,5 Epitheloidzellen pro HPF (Seddon et al., 1983).

Die Mitoserate ist ebenfalls ein relevanter prognostischer Faktor und korreliert mit der Krankheitsmortalität (McLean et al., 1977).

Bestimmte Varianten von Gefäßmustern korrelieren ebenfalls mit dem Krankheitsverlauf (Folberg et al., 1992) (Folberg et al., 1993). Bei der Mehrheit der Uveamelanome ist eine Mischung aus diversen Gefäßmustern zu finden. Das Vorhandensein einer geschlossenen Gefäßschleife (*single-closed vasculator loop*) ist häufiger mit einer schlechteren Prognose und Metastasierung assoziiert (Folberg et al., 1992). Die Gefäßdichte scheint ebenfalls eine prognostische Bedeutung zu haben. In einer Analyse von 123 Uveamelanomen konnte eine Korrelation zwischen Gefäßdichte und Krankheitsverlauf gesehen werden (Foss et al., 1996). Es konnte zusätzlich gesehen werden, dass Patienten mit metastasiertem Uveamelanom und höherer Mikrogefäßdichte tendenziell eine schlechtere Prognose zeigten (Toivonen et al., 2004).

Genetische Charakteristika haben, wie bereits diskutiert, eine prognostische Relevanz. Der Verlust von Chromosom 3 korreliert mit höherem Metastasierungsrisiko und schlechter Prognose mit einer sehr niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate (Prescher et al., 1996). Andere chromosomale Anomalien, die ebenfalls eine schlechte Auswirkung auf die gesamte Überlebenszeit haben, sind auf den Chromosomen 8q und 6p zu finden. Die Prognose hier ist jedoch nicht so schlecht wie bei Uveamelanomen mit Chromosom 3-Verlust (Ehlers et al., 2008). Ein partieller Verlust von Chromosom 3 ist mit einer besseren Prognose assoziiert als bei komplettem Chromosom 3 Verlust (Shields et al., 2011) (Abdel-Rahman et al., 2011).

Im Verlauf folgt die TNM-Klassifikation des Uveamelanoms, wie sie im *AJCC Cancer Staging Manual* (7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 547-59) dargestellt wird.

**Tab. 1:** TNM-Klassifikation des Uveamelanoms

<b>Alle Uveamelanome</b>	
<i>T<sub>x</sub></i>	<i>Primarius kann nicht beurteilt werden</i>
<i>T<sub>0</sub></i>	<i>Kein Hinweis auf Primarius</i>
<b>Iris</b>	
<i>T<sub>1</sub></i>	<i>T<sub>1</sub>Tumor auf die Iris beschränkt</i>
<i>T<sub>1a</sub></i>	<i>Tumor auf die Iris beschränkt, kleiner als <math>\frac{1}{4}</math> der Irisoberfläche</i>
<i>T<sub>1b</sub></i>	<i>Tumor auf die Iris beschränkt, größer als <math>\frac{1}{4}</math> der Irisoberfläche</i>
<i>T<sub>1c</sub></i>	<i>Tumor auf die Iris beschränkt, mit sekundärem Glaukom</i>
<i>T<sub>2</sub></i>	<i>Tumor konfluierend oder den Ziliarkörper/die Aderhaut oder beides überschreitend</i>
<i>T<sub>2a</sub></i>	<i>Tumor konfluierend oder den Ziliarkörper/die Aderhaut oder beides überschreitend, mit sekundärem Glaukom</i>
<i>T<sub>3</sub></i>	<i>Tumor konfluierend oder den Ziliarkörper/die Aderhaut oder beides überschreitend, mit skleraler Ausbreitung</i>
<i>T<sub>3a</sub></i>	<i>Tumor konfluierend oder den Ziliarkörper/die Aderhaut oder beides überschreitend, mit skleraler Ausbreitung und sekundärem Glaukom</i>
<i>T<sub>4</sub></i>	<i>Tumor mit extraskleraler Ausbreitung</i>
<i>T<sub>4a</sub></i>	<i>Tumor mit extraskleraler Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T<sub>4b</sub></i>	<i>Tumor mit extraskleraler Ausbreitung <math>&gt; 5</math> mm</i>
<b>Ziliarkörper und Aderhaut</b>	
<i>T<sub>1</sub></i>	<i>Tumorgröße Kategorie 1</i>
<i>T<sub>1a</sub></i>	<i>Tumorgröße Kategorie 1, ohne Ziliarkörperbeteiligung und extraokuläre Ausbreitung</i>
<i>T<sub>1b</sub></i>	<i>Tumorgröße Kategorie 1, mit Ziliarkörperbeteiligung</i>
<i>T<sub>1c</sub></i>	<i>Tumorgröße Kategorie 1, ohne Ziliarkörperbeteiligung aber mit extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>

<i>T1d</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 1, mit Ziliarkörperbeteiligung und extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T2</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 2</i>
<i>T2a</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 2, ohne Ziliarkörperbeteiligung und extraokuläre Ausbreitung</i>
<i>T2b</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 2, mit Ziliarkörperbeteiligung</i>
<i>T2c</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 2, ohne Ziliarkörperbeteiligung aber mit extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T2d</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 2, mit Ziliarkörperbeteiligung und extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T3</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 3</i>
<i>T3a</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 3, ohne Ziliarkörperbeteiligung und extraokuläre Ausbreitung</i>
<i>T3b</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 3, mit Ziliarkörperbeteiligung</i>
<i>T3c</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 3, ohne Ziliarkörperbeteiligung aber mit extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T3d</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 3, mit Ziliarkörperbeteiligung und extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T4</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 4</i>
<i>T4a</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 4, ohne Ziliarkörperbeteiligung und extraokuläre Ausbreitung</i>
<i>T4b</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 4, mit Ziliarkörperbeteiligung</i>
<i>T4c</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 4, ohne Ziliarkörperbeteiligung aber mit extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T4d</i>	<i>Tumorgröße Kategorie 4, mit Ziliarkörperbeteiligung und extraokulärer Ausbreitung <math>\leq 5</math> mm</i>
<i>T4e</i>	<i>Jede Größenkategorie mit extraokulärer Ausbreitung <math>&gt; 5</math> mm</i>
<b><i>Regionäre Lymphknoten</i></b>	
<i>NX</i>	<i>Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden</i>



<i>N0</i>	<i>Keine regionäre Lymphknotenmetastasen</i>
<i>N1</i>	<i>Regionäre Lymphknotenmetastasen</i>
<b><i>Fernmetastasierung</i></b>	
<i>M0</i>	<i>Keine Fernmetastasen</i>
<i>M1</i>	<i>Fernmetastasen</i>
<i>M1a</i>	<i>Größte Fernmetastase <math>\leq 3</math> cm.</i>
<i>M1b</i>	<i>Größte Fernmetastase 3.1–8.0 cm.</i>
<i>M1c</i>	<i>Größte Fernmetastase <math>\geq 8</math> cm.</i>

### 1.3.5 Therapiemöglichkeiten

Sobald die Diagnose des Uveamelanoms gestellt wird, hängt die Wahl der Behandlung von der Lokalisation, der Größe des Tumors sowie vom Patientenalter, weiteren Komorbiditäten, dem Visus und dem allgemeinen Status des betroffenen Auges ab. Hier werden Optionen für die primäre lokale Therapie des Uveamelanoms dargestellt.

#### 1.3.5.1 Enukleation

Die Enukleation war früher die Hauptbehandlung für das primäre intraokuläre Uveamelanom. Heutzutage wird sie weiterhin in Fällen verwendet, wo es schwierig ist das Sehen zu retten, wie zum Beispiel bei großen fortgeschrittenen Tumoren, Tumoren mit Papillenbeteiligung, Netzhautablösung oder Glaskörperblutung (Puusaari et al., 2003). In mehreren Studien konnten keine signifikanten Unterschiede in der Mortalitätsraten zwischen Patienten mit Uveamelanom, die eine chirurgische Behandlung des primären Tumors hatten, und Patienten die eine konservative lokale Behandlung des intraokulären Uveamelanoms hatten, gefunden werden (Puusaari et al., 2003). Bei Vergleich der Enukleation und der Strahlentherapie bei Patienten mit mittelgroßen Aderhautmelanomen konnte kein statistisch relevanter Unterschied in der gesamten Überlebenszeit und Lebensqualität gesehen werden (Gomer, 1991) (Canal-Fontcuberta et al., 2012). Grundsätzlich kann daher zunächst ein konservativer therapeutischer Versuch erfolgen, um das Sehen und das Auge insgesamt zu retten.

### **1.3.5.2 Brachytherapie**

Die Verwendung von wiederverwendbaren goldabgeschirmten episkleralen Plaques in der Behandlung des primären Tumors hat sich in mehreren Zentren etabliert (Diener-West et al., 2001) (Earle et al., 1987). Diese Behandlungsoption hat insgesamt sehr gute Ergebnisse in der lokalen Tumorkontrolle gezeigt, mit lokalen Kontrollraten von mehr als 90% (Seregard and Damato, 2014). Je nach Tumoreigenschaften (z. B. Tumorgröße) und Isotopen-Charakteristika, wie spezifische Halbwertszeit und Gewebepenetration, wurden verschiedene Radioisotope in der lokalen Behandlung des Uveamelanoms verwendet. Das Auftreten von Nebenwirkungen unter dieser Behandlung ist meistens dosisabhängig. Die häufigsten Nebenwirkungen der Brachytherapie sind Optikusneuropathie, Makulopathie, Katarakt und Neovaskularisationsglaukom (Finger et al., 2011) (Finger et al., 2010).

### **1.3.5.3 Partikeltherapie**

Im Gegensatz zur konventionellen Strahlentherapie, stellt die Partikelbestrahlung eine mehr gezielte Strahlungsbehandlung vor. Das Phänomen ist bekannt als Bragg Peak. Der Partikelstrahl dringt nur bis zu der gewünschten Gewebetiefe ein und hält danach an. Somit wäre theoretisch das Risiko einer Schädigung der umgebenden gesunden Gewebestrukturen niedriger. Die Partikeltherapie kann mit Protonen, Helium oder Kohlenstoffionen durchgeführt werden (Wang et al., 2013). Die häufigsten Nebenwirkungen dieser Behandlung sind Glaukom, Strahlenretinopathie, Katarakt, Optikusneuropathie und Enukleation aufgrund von Komplikationen. Leider kommt es bei der Partikeltherapie von hinteren Uveamelanomen häufig zu einer Strahlung auf das vordere Segment des Auges. Der Prozentsatz der Beteiligung der Linse und der vorderen Augenkammer im Behandlungsfeld korreliert mit dem Risiko der Entstehung eines Neovaskularisationsglaukoms (Daftari et al., 1997).

### **1.3.5.4 Photokoagulation, photodynamische Therapie**

Die photodynamische Therapie (PDT) besteht aus der Stimulation eines intravenös verabreichten Photosensibilisators durch eine spezifische Wellenlänge, die an der Zielregion appliziert wird (Pereira et al., 2013). Daraufhin erfolgt die Generierung von freien Radikalen, die eine Zell- und Gewebeerstörung durch komplexe Mechanismen induziert (Gomer, 1991) (Canal-Fontcuberta et al., 2012). Es wird spekuliert, dass die Wirksamkeit dieser Methode

gegen Uveamelanome durch eine Kombination von Gefäßverschluss, direkter Zytotoxizität und Immunsystemaktivierung entsteht (Nowis et al., 2005).

### **1.3.5.5 Transpupilläre Thermotherapie (TTT)**

Bei dieser Behandlung wird ein Infrarot-Laserstrahl durch die erweiterte Pupille auf die Tumoroberfläche geliefert. Somit folgt eine direkte Zellzerstörung und anschließend eine Tumornekrose (Pereira et al., 2013). Es konnte allerdings in mehreren Studien ein relativ hohes Lokalrezidivrisiko (10% nach 3 Jahren, und 33% nach 10 Jahren) nach Anwendung von TTT als Primärbehandlung für kleine hintere Uveamelanome gesehen werden (Aaberg et al., 2008) (Harbour et al., 2003) (Shields et al., 2002). Zu den häufigsten Komplikationen der primären TTT gehören Zweigarterien- und Venenverschlüssen, epiretinale Membranen, zystoides Makulaödem und Papillenödem (Shields et al., 2002).

### **1.3.5.6 Lokale Resektion**

Die lokale Resektion eines Uveamelanoms stellt eine Behandlungsoption dar, die einen Rettungsversuch des Auges anbietet. Diese kann entweder transretinal (Endoresektion) für Tumoren, die am hinteren Segment liegen, erfolgen, oder transskleral (Exoresektion) (Pereira et al., 2013). Um das Risiko eines Lokaltumorrezidivs bei der Exoresektion zu reduzieren, wird eine adjuvante Brachytherapie zusätzlich empfohlen (Bechrakis et al., 2010). Der Vorteil einer neoadjuvante Strahlungsbehandlung vor einer Endoresektion bleibt bislang fraglich (Damato, 2012). Zu den schweren Komplikationen der Methode gehören Netzhautablösung, Glaskörperblutungen, Katarakt und erhöhter Augeninnendruck (Gündüz, 2010).

Da all diese Therapiemöglichkeiten langfristig keinen signifikanten Nutzen zeigen, und da vor allem bei metastasierten Uveamelanomen die bekannte Systemtherapien keine zufriedenstellende Ansprechraten zeigen (Pföhler et al., 2003), ist der Bedarf der Entwicklung von neuen Therapien hoch. Daher wird die Anwendung von Prohomonkonvertasen als möglicher Angriffspunkt untersucht.

## 1.4 Prohormonkonvertasen

### 1.4.1 Entdeckung und Definition

Es ist seit mehreren Jahren bekannt, dass die Prozessierung von Vorläuferproteinen durch limitierte Proteolyse ein sehr wichtiger und weit verbreiteter zellulärer Mechanismus für die Aktivierung von Proteinen und Peptiden ist. Derartige Proteine sind z. B. Hormone, Enzyme und Rezeptore sowie Transkriptionsfaktoren. Die Prozessierung ihrer Vorläufermolekülen durch endoproteolytische Spaltung führt zur Entstehung von biologisch aktiven Proteinen und stellt somit einen signifikanten Mechanismus dar, der zur Konservierung der Zellfunktionen dient (Artenstein and Opal, 2011).

Proteasen sind zahlreich vorkommende Enzyme und stellen zwei bis drei Prozent der Genprodukte in fast allen Organismen dar. Etwa 500 Peptidasen und Homologe können bereits im menschlichen Genom erkannt werden (Barrett et al., 2003). Bislang sind fünf Klassen von proteolytischen Enzymen auf der Grundlage ihrer katalytischen Mechanismen erfasst: Aspartat-, Cystein-, Metallo-, Threonin- und Serin-Proteasen (Page and Di Cera, 2008).

Serinproteasen stellen etwa ein Drittel aller bekannten proteolytischen Enzyme dar. Der Familienname stammt von dem nukleophilen Ser-Aminosäurerest ins Substrat dar. Hier findet die Reaktion zwischen der Protease und der Carbonyl-gruppe des Substratpeptids statt (Hedstrom, 2002). Proprotein Konvertasen (PCs) sind grundsätzlich kalziumabhängige Serin-Endoproteasen, die innerhalb definierter pH-Bereiche funktionieren (Thomas, 2002) (Anderson et al., 2002).

Die Familie der Proproteinkonvertasen bei Säugetieren besteht aus neun sekretorischen Serin-Proteasen, die mit Subtilisin (aus Bakterien) und Kexin (aus Hefe) verwandt sind (Turpeinen et al., 2013). Davon aktivieren die Proprotein-Konvertasen 1 (PC1), PC2, Furin, PC4, PC5, PC7 und PACE4 (Paired basic amino acid cleaving enzyme 4) zelluläre und pathogene Vorläuferproteine durch Spaltung definierter Aminosäuresequenzen. Subtilisin-Kexin-Isozym 1 (SKI-1) und Proproteinknvertase Subtilisin-kexin 9 (PCSK9) regulieren die Cholesterin und/oder Lipid-Homeostase durch Spaltung von beteiligten Proteinen an nicht-basischen Aminosäureresten oder durch induzierte Rezeptorenabbau (Artenstein and Opal, 2011).

Der Mechanismus der Protein-Aktivierung, durch die Spaltung von inaktiven sekretorischen Vorläufern an bestimmten einzelnen oder gepaarten basischen Aminosäuren, wurde initial nach der Arbeit über die Vorläufer von Insulin,  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH vorgeschlagen (Steiner et al., 1967). Im Bereich der Virologie war auch bekannt, dass für die Aktivierung von vielen

infektiösen Retroviren eine Prozessierung von Proteinen der Zelloberfläche durch Proteasen des Wirts erforderlich war (Klenk and Garten, 1994). Ein wichtiger Schritt in der Erforschung der Rolle von Proproteinkonvertasen war die Arbeit über die subtilisin-ähnliche Serinprotease Kexin (Hefe-Proteine) (Mizuno et al., 1988), die bei der Prozessierung von " *pro- $\alpha$ -mating factor* " beteiligt war (Julius et al., 1984). Anschließend erfolgte die Identifizierung und Charakterisierung des Furin-Proteins und ihrer Kex2- ähnlichen Funktion als Proprotease bei höheren Eukaryonten (van de Ven et al., 1990). Kurz danach erfolgte die Entdeckung der neuroendokrinen PCs PC1 und PC2 (Seidah et al., 1990) (Smeekens et al., 1991). Anhand von diesen neuen Daten erfolgte die Identifizierung von PC4 und ihre potentielle Rolle in der Reproduktion durch die Beteiligung am Reifungsprozess der Rattenspermatogenese (Seidah et al., 1992), sowie die Entdeckung von PC5 (Lusson et al., 1993) und PC7 (Seidah et al., 1996). Kiefer konnte mittels PCR (*Polymerase chain reaction*) 1991 das Enzym PACE4 identifizieren und hat die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zwischen dieser und Furin demonstriert (Kiefer et al., 1991). Die bislang genannten PCs sind durch ihre Spezifität für basische Aminosäuren charakterisiert. Die entsprechenden menschlichen Gene für PC1- PC7 sind als PCSK1-PCSK7 bekannt, wobei das Gen, das das Protein Furin (PCSK3) kodiert, offiziell Furin lautet. Außerdem erfolgte die Identifizierung von SKI-1, eines pyrolysin-ähnlichen Homologs von Subtilisin, das nicht durch eine Spezifität für basische Aminosäure charakterisiert ist (Seidah et al., 1999). Letztlich erfolgte die Entdeckung von PCSK9, welche hauptsächlich in der Cholesterin-Regulation beteiligt ist (Seidah et al., 2003).

PCs sind bei der Prozessierung von verschiedenen Proteinen beteiligt. Die Prozessierung kann nicht nur zu einer Aktivierung der Proteine führen, sondern auch gelegentlich zu deren Inhibierung (Seidah et al., 2008) (Seidah and Prat, 2007). PCs werden initial als inaktive Vorstufen synthetisiert, die eine Prodomäne besitzen. Im Rahmen eines autoproteolytischen intramolekularen Spaltungsprozesses kommt es zur Proteinfaltung und Aktivierung (Thomas, 2002) (Anderson et al., 2002). Die PCs PC1, PC2, Furin, PC4, PC5, PACE4 und PC7 spalten anschließend die sekretorischen Proteinvorstufen an bestimmten einzelnen oder gepaarten basischen Aminosäuren innerhalb des Motivs (R / K) X<sub>n</sub> (R / K) ↓. (Seidah and Chrétien, 1999) (Turpeinen et al., 2011). In den letzten Jahren gab es zunehmende Erkenntnisse zur Rolle der Proproteinkonvertasen nicht nur in der Homöostase sondern auch in mehreren pathophysiologischen Prozessen, einschließlich Tumoren, Endokrinopathien, Infektionen usw. (Seidah, 2011). Daher stellen diese Enzyme potenzielle therapeutische Ziele für die Behandlung von mehreren Krankheiten dar.

## 1.4.2 Struktur

Nach Sequenzierung des Hefen-Protein Kexin konnte das Vorhandensein von einer katalytischen Domäne festgestellt werden, die homolog zu derjenigen des bakteriellen Proteins Subtilisin war (Mizuno et al., 1988). Ebenfalls konnte eine strukturelle Ähnlichkeit mit den katalytischen Domänen der sieben basisch-spezifischen Proproteinkonvertasen PC1, PC2, Furin, PC4, PC5, PACE4 und PC7 gesehen werden (Artenstein and Opal, 2011) (Abb. 11). Diese Proteine und Kexin teilen gemeinsame Strukturen: ein N-terminales Signalpeptid, gefolgt von einem Propeptid von 80-90 Aminosäuren, mit dem kanonischen Spaltmotiv für die (auto)-Aktivierung RX-Kyr-R an seiner terminalen Domäne, eine katalytische Domäne von etwa 285 Aminosäureresten (mit ca 25 -30% Homologie zu den Subtilisinen) und eine gut konservierte P- oder Homo-B-Domäne von ca. 150 Aminosäureresten (Steiner et al., 1992) (Rouillé et al., 1995). Die P-Domäne besteht aus " 8-stranded *b-barrels* " mit gut organisierten hydrophoben Kernen (Lipkind et al., 1998) und ist wichtig für die Erhaltung der Struktur, der katalytischen Funktion und der Regulation weiterer kalzium- und pH-abhängigen Funktionen (Zhou et al., 1998). PC4, PC7 und PCSK9 haben nur einen primären autokatalytischen Standort, während PC5 zwei validierte alternativ gespleißte Formen aufweist, nämlich PC5A und PC5B (Seidah and Prat, 2012). Alle PCs zeigen die typische katalytische Trias, bestehend aus den Aminosäuren Asp, His und Ser (Owen and Campbell, 1999). Die karboxyterminale Domäne von jeder Proproteinkonvertasen enthält Sequenzen, die zur Regulation ihrer zellulären Lokalisation und für ihren Transport dienen. PC5 und PACE4 enthalten zusätzlich eine spezifische Cys-reiche Domäne, die an den Heparansulfat-Proteoglykanen der Zelloberfläche und des extrazellulären Matrix bindet. PCSK9 enthält eine Cys-His-reiche Domäne (CHRD), die für den Transport des PCSK9-LDLR (*Low-Density Lipoprotein Receptor*)-Komplexes an den Endosomen und Lysosomen verantwortlich ist (Seidah and Prat, 2012). Die neun menschlichen PCs können zwischen den S8A und S8B Unterfamilien unterteilt werden (Rawlings et al., 2006). Furin, PC1, PC2, PACE4, PC4, PC5 und PC7 sind in Unterfamilie S8B klassifiziert. SKI-1 und PCSK9 sind in Unterfamilie S8A eingestuft. Sequenzierungsversuche von SKI-1 und PCSK9 weisen auch die Anwesenheit von Subtilisin-ähnlichen pro- und katalytischen Domänen auf (Seidah et al., 2003). In diesen Proteinen scheint jedoch die C-terminale Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne mehr variabel zu sein. SKI-1 und PCSK9 weisen zudem keine P-Domäne auf.

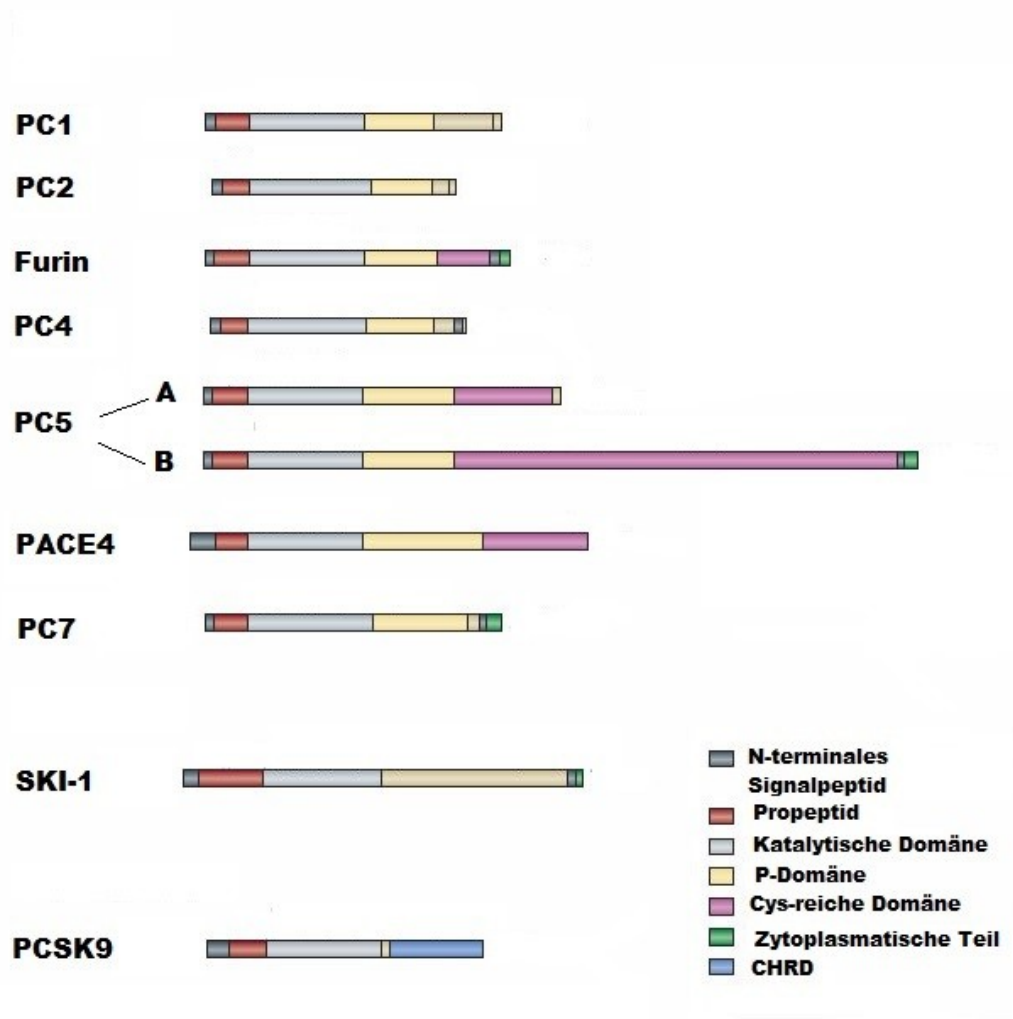


Abb. 9: Primäre Struktur der Proproteinkonvertasen (Modifiziert nach Seidah and Prat, 2012)

### 1.4.3 Gewebe- und Zellverteilung

#### Gewebeverteilung:

Die Gewebeexpression, die intrazelluläre Lokalisierung und der Sekretionsweg von jeder Proproteinkonvertase ist unterschiedlich und bestimmt die Selektivität dieser Enzyme an spezifischen Substraten (Thomas, 2002).

PC1 und PC2 sind meistens innerhalb unreifer sekretorischer Granulae von neuronalen und endokrinen Zellen lokalisiert (Muller et al., 1998) (Day et al., 1992) und sind für die

proteolytische Spaltung von größeren Vorläufermolekülen zur Entstehung von bioaktiven Peptiden in diesen Zellen verantwortlich (Yaoi et al., 2003). Immunzytochemische und in situ Hybridisierungs-Studien haben gezeigt, dass diese Konvertasen sowohl in den pankreatischen Langerhans-Inseln (Malide et al., 1995) (Tanaka et al., 1996), als auch in der Hypophyse (Marcinkiewicz et al., 1993) (Kurabuchi and Tanaka, 1997) und im Gehirn (Schäfer et al., 1993) (Birch et al., 1994) exprimiert sind. PC1- und PC2 sind ebenfalls in der Haut vorhanden. Insbesondere konnte eine Expression von PC1 und PC2 sowohl in Mastzellen der humaner Haut (Artuc et al., 2006), in humanen kutanen Melanozyten (Peters et al., 2000) und in dermalen Fibroblasten (Schiller et al., 2001) detektiert werden.

PC4 ist bei männlichen Mäusen in spermatogenen Zellen exprimiert (Seidah et al., 1992) (Gyamera-Acheampong et al., 2006). Bei weiblichen Mäusen ist PC4 in der Plazenta und in den Ovarien exprimiert (Gyamera-Acheampong and Mbikay, 2008). PC4 aktiviert Proteinvorstufen in dem reproduktiven Sekretionsweg (Torii et al., 1993). Ihre beschränkte Expression in spermatogenen Zellen, ovariellen Makrophagen und in der Plazenta ist ein Hinweis auf ihre Rolle bei der Reproduktion (Seidah et al., 1992) (Tadros et al., 2001). Ihre Rolle in der Spermienreifung und in der Fertilization ist gut dokumentiert. PC4-Knock-out-Mäuse waren subfertil ohne andere erkennbare spermatogene Defekte (Mbikay et al., 1997a) (Scamuffa et al., 2006) (Basak et al., 2008).

PC5 ist ein ubiquitäres Enzym, welches in vielen Geweben exprimiert wird (Lusson et al., 1993) (Essalmani et al., 2006), genauso wie PACE4 (Dong et al., 1995) und Furin (Thomas, 2002). PC7 ist ebenfalls eine ubiquitär exprimierte Proproteinkonvertase (Seidah et al., 1996) (Rousselet et al., 2011), sowie SKI-1 (Seidah et al., 1999). Hier muss betont werden, dass die Expressionsmustern unterschiedlich für jedes Gewebe sind und bislang nicht vollständig charakterisiert wurden (Seidah et al., 1994).

PCSK9 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und reguliert den Cholesterinstoffwechsel durch Unter-Regulation des LDL-Rezeptors (LDLR) in der Leber (Luo et al., 2009). PCSK9 wird auch im Dünndarm und in den Nieren exprimiert (Seidah et al., 2003). Es gibt zusätzlich Daten, die eine vorübergehende Expression dieses Enzyms im Telenzephalon und Cerebellum während der Embryogenese zeigen (Seidah et al., 2003).

Aktivität der Proproteinkonvertasen im Augewebe wurde auch berichtet. Fuller et al. haben demonstriert, dass PC1 und PC2 eine mRNA-Expression in der Retina zeigten. Zudem waren PACE4 und möglicherweise PC5 häufiger in der Glia des Sehnervs und der Retina. PC1, PC2 und PC5 wurden eher in Retina-Nervenzellen exprimiert, während PACE4 eher in Astrozyten



und Müller-Zellen vorhanden war. Es wird vermutet, dass PACE4 ein Enzym ist, das Veränderungen der Bioaktivität von Wachstumsfaktoren und eine erhöhte Biosynthese von extrazellulärer Matrix durch eine Glia-Aktivierung im ONH (*Optic nerve head*) ermöglichen kann (Fuller et al., 2009).

Zellverteilung und Aktivierung:

PC1 und PC2 werden als Zymogene synthetisiert und ihre Aktivierung benötigt die Entfernung eines aminoterminalen Propeptids. In endokrinen Zelllinien wird PC1 als ein 94-kDa-Vorläufer synthetisiert, der N-terminal zu einer aktiven 87-kDa-Form verkürzt wird (Winsky-Sommerer et al., 2000). Durch weitere Spaltung am C-terminalen Ende entsteht das finale 66-kDa-Produkt (Vindrola, 1994) (Benjannet et al., 1995) (Vindrola and Lindberg, 1992). PC2 wird als eine 75-kDa unreife Form synthetisiert, die an der N-terminalen Teil aktiviert wird, und somit entsteht das aktive 68-kDa-Enzym (Benjannet et al., 1993) (Shennan et al., 1994). Die PC1-Aktivierung wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) durchgeführt, während PC2 eher im trans-Golgi Netzwerk (TGN) und in unreifen sekretorischen Granulae aktiviert wird (Vindrola and Lindberg, 1992) (Benjannet et al., 1993) (Lindberg, 1994). PC1 verlässt das ER innerhalb von 10 Minuten nach der Spaltung seines Propeptids (Benjannet et al., 1993) (Zhou and Lindberg, 1993) (Zhou and Mains, 1994). Die PC2-Verarbeitung ist viel langsamer. Die posttranslationale Prozessierung von ProPC2 ist auf eine Wechselwirkung mit dem neuroendokrinen Protein 7B2 zurückzuführen (Braks and Martens, 1994) (Benjannet et al., 1995). Im Verlauf sind beide enzymatisch aktiven Komponenten in sekretorischen Granula zusammen lokalisiert (Dittié and Tooze, 1995) (Malide et al., 1995).

Die Biosynthese und intrazelluläre Zirkulation der Proproteinkovertase 4 in dem sekretorischen Weg ist nicht vollständig klar. Der größte Anteil von PC4 wird im ER als proPC4 behalten (Gyamera-Acheampong and Mbikay, 2008). Es wird vermutet, dass dieses Zymogen die Unterstützung eines bestimmten Chaperon-Proteins erfordert, um effizient durch den sekretorischen Weg zu zirkulieren. Weiterhin ist es noch unklar, wie die reife PC4 vollständig aktiviert wird, da in ihrer Prodomäne die erkennbare interne sekundäre Spaltungsstelle fehlt. Bei den meisten Proproteinkovertasen befreit die Spaltung an dieser Stelle das Enzym vom inhibitorischen Propeptid, welches durch die primäre Spaltung an der Abgrenzung zwischen der Vor- und der katalytischen Domäne (Anderson et al., 1997) (Anderson et al., 2002) zur Entstehung kommt. Bei der Nagetier-PC4 fehlt eine Transmembran-Domäne in ihrer C-terminalen Domäne. Doch PC4 ist an der Oberfläche von intakten Mausspermien durch

Immunoelektronenmikroskopie nachweisbar (Gyamera-Acheampong et al., 2006). Die Natur dieser Assoziation ist weiterhin unklar.

Das PC5-Gen kodiert zwei Isoformen, PC5A (915 aa; 21 Exons) und PC5B (1877 aa; 38 Exons) (Seidah and Prat, 2002). Die membrangebundene PC5B (sowie Furin und PC7) kommt aus der Zelloberfläche zurück zu dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) über Endosomen. Diese Proproteinkovertase prozessiert Vorläuferproteine entweder in dem trans-Golgi-Netzwerk, oder an der Zelloberfläche und in den Endosomen (Thomas, 2002) (Xiang et al., 2000) (Mayer et al., 2004). Die sezernierte PC5A, die keine Transmembran-Domäne enthält, enthält eine COOH-terminale Cystein-reiche Domäne (CRD), die mit Gewebeinhibitoren von Metalloproteasen (TIMPs) zusammenwirkt. Diese ermöglicht die Bildung eines Komplexes mit Heparansulfatproteoglycanen (HSPG) an der Zelloberfläche (Seidah and Prat, 2012) (Nour et al., 2005). Somit, sind genau wie Furin, PC5A und PACE4 auch an der Zelloberfläche anwesend (Jin, 2005).

PC7 wird zunächst als proPC7-Zymogen synthetisiert. Im ER findet eine autokatalytische Spaltung statt (van de Loo et al., 2000) (Meerabux et al., 1996). Im Verlauf folgt eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen, einschließlich N-Glykosylierung und Cys-Palmitoylierung ihrer zytosolischen Teil (van de Loo et al., 2000). Das Prosegment von PC7 ist zunächst über den konventionellen, Golgi-abhängigen Sekretionsweg sezerniert. Die reife PC7 wird teilweise sulfatiert und erreicht die Zelloberfläche über den üblichen Weg. Jedoch erreicht nur ein Bruchteil der PC7 die Zelloberfläche durch einen Brefeldin A- und COPII-unabhängigen unkonventionellen Sekretionsweg (Rousselet et al., 2011). Schließlich können, genauso wie Furin (Thomas, 2002), die membrangebundene PC5 und PC7 auch von der Zelloberfläche zu dem trans-Golgi Netzwerk durch Endosomen zurückkommen (Declercq et al., 2012).

Furin wird anfänglich als ein 96-kDa-Zymogen synthetisiert, welches im ER, eine schnelle autoproteolytische Spaltung seines 83-Aa-Propeptids erfährt. Der Transport aus dem ER zum Golgi-Apparat erfordert die Spaltung dieses N-terminalen Propeptids. Das gespaltene Propeptid bleibt mit dem Enzym und kann als potentieller Autoinhibitor fungieren (Molloy et al., 1999). Im trans-Golgi-Netzwerk (TGN)/endosomal System wird das Furin-Propeptid erneut autoproteolytisch gespalten (Thomas, 2002). Dies führt zur Aktivierung. Im Verlauf wird das Enzym aus dem trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche und zurück in den endosomal Signalweg transportiert (Thomas, 2002).

SKI-1 wird als inaktive Vorstufe von 1052 Aminosäuren synthetisiert, die durch 3 sequenzielle autokatalytische Spaltungen in seinem Prosegment aktiviert wird (Elagoz et al., 2002). Studien

über die intrazelluläre Lokalisation und Aktivierung von SKI-1 zeigten, dass sie im Golgi-Apparat und in den Endosomen und Lysosomen, aber nicht auf der Zelloberfläche gefunden werden kann (Pullikotil et al., 2007). Im Gegensatz zu Furin, PC7 (Thomas, 2002) (van de Loo et al., 1997) und PC5/6B (Xiang et al., 2000), welche aus der Zelloberfläche zurück zum trans-Golgi-Netzwerk kommen, erreicht SKI-1 die Endosomen/Lysosomen nicht durch die Zelloberfläche, sondern direkt aus dem trans-Golgi-Netzwerk (Seidah et al., 2008).

PCSK9 wird als inaktiver Enzymkomplex sezerniert und dann nach Spaltung des Prosegments aktiviert (Seidah, 2009). Nach Bindung an den LDLR (Maxwell and Breslow, 2004), wird der PCSK9-LDLR-Komplex in den Endosomen und Lysosomen abgebaut (Nassoury et al., 2007). Die Interaktion von PCSK9 mit dem LDLR erfordert die Bindung seiner katalytischen Domäne an der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-A-Domäne des LDLR (Kwon et al., 2008) und an der C-terminalen Cys-His-reiche Domäne des PCSK9 (Nassoury et al., 2007).

#### **1.4.4 Rolle der Prohormonkonvertasen bei der malignen Transformation, Tumorprogression und Metastasierung**

Die PC-Familie spielt bei der Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, welche für die zelluläre Transformation, Tumorprogression und die Metastasierung entscheidend sind, eine wichtige Rolle (Artenstein and Opal, 2011). Das Spektrum der verschiedenen Rollen der Proproteinkovertasen bei der Tumorentwicklung ist natürlich sehr breit. Hier werden einige Aspekte dieser Assoziation erläutert.

Die Entdeckung von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) als eine wichtige Gruppe von Krebs-assoziierten PC- Substraten war ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Rolle von PCs in der malignen Transformation. Die Furin-abhängige Spaltung und Aktivierung von der Metalloprotease Stromelysin-3, welche hauptsächlich in Stromazellen exprimiert wird und bei der Tumorprogression und Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist, war ein erster wichtiger Hinweis auf die Rolle der PCs (Pei and Weiss, 1995) (Basset et al., 1990). Ähnliche Ergebnisse über die Tumorentwicklung durch Furin-abhängige Aktivierung von MT1-MMP (*Membrane type 1-matrix metalloproteinase*) in Astrozytomen-Zelllinien sind ebenfalls bekannt (Mercapide et al., 2002). Auch konnte festgestellt werden, dass MT2-MMP durch PACE4 in murinen SCC (Spinözelluläres Karzinom)-Zelllinien gespalten wurde (Mahloogi et al., 2002).

Die Zellbewegung zusammen mit der Zelladhäsion und der Sekretion von Proteasen sind entscheidende Elemente in der Tumorinvasivität. PCs sind in diesen Prozess involviert. PCs sind in der Prozessierung von alpha6 (Bergeron et al., 2003) und alphaV Integrine (Mayer et al., 2003) beteiligt, Moleküle, die wichtig für die Zelladhäsion an Stromakomponenten sind.

Die Bindung vom Wachstumsfaktor IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) an den IGF-1-Rezeptor, führt zu erhöhten Proliferations- und Überlebenssignale. IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor, der als ein Proprotein synthetisiert wird, und welcher durch Furin aktiviert wird. PC5 und PC7 sind auch in der Lage, diesen Wachstumsfaktor zu aktivieren (Duguay et al., 1997). IGF-1-Rezeptor wird auch als Vorläufer synthetisiert, der nach Furin-Spaltung aktiviert wird (Khatib, 2001). Diese Spaltung vom IGF-1-Rezeptor-Vorläufer ist für die intrazelluläre Signaltransduktion (Tyrosinkinase-Aktivität) und Liganden-Bindung (IGF-1) notwendig (Lehmann et al., 1998). TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) ist ein anderer wichtiger Wachstumsfaktor, der die Expression von Metalloproteinasen und Integrinen induziert, die für die Entwicklung des malignen Phänotyps bedeutend sind (Gold, 1999). Es wurde gezeigt, dass Furin eins von den Molekülen ist, das verantwortlich für die TGF- $\beta$ -Reifung in vitro und in vivo ist (Dubois et al., 1995). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) gehört zu den wichtigsten angiogenetischen Faktoren bei der Karzinogenese von mehreren Krebserkrankungen (Brown et al., 1997). Es ist gezeigt worden, dass sowohl VEGF-C als auch andere Mitglieder dieser Wachstumsfaktor-Familie durch Furin, aber auch durch PC5 und PC 7 aktiviert werden (Siegfried et al., 2003a). Somit wurde die PC-Expression mit der Tumor-Angiogenese in Verbindung gebracht. Eine höhere Expression von Furin und VEGF-C wurden in SCCs dokumentiert (López de Cicco et al., 2004). PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) und seine Rezeptoren sind häufig beim malignem Tumorwachstum beteiligt (Apte et al., 2004) und in mehreren menschlichen Tumoren hochreguliert (George, 2001). Es gibt Hinweise, dass Furin eine der potentesten PDGF-A-Konvertasen sein kann. Mutation eines kritischen PC-Teiles hat die Prozessierung von Pro-PDGF-A-inhibiert, sowie die Tyrosinphosphorylierung des PDGF-A-Rezeptors und anschließend die Zellproliferation (Siegfried et al., 2003b).

Die ersten PCs, die mit malignen Transformation assoziiert wurden, waren PC1 und PC2 (Smeekens and Steiner, 1990). PC1 und PC2 sind in Phäochromozytomen aber nicht in normalen Nebennierenmark exprimiert (Konoshita et al., 1994). Diese Unterschiede in der Expression von PC1 und PC2 zwischen normalen Zellen und Tumorzellen oder zwischen Tumoren mit unterschiedlich aggressivem Potenzial wurden auch bei anderen Propeptinkonvertasen beobachtet, wie Furin und PACE4. Furin und PACE4 wurden beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) detektiert. PC1 und PC2 sind in dem

kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) exprimiert (Mbikay et al., 1997b). Eine Überexpression von diesen Proproteinkovertasen konnte auch bei Mamma-Ca (*Carcinoma*), Kolon-Ca sowie Kopf-Hals-Tumoren gesehen werden (Bassi et al., 2003) (Wang et al., 2015) (Khatib, 2001).

Mehrere Studien haben eine Korrelation der PC-Expression mit schnellem Wachstum, Invasivität oder metastatischem Potential von bösartigen Zelllinien gezeigt (Bassi et al., 2000) (Hubbard et al., 1997). Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen wurden in der Vergangenheit verwendet, um die Beziehung zwischen dem biologischen Verhalten des Tumors und der Furin-Expression zu zeigen (Bassi et al., 2001a) (Bassi et al., 2001b). Eine Überexpression von Furin wurde auch bei anderen Tumoren, wie zum Beispiel Ovarial-Ca (Page et al., 2007) und Mamma-Ca (Cheng et al., 1997) beobachtet.

Im Laufe der Zeit, gab es weitere Hinweise auf die Rolle der Proproteinkovertasen bei der Tumorprogression. Die Überexpression von PACE4 war ausreichend um eine maligne Transformation von normalen murinen Keratinozyten zu induzieren. Dies wurde auf die verbesserte Prozessierung von MMPs und der membranartigen MMP (MT-MMP) in ihre aktive Form durch die überexprimierte PACE4 zurückgeführt (Bassi et al., 2005a). Andere Arbeiten demonstrieren Daten zur Überexpression von PACE4 im menschlichen Prostatakarzinomgewebe und deuten somit an, dass PACE4 eine Rolle bei der Progression vom Prostatakarzinom hat (D'Anjou et al., 2011). Zudem konnte eine deutlich erhöhte PACE4-Expression in Brusttumoren gesehen werden (Cheng et al., 1997).

PC5 und PC7 wurden bezüglich ihrer prognostischen Bedeutung ebenfalls bei einigen menschlichen Tumoren untersucht. Diese Studien zeigten eine positive Assoziation zwischen PC7-Expression und der Entwicklung von Brusttumoren, wobei hier PC5 eher nicht nachweisbar war (Cheng et al., 1997). Andererseits zeigte die Analyse von verschiedenen menschlichen Kolonkarzinom-Zellen eine erhöhte Expression von PC5 (Rovère et al., 1998).

Nach Zusammenschau der bislang publizierten Daten, durch die Kontrolle der Reifung/Aktivierung von tumor-assoziierten Proteinen, stellen die PCs regulatorische Moleküle der Tumorentwicklung und Tumorprogression auf verschiedenen Ebenen dar. Aufgrund der vielfältigen Wirkungen der PCs bei der Tumorzellproliferation, Motilität, Adhäsion und Invasivität bieten sie sich als Zielstruktur für die Entwicklung von gezielten Therapiestrategien an, die in der Lage sind, viele relevante Eigenschaften von Tumorzellen zu neutralisieren.

### 1.4.5 Prohormonkonvertasen beim malignen Melanom

Mehrere Proteine, die den metastatischen Charakter verschiedener Tumorzellen, einschließlich Melanomzellen, beeinflussen, wie Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, werden zunächst als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert, die im Verlauf durch Proproteinkonvertase in ihre aktive Form konvertiert werden (Bassi et al., 2005b) (Khatib et al., 2002).

In den letzten Jahre wurden zunehmende Daten über die Rolle der Proproteinkonvertasen beim kutanen Melanom bekannt. Von Lalou et al. konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von PCs in primären humanen Melanomzellen mit CDKN2-A, p53- und N-Ras-Gen-Mutationen den invasiven Phänotyp dieser Tumoren unterdrücken konnte, indem die Expression und/oder Aktivierung von mehreren ECM-abbauenden Enzymen und ihren Inhibitoren alteriert wurde (Lalou et al., 2010). Bei diesen Tumorzellen konnte Furin, PACE4, PC5 und PC7 detektiert werden. Die Hemmung ihrer Aktivität durch den PC-Inhibitor  $\alpha$ 1-PDX führte zu einer Inhibierung der Migration und Invasion, die mit verminderter MMP-2-Aktivität und erhöhter Expression von TIMP-1 und TIMP-2 assoziiert war.

In einer anderen Studie von Sun et al. wurde die Korrelation von PCSK9-Expression mit der Melanom-Metastasierung in der Leber untersucht. PCSK9  $-/-$  Mäuse, denen B16F1 Maus-Melanom-Zellen injiziert worden waren, entwickelten weniger hepatische Metastasen. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass PCSK9  $-/-$  Mäuse erhöhte Apoptoseraten der hepatischen Stromazellen aber auch der Tumorzellen zeigten, am ehesten durch eine Aktivierung des Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF)-Wegs (Sun et al., 2012).

Zusätzlich zu den oben erwähnten Daten, haben Weiß et al. die Rolle von SKI-1 bei kutanen Melanomen untersucht. Es wurde gezeigt, dass SKI-1 in menschlichen Pigmentzellen exprimiert wird. Zudem zeigte sich eine höhere SKI-1 Aktivität in Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen Melanozyten. SKI-1-Immunreaktivität war auch in Melanommetastasen nachweisbar. Letztlich konnte gezeigt werden, dass die dec-RRL-LL-CMK-vermittelte SKI-1-Hemmung (Enzyminhibitor Decanoyl-RRL-LL-Chlormethylketon) zu einer Unterdrückung der Proliferation und der Stoffwechselaktivität von Melanomzellen *in vitro* und zu einer Reduktion des Tumorwachstums von Melanomzellen *in vivo* (intrakutan in immundefiziente Mäuse injiziert) führt (Weiß et al., 2014).

Diese ersten Daten über die Rolle von Proproteinkonvertasen beim malignen Melanom weisen darauf hin, dass diese Enzyme potentielle therapeutische Ziele für die Behandlung des malignen

Melanoms darstellen können, zum Beispiel durch die Entwicklung entsprechender PC-Inhibitoren.

## 1.5 Zielsetzung

Das Uveamelanom ist der aggressivste Tumor des Auges. Die Pathogenese des Uveamelanoms ist bislang nicht vollständig geklärt und die therapeutischen Optionen bei fortgeschrittenen und vor allem bei metastasierten Tumoren sind, wie beim kutanen malignen Melanom, eingeschränkt. Bei aktuell metastasiertem Uveamelanom werden mit der Standardchemotherapie mit Treosulfan und Gemcitabine keine besseren Ansprechraten als 28,6%, mit einer mittleren Überlebensrate von 61 Wochen (Pföhler et al., 2003) erwartet. Die zunehmende Bedeutung der PCs bei der malignen Transformation, Tumorwachstum und der Metastasierung bei vielen Tumoren stellt daher ein attraktives Forschungsfeld dar. Bislang gibt es kaum Daten über die pathogenetische, prognostische und eventuell therapeutische Relevanz dieser Proteine beim Uveamelanom.

Neben den oben dargestellten Daten zu SKI-1 zeigen vorläufige Befunde auch eine Expression und mögliche Rolle von PACE4 beim malignen Melanom der Haut. Im Bezug auf diese Daten stellte sich nun die Frage, ob eine Beteiligung von PACE4 in der Tumorprogression bei Uveamelanomen auch möglich wäre. In der Literatur existieren bislang keine Daten über die Rolle dieser Proteine bei Uveamelanomen. Um zu überprüfen, ob die Expression von PACE4 im Uveamelanom eine Rolle spielt, wurden daher 34 enukleierte Uveamelanome auf die Expression von PACE4 untersucht. Um die klinische Relevanz als prognostischen Marker zu untersuchen wurde die Expression sowohl mit anderen prognostischen Faktoren wie Tumorzellmorphologie, Tumorlokalisation, Vorhandensein von Nekrosen, Mitosen pro HPF, Beteiligung des Ziliarkörpers usw. als auch mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patientenkollektiv und histologisches Material**

Es wurden die Daten von 34 Patienten verwendet, die zwischen 1994 und 2009 aufgrund eines Uveamelanoms am Universitätsklinikum Münster (Klinik für Augenheilkunde) mit einer transskleralen Tumorresektion operiert wurden (n=34). Sofern möglich wurden alle Patienten über die Studie aufgeklärt und haben ihr Einverständnis dokumentiert. Die Studie wurde nach Einholung eines positiven Votums der Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Aktenzeichen: 2016-213-f-S) durchgeführt.

Von den 34 Patienten, waren 14 männlich, 19 weiblich. In einem Fall ist das Geschlecht nicht bekannt. Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten lag insgesamt bei 65,6 Jahren. Das Durchschnittsalter bei den Männern lag bei 63,8 Jahren und bei den Frauen bei 64,0 Jahren. Die Patienten wurden anhand der vorhandenen Dokumentation über insgesamt 10,8 Jahre postoperativ nachverfolgt. Die enukleierten Tumoren der untersuchten Patienten wurden im Verlauf in dem hiesigen Institut für Pathologie (Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, UKM Münster) sowie in dem Institut für experimentelle Ophthalmologie, UKM Münster bearbeitet und histologisch auf diversen Parametern wie Tumorlokalisierung, Nekrosen usw. untersucht. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Marker wurde bestimmt. In einem Teil der Präparate konnten jedoch nicht alle der Parameter klar definiert werden. Dieses wurde entsprechend dokumentiert. Nach Auswertung der histologischen Kriterien erfolgte die Untersuchung der PACE4-Expression mittels Immunhistochemie in der Hautklinik des Universitätsklinikums Münster.

Es wurden ausschließlich in Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE-) Gewebe verwendet.

#### **2.1.2 Verwendete Antikörper**

Für die Darstellung der PACE4-Expression wurde ein polyklonaler, aus Kaninchen stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper gegen PCSK6/PACE4 von *ThermoScientific DakoCytomation* in einer Verdünnung von 1:150 verwendet.



Zusätzlich wurde als negative Kontrolle ein aus Kaninchen stammender Antikörper von *Thermo-Scientific DakoCytomation* in einer Verdünnung von 1:150 verwendet (Initiale Konzentration 20µg/L).

### 2.1.3 Kontrolle-Gewebe

Als positive Kontrolle wurde nach Anleitung des Herstellers humanes Leber-Gewebe angewendet. Als negative Kontrolle wurde nach Anleitung des Herstellers humanes Prostata-Gewebe angewendet.

Die Uveamelanomgewebe wurden vom hiesigen Institut für Pathologie (Gerhard-Domagk-Institut Für Pathologie, UKM Münster) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.4 Liste der verwendeten Materialien

**Tab. 2:** Liste der verwendeten Materialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Antibody Diluent</i>	<i>DakoCytomation, Hamburg</i>
Antikörper: PCSK6/ PACE4 polyklonaler Antikörper, Spezies Kaninchen	<i>Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts.</i>
<i>Negative Control, Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal)</i>	<i>Thermo-Scientific Dako Cytomation, Waltham, Massachusetts</i>
AEC (AC 1310100 AEC 2 Komponenten Kit)	DCS, Hamburg
Aqua dest	Apotheke UKM, Münster
Automat für HE-Färbung, <i>Model Autostainer 480, Lab Vision</i>	<i>Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts</i>
Citratpuffer pH 6,1	DCS, Hamburg
<i>DAKO Pen</i>	DakoCytomation, Hamburg
DCS Polylink (Sekundärantikörper)-HRP (Peroxidase) Kit PD000RP	DCS, Hamburg
Deckgläser 24 x 50 mm, Dicke 1, Automat-Star	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig
Digitalkamera Olympus DP70	<i>Olympus Corporation, Tokyo, Japan</i>
Digitaluhr	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eindeckmittel Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt

Eppendorfgefäß 2 ml	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Ethanol	Appllichem Panreac, Darmstadt
Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Histoclear Tissue Tek</i> <sup>®</sup>	Sakura Finetek Europe B.V., Niederlanden
Kälteplatte, Model COA 30	MEDITE GmbH, Burgdorf
Kochplatte	Braun Elektrik, Kronberg
Lichtmikroskop Olympus CX-31, RBSF	<i>Olympus Corporation, Tokyo, Japan</i>
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan HBO 100 W/2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Messzylinder, Silberbrand Eterna	Sigma-Aldrich, St. Louis
Mikrotom (Rotationsmikrotom) Typ HM360	<i>Microm International GmbH, Walldorf</i>
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Objektträger <i>SuperFrost Plus</i>	Menzel GmbH, Braunschweig
Paraffin Wax (54°-57°)	Tissue Tek, Staufen
pH-Metter Typ PB11	Sartorius AG, Göttingen
Pipetten 0,5 – 10-20-50-100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Waschpuffer, Labline Puffersystem	DCS, Hamburg

## 2.1.5 Häufig verwendete Software

**Tab. 3:** Häufig verwendete Software

Name	Hersteller
<i>Excel</i> <sup>®</sup>	<i>Microsoft Corporation, Redmond, USA</i>
<i>ImageJ</i> <sup>®</sup>	<i>National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA</i>
<i>Olympus DP Soft 3.2</i>	<i>Soft Imaging System GmbH, Berlin</i>
<i>Paint</i> <sup>®</sup>	<i>Microsoft Corporation, Redmond, USA</i>
<i>Word</i> <sup>®</sup>	<i>Microsoft Corporation, Redmond, USA</i>
<i>Zotero</i> <sup>®</sup> Reference Management Software	<i>Center for History and New Media of George Mason University (GMU), Virginia, USA</i>
<i>GraphPad-PRISM 6</i> <sup>®</sup>	<i>GraphPad Software, Inc, San Diego, USA</i>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunhistochemie-Prinzip

Immunhistologische Nachweise beruhen auf Antigen (Epitop)-Antikörper-Reaktionen. Diese werden über ein indirektes Detektionssystem dargestellt. Nach einer antikörperspezifischen Vorbehandlung wird das Gewebe mit einem unkonjugierten Primäantikörper inkubiert, in unserem Fall mit dem PCSK6/PACE4-Antikörper sowie mit dem Kaninchen-IgG (als negative Kontrolle). Danach erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Sekundäantikörpers, der an den gebundenen Primäantikörper bindet. Biotin hat eine hohe Affinität zu Streptavidin. Bei Zugabe Streptavidin gekoppelter Phosphatase, lagert sich das Streptavidin an das Biotin des gebundenen Sekundäantikörpers. Das anschließend zugegebene Chromogen wird von der Phosphatase durch Hydrolyse zur Präzipitation gebracht (rot). Als Gegenfärbung dient Hämalaun.

### 2.2.2 Vorbereitung des histologischen Materials

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an FFPE-Material vorgenommen, das am Mikrotom in 1 µm dünne Schichten geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und anschließend 30 min bei 60°C getrocknet wurde. Vor Beginn der eigentlichen Färbungen wurden die Gewebeschnitte 2 x 15 min in *HistoClear* entparaffiniert und anschließend mit Ethanol in einer absteigenden Konzentration bearbeitet.

### 2.2.3 Erarbeitung der Färbeprotokolle

Zur Austestung wurden Paraffinschnitte von humanem Lebergewebe benutzt, da sie laut Anweisung des Herstellers des Antikörpers (*Thermo Scientific*) eine stark positive Reaktion erwarten ließen. Das Antikörper wurde mit hitzeinduzierter Demaskierung durch Erhitzen der Schnitte in Citratpuffer (pH=6,1) in verschiedenen Konzentrationen (Antikörper-Verdünnung 1:100, 1:150 und 1:200) getestet. Dabei wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen durch Auslassen des Primäantikörpers mitgeführt, um unspezifische Anfärbungen sowie Hintergrundfärbungen zu erkennen bzw. auszuschließen. Als negative Kontrollgewebe wurden Paraffinschnitte von humanem Prostatagewebe benutzt. Das beste Färbeergebnis wurde mit einer Verdünnung des Primäantikörpers von 1:150 (Konzentration 1 mg/ml) erreicht.

## 2.2.4 Färbeprotokoll PCSK6/PACE4

Für die Darstellung von PCSK6/PACE4 wurde der entsprechende Antikörper in einer Verdünnung von 1:150 verwendet. Als negative Kontrolle wurde der Kaninchen-IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:150 angewendet (Ausgangskonzentration 20µg/L).

Die Färbung erfolgte mit Hilfe des Polylink-HRP Kit PD000RP (*DCS Detection Line*). Eine Antigen-Demaskierung mit hitzeinduzierter Demaskierung durch Erhitzen der Schnitte in Citratpuffer (pH=6,1) war notwendig. Bei jeder Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Färbeschritte:

Zunächst wurden die Paraffin-Schnitte in Glasküvetten nach folgendem Schema entparaffiniert:  
 2x15 Minuten *HistoClear* (Tissue Tek, SAKURA) → 30 Sekunden 100% Ethanol vergällt →  
 2x30 Sekunden 96% Ethanol vergällt → 30 Sekunden 70% Ethanol vergällt → 30 Sekunden  
 50% Ethanol vergällt → 2x30 Sekunden Aqua dest.

Anschließend erfolgte die Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene: Die folgenden Vorbehandlungen erfolgten im Dampfgarer bei 90°C für 25 Minuten, danach kühlten die Schnitte für 20 Minuten in Citratpuffer pH 6,1 ab.

Im Verlauf erfolgte die Färbung wie unten beschrieben:

- Die Präparate wurden in Labline Waschpuffer DCS WL 583 C2500 (1:20 mit Aqua dest verdünnt) über ca. 20 Minuten gespült
- Die Schnitte wurden anschließend mit Dako Pen S2002 eingerahmt und in einer feuchten Kammer gelegt → 70-100µl verdünnten Antikörper (PACE4) wurden zugegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- Spülung der Schnitte in Labline Waschpuffer, 1x3 Minuten
- 1-2 Tropfen Link (DCS Polylink-HRP Kit PD000RP) pro Schnitt und dann Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülung der Schnitte in Labline Waschpuffer, 1x3 Minuten
- 1-2 Tropfen Streptavidin HRP gekoppelt (DCS Polylink-HRP Kit PD000RP) pro Schnitt und dann Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur
- Spülung der Schnitten in Labline Waschpuffer, 1x3 Minuten

→ AEC (AC 1310100 AEC 2 Komponenten Kit DCS) herstellen: 20µl AEC Konzentrat auf 1ml AEC Puffer, je 70-100µl fertige Lösung pro Schnitt und dann Inkubation über 20 Minuten bei Raumtemperatur

→ Gegenfärbung mit saurer Hämalaunlösung und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Roticlear

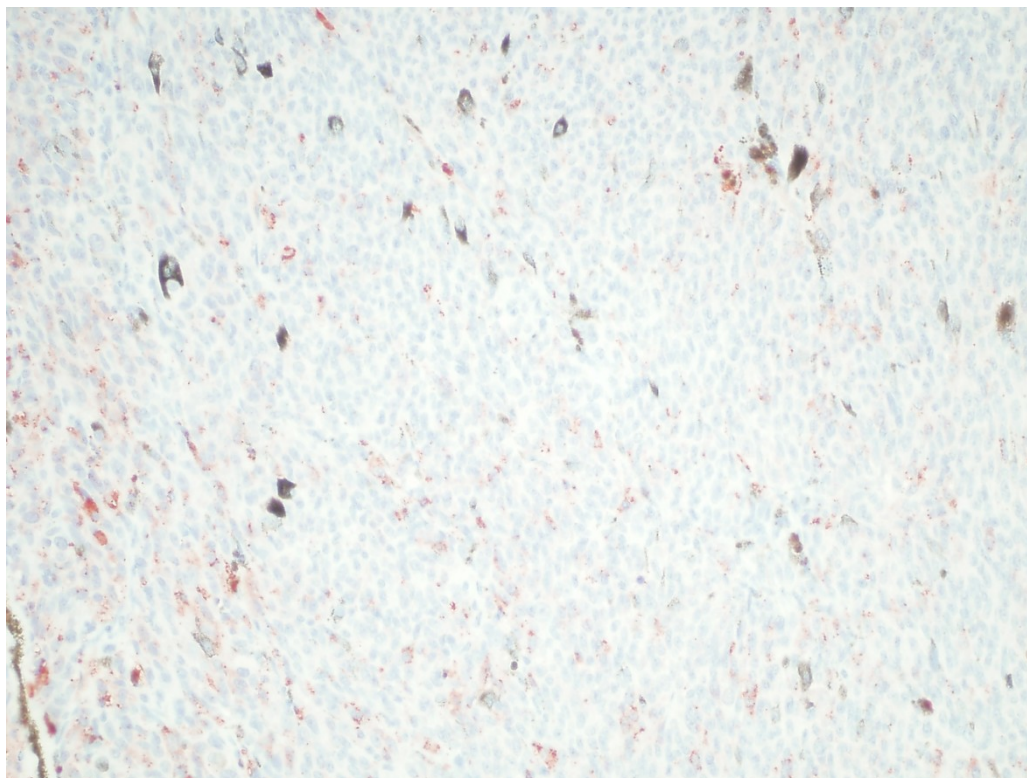
→ Eindecken der Gewebeschnitte.

Um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu verhindern, wurden die Präparate nach jedem Inkubationsschritt in einer feuchten Kammer gelegt.

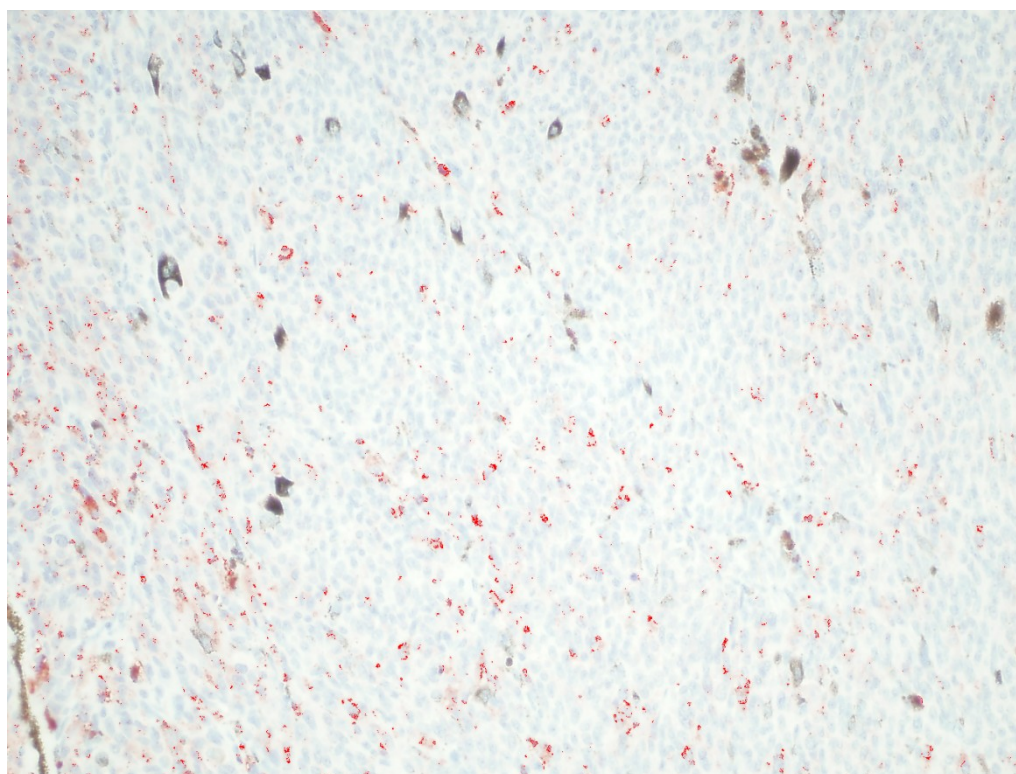
## 2.2.5 Quantifizierung

Nach der immunhistochemischen Färbung der Präparate mit dem PACE4-Antikörper, erfolgte die Begutachtung des Färbeergebnisses. Zudem erfolgten beim jeden Präparat eine Färbung mit dem Kaninchen-IgG-Isotyp-Antikörper, als negative Kontrolle. Zunächst wurde das qualitative Färbeergebnis beurteilt, wobei auch unspezifische Färbungen und Hintergrundfärbungen entsprechend mitberücksichtigt wurden. Um eine Quantifizierung der Färbung zu erreichen, wurde das Programm *ImageJ*<sup>®</sup> verwendet. Jeder Schnitt wurde mit einer Digitalkamera Olympus DP70 unter dem Mikroskop Zeiss Axioplan HBO 100 W/2 photographiert. Dann wurden von jedem Schnitt 15 repräsentative Gesichtsfeldaufnahmen in einer 20fachen Vergrößerung aufgenommen (7 Bilder vom Randbereich, 8 Bilder ohne Bezug zum Rand des Präparates). Im Verlauf wurde jede Foto-Aufnahme mittels *ImageJ*<sup>®</sup> nach dem folgenden Schema bearbeitet: ***File*→*Open*→*Selected Image*→*Image*→*Adjust*→*Color Threshold***. Anschließend nach Auswählen der gewünschten Grenzen in den Bereichen *Hue, Saturation and Brightness* folgt die Option ***Analyze*→*Analyze Particles*→*Summarize results***. Hier wird ein Beispielschnitt VOR und NACH der Bearbeitung dargestellt.

Vor *ImageJ*<sup>®</sup> Bearbeitung :



Nach *ImageJ*<sup>®</sup> Bearbeitung:



Ziel war die Quantifizierung der PACE4-Färbung durch die Messung der angefärbten Oberfläche. Dafür wurden bei jeder Foto-Aufnahme Farbschwellenwerte bestimmt, so dass die angefärbten Areale selektiert werden konnten. Durch das Programm *Paint*<sup>®</sup> (*Microsoft Windows*<sup>®</sup>) wurden bedarfsweise die Bilder bearbeitet, so dass unspezifische Färbungen (z.B. durch Einblutungen usw.) ausgeschlossen werden konnten. Interessanterweise waren bei einzelnen Abbildungen Blutgefäße darstellbar. *Image J*<sup>®</sup> verwendet Farbkontraste zur Differenzierung von gefärbten und nicht gefärbten Zellen. Da die Farbe der Erythrozyten in den Blutgefäßen dem Spektrum des immunhistochemischen Farbproduktes sehr ähnlich war, wurden die Gefäße durch die Morphologie identifiziert und dann mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms gelöscht. Insbesondere wurden, um einen negativen Einfluss auf die gesamte Berechnung der PACE4 Färbung zu vermeiden, diese bedarfsweise durch das Programm *Paint*<sup>®</sup> (*Microsoft Windows*<sup>®</sup>) aus den Bildern entfernt. Die Gefäße oder die Blut-Artefakte wurden mit der Hilfe des Programms weißlich verfärbt. Da die Berechnung der gefärbten Oberfläche in *Image J*<sup>®</sup> durch die Erkennung von rötlichen Strukturen kalkuliert wurde, konnten die Areale, die mit dem *Paint*<sup>®</sup> Programm weißlich gefärbt wurden, nicht anerkannt und daher nicht mitberücksichtigt werden.

Die kumulative angefärbte Oberfläche von jeder Aufnahme wurde dann kalkuliert und mittels *Microsoft Word Excel 2007*<sup>®</sup> wurde anschließend der Mittelwert von allen Färbeergebnissen der 15 Bilder errechnet, welcher als repräsentativ für das quantitative Färbeergebnis des gesamten Schnittes berücksichtigt wurde.

## 2.2.6 Erhebung der klinischen Daten

Die klinischen Daten der Patienten wurden, soweit von der ärztlichen Dokumentation erlaubt, durch die Patientenakten der UKM Augenklinik und durch das Krankenhausinformationssystem Orbis erhoben. Zur Eruiierung des klinischen Verlaufs wurden bedarfsweise die Haus- oder Augenärzte der Patienten telefonisch kontaktiert. Falls die Daten der niedergelassenen behandelnden Ärzte nicht mehr aktuell, unbekannt oder falsch angegeben wurden, wurden die Patienten oder deren Verwandte angerufen. Somit konnte die Mehrheit der klinischen Patientendaten gesammelt werden.

### **2.2.7 Statistische Analyse**

Die Graphik-Herstellung und die statistische Analyse erfolgte mittels des Programms *GraphPad-PRISM-6*<sup>®</sup>. Da die Expression der PACE4 Färbung keine Normalverteilung (Gaußkurve) aufweist, wurde für die statistische Auswertung der Kruskal-Wallis-Test (nach William Kruskal und Wilson Allen Wallis, auch als H-Test bekannt) und der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier statistischer Test, womit überprüft werden kann, ob sich die zentralen Tendenzen von mehr als zwei verschiedenen Stichproben signifikant voneinander unterscheiden. Die abhängige Variable muss dabei nicht normalverteilt, aber mindestens ordinalskaliert sein (Kruskal and Wallis, 1952). Der Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben ist ein nichtparametrischer Test zur Überprüfung, ob die zentrale Tendenz von zwei verschiedenen Stichproben unterschiedlich ist (Mann and Whitney, 1947).



## 3 Ergebnisse

Untersuchungen zur Rolle der Prohormonkonvertase PACE4 in kutanen Melanomen hatten deren Expression mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors assoziiert. Um die Relevanz im Uveamelanom zu analysieren, erfolgte die immunhistochemische Färbung von PACE4 in Aderhautmelanomen. Die PACE4-Expression wurde anschliessend mit standardisierten histologischen Kriterien und dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert.

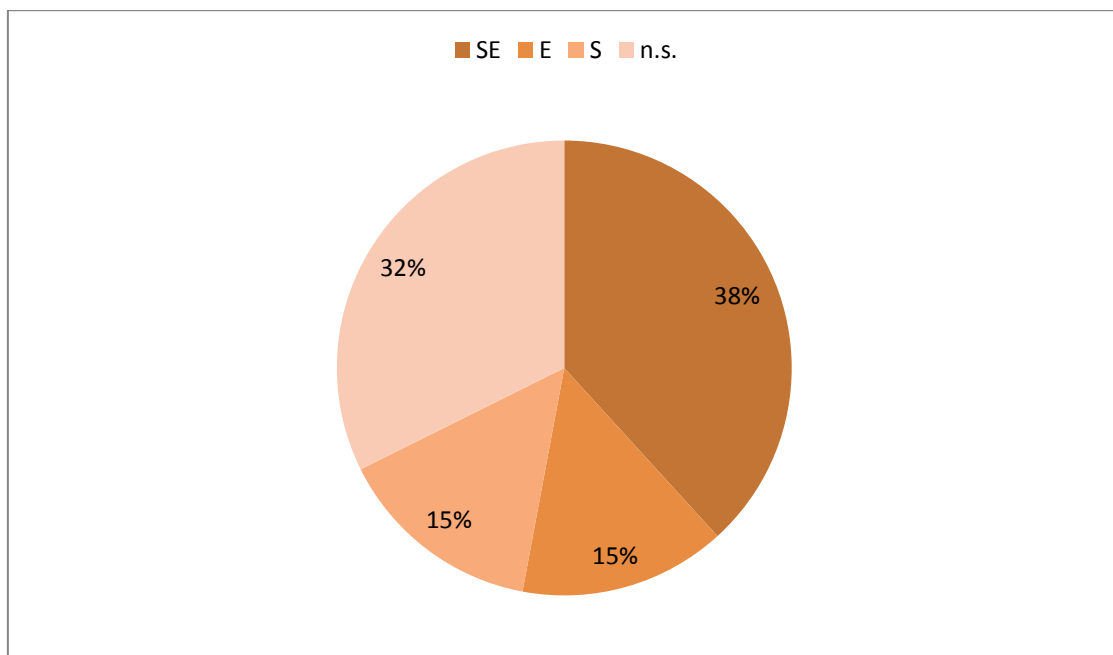
### 3.1 Histopathologische Befundung

Die histologische Auswertung erfolgte am Institut für Pathologie (Gerhard-Domagk-Institut Für Pathologie) sowie am Institut für experimentelle Ophthalmologie, UKM Münster, unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen und Augenarztes. Zunächst wurden alle enukleierten Augen in einer HE-Färbung auf histologische Kriterien des Aderhautmelanoms hin untersucht. Insbesondere wurden folgende Kriterien ausgewertet:

1. Morphologie: Spindelzell-, Epitheloidzell- oder gemischtzellige Melanome
2. Zellteilung: Mitosen pro 10 HPF
3. Anteil der nekrotischen Zellen in Prozent
4. Extraokuläre Beteiligung
5. Lokalisation in Relation zum Äquator (Vorderer Augenabschnitt/Hinterer Augenabschnitt)
6. Lokalisation im Ziliarkörper, in der Iris, oder in der Aderhaut
7. Vorhandensein einer Ziliarkörperinfiltration

### 3.1.1 Morphologie: Spindelzell-, Epitheloidzell- oder gemischtzellige Melanome

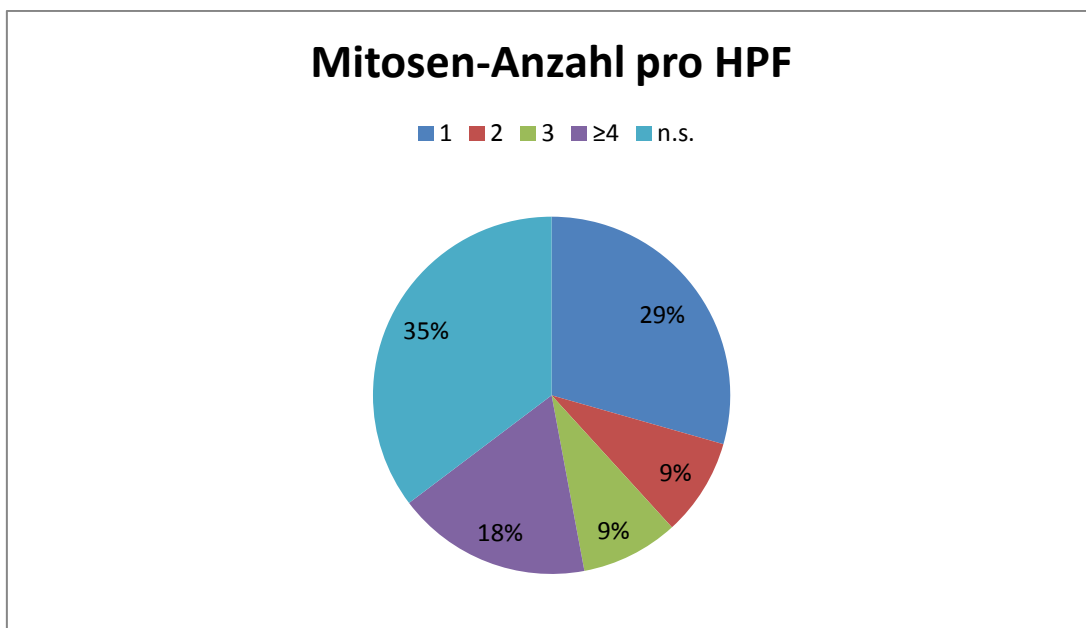
Die 34 untersuchten Uveamelanome wurden zunächst nach deren Morphologie in der HE Färbung als Spindelzellmelanome (S), Epitheloidzellmelanome (E) und gemischtzellige Melanome (SE) kategorisiert. Die Definition dieser Gruppierungen ergaben sich wie folgt: Ausschließlich aus Spindelzellen zusammengesetzte Tumoren wurden als Spindelzellmelanome gewertet. Als epitheloide Melanome wurden Tumoren bezeichnet, bei denen mehr als die Hälfte des Tumors aus großen runden Zellen mit einem großen Kern, einem prominenten eosinophilen Nukleolus, reichlich Zytoplasma bestehen und die Verlust der Kohäsion zeigen. Wenn weniger als die Hälfte des Tumors aus Epitheloidzellen besteht, wurde der Tumor als gemischter Zelltyp eingestuft. Wie in Abb. 10 zu sehen, waren 15% (4/34) der Uveamelanome in der Kategorie Spindelzellmelanome, 15% (5/34) in der Kategorie und 38% (13/34) gemischtzellige Melanome. Bei 32% der Präparate war keine Zuordnung zu einem Zelltyp möglich.



**Abb. 10:** Morphologische Kategorisierung der Uveamelanome mit Angabe der Häufigkeit: Gemischtzellige Melanome (SE), Spindelzellmelanome (S), Epitheloidzellmelanome (E), und nicht spezifizierbare (n.s.)

### 3.1.2 Mitosen pro 10 HPF

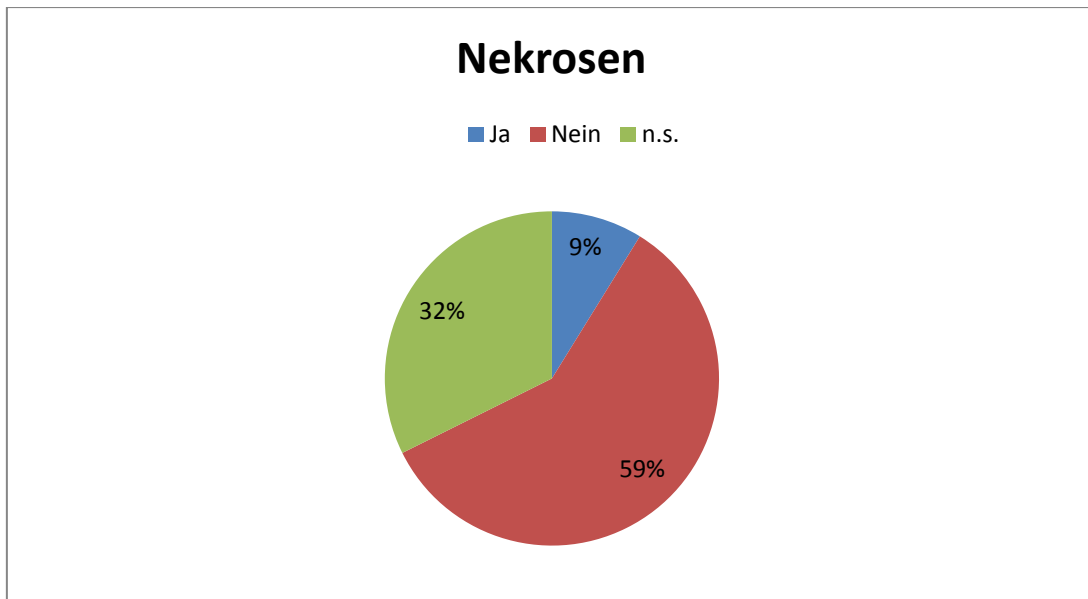
Die Mitoserate ist ein signifikanter prognostischer Faktor und korreliert mit der Krankheitsmortalität (McLean et al., 1977). Hier wurde der Proliferationsmarker Ki-67 zur Darstellung der Mitosen verwendet. Um die Mitoserate zu quantifizieren und die Relevanz der Anzahl der Mitosen zu bestimmen, wurde die Anzahl der Mitosen pro 10 HPF ermittelt und in Kategorien (keine Mitose, 1, 2, 3 oder >4 Mitosen) eingeteilt. Eine Mitose zeigten 10/34 (35%) der Präparate, zwei Mitosen waren bei 3/34 (9%) der Präparate, drei Mitosen waren bei 3/34 (9%) der Präparate und mehr als 4 Mitosen waren bei 6/34 (18%) der Präparate zu finden (Abb. 11).



**Abb. 11:** Anzahl der Mitosen im Uveamelanom pro 10 HPF (nicht spezifizierbare als "n.s." bezeichnet)

### 3.1.3 Nekrosen

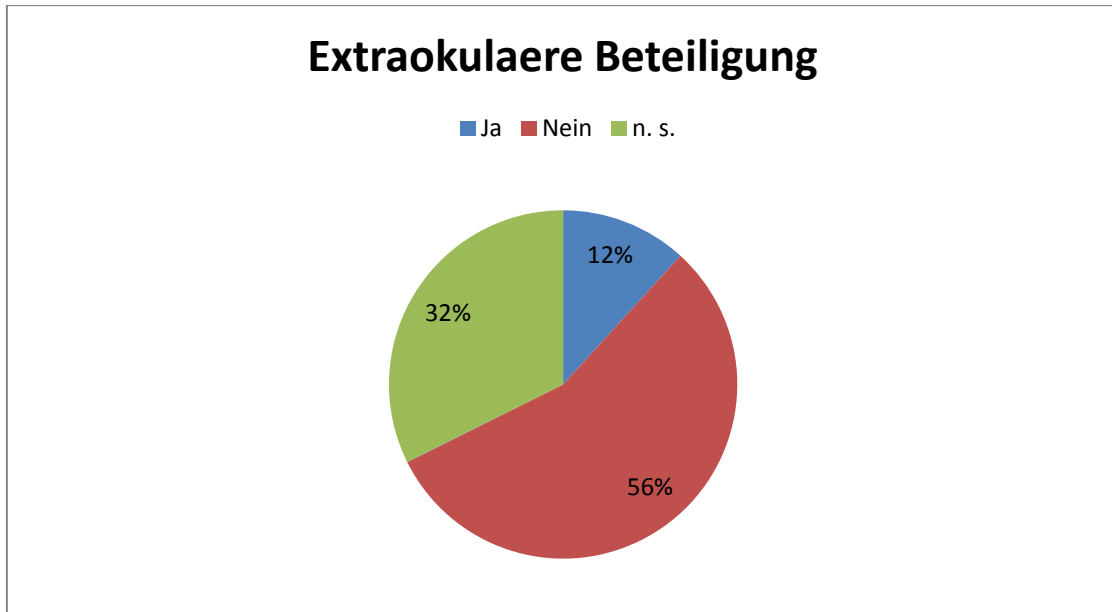
Ein weiteres Kriterium für die Aggressivität des Uveamelanoms, ist die Anzahl der nekrotischen Zellen. Tumornekrosen sind häufiger bei größeren Tumoren und in epitheloidzelligen Arealen der Uveamelanome zu sehen (COMS report no. 6, 1998). Die Uveamelanome wurden in der HE-Färbung auf Nekrosen untersucht. Nekrosen wurden in 9% (3/34) der Uveamelanome gefunden, keine Nekrosen zeigten sich in 59% (20/34) der Uveamelanome (Abb. 12).



**Abb. 12:** Anzahl der Präparate mit Nekrosen (‘n.s.’: nicht spezifizierbare)

### 3.1.4 Extraokuläre Beteiligung

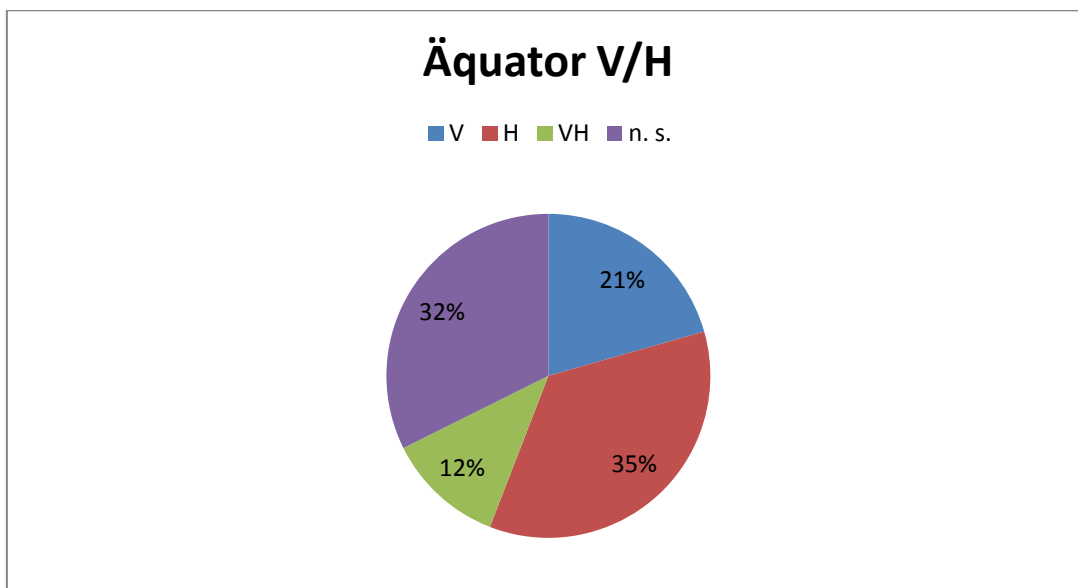
Die Uveamelanome, die eine extraokuläre Beteiligung aufweisen, sind relativ selten und mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Das therapeutische Management ist hier schwierig (Jeong and Sa, 2015). In Abb. 13 ist die Häufigkeit einer extraokulären Beteiligung gezeigt. Eine extraokuläre Beteiligung zeigten 4/34 (12%) der Präparate und keine extraokuläre Beteiligung zeigten 19/34 (56%) der Präparate.



**Abb. 13:** Anteil der Uveamelanome mit oder ohne extraokuläre Beteiligung (“n.s.”: nicht spezifizierbare)

### 3.1.5 Lokalisation im Verhältnis zum Äquator

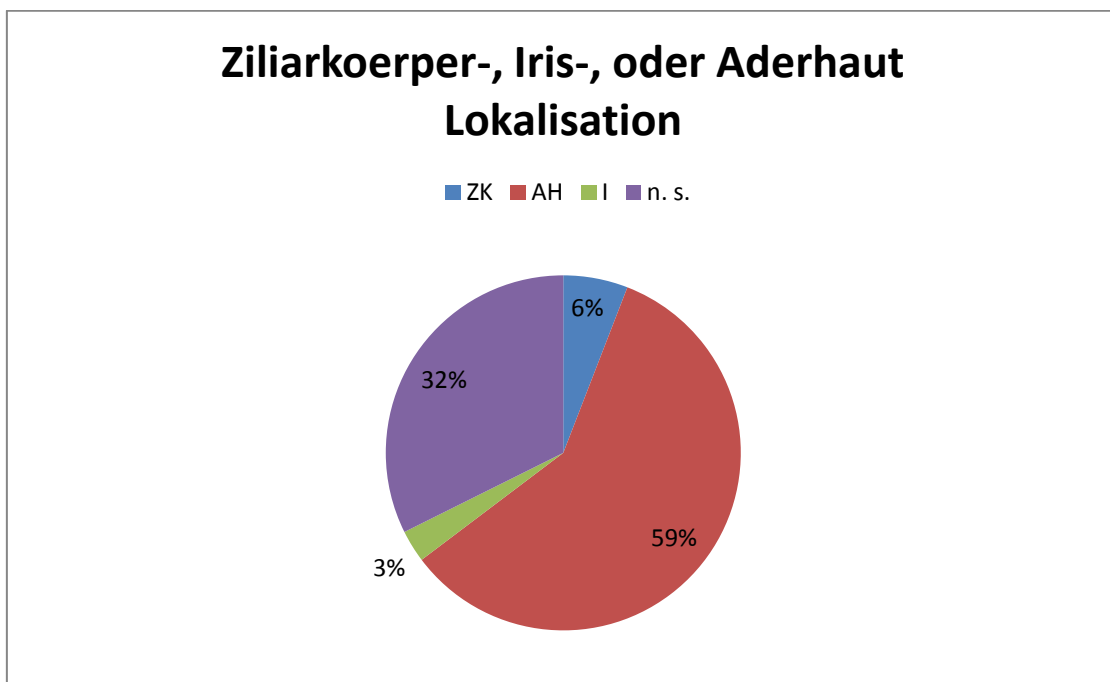
Uveamelanome, die im vorderen Augenabschnitt (Uveamelanome anterior zum Äquator oder Ziliarkörpermelanome, oder Ziliochoroidale Melanome) lokalisiert sind, haben eine insgesamt ungünstigere Prognose als Uveamelanome, die im hinteren Augenabschnitt lokalisiert sind (Seregard and Kock, 1995) (Li et al., 2000). Eine Lokalisation im vorderen Augenabschnitt zeigten 7/34 (21%) der Präparate und eine Lokalisation im hinteren Augenabschnitt zeigten 12/34 (35%) der Präparate. Zudem zeigten 4/34 (12%) der Präparate eine Lokalisation des Uveamelanoms in beiden Augenabschnitten (Abb. 14).



**Abb. 14:** Lokalisation im Verhältnis zum Äquator: V = Melanom im vorderen Augenabschnitt, H = Melanom im hinteren Augenabschnitt, VH = Melanom in beiden Augenabschnitten, n.s = nicht spezifizierbare

### 3.1.6 Lokalisation des Primarius: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut

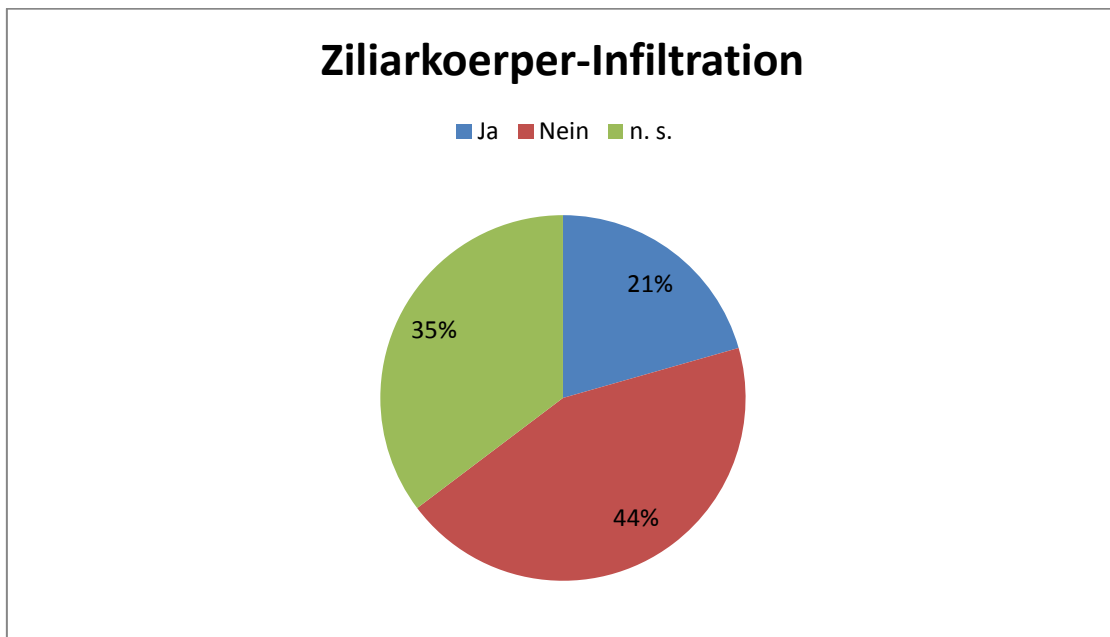
Neben der Lokalisation im Verhältnis zum Äquator des Auges, werden unterschiedlich aggressive Verläufe der Uveamelanoms in Abhängigkeit von der Lokalisation an Ziliarkörper, Iris und der Aderhaut beschrieben (Ashton, 1964) (Shields et al., 2001) (McLean et al., 1982). Daher wurde zusätzlich analysiert, wie die Lokalisation der hier untersuchten Uveamelanome war. In unserer Population sind 20/34 (59%) der Präparate in der Aderhaut lokalisiert, 2/34 (6%) der Präparate sind im Ziliarkörper und 1/34 (3%) der Präparate ist in der Iris lokalisiert (Abb. 15).



**Abb. 15:** Lokalisation der Uveamelanome: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut (n.s.= nicht spezifizierbare)

### 3.1.7 Sekundäre Infiltration des Ziliarkörpers

Die Invasion des Ziliarkörpers gehört zu den Parametern mit sehr schlechter prognostischer Bedeutung. Die schlechte Prognose ist in diesem Fall auch unabhängig von der Tumorgroße (Gragoudas et al., 1988) (Schmittl et al., 2004). In unserer Population zeigten 7/34 (20%) der Präparate eine sekundäre Infiltration des Ziliarkörpers, 15/34 (44%) zeigten keine sekundäre Infiltration des Ziliarkörpers und bei 12/34 (35%) der Präparate war das nicht spezifizierbar (Abb. 16).



**Abb. 16:** Anteil der Uveamelanome mit Ziliarkörperinfiltration (n.s. = nicht spezifizierbare)

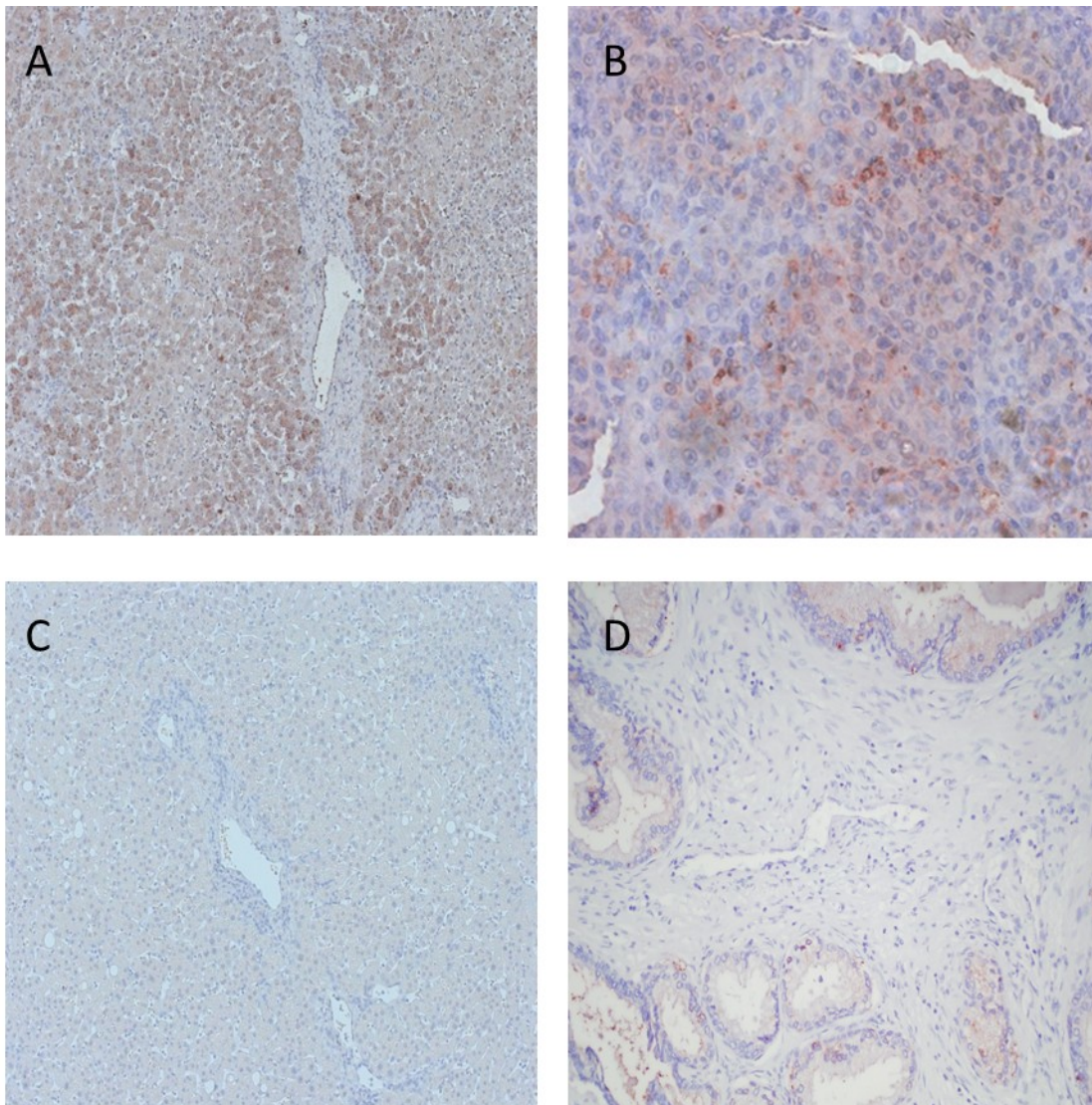
## 3.2 Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von PCSK6/PACE4

Der Hypothese folgend, dass die Ausprägung der PACE4-Expression der Uvea Melanomzellen mit der Aggressivität des Tumors korreliert, wurden 34 Uveamelanome immunhistochemisch



mit anti-PACE4 Antikörper gefärbt. Die Präparate wurden anschließend je nach Färbungsmuster und Farbtintensität kategorisiert.

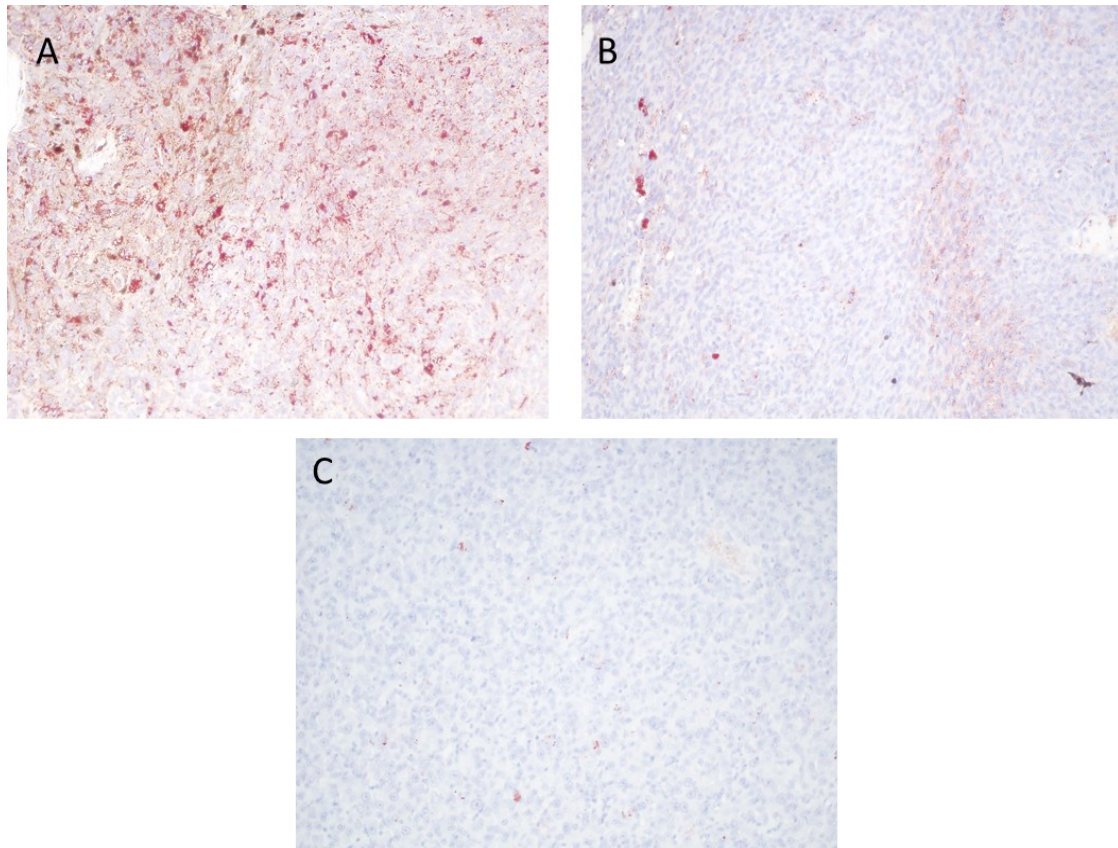
Das Färbeprodukt der zytoplasmatischen PACE4-Färbungen stellt sich im Kontrollgewebe, der Leber, rosa-braun dar (Abb. 17A+B). Als positives Kontrollgewebe wurde humanes Lebergewebe verwendet (Abb. 17A). Als negatives Kontrollgewebe wurde Prostatagewebe genutzt. (Abb. 17D). Auch die Isotyp-Kontrolle mit Kaninchen-IgG war negativ und wurde für jedes Präparat mitgeführt (Abb. 17C).



**Abb. 17:** Exemplarische Beispiele der Kontrollfärbungen für PACE4. A Lebergewebe als Positivkontrolle zeigt eine homogene Färbung des Zytoplasmas angefärbt, 200fache Vergrößerung. B 400fache Vergrößerung. C Die Isotyp-IgG-Antikörperfärbung des Lebergewebes ist negativ, 200fache Vergrößerung. D Prostatagewebe als Negativkontrolle mit anti-PACE4 gefärbt, 200fache Vergrößerung

**Färbemuster der PACE4 Färbung von Uveamelanomen: Repräsentative Uveamelanome mit erhöhter, niedriger und mittlerer PACE4-Expression:**

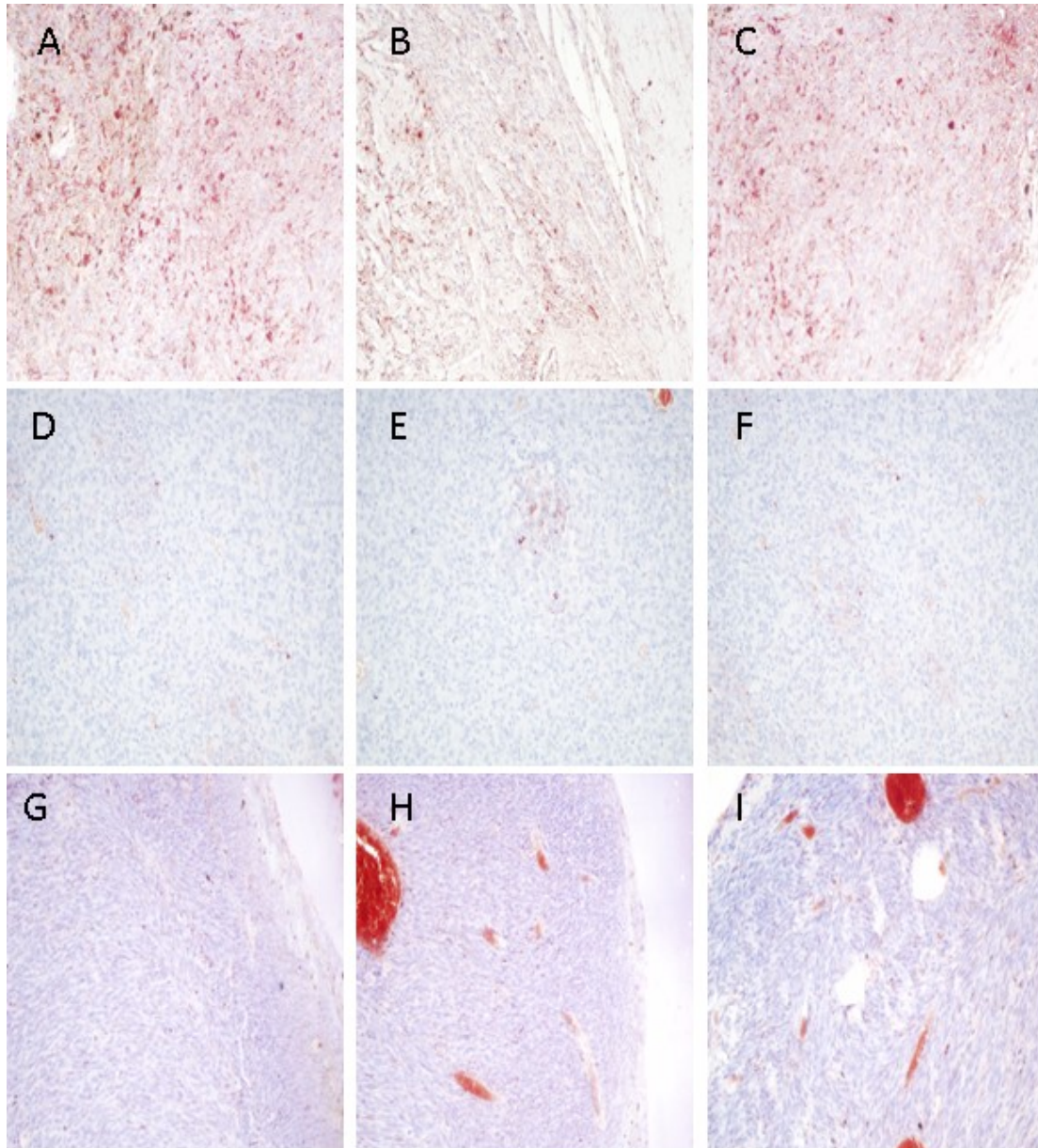
Bei den angefärbten Tumoren zeigten sich Unterschiede sowohl in der Expression als auch in der Verteilung in den Tumoren. Es konnten drei Färbemuster der PACE4-Expression identifiziert werden: Diffus (Abb. 18A), gruppiert stehende PACE4 positive Zellen (wolkig) (Abb. 18B), sowie Färbung von einzelnen Zellen (Abb. 18C).



**Abb. 18:** Beispiele des Färbemusters der PACE4-Expression: A. Diffuses Färbemuster B. Wolkiges Färbemuster C. Färbung von einzelnen Zellen

### **3.3 Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von PACE4**

Die Quantifizierung der PACE4-Expression erfolgte an den immunhistochemisch gefärbten Uveamelanomen. Die Expression variierte stark. Einige Präparate zeigten ein vollständig negatives Gewebe, andere zeigten eine sehr starke Expression von nahezu allen Melanomzellen, und andere Präparate zeigten eine mittlere PACE4-Expression, mit Färbung von einigen Tumorbereichen (Abb. 19).

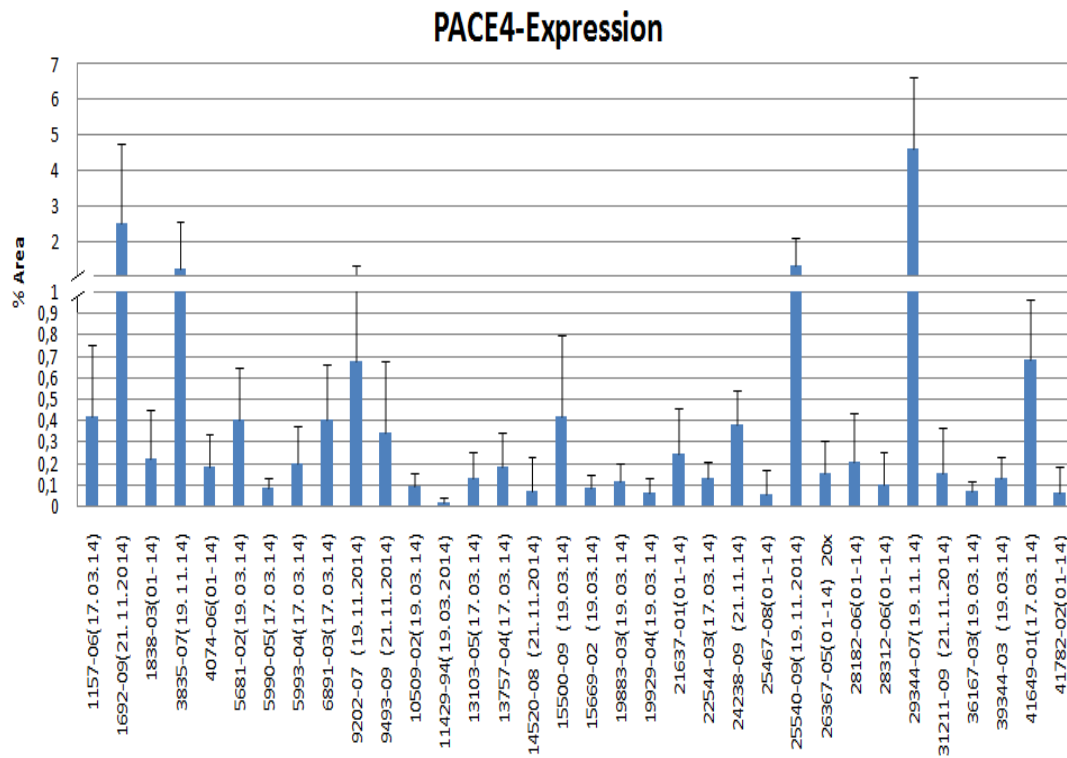


**Abb. 19:** PACE4 Färbung von Uveamelanomen. A-C: Präparate mit hoher PACE4-Expression, D-F: Präparate mit negativer oder minimaler PACE4-Expression, G-I: Präparate mit mittlerer PACE4-Expression

Zur Quantifizierung der PACE4-Expression wurde die Software *ImageJ*® zur Hilfe genommen. Zunächst wurde die Gesamtfläche von 15 Gesichtsfeldern eines Melanomschnittes bestimmt. Anschließend konnten nach Setzen eines Schwellenwertes die positiv gefärbten Anteile gemessen und in Relation zur Gesamtfläche gesetzt werden (Abb. 20). Wie in Tabelle 4 zu sehen, variierte die PACE4-Expression deutlich.

<b>Präparat</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
1157-06(17.03.14)	0,41	0,34
1692-09(21.11.2014)	2,53	2,25
1838-03(01-14)	0,22	0,22
3835-07(19.11.14)	1,28	1,28
4074-06(01-14)	0,18	0,15
5681-02(19.03.14)	0,40	0,24
5990-05(17.03.14)	0,08	0,04
5993-04(17.03.14)	0,20	0,17
6891-03(17.03.14)	0,40	0,26
9202-07 (19.11.2014)	0,68	0,67
9493-09 (21.11.2014)	0,34	0,33
10509-02(19.03.14)	0,09	0,06
11429-94(19.03.2014)	0,02	0,02
13103-05(17.03.14)	0,13	0,12
13757-04(17.03.14)	0,18	0,16
14520-08 (21.11.2014)	0,07	0,15
15500-09 (19.03.14)	0,42	0,38
15669-02 (19.03.14)	0,08	0,06
19883-03(19.03.14)	0,12	0,08
19929-04(19.03.14)	0,06	0,07
21637-01(01-14)	0,24	0,21
22544-03(17.03.14)	0,13	0,08
24238-09 (21.11.14)	0,38	0,15
25467-08(01-14)	0,05	0,11
25540-09(19.11.2014)	1,36	0,76
26367-05(01-14) 20x	0,15	0,15
28182-06(01-14)	0,21	0,22
28312-06(01-14)	0,10	0,15
29344-07(19.11.14)	4,62	2,00
31211-09 (21.11.2014)	0,15	0,21
36167-03(19.03.14)	0,07	0,04
39344-03 (19.03.14)	0,13	0,10
41649-01(17.03.14)	0,68	0,28
41782-02(01-14)	0,06	0,12

**Tabelle 4:** Quantifizierung der PACE4-Expression



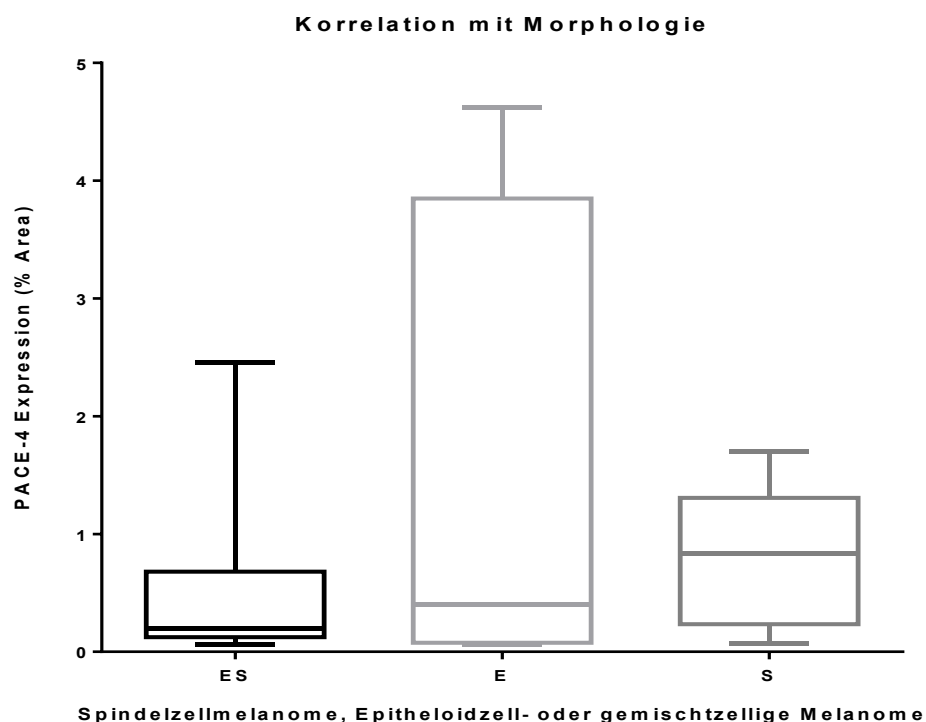
**Abb. 20:** Prozentuale Expression von PACE4 bezogen auf die Präparatfläche

### 3.4 Korrelation der PACE4-Expression mit histopathologischen Charakteristika der Uveamelanome

#### 3.4.1 Korrelation mit Morphologie (Spindelzellmelanome, Epitheloidzell- oder gemischtzellige Melanome)

Da die Morphologie der Uveamelanome mit dem klinischen Verlauf korreliert, wurde untersucht, ob die PACE4-Expression mit dem morphologischen Muster korreliert.

Die 3 Gruppen (Epitheloidzellige Uveamelanome= E, Spindelzellige Uveamelanome= S, Gemischtzellige Uveamelanome= ES) werden in der o.g. Grafik demonstriert und im Verlauf statistisch analysiert. Die Analyse mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests ergab einen p-Wert von 0,6596, welches darauf hinweist, dass zwischen spindel-, epitheloid- oder gemischtzellige Melanome kein statistisch signifikanter Unterschied in der PACE4-Expression besteht (Abb. 21). Präparate, die keiner der Zellmorphologien zugeordnet werden konnten, wurden nicht analysiert.

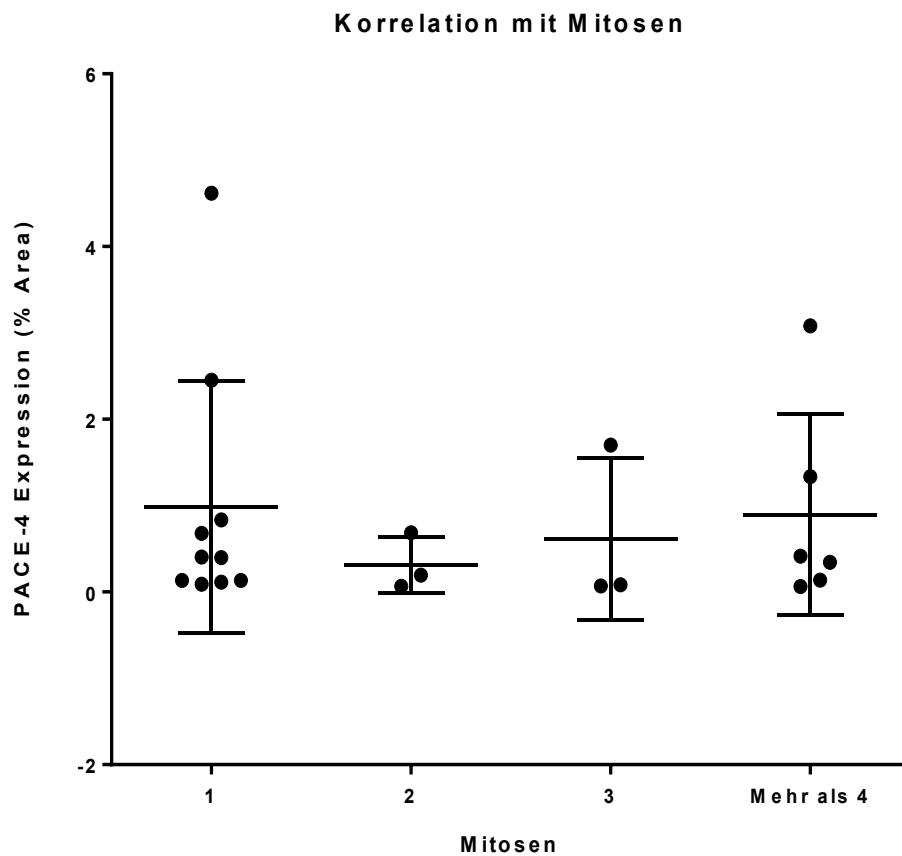


**Abb. 21:** Korrelation der PACE4-Expression mit Zellenmorphologie: (Epitheloidzellige Uveamelanome= E, Spindelzellige Uveamelanome= S, Gemischtzellige Uveamelanome= ES) (p= 0,6596)

### 3.4.2 Korrelation mit Mitosen pro 10 HPF

Da die erhöhte mitotische Aktivität (Mitosennummer pro HPF) eine negative prognostische Bedeutung hat, wurde untersucht, ob PACE4 mit den Mitosen pro 10 HPF korreliert.

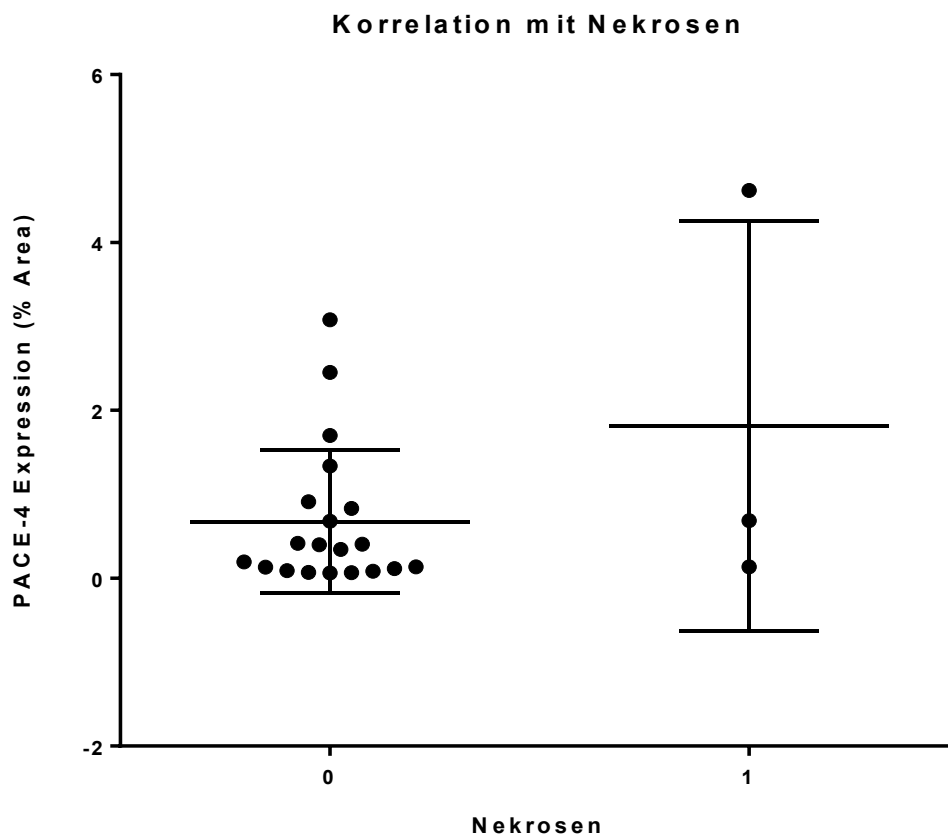
In Abb. 22 wurde die mitotische Aktivität (Mitosennummer pro 10 HPF) mit der PACE4-Expression korreliert. Die Präparate wurden in 4 Gruppen unterteilt (1 Mitose pro 10 HPF, 2 Mitosen pro 10 HPF, 3 Mitosen pro 10 HPF und mehr als 4 Mitosen pro 10 HPF). Der p-Wert zeigte sich hier bei 0,7432, welches darauf hinweist, dass zwischen den 4 Gruppen mit unterschiedlichen Mitoseraten kein statistisch signifikanter Unterschied in der PACE4-Expression besteht.



**Abb. 22:** Korrelation mit Mitosen pro 10 HPF ( $p=0,7432$ )

### 3.4.3 Korrelation mit Nekrosen

Hier wird die PACE4-Expression mit dem Vorhandensein von Nekrosen korreliert. Die Präparate wurden in Uvealome mit Nekrose oder ohne Nekrose unterteilt. Die 2 Gruppen wurden in der o.g. Grafik demonstriert und im Verlauf statistisch analysiert (Mann-Whitney-Test). Der p-Wert zeigte sich hier bei 0,3546, welches darauf hinweist, dass zwischen den Gruppen die Nekrosen und den Gruppen, die keine Nekrosen aufweisen, kein statistisch signifikanter Unterschied in der PACE4-Expression besteht (Abb. 23).



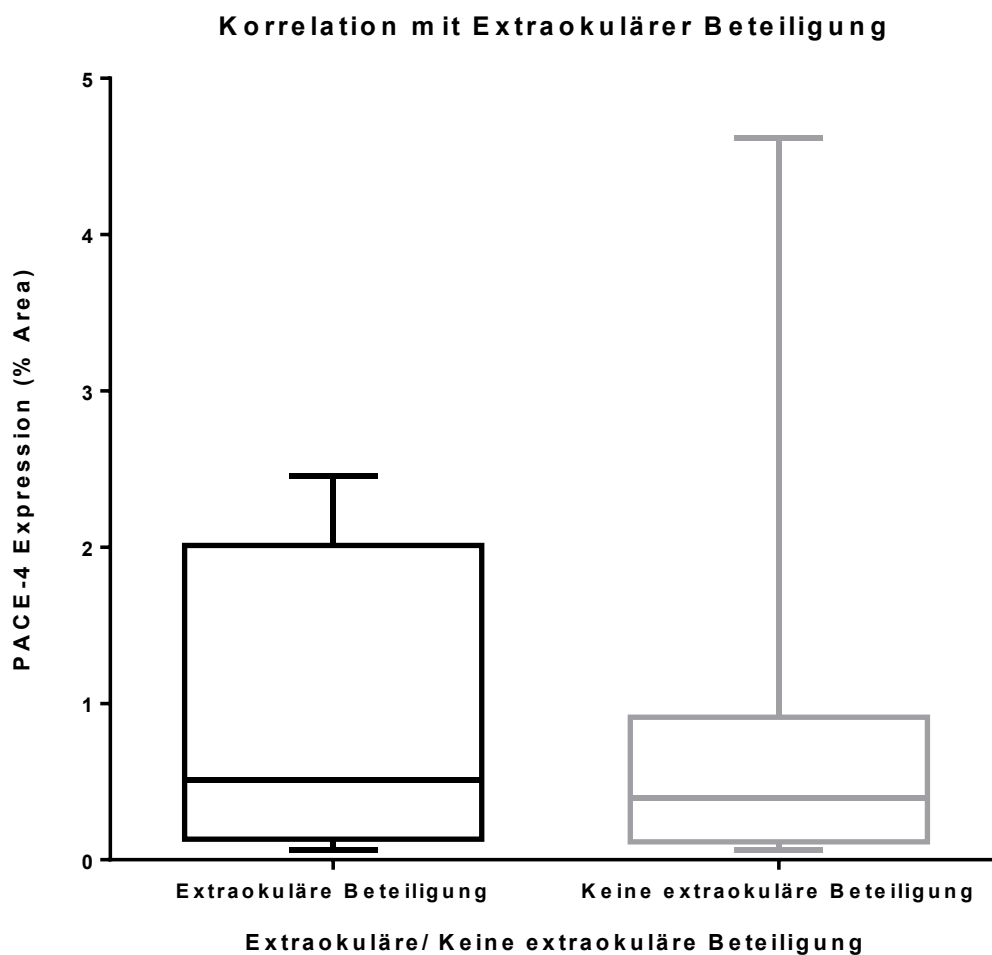
**Abb. 23:** Korrelation der PACE4-Expression mit Nekrosen ( $p= 0,3546$ )



### 3.4.4 Korrelation mit Extraokulärer Beteiligung

Da Uveamelanome, die eine extraokuläre Beteiligung aufweisen, eine schlechtere Prognose mit niedriger Überlebensrate im Vergleich zur Uveamelanomen ohne extraokuläre Beteiligung zeigen, wurde untersucht, ob PACE4 mit diesem Parameter korreliert.

Die 2 Gruppen werden in der u.g. Grafik demonstriert und im Verlauf statistisch analysiert (Mann-Whittney-Test). Der p-Wert zeigte sich hier bei 0,9683, welches darauf hinweist, dass zwischen den Gruppen die eine extraokuläre Beteiligung und den Gruppen die keine extraokuläre Beteiligung aufweisen, kein statistisch signifikanter Unterschied in der PACE4-Expression besteht (Abb. 24).

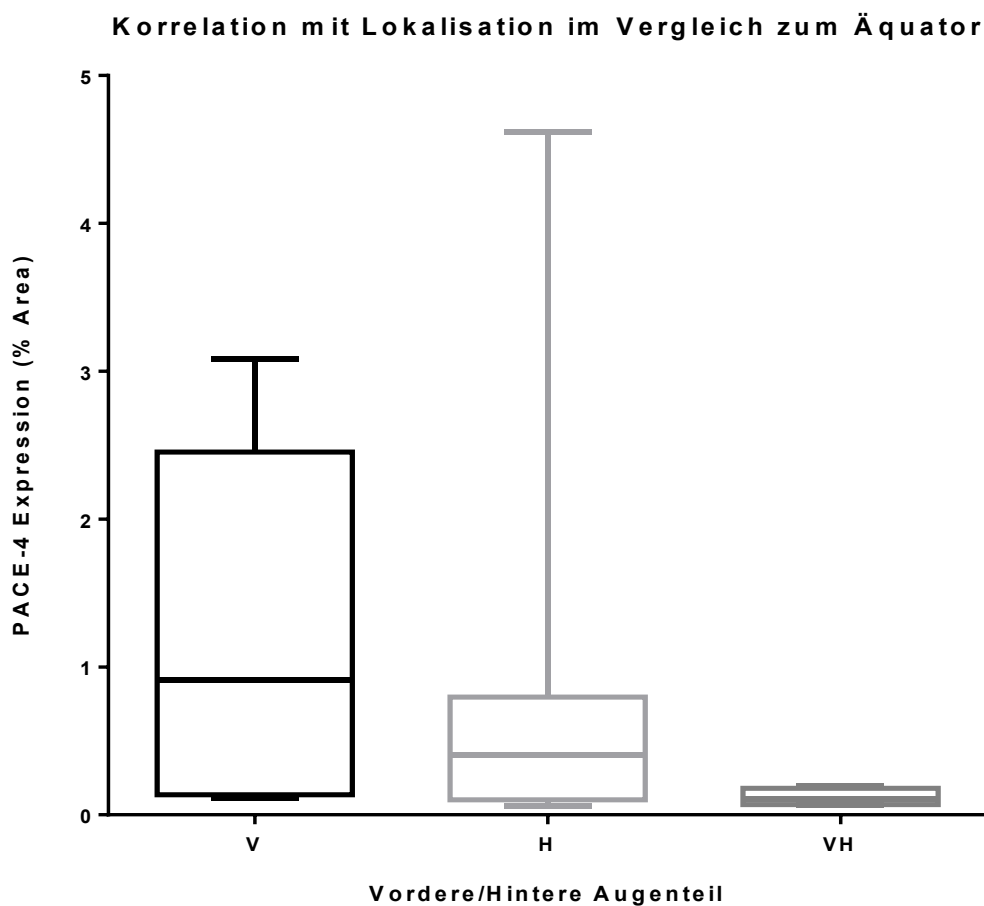


**Abb. 24:** Korrelation der PACE4-Expression mit extraokulärer Beteiligung (p= 0,968)

### 3.4.5 Korrelation mit Lokalisation in Referenz zum Äquator (Vorderer/Hinterer Augenabschnitt)

Da die Lokalisation der Uveamelanome im vorderen Augenabschnitt mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, wurde untersucht, ob PACE4 mit diesem Parameter korreliert.

Die Präparate wurden in 3 Gruppen unterteilt: Lokalisation im vorderen Augenabschnitt, Lokalisation im hinteren Augenabschnitt und Lokalisation im Äquator. Die 3 Gruppen werden in der u.g. Grafik demonstriert und im Verlauf statistisch analysiert (Kruskal-Wallis-Test). Der p-Wert zeigte sich hier bei 0,0693, welches darauf hinweist, dass zwischen den 3 Gruppen, kein statistisch signifikanter Unterschied in der PACE4-Expression besteht (Abb. 25).

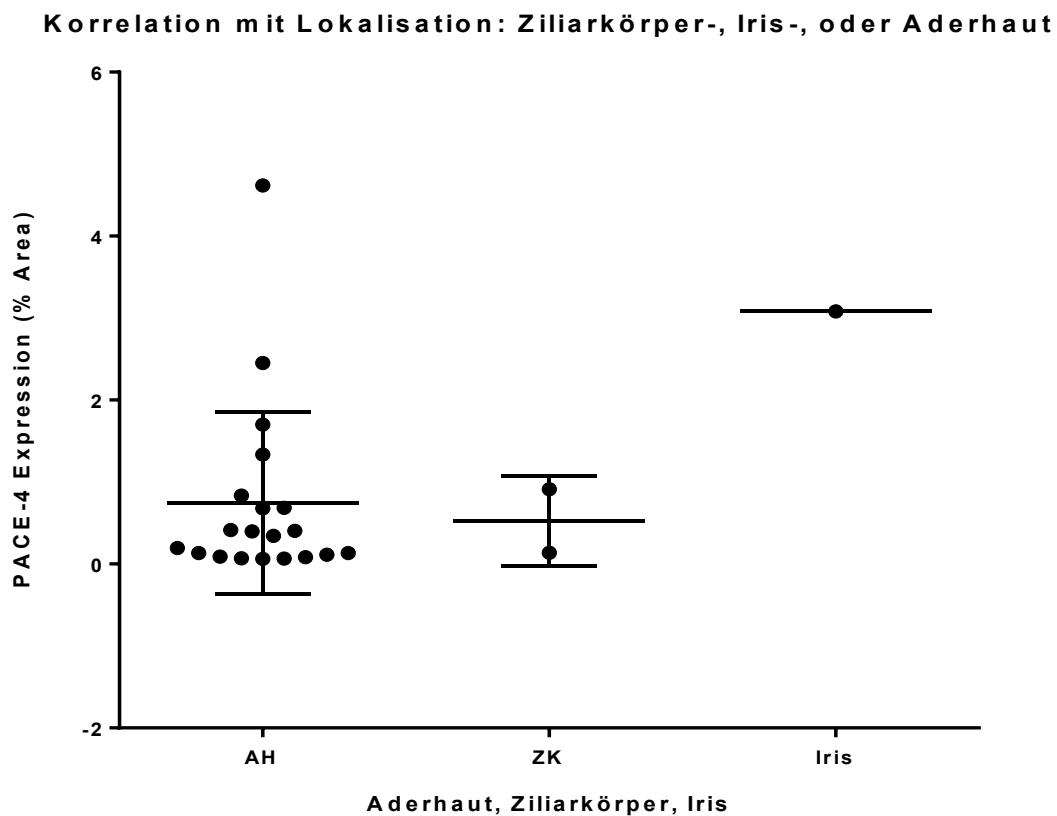


**Abb. 25:** Korrelation mit Lokalisation im Referenz zum Äquator (Vorderer/Hinterer Augenabschnitt) (p= 0,0693)

### 3.4.6 Korrelation mit Lokalisation: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut

Da die Tumorlokalisation eine prognostische Bedeutung hat (Irismelanome haben insgesamt die günstigste Prognose, Ziliarkörpermelanome haben die schlechteste Prognose), wurde untersucht, ob PACE4 mit diesem Parameter korreliert.

Wie in Abb. 26 zu sehen, sind die meisten untersuchten Tumoren in der Aderhaut lokalisiert. Die PACE4-Expression bei diesen Tumoren zeigt eine große Variabilität. Nur 3 Tumoren hatten eine primäre Lokalisation im Ziliarkörper und nur 1 Melanom war in der Iris lokalisiert. Aufgrund der niedrigen Zahl war keine statistische Analyse möglich. Die uncharakterisierte Population der Uveamelanome bezüglich der Lokalisation wurde in der Grafik zunächst nicht berücksichtigt.

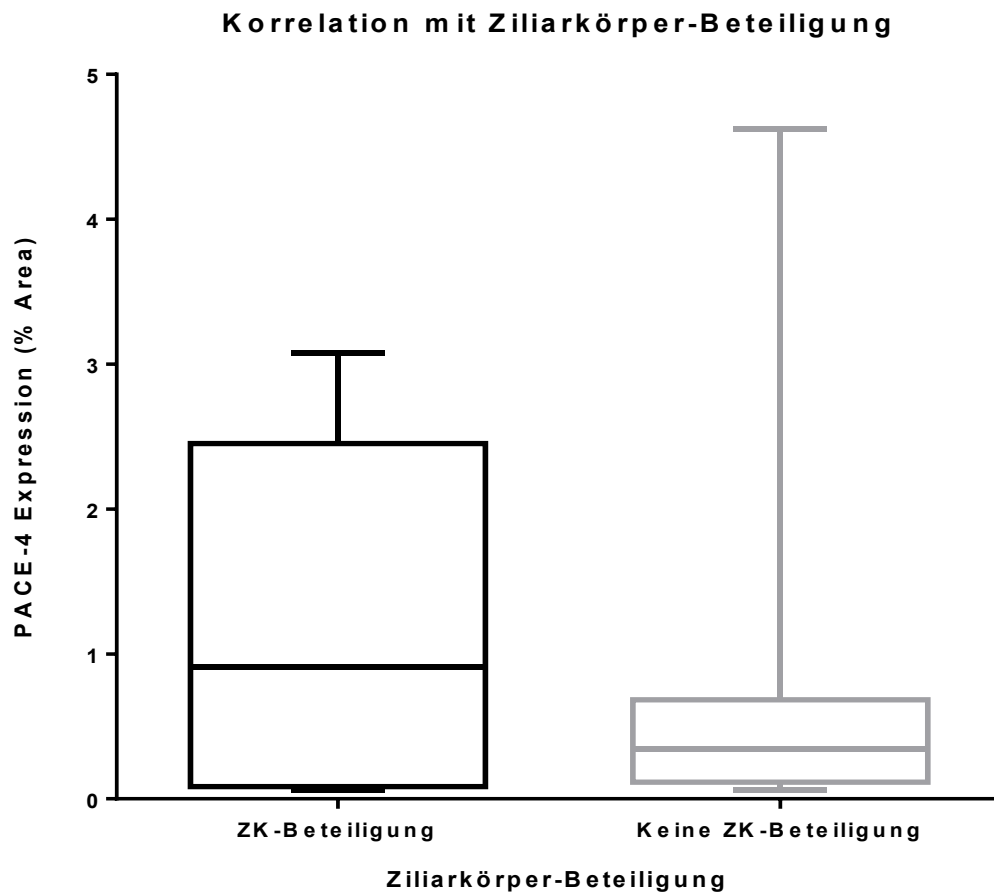


**Abb. 26:** Korrelation mit Lokalisation: Ziliarkörper-, Iris-, oder Aderhaut: Die Tumorlokalisation wurde mit der PACE4-Expression korreliert (AH= Aderhaut, ZK=Ziliarkörper)

### 3.4.7 Korrelation mit Ziliarkörperinfiltration

Die Involvierung des Ziliarkörpers wurde in mehreren Arbeiten als negativer prognostischer Faktor bewertet (Singh et al., 2001), daher wurde untersucht ob die PACE4-Expression mit diesem Parameter korreliert.

Die Präparate wurden in 2 Gruppen geteilt: Uveamelanome die eine Ziliarkörperbeteiligung aufweisen, und Uveamelanome die keine Ziliarkörperbeteiligung aufweisen. Der p-Wert zeigte sich hier bei 0,3316, welches darauf hinweist, dass zwischen den Gruppen die eine Ziliarkörper-Beteiligung und den Gruppen die keine Ziliarkörper-Beteiligung aufweisen, kein statistisch signifikanter Unterschied in der PACE4-Expression besteht (Abb. 27).



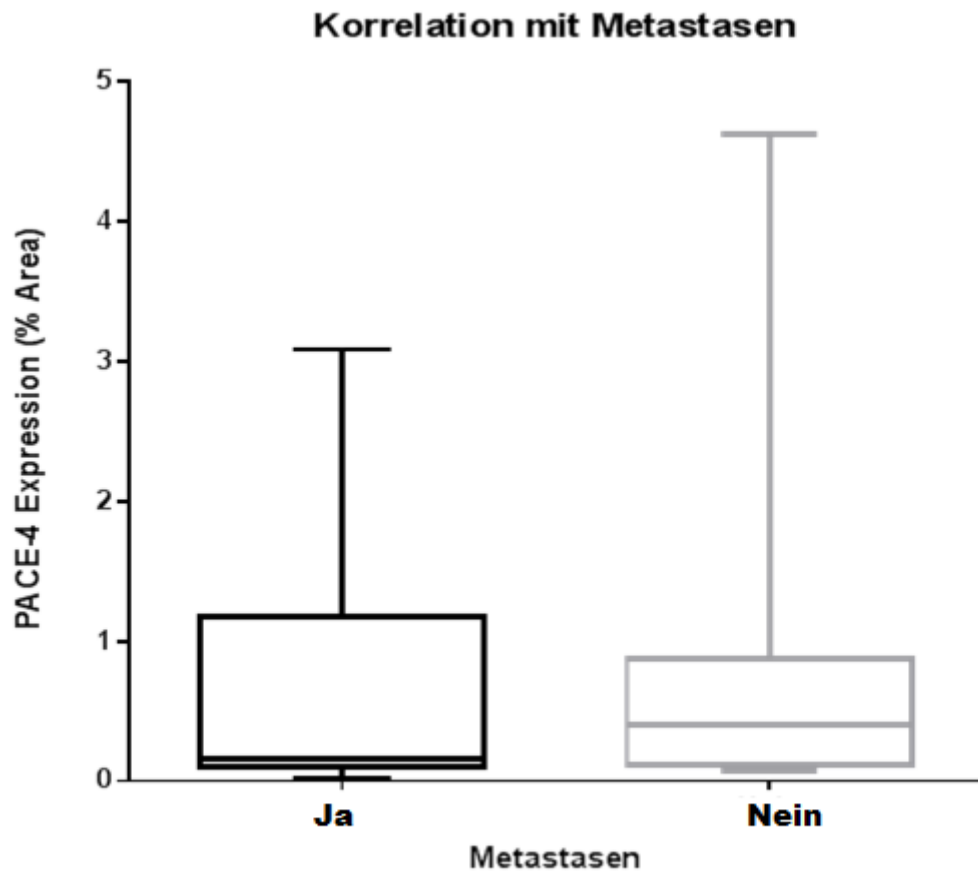
**Abb. 27:** Korrelation mit Ziliarkörperinfiltration (p= 0,3316)

### 3.4.8 Korrelation mit Metastasierung

In diesem Abschnitt wird die Korrelation zwischen der PACE4-Expression und der Metastasierung bei den untersuchten Uveamelanomen untersucht.

Zur Datenhebung wurden die digitale sowie die Papierform vorliegende Patientenakte der Augenklinik des UKM als Quellen genutzt. Dafür wurde die aktuelle Version der Deklaration von Helsinki zum Daten- und Patientenschutz beachtet.

In der statistischen Analyse zeigte sich keine Korrelation von Metastasierung zur Expression von PACE4 ( $p=0,6385$ ) (Abb. 28).



**Abb. 28:** Korrelation mit Metastasierung ( $p= 0,6385$ )

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war zu überprüfen, ob die Expression der Prohomonkonvertase PACE4 mit der Aggressivität von Uveamelanomen in Zusammenhang steht.

Dafür wurde eine Population von 34 Uveamelanomen von Patienten, die zwischen 1994 und 2009 in der Klinik für Augenheilkunde am Universitätsklinikum Münster behandelt wurden, untersucht. Die Präparate wurden zunächst auf histopathologische Charakteristika wie Morphologie, Mitosen pro 10 HPF, Nekrosen, extraokuläre Beteiligung, Lokalisation im Referenz zum Äquator, Lokalisation im Ziliarkörper, Iris, oder Aderhaut und Ziliarkörper-Infiltration untersucht. Diese Charakteristika dienen laut mehreren Arbeiten als Aggressivitäts- und Prognose-Marker der Uveamelanome (Rashid and Grossniklaus, 2014).

Um die prognostische Bedeutung der PACE4-Expression in Uveamelanomen zu bewerten, erfolgte die Korrelation der Expression mit den histopathologischen Tumor-Charakteristika. Zunächst wurde die Korrelation zwischen der PACE4-Expression und der Zellmorphologie untersucht. Die Zellmorphologie hat eine prognostische Wichtigkeit (Gill and Char, 2012), und zwar sind spindelzellige Tumoren mit einer besseren Prognose assoziiert, während epitheloidzellige Tumoren mit einer eher schlechteren Prognose assoziiert sind (McLean et al., 1983). In unserer Population der histologisch definierten Präparate sind die meisten Uveamelanome als gemischtzellige Form charakterisiert. Dies entspricht der bisherigen Kenntnissen der Literatur (Adams et al., 1988). Es konnte jedoch keine Korrelation der Morphologie mit der PACE4-Expression gesehen werden. Im Hinblick auf die Mitosenrate, welche als negativer Marker für den klinischen Verlauf sowie für die tumorbedingte Mortalität dienen kann (Mooy et al., 1995), konnte die Aussage getroffen werden, dass zwischen den 4 Gruppen mit unterschiedlichen Mitosenraten kein statistisch signifikanter Unterschied der PACE4-Expression vorhanden ist. Bezüglich des Vorhandenseins von Nekrosen konnte ebenfalls keine Korrelation mit der PACE4-Expression gesehen werden. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass die prognostische Bedeutung von Nekrosen in mehreren Arbeiten nicht als sicherer prognostischer Marker zu werten war (Moshari et al., 2001) (de la Cruz et al., 1990). Die extraokuläre Beteiligung, die als negativer prognostischer Marker anzusehen ist (Pach et al., 1986), korreliert laut unserer Ergebnissen auch nicht mit der PACE4-Expression. Anschließend erfolgte die Korrelation der PACE4-Expression mit der Tumorlokalisation und insbesondere zunächst mit der Lokalisation im Verhältnis zum Äquator und danach mit der Lokalisation im Ziliarkörper, Iris, oder Aderhaut. Bezüglich der Lokalisation im Vergleich zum Äquator, zeigte sich zwischen den 3 Lokalisationsgruppen (vordere Augenabschnitt, hintere Augenabschnitt und Lokalisation am Äquator) keine Korrelation mit der PACE4-Expression.

Eine statistische Korrelation der PACE4-Expression zur Lokalisation an Aderhaut, Ziliarkörper und Iris war leider wegen der geringen auswertbaren Präparate nicht möglich. Grundsätzlich befindet sich die große Mehrheit der Uveamelanome in der Aderhaut, und nur wenige Tumoren sind in der Iris oder im Ziliarkörper lokalisiert (Griewank and Murali, 2013). Das entsprach auch unserer Population. Hier fanden sich bei 23 charakterisierten Uveamelanomen 20 an der Aderhaut, 2 am Ziliarkörper und 1 Uveamelanom an der Iris. Eine Korrelation der PACE4-Expression mit der Invasion des Ziliarkörpers konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Die Beteiligung des Ziliarkörpers, sowohl als primäre Tumorlokalisation als auch als sekundärbedingte Beteiligung durch eine Ziliarkörperinvasion von Aderhautmelanomen hat eine sehr negative prognostische Bedeutung für den Krankheitsverlauf (Gragoudas et al., 1986). Somit scheint die PACE4-Expression auch hinsichtlich dieses Aspekts keine prognostische Relevanz zu haben. Letztlich erfolgte die Korrelation der PACE4-Expression mit dem klinischen Verlauf der Patienten, und insbesondere mit der Entwicklung von Metastasierung. Hier konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression und der Tumorprogression gesehen werden, welche mit den Befunden aus der der Korrelation von PACE4-Expression und histologischen Charakteristika vereinbar war.

Insgesamt ergibt die Korrelation der PACE4-Expression mit histopathologischen Parametern oder klinischem Verlauf keine signifikante prognostische Bedeutung der PACE4-Expression für die Uveamelanome. Somit konnte die Beobachtung über die Korrelation der PACE4-Expression mit der Aggressivität von kutanen Melanomen in dieser Untersuchung nicht für die Uveamelanome gezeigt werden. Es sind einige Einschränkungen der Studie bei der Auswertung der Daten zu berücksichtigen. Der Anzahl der Präparate mit  $n=34$  war limitiert. Eine vollständige Analyse aller histologischen Kriterien war nicht für alle Präparate möglich und aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie waren nicht alle Krankheitsverläufe vollständig dokumentiert. Letztlich wurden die Patienten im Durchschnitt laut der vorhandenen Dokumentation über 10,8 Jahren nachverfolgt, so dass möglicherweise einzelne Verläufe bei später Metastasierung nicht korrekt abgebildet wurden.

Um die fehlende Relevanz der PACE4-Expression für die Uveamelanome im Gegensatz zu den kutanen Melanomen zu verstehen, wäre interessant die pathogenetische und klinische Ähnlichkeiten und Unterschiede der beiden Gruppen zu analysieren.

Obwohl es einige pathophysiologische Gemeinsamkeiten beim kutanen Melanom und Uveamelanom gibt, überwiegen die Unterschiede. Beide Entitäten gehen von Melanozyten der Neuralleiste aus, die in der Embryonalentwicklung in die Epidermis oder in das Auge migrieren (van den Bosch et al., 2010). Klinische Beobachtungen haben Hinweise darauf gegeben, daß es

einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von atypischen Nävi und von Uveamelanomen geben könnte (van Hees et al., 1998) (McCarthy et al., 1993). Ein wichtiger Hinweis für eine Assoziation von kutanen Melanomen und Uveamelanomen ist beim atypischen-Nävis-Syndrom zu finden. Hierbei handelt es sich um familiäre Syndrome, die mit dem Auftreten von zahlreichen atypischen Nävi einhergehen und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von kutanen Melanomen haben (Hurst et al., 2003). Einzelne Fälle mit primären okulären Melanomen und mit primären kutanen Melanomen ohne atypischen-Nävis-Syndrome sind ebenfalls beschrieben worden. Augsburger et al. und Gilbert et al. haben 2 Patienten dokumentiert, die ca. 10 Jahre nach dem Auftreten von einem kutanen Melanom, zusätzlich auch ein okuläres Melanom entwickelt haben (Augsburger et al., 1980) (Gilbert et al., 1987). Es muss jedoch angemerkt werden, dass es sich meistens um Einzelfälle handelt. Statistisch konnte bislang kein klarer Zusammenhang zum Auftreten von Uveamelanom und kutanem Melanom gezeigt werden.

Bezüglich der genetischen Prädisposition einen Tumor zu entwickeln gibt es Hinweise auf Unterschiede zwischen Uvea- und kutanen Melanomen. Genetische Mutationen im MC1R-Gen (*Melanocortin-1 receptor*), welches in der Regulation der Eumelanin-Produktion involviert ist, sind mit Hauttyp I und II assoziiert und mit einer Anfälligkeit für kutane Melanome beteiligt (Box et al., 1997) (Frändberg et al., 1998). Im Gegensatz zu einigen Patienten mit kutanen Melanomen, zeigen Patienten mit okulären Melanomen keine spezifische genetische Varianten von MC1R, obwohl doch eine signifikante Inzidenz von heller Augenfarbe dokumentiert werden konnte (Singh et al., 1995). Aktivierende BRAF-Mutationen, die bei ca. 66% der Patienten mit kutanen Melanomen detektiert werden können (Davies et al., 2002), scheinen bei den okulären Melanomen keine Bedeutung zu haben (Cruz et al., 2003). Das gleiche wird für die NRAS-Mutationen beobachtet (Cruz et al., 2003). Zu den häufigen somatischen Mutationen in humanen kutanen Melanomen gehören letztlich Mutationen von ras Genen (Ball et al., 1994) (Krauthammer et al., 2015). Entsprechende Studien haben jedoch keinen Zusammenhang zwischen humanen okulären Melanomen und ras-Mutationen gezeigt (Soparker et al., 1993). Bei den Uveamelanomen sind sehr häufig Mutationen entweder im GNAQ oder im GNA11 Gen zu finden, die wiederum nicht in kutanen Melanomen nachgewiesen werden. Die Aktivierung des Gαq-Gα11 Signalwegs stellt einen Hauptweg für die Entwicklung des Uveamelanoms dar, jedoch nicht für die Entwicklung von kutanen Melanomen (Van Raamsdonk et al., 2010).

Unterschiede zwischen beiden Tumoren können auch auf der Karyotyp-Ebene gesehen werden. Die auffälligste Chromosomanomalie der Uveamelanome ist der vollständige oder teilweise Verlust von Chromosom 3. Andere häufige genetische Anomalien der Uvealmelanome stellen



den Verlust von 1p, 6q, 8 und 9p sowie der Gewinn von 1q, 6p und 8q dar (Coupland et al., 2013). Diese sind bei kutanen Melanomen nicht zu finden. Demgegenüber sind bei den kutanen Melanomen Anomalien in den Chromosomen 1, 6, 7, 9 und 10 zu sehen (Chin et al., 1998). Strukturelle Umlagerungen vom Chromosom 1 sind besonders häufig und beziehen sich auf Translokationen, Duplikationen und Deletionen, welche zum Verlust von 1p führen können. Die meisten bekannten Chromosom-6 Anomalien betreffen den Verlust von 6q und den Gewinn von 6p. Die ebenfalls häufig beschriebene Chromosomanomalien +7 und -10 sind mit Tumorprogression assoziiert (Höglund et al., 2004).

Unterschiede zwischen den beiden Tumoren können auch auf der Ebene der Epigenetik gesehen werden. Eine wichtige epigenetische Modifizierung stellt die Gen-Methylierung oder Demethylierung, die zur Regulation der Gen-Transkription und somit zur Aktivierung oder Deaktivierung der entsprechenden Genen führen kann, dar (Chuang and Jones, 2007). Bei den kutanen Melanomen sind folgende Gene häufig hypermethyliert: RASSF1A, APC, PYCARD, RARB, MGMT, DAPK, 3-OST-2, HOXB13, SYK, TIMP3A, CDKN2A, FHIT, SOCS1, SOCS2 und PTEN (van den Bosch et al., 2010). Bei den Uveamelanomen konnten in 33% der Fälle eine Methylierung von CDKN2A festgestellt werden (Merbs and Sidransky, 1999). Ebenso erscheint RASSF1 in 13% -70% der Uveamelanome (Maat et al., 2007) und hTERT in bis zu 52% der Uveamelanome (Moulin et al., 2008) methyliert zu sein.

Zusätzlich sind einige miRNAs (microRNAs) als mögliche epigenetische Regulatoren in der Tumorgenese und/oder Metastasierung von Uveamelanomen beteiligt, wie let-7b, miR18a, miR-199a, miR495, miR549 und mehr (Worley et al., 2008) (Radhakrishnan et al., 2009). Das Vorhandensein von unterschiedlichen miRNAs kann zur Charakterisierung des Metastasierungsrisiko als niedrig oder hoch dienen (Worley et al., 2008) (Radhakrishnan et al., 2009). Bei den kutanen Melanomen wurden ebenfalls viele verschiedene miRNAs identifiziert, jedoch andere als bei den Uvealmelanomen (zum Beispiel miR-137, miR-182, miR-221, miR-222 und verschiedene Subtypen der let-7-Familie) (Bemis et al., 2008) (Segura et al., 2009) (Felicetti et al., 2008) (Johnson et al., 2005). Deren genaue Rolle in der Tumorentwicklung und/oder Metastasierung wird aktuell weiterhin erforscht.

Es gibt zusätzlich signifikante epidemiologische Unterschiede zwischen kutanen Melanomen und okulären Melanomen. Obwohl es in den letzten Jahren zu einer Inzidenz-Steigerung des kutanen Melanoms weltweit gekommen ist, ist die Häufigkeit des okulären Melanoms unverändert geblieben, was möglicherweise auf einen größeren Einfluss der UV-Exposition bei der Entwicklung der kutanen Melanomen als bei der Entwicklung der okulären Melanomen zurückzuführen ist (Dolin et al., 1994). Patienten, bei denen ein kutanes Melanom bereits

diagnostiziert wurde, haben ein 10-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines zweiten Melanoms, sie haben allerdings kein zusätzliches Risiko für die Entwicklung eines Uveamelanoms (Shors et al., 2002).

Unterschiede zwischen Uveamelanom und kutanem Melanom sind zusätzlich im Metastasierungsprofil zu beobachten. Die Metastasierung der kutanen Melanome ist in der Regel sowohl hämatogen als auch lymphogen. Zudem kann eine Metastasierung auch durch lokale Invasion erfolgen (van den Bosch et al., 2010). Die kutanen Melanome metastasieren häufiger in die Haut (13% -38%), in die distalen Lymphknoten (5% -34%), in weitere subkutane Lokalisationen (32%), in die Lunge (18% -36%), die Leber (14% -20%), in ZNS (2% -20%), und/oder die Knochen (4% -17%) (Leiter et al., 2004). Bei den Uveamelanomen ist die Metastasierung fast ausschließlich hämatogen und betrifft hauptsächlich die Leber (90%) (Bedikian et al., 1995). Der Grund, weshalb Uveamelanomen eher keine lymphogene Metastasierung aufweisen, kann auf die Abwesenheit von drainierenden Lymphgefäßen am Auge zurückgeführt werden. Es ist jedoch noch nicht bekannt, warum die Leber vor allem von Metastasen betroffen ist (Landreville et al., 2008).

Wie hier gezeigt wurde, gibt es wesentliche Unterschiede zwischen Uveamelanomen und kutanen Melanomen. Es wird weiterhin diskutiert, ob es sich um die gleiche Krankheit oder um zwei Varianten der gleichen Entität handelt, und in wie fern diese Varianten unterschiedlich sind. Auf dem Boden dieses Aspektes wäre eventuell auch der Unterschied bezüglich der Rolle von PACE4 bei diesen Tumoren zu erklären. Laut ersten Daten aus unserer Arbeitsgruppe (Böhm et al., eingereicht) scheint die Proproteinkonvertase PACE4 eine wichtige Rolle in Onkogenese, Tumorwachstum, Aggressivität und Metastasierung des kutanen malignen Melanoms zu spielen. Die Tatsache, dass keine signifikante Korrelation der PACE4-Expression mit der Tumoraggressivität bei Uveamelanomen besteht, wäre eventuell darauf zurückzuführen, dass die Ätiopathogenese und Molekularbiologie dieser Tumoren nicht identisch, sondern in vielen Ebenen sogar sehr unterschiedlich sein kann.

Trotz zunehmender Hinweise, dass die Prohormonkonvertase inklusive PACE4 eine Rolle im Tumorprogress verschiedener Tumoren zeigen, gilt dieses aber nicht für alle Tumorentitäten. (Bassi et al., 2005b). Mehrere entsprechende Daten sind diesbezüglich in der Literatur zu finden. Es wurde zum Beispiel bereits gezeigt, dass die Expression von Furin mit der Onkogenese von diversen Tumoren, wie zum Beispiel von epithelialen Tumoren der Kopf-Hals-Region, assoziiert ist, und dass die Furin-Hemmung zur Tumorsuppression in diesen Fällen führen kann (Bassi et al., 2001a) (Bassi et al., 2001b) (Mercapide et al., 2002). Declercq et al. haben jedoch gezeigt, dass der Effekt von Furin bei der Inaktivierung der Tumorentwicklung

vom Typ des Tumors abhängt. Sie haben demonstriert, dass die Furin-Hemmung in einem Mausmodell für das hepatozelluläre Karzinom zur Entstehung von signifikant größeren Tumoren aufgrund einer vermehrter Hepatozytenproliferation geführt hat (Declercq et al., 2015). Daher wäre die Furin-Hemmung keine gute therapeutische Strategie für das hepatozelluläre Karzinom und könnte sogar die Tumorbildung fördern.

Entsprechende Daten sind über PACE4 und Ovarialtumoren publiziert. In der Arbeit von Fu et al. wurde gezeigt, dass die PACE4-Expression in Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu normalen Ovarialepithelzellen deutlich reduziert ist. Im Gegensatz zu Arbeiten in denen die Überexpression von Proproteinkonvertasen, inklusiv PACE4, mit Tumoraggressivität assoziiert war (Hubbard et al., 1997) (Bassi et al., 2000), zeigte sich hier eine sehr niedrige PACE4-Expression sowohl in primären- als auch in etablierten Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu normalen menschlichen Ovarianepithelzellen (Fu et al., 2003). Ähnliche Daten konnten bei der Arbeit von Matei et al. gesehen werden, die das Genexpressionsmuster in normalen ovariellen Epithelzellen und Ovarialkarzinomzellen verglichen haben. Hier wurde gezeigt, dass PACE4 Transkripte deutlich höher in normalen Ovarien als in Ovarialkarzinomen exprimiert wurden (Matei et al., 2002). Somit wird die Hypothese unterstützt, dass auch eine Reduktion der PC-Expression an der Tumorentwicklung beteiligt sein kann.

Ähnliche Beobachtungen sind auch für andere Proproteinkonvertasen gesehen worden. Die genaue Rolle von Proproteinkonvertase PC5/6 in der Tumorgenese/Metastasierung ist bislang noch nicht vollständig untersucht. Es konnte, zum Beispiel, keine signifikante PC5/6-Expression weder im normalen Brustgewebe oder im Mammakarzinom gesehen werden (Cheng et al., 1997). Sun et al. haben zudem die Rolle von PC5/6 bei intestinalen Tumoren mittels Knock-out Mäuse untersucht. Sie haben gezeigt, dass Proproteinkonvertasen die Tumorentstehung fördern (Khatib et al., 2002). Die PC5/6-Expression wurde bei intestinalen Tumoren im Vergleich zum normalen intestinalen Gewebe eher herunterreguliert. PC5/6-defiziente Mäuse zeigten zudem eine erhöhte Tumorgenese-Neigung bezüglich duodener Tumoren (Sun et al., 2009). In diesem Fall ist die Expression von PC5/6 nicht als negativer sondern eher als positiver prognostischer Faktor bei den intestinalen Tumoren zu werten. In unserem Fall muss betont werden, dass die PACE4-Expression bei den untersuchten Uveamelanomen keine Aussage über die prognostische Relevanz zulässt. PACE4-positive Uveamelanome hatten keine bessere Prognose als Uveamelanome, die eine niedrige PACE4-Expression aufwiesen.

Hinweise über eine unterschiedliche Verteilung von PC2 und PC3 je nach Tumortyp sind auch bekannt. Scopsi et al. zeigten Daten über eine fehlende Expression von PC2 und PC3 bei

diversen Geweben, wie zum Beispiel bei Schilddrüsen-Follikelzellen, Nebenschilddrüsen, Nebennieren, Hoden, und bei einer Anzahl von nicht-neuroendokrinen Gewebe, sowohl normal als auch tumorös. PC2 und PC3 wurden nur bei neuroendokrinen Zellen und Tumoren wie zum Beispiel bei Phäochromozytomen, Paragangliomen, gastrointestinalen und bronchialen Karzinoiden exprimiert, so dass die beiden Enzyme als hochempfindliche Marker für neuroendokrine Differenzierung gesehen werden können (Scopsi et al., 1995).

Die oben genannten Daten lassen darauf hinweisen, dass die Expression aber auch die prognostische Bedeutung von diversen Mitgliedern der Proproteinkonvertasen-Familie unterschiedlich je nach Tumortyp ist. Bezüglich der PACE4-Expression in unserem Fall, scheint diese bei den Uveamelanomen ebenfalls nicht homogen zu sein: Die Expression ist unterschiedlich bei jedem Melanom, zum Teil mit großen Schwankungen zwischen den Präparaten. Zudem scheint auch bei den Präparaten in denen eine deutliche PACE4-Expression nachgewiesen werden konnte, keine signifikante prognostische Relevanz vorhanden zu sein, so dass eine Bedeutung der Prohomronkonvertase PACE4 als prognostischer Marker nicht gefunden werden konnte. Welche biologische Relevanz PACE4 für das Uveamelanom hat, ist in weiterführenden Studien zu untersuchen.

## 5 Literatur

Aaberg, T.M., Bergstrom, C.S., Hickner, Z.J., and Lynn, M.J. (2008). Long-term results of primary transpupillary thermal therapy for the treatment of choroidal malignant melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* 92, 741–746.

Aalto, Y., Eriksson, L., Seregard, S., Larsson, O., and Knuutila, S. (2001). Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 313–317.

Abdel-Rahman, M.H., Yang, Y., Zhou, X.-P., Craig, E.L., Davidorf, F.H., and Eng, C. (2006). High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 288–295.

Adams, K.S., Abramson, D.H., Ellsworth, R.M., Haik, B.G., Bedford, M., Packer, S., Seddon, J., Albert, D., and Polivogianis, L. (1988). Cobalt plaque versus enucleation for uveal melanoma: comparison of survival rates. *Br. J. Ophthalmol.* 72, 494–497.

Al-Jamal, R.T., Toivonen, P., and Kivelä, T. (2010). Nucleolar size in choroidal and ciliary body melanomas and corresponding hepatic metastases. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 88, 458–462.

Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F., and Thomas, G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* 16, 1508–1518.

Anderson, E.D., Molloy, S.S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S., and Thomas, G. (2002). The ordered and compartment-specific autolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 277, 12879–12890.

Apte, S.M., Bucana, C.D., Killion, J.J., Gershenson, D.M., and Fidler, I.J. (2004). Expression of platelet-derived growth factor and activated receptor in clinical specimens of epithelial ovarian cancer and ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* 93, 78–86.

Artenstein, A.W., and Opal, S.M. (2011). Proprotein Convertases in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 2507–2518.

Artuc, M., Böhm, M., Grützkau, A., Smorodchenko, A., Zuberbier, T., Luger, T., and Henz, B.M. (2006). Human mast cells in the neurohormonal network: expression of POMC, detection of precursor proteases, and evidence for IgE-dependent secretion of alpha-MSH. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1976–1981.

Ashton, N. (1964). PRIMARY TUMOURS OF THE IRIS\*. *Br. J. Ophthalmol.* *48*, 650–668.

Augsburger, J.J., Shields, J.A., Mastrangelo, M.J., and Frank, P.E. (1980). Diffuse Primary Malignant Melanoma After Prior Primary Cutaneous Malignant Melanoma. *Arch. Ophthalmol.* *98*, 1261–1264.

Ball, N.J., Yohn, J.J., Morelli, J.G., Norris, D.A., Golitz, L.E., and Hoeffler, J.P. (1994). RAS Mutations in Human Melanoma: A Marker of Malignant Progression. *J. Invest. Dermatol.* *102*, 285–290.

Barrett, A.J., Tolle, D.P., and Rawlings, N.D. (2003). Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem.* *384*, 873–882.

Basak, A., Shervani, N.J., Mbikay, M., and Kolajova, M. (2008). Recombinant proprotein convertase 4 (PC4) from *Leishmania tarentolae* expression system: purification, biochemical study and inhibitor design. *Protein Expr. Purif.* *60*, 117–126.

Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* *348*, 699–704.

Bassi, D.E., Mahloogi, H., and Klein-Szanto, A.J. (2000). The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol. Carcinog.* *28*, 63–69.

Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., Lopez De Cicco, R., Ridge, J.A., and Klein-Szanto, A.J. (2001a). Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* *31*, 224–232.

Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Mahloogi, H., Zucker, S., Thomas, G., and Klein-Szanto, A.J. (2001b). Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10326–10331.

- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Lopez De Cicco, R., and Klein-Szanto, A. (2003). Increased furin activity enhances the malignant phenotype of human head and neck cancer cells. *Am. J. Pathol.* *162*, 439–447.
- Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Cenna, J., Litwin, S., Cukierman, E., and Klein-Szanto, A.J.P. (2005a). PACE4 expression in mouse basal keratinocytes results in basement membrane disruption and acceleration of tumor progression. *Cancer Res.* *65*, 7310–7319.
- Bassi, D.E., Fu, J., Lopez de Cicco, R., and Klein-Szanto, A.J.P. (2005b). Proprotein convertases: “master switches” in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog.* *44*, 151–161.
- Bastian, B.C., Olshen, A.B., LeBoit, P.E., and Pinkel, D. (2003). Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. *Am. J. Pathol.* *163*, 1765–1770.
- Bechrakis, N.E., Petousis, V., Willerding, G., Krause, L., Wachtlin, J., Stroux, A., and Foerster, M.H. (2010). Ten-year results of transscleral resection of large uveal melanomas: local tumour control and metastatic rate. *Br. J. Ophthalmol.* *94*, 460–466.
- Bedikian, A.Y., Legha, S.S., Mavligit, G., Carrasco, C.H., Khorana, S., Plager, C., Papadopoulos, N., and Benjamin, R.S. (1995). Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver: a review of the M. D. Anderson Cancer Center experience and prognostic factors. *Cancer* *76*, 1665–1670.
- Bemis, L.T., Chen, R., Amato, C.M., Classen, E.H., Robinson, S.E., Coffey, D.G., Erickson, P.F., Shellman, Y.G., and Robinson, W.A. (2008). MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res.* *68*, 1362–1368.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1993). Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* *294 ( Pt 3)*, 735–743.
- Benjannet, S., Savaria, D., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1995). 7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase PC2. *J. Neurochem.* *64*, 2303–2311.

- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.-C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., et al. (2004). NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* 279, 48865–48875.
- Bergeron, E., Basak, A., Decroly, E., and Seidah, N.G. (2003). Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem. J.* 373, 475–484.
- Birch, N.P., Hakes, D.J., Dixon, J.E., and Mezey, E. (1994). Distribution and regulation of the candidate prohormone processing enzymes SPC2 and SPC3 in adult rat brain. *Neuropeptides* 27, 307–322.
- van den Bosch, T., Kilic, E., Paridaens, D., and de Klein, A. (2010). Genetics of Uveal Melanoma and Cutaneous Melanoma: Two of a Kind? *Dermatol. Res. Pract.* 2010, 1–13.
- van den Bosch, T., van Beek, J.G.M., Vaarwater, J., Verdijk, R.M., Naus, N.C., Paridaens, D., de Klein, A., and Kiliç, E. (2012). Higher percentage of FISH-determined monosomy 3 and 8q amplification in uveal melanoma cells relate to poor patient prognosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2668–2674.
- Bott, M., Brevet, M., Taylor, B.S., Shimizu, S., Ito, T., Wang, L., Creaney, J., Lake, R.A., Zakowski, M.F., Reva, B., et al. (2011). The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat. Genet.* 43, 668–672.
- Box, N.F., Wyeth, J.R., O’Gorman, L.E., Martin, N.G., and Sturm, R.A. (1997). Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1891–1897.
- Braks, J.A., and Martens, G.J. (1994). 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* 78, 263–273.
- Brown, L.F., Detmar, M., Claffey, K., Nagy, J.A., Feng, D., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 79, 233–269.



Callender Colonel, G.R., Wilder, H.C., and Ash, J.E. (1942). Five Hundred Melanomas of the Choroid and Ciliary Body Followed Five Years Or Longer\*. *Am. J. Ophthalmol.* 25, 962–967.

Canal-Fontcuberta, I., Salomão, D.R., Robertson, D., Cantrill, H.L., Koozekanani, D., Rath, P.P., and Pulido, J.S. (2012). Clinical and histopathologic findings after photodynamic therapy of choroidal melanoma. *Retina Phila. Pa* 32, 942–948.

Chang, A.E., Karnell, L.H., and Menck, H.R. (1998). 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* 83, 1664–1678.

Char, D.H., Crawford, J.B., and Kroll, S. (1996). Iris melanomas. Diagnostic problems. *Ophthalmology* 103, 251–255.

Cheng, M., Watson, P.H., Paterson, J.A., Seidah, N., Chrétien, M., and Shiu, R.P. (1997). Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 71, 966–971.

Chin, L., Merlino, G., and DePinho, R.A. (1998). Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev.* 12, 3467–3481.

Chuang, J.C., and Jones, P.A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatr. Res.* 61, 24R – 29R.

Coupland, S.E., Lake, S.L., Zeschnigk, M., and Damato, B.E. (2013). Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye Lond. Engl.* 27, 230–242.

Couturier, J., and Saule, S. (2012). Genetic determinants of uveal melanoma. *Dev. Ophthalmol.* 49, 150–165.

Cruz, F., Rubin, B.P., Wilson, D., Town, A., Schroeder, A., Haley, A., Bainbridge, T., Heinrich, M.C., and Corless, C.L. (2003). Absence of BRAF and NRAS mutations in uveal melanoma. *Cancer Res.* 63, 5761–5766.

de la Cruz, P.O., Specht, C.S., and McLean, I.W. (1990). Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 65, 112–115.

Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2135–2147.

Daftari, I.K., Char, D.H., Verhey, L.J., Castro, J.R., Petti, P.L., Meecham, W.J., Kroll, S., and Blakely, E.A. (1997). Anterior segment sparing to reduce charged particle radiotherapy complications in uveal melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *39*, 997–1010.

Damato, B. (2012). Progress in the management of patients with uveal melanoma. The 2012 Ashton Lecture. *Eye Lond. Engl.* *26*, 1157–1172.

D'Anjou, F., Routhier, S., Perreault, J.-P., Latil, A., Bonnel, D., Fournier, I., Salzet, M., and Day, R. (2011). Molecular Validation of PACE4 as a Target in Prostate Cancer. *Transl. Oncol.* *4*, 157–172.

Davidorf, F.H. (1981). The melanoma controversy. A comparison of choroidal, cutaneous, and iris melanomas. *Surv. Ophthalmol.* *25*, 373–377.

Davidorf, F.H., and Lang, J.R. (1975). The natural history of malignant melanoma of the choroid: small vs large tumors. *Trans. Sect. Ophthalmol. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* *79*, OP310–OP320.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949–954.

Day, R., Schafer, M.K., Watson, S.J., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1992). Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *6*, 485–497.

Declercq, J., Meulemans, S., Plets, E., and Creemers, J.W.M. (2012). Internalization of proprotein convertase PC7 from plasma membrane is mediated by a novel motif. *J. Biol. Chem.* *287*, 9052–9060.

Declercq, J., Brouwers, B., Pruniau, V.P.E.G., Stijnen, P., Tuand, K., Meulemans, S., Prat, A., Seidah, N.G., Khatib, A.-M., and Creemers, J.W.M. (2015). Liver-Specific Inactivation of the

Proprotein Convertase FURIN Leads to Increased Hepatocellular Carcinoma Growth. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–8.

Dhupper, M., Biswas, J., Gopal, L., Kumar, S.K., and Khetan, V. (2012). Clinicopathological correlation of choroidal melanoma in Indian population: A study of 113 cases. *Oman J. Ophthalmol.* 5, 42–45.

Diener-West, M., Hawkins, B.S., Markowitz, J.A., and Schachat, A.P. (1992). A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 110, 245–250.

Diener-West, M., Earle, J.D., Fine, S.L., Hawkins, B.S., Moy, C.S., Reynolds, S.M., Schachat, A.P., Straatsma, B.R., and Collaborative Ocular Melanoma Study Group (2001). The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma, II: characteristics of patients enrolled and not enrolled. COMS Report No. 17. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 119, 951–965.

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., et al. (2005). 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* 123, 1639–1643.

Dittié, A.S., and Tooze, S.A. (1995). Characterization of the endopeptidase PC2 activity towards secretogranin II in stably transfected PC12 cells. *Biochem. J.* 310, 777–787.

Dolin, P.J., Foss, A.J., and Hungerford, J.L. (1994). Uveal melanoma: is solar ultraviolet radiation a risk factor? *Ophthalmic Epidemiol.* 1, 27–30.

Dong, W., Marcinkiewicz, M., Vieau, D., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Day, R. (1995). Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1778–1796.

Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* 270, 10618–10624.

Duguay, S.J., Milewski, W.M., Young, B.D., Nakayama, K., and Steiner, D.F. (1997). Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-1A by subtilisin-related proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* *272*, 6663–6670.

Earle, J., Kline, R.W., and Robertson, D.M. (1987). Selection of iodine 125 for the Collaborative Ocular Melanoma Study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* *1960* *105*, 763–764.

Ehlers, J.P., Worley, L., Onken, M.D., and Harbour, J.W. (2008). Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 115–122.

Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L., and Seidah, N.G. (2002). Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J. Biol. Chem.* *277*, 11265–11275.

Essalmani, R., Hamelin, J., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Mbikay, M., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Prat, A. (2006). Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 354–361.

Felicetti, F., Errico, M.C., Segnalini, P., Mattia, G., and Carè, A. (2008). MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *8*, 1759–1765.

Finger, P.T., Chin, K.J., Yu, G.-P., and Palladium-103 for Choroidal Melanoma Study Group (2010). Risk factors for radiation maculopathy after ophthalmic plaque radiation for choroidal melanoma. *Am. J. Ophthalmol.* *149*, 608–615.

Finger, P.T., Chin, K.J., Yu, G.-P., Patel, N.S., and Palladium-103 for Choroidal Melanoma Study Group (2011). Risk factors for cataract after palladium-103 ophthalmic plaque radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *80*, 800–806.

Folberg, R., Pe'er, J., Gruman, L.M., Woolson, R.F., Jeng, G., Montague, P.R., Moninger, T.O., Yi, H., and Moore, K.C. (1992). The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study. *Hum. Pathol.* *23*, 1298–1305.

Folberg, R., Rummelt, V., Parys-Van Ginderdeuren, R., Hwang, T., Woolson, R.F., Pe'er, J., and Gruman, L.M. (1993). The Prognostic Value of Tumor Blood Vessel Morphology in Primary Uveal Melanoma. *Ophthalmology* *100*, 1389–1398.

Foss, A.J., Alexander, R.A., Jefferies, L.W., Hungerford, J.L., Harris, A.L., and Lightman, S. (1996). Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. *Cancer Res.* 56, 2900–2903.

Frändberg, P.A., Doufexis, M., Kapas, S., and Chhájłani, V. (1998). Human pigmentation phenotype: a point mutation generates nonfunctional MSH receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 490–492.

Fu, Y., Campbell, E.J., Shepherd, T.G., and Nachtigal, M.W. (2003). Epigenetic regulation of proprotein convertase PACE4 gene expression in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 1, 569–576.

Fuller, J.A., Brun-Zinkernagel, A.-M., Clark, A.F., and Wordinger, R.J. (2009). Subtilisin-like proprotein convertase expression, localization, and activity in the human retina and optic nerve head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5759–5768.

Gamel, J.W., and McLean, I.W. (1977). Quantitative analysis of the Callender classification of uveal melanoma cells. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 95, 686–691.

George, D. (2001). Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors. *Semin. Oncol.* 28, 27–33.

Gilbert, C.M., el Baba, F., Schachat, A.P., Grossniklaus, H., and Green, W.R. (1987). Nonsimultaneous primary choroidal and cutaneous melanomas. Report of a case. *Ophthalmology* 94, 1169–1172.

Gill, H.S., and Char, D.H. (2012). Uveal melanoma prognostication: from lesion size and cell type to molecular class. *Can. J. Ophthalmol. J. Can. Ophtalmol.* 47, 246–253.

Gold, L.I. (1999). The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 10, 303–360.

Gomer, C.J. (1991). Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 54, 1093–1107.

Gragoudas, E.S., Seddon, J.M., Egan, K.M., Polivogianis, L., Hsieh, C.-C., Goitein, M., Verhey, L., Munzenrider, J., Austin-Seymour, M., Urie, M., et al. (1986). Prognostic Factors for Metastasis Following Proton Beam Irradiation of Uveal Melanomas. *Ophthalmology* 93, 675–680.

Gragoudas, E.S., Seddon, J.M., Egan, K.M., Glynn, R.J., Goitein, M., Munzenrider, J., Verhey, L., Urie, M., and Koehler, A. (1988). Metastasis from uveal melanoma after proton beam irradiation. *Ophthalmology* 95, 992–999.

Graumann (2004). *CompactLehrbuch Anatomie: in 4 Bänden*, Schattauer Verlag 2004, S 10-33.

Griewank, K.G., and Murali, R. (2013). Pathology and genetics of uveal melanoma. *Pathology (Phila.)* 45, 18–27.

Guest, P.C., Arden, S.D., Bennett, D.L., Clark, A., Rutherford, N.G., and Hutton, J.C. (1992). The post-translational processing and intracellular sorting of PC2 in the islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 267, 22401–22406.

Gündüz (2010). Exoresection via partial lamellar sclerouvectomy approach for uveal tumors: A successful performance by a novice surgeon. *Clin. Ophthalmol.* 59.

Gyamera-Acheampong, C., and Mbikay, M. (2008). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: a review. *Hum. Reprod. Update* 15, 237–247.

Gyamera-Acheampong, C., Tantibhedhyangkul, J., Weerachatanukul, W., Tadros, H., Xu, H., van de Loo, J.-W., Pelletier, R.-M., Tanphaichitr, N., and Mbikay, M. (2006). Sperm from mice genetically deficient for the PCSK4 proteinase exhibit accelerated capacitation, precocious acrosome reaction, reduced binding to egg zona pellucida, and impaired fertilizing ability. *Biol. Reprod.* 74, 666–673.

Harbour, J.W., Meredith, T.A., Thompson, P.A., and Gordon, M.E. (2003). Transpupillary thermotherapy versus plaque radiotherapy for suspected choroidal melanomas. *Ophthalmology* 110, 2207–2214; discussion 2215.

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., and Bowcock, A.M. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330, 1410–1413.

Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501–4524.

van Hees, C.L., Jager, M.J., Bleeker, J.C., Kemme, H., and Bergman, W. (1998). Occurrence of cutaneous and uveal melanoma in patients with uveal melanoma and their first degree relatives. *Melanoma Res.* *8*, 175–180.

Höglund, M., Gisselsson, D., Hansen, G.B., White, V.A., Säll, T., Mitelman, F., and Horsman, D. (2004). Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *108*, 57–65.

Hopkinson, S.B., Baker, S.E., and Jones, J.C. (1995). Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen (the 180-kD bullous pemphigoid antigen/BP180): identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and alpha 6 integrin. *J. Cell Biol.* *130*, 117–125.

Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2009). PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S172–S177.

Hu, D.-N., Yu, G.-P., McCormick, S.A., Schneider, S., and Finger, P.T. (2005). Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups. *Am. J. Ophthalmol.* *140*, 612–617.

Hubbard, F.C., Goodrow, T.L., Liu, S.C., Brilliant, M.H., Basset, P., Mains, R.E., and Klein-Szanto, A.J. (1997). Expression of PACE4 in chemically induced carcinomas is associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer Res.* *57*, 5226–5231.

Hungerford, J.L. (2003). Current trends in the treatment of ocular melanoma by radiotherapy. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* *31*, 8–13.

Hurst, E.A., Harbour, J.W., and Cornelius, L.A. (2003). Ocular melanoma: a review and the relationship to cutaneous melanoma. *Arch. Dermatol.* *139*, 1067–1073.

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., et al. (1998). BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* *16*, 1097–1112.

Jeong, H., and Sa, H.-S. (2015). Uveal Melanoma with Massive Extraocular Extension through the Sclerocorneal Limbus. *Korean J. Ophthalmol. KJO* *29*, 280–281.

Jin, W. (2005). Proprotein Convertases Are Responsible for Proteolysis and Inactivation of Endothelial Lipase. *J. Biol. Chem.* *280*, 36551–36559.

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* *120*, 635–647.

Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., and Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* *37*, 1075–1089.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 517–531.

Kaur, J., Malik, M.A., Gulati, R., Azad, S.V., and Goswami, S. (2014). Genetic determinants of uveal melanoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *35*, 11711–11717.

Khatib, A.-M. (2001). Inhibition of Proprotein Convertases Is Associated with Loss of Growth and Tumorigenicity of HT-29 Human Colon Carcinoma Cells. IMPORTANCE OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1) RECEPTOR PROCESSING IN IGF-1-MEDIATED FUNCTIONS. *J. Biol. Chem.* *276*, 30686–30693.

Khatib, A.-M., Siegfried, G., Chrétien, M., Metrakos, P., and Seidah, N.G. (2002). Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am. J. Pathol.* *160*, 1921–1935.

Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D., and Barr, P.J. (1991). Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* *10*, 757–769.

Klenk, H.D., and Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* *2*, 39–43.

Konoshita, T., Gasc, J.M., Villard, E., Takeda, R., Seidah, N.G., Corvol, P., and Pinet, F. (1994). Expression of PC2 and PC1/PC3 in human pheochromocytomas. *Mol. Cell. Endocrinol.* *99*, 307–314.



Krauthammer, M., Kong, Y., Bacchiocchi, A., Evans, P., Pornputtapong, N., Wu, C., McCusker, J.P., Ma, S., Cheng, E., Straub, R., et al. (2015). Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat. Genet.* *47*, 996–1002.

Kruskal, W.H., and Wallis, W.A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* *47*, 583–621.

Kujala, E., Mäkitie, T., and Kivelä, T. (2003). Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 4651–4659.

Kujala, E., Tuomaala, S., Eskelin, S., and Kivelä, T. (2009). Mortality after uveal and conjunctival melanoma: which tumour is more deadly? *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* *87*, 149–153.

Kuo, P.K., Puliafito, C.A., Wang, K.M., Liu, H.S., and Wu, B.F. (1982). Uveal melanoma in China. *Int. Ophthalmol. Clin.* *22*, 57–71.

Kurabuchi, S., and Tanaka, S. (1997). Immunocytochemical localization of prohormone convertases PC1 and PC2 in the anuran pituitary gland: subcellular localization in corticotrope and melanotrope cells. *Cell Tissue Res.* *288*, 485–496.

Kwon, H.J., Lagace, T.A., McNutt, M.C., Horton, J.D., and Deisenhofer, J. (2008). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 1820–1825.

Lalou, C., Scamuffa, N., Mourah, S., Plassa, F., Podgorniak, M.-P., Soufir, N., Dumaz, N., Calvo, F., Basset-Seguin, N., and Khatib, A.-M. (2010). Inhibition of the proprotein convertases represses the invasiveness of human primary melanoma cells with altered p53, CDKN2A and N-Ras genes. *PloS One* *5*, e9992.

Landreville, S., Agapova, O.A., and Harbour, J.W. (2008). Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* *4*, 629–636.

Lehmann, M., André, F., Bellan, C., Remacle-Bonnet, M., Garrouste, F., Parat, F., Lissitsky, J.C., Marvaldi, J., and Pommier, G. (1998). Deficient processing and activity of type I insulin-like growth factor receptor in the furin-deficient LoVo-C5 cells. *Endocrinology* *139*, 3763–3771.

Leiter, U., Meier, F., Schitteck, B., and Garbe, C. (2004). The natural course of cutaneous melanoma. *J. Surg. Oncol.* *86*, 172–178.

Li, W., Gragoudas, E.S., and Egan, K.M. (2000). Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 *118*, 1066–1070.

Lindberg, I. (1994). Evidence for cleavage of the PC1/PC3 pro-segment in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Neurosci.* *5*, 263–268.

Lipkind, G.M., Zhou, A., and Steiner, D.F. (1998). A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 7310–7315.

van de Loo, J.W., Creemers, J.W., Bright, N.A., Young, B.D., Roebroek, A.J., and Van de Ven, W.J. (1997). Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase. *J. Biol. Chem.* *272*, 27116–27123.

van de Loo, J.W., Teuchert, M., Pauli, I., Plets, E., Van de Ven, W.J., and Creemers, J.W. (2000). Dynamic palmitoylation of lymphoma proprotein convertase prolongs its half-life, but is not essential for trans-Golgi network localization. *Biochem. J.* *352 Pt 3*, 827–833.

López de Cicco, R., Watson, J.C., Bassi, D.E., Litwin, S., and Klein-Szanto, A.J. (2004). Simultaneous expression of furin and vascular endothelial growth factor in human oral tongue squamous cell carcinoma progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 4480–4488.

Luo, Y., Warren, L., Xia, D., Jensen, H., Sand, T., Petras, S., Qin, W., Miller, K.S., and Hawkins, J. (2009). Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. *J. Lipid Res.* *50*, 1581–1588.

Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 6691–6695.

Maat, W., van der Velden, P.A., Out-Luiting, C., Plug, M., Dirks-Mulder, A., Jager, M.J., and Gruis, N.A. (2007). Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 486–490.

Machida, Y.J., Machida, Y., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Dutta, A. (2009). The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. *J. Biol. Chem.* *284*, 34179–34188.

Mahloogi, H., Bassi, D.E., and Klein-Szanto, A.J.P. (2002). Malignant conversion of non-tumorigenic murine skin keratinocytes overexpressing PACE4. *Carcinogenesis* *23*, 565–572.

Malide, D., Seidah, N.G., Chrétien, M., and Bendayan, M. (1995). Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *43*, 11–19.

Mann, H.B., and Whitney, D.R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Stat.* *18*, 50–60.

Marcinkiewicz, M., Day, R., Seidah, N.G., and Chrétien, M. (1993). Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 4922–4926.

Mariani, P., Piperno-Neumann, S., Servois, V., Berry, M.G., Dorval, T., Plancher, C., Couturier, J., Levy-Gabriel, C., Lumbroso-Le Rouic, L., Desjardins, L., et al. (2009). Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* *35*, 1192–1197.

Marschner, K., Kollmann, K., Schweizer, M., Bräulke, T., and Pohl, S. (2011). A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* *333*, 87–90.

Matei, D., Graeber, T.G., Baldwin, R.L., Karlan, B.Y., Rao, J., and Chang, D.D. (2002). Gene expression in epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* *21*, 6289–6298.

Maxwell, K.N., and Breslow, J.L. (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7100–7105.

Mayer, G., Boileau, G., and Bendayan, M. (2003). Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J. Cell Sci.* *116*, 1763–1773.

Mayer, G., Boileau, G., and Bendayan, M. (2004). The proprotein convertase furin colocalizes with caveolin-1 in the Golgi apparatus and endosomes of hepatocytes. *Cell Tissue Res.* *316*, 55–63.

Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chrétien, M., et al. (1997a). Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6842–6846.

Mbikay, M., Sirois, F., Yao, J., Seidah, N.G., and Chrétien, M. (1997b). Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br. J. Cancer* *75*, 1509–1514.

McCarthy, J.M., Rootman, J., Horsman, D., and White, V.A. (1993). Conjunctival and uveal melanoma in the dysplastic nevus syndrome. *Surv. Ophthalmol.* *37*, 377–386.

McLean, I.W., Foster, W.D., and Zimmerman, L.E. (1982). Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum. Pathol.* *13*, 123–132.

McLean, I.W., Foster, W.D., Zimmerman, L.E., and Gamel, J.W. (1983). Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. *Am. J. Ophthalmol.* *96*, 502–509.

McLean, M.J., Foster, W.D., and Zimmerman, L.E. (1977). Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *95*, 48–58.

McNutt, M.C., Lagace, T.A., and Horton, J.D. (2007). Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 20799–20803.

Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J., Lister, T.A., and Young, B.D. (1996). A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res.* *56*, 448–451.

Merbs, S.L., and Sidransky, D. (1999). Analysis of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) alterations in primary sporadic uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *40*, 779–783.

Mercapide, J., Lopez De Cicco, R., Bassi, D.E., Castresana, J.S., Thomas, G., and Klein-Szanto, A.J.P. (2002). Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *8*, 1740–1746.

Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S., and Matsuo, H. (1988). Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *156*, 246–254.

Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F., and Thomas, G. (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* *9*, 28–35.

Mooy, C.M., Luyten, G.P., de Jong, P.T., Luider, T.M., Stijnen, T., van de Ham, F., van Vroonhoven, C.C., and Bosman, F.T. (1995). Immunohistochemical and prognostic analysis of apoptosis and proliferation in uveal melanoma. *Am. J. Pathol.* *147*, 1097–1104.

Mork, T. (1961). Malignant neoplasms of the eye in Norway. Incidence, treatment and prognosis. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* *39*, 824–831.

Moshari, A., Cheeseman, E.W., and McLean, I.W. (2001). Totally necrotic choroidal and ciliary body melanomas: associations with prognosis, episcleritis, and scleritis. *Am. J. Ophthalmol.* *131*, 232–236.

Moulin, A.P., Clément, G., Bosman, F.T., Zografos, L., and Benhattar, J. (2008). Methylation of CpG island promoters in uveal melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* *92*, 281–285.

Mudhar, H.S., Parsons, M.A., Sisley, K., Rundle, P., Singh, A., and Rennie, I.G. (2004). A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma. *Histopathology* *45*, 1–12.

Muller, L., Picart, R., Barret, A., Seidah, N.G., and Tougaard, C. (1998). Immunocytochemical Localization of the Prohormone Convertases PC1 and PC2 in Rat Prolactin Cells. *J. Histochem. Cytochem.* *46*, 101–108.

Nassoury, N., Blasiolo, D.A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P.S., Attie, A.D., Prat, A., and Seidah, N.G. (2007). The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic Cph. Den.* *8*, 718–732.

Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C.F., Huang, Y., Chiang, L.W., Grenier, J.M., Ozenberger, B.A., Jacobsen, J.S., et al. (2003). Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.* *420*, 55–67.

Naus, N.C., van Drunen, E., de Klein, A., Luyten, G.P., Paridaens, D.A., Alers, J.C., Ksander, B.R., Beverloo, H.B., and Slater, R.M. (2001). Characterization of complex chromosomal abnormalities in uveal melanoma by fluorescence in situ hybridization, spectral karyotyping, and comparative genomic hybridization. *Genes. Chromosomes Cancer* *30*, 267–273.

Nishikawa, H., Wu, W., Koike, A., Kojima, R., Gomi, H., Fukuda, M., and Ohta, T. (2009). BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res.* *69*, 111–119.

Nour, N., Mayer, G., Mort, J.S., Salvas, A., Mbikay, M., Morrison, C.J., Overall, C.M., and Seidah, N.G. (2005). The Cysteine-rich Domain of the Secreted Proprotein Convertases PC5A and PACE4 Functions as a Cell Surface Anchor and Interacts with Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5215–5226.

Nowis, D., Makowski, M., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., and Gołab, J. (2005). Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim. Pol.* *52*, 339–352.

Onken, M.D., Worley, L.A., Ehlers, J.P., and Harbour, J.W. (2004). Gene Expression Profiling in Uveal Melanoma Reveals Two Molecular Classes and Predicts Metastatic Death. *Cancer Res.* *64*, 7205–7209.

Onken, M.D., Worley, L.A., and Harbour, J.W. (2008). A metastasis modifier locus on human chromosome 8p in uveal melanoma identified by integrative genomic analysis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 3737–3745.

Onken, M.D., Worley, L.A., Tuscan, M.D., and Harbour, J.W. (2010). An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J. Mol. Diagn. JMD* *12*, 461–468.

Onken, M.D., Worley, L.A., Char, D.H., Augsburger, J.J., Correa, Z.M., Nudleman, E., Aaberg, T.M., Altaweel, M.M., Bardenstein, D.S., Finger, P.T., et al. (2012). Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* *119*, 1596–1603.

Owen, C.A., and Campbell, E.J. (1999). Extracellular proteolysis: new paradigms for an old paradox. *J. Lab. Clin. Med.* *134*, 341–351.

Pach, J.M., Robertson, D.M., Taney, B.S., Martin, J.A., Campbell, R.J., and O'Brien, P.C. (1986). Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas with extrascleral extension. *Am. J. Ophthalmol.* *101*, 325–331.

Page, M.J., and Di Cera, E. (2008). Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 1220–1236.

Page, R.E., Klein-Szanto, A.J.P., Litwin, S., Nicolas, E., Al-Jumaily, R., Alexander, P., Godwin, A.K., Ross, E.A., Schilder, R.J., and Bassi, D.E. (2007). Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* *29*, 289–299.

Pasquato, A., Pullikotil, P., Asselin, M.-C., Vacatello, M., Paolillo, L., Ghezzi, F., Basso, F., Di Bello, C., Dettin, M., and Seidah, N.G. (2006). The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors. *J. Biol. Chem.* *281*, 23471–23481.

Pei, D., and Weiss, S.J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* *375*, 244–247.

Peña-Llopis, S., Vega-Rubín-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavía-Jiménez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., et al. (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* *44*, 751–759.

Pereira P.R., Odashiro A. N, Lim L., Miyamoto C., Blanco P., Odashiro M., Maloney S., De Souza D.F., Burnier M.Jr. (2013) Current and emerging treatment options for uveal melanoma *Clin Ophthalmol.* *7*, 1669-1682.

Peters, E.M., Tobin, D.J., Seidah, N.G., and Schallreuter, K.U. (2000). Pro-opiomelanocortin-related peptides, prohormone convertases 1 and 2 and the regulatory peptide 7B2 are present in melanosomes of human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 430–437.

Pföhler et al., (2003). Treosulfan and gemcitabine in metastatic uveal melanoma patients: results of a multicenter feasibility study. *Anticancer Drugs.* *14*, 337-40.

Pihlajaniemi, T., and Rehn, M. (1995). Two new collagen subgroups: membrane-associated collagens and types XV and XVII. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *50*, 225–262.

Pol, C.V.D. (2014) BASIC ANATOMY AND PHYSIOLOGY OF THE HUMAN VISUAL SYSTEM. ResearchGate , *Chapter 6*, 237-247. zit. n: "[https://www.researchgate.net/publication/265031683\\_BASIC\\_ANATOMY\\_AND\\_PHYSIOLOGY\\_OF\\_THE\\_HUMAN\\_VISUAL\\_SYSTEM](https://www.researchgate.net/publication/265031683_BASIC_ANATOMY_AND_PHYSIOLOGY_OF_THE_HUMAN_VISUAL_SYSTEM)"

Prescher, G., Bornfeld, N., Hirche, H., Horsthemke, B., Jöckel, K.H., and Becher, R. (1996). Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet Lond. Engl.* *347*, 1222–1225.

Pullikotil, P., Benjannet, S., Mayne, J., and Seidah, N.G. (2007). The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* *282*, 27402–27413.

Puusaari, I., Heikkonen, J., Summanen, P., Tarkkanen, A., and Kivelä, T. (2003). Iodine brachytherapy as an alternative to enucleation for large uveal melanomas. *Ophthalmology* *110*, 2223–2234.

Radhakrishnan, A., Badhrinarayanan, N., Biswas, J., and Krishnakumar, S. (2009). Analysis of chromosomal aberration (1, 3, and 8) and association of microRNAs in uveal melanoma. *Mol. Vis.* *15*, 2146–2154.

Rashid, A.B., and Grossniklaus, H.E. (2014). Clinical, pathologic, and imaging features and biological markers of uveal melanoma. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1102*, 397–425.

Rawlings, N.D., Morton, F.R., and Barrett, A.J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* *34*, D270–D272.

Reese, A.B. (1973). Congenital melanomas. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* *71*, 186–192.



Rosenthal, E., McCrory, A., Talbert, M., Young, G., Murphy-Ullrich, J., and Gladson, C. (2004). Elevated expression of TGF-beta1 in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Mol. Carcinog.* *40*, 116–121.

Rouillé, Y., Duguay, S.J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A.A., Chan, S.J., and Steiner, D.F. (1995). Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front. Neuroendocrinol.* *16*, 322–361.

Rousselet, E., Benjannet, S., Hamelin, J., Canuel, M., and Seidah, N.G. (2011). The proprotein convertase PC7: unique zymogen activation and trafficking pathways. *J. Biol. Chem.* *286*, 2728–2738.

Rovère, C., Barbero, P., Maoret, J.J., Laburthe, M., and Kitabgi, P. (1998). Pro-neurotensin/neuromedin N expression and processing in human colon cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *246*, 155–159.

Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol. Cell* *2*, 505–514.

Sakamoto, T., Sakamoto, M., Yoshikawa, H., Hata, Y., Ishibashi, T., Ohnishi, Y., and Inomata, H. (1996). Histologic findings and prognosis of uveal malignant melanoma in Japanese patients. *Am. J. Ophthalmol.* *121*, 276–283.

Scamuffa, N., Calvo, F., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Khatib, A.-M. (2006). Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1954–1963.

Schäfer, M.K., Day, R., Cullinan, W.E., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Watson, S.J. (1993). Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *13*, 1258–1279.

Schiller, M., Raghunath, M., Kubitscheck, U., Scholzen, T.E., Fisbeck, T., Metze, D., Luger, T.A., and Böhm, M. (2001). Human dermal fibroblasts express prohormone convertases 1 and 2 and produce proopiomelanocortin-derived peptides. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 227–235.

- Schmittl, A., Bechrakis, N.E., Martus, P., Mutlu, D., Scheibenbogen, C., Bornfeld, N., Foerster, M.H., Thiel, E., and Keilholz, U. (2004). Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 *40*, 2389–2395.
- Scopsi, L., Gullo, M., Rilke, F., Martin, S., and Steiner, D.F. (1995). Proprotein convertases (PC1/PC3 and PC2) in normal and neoplastic human tissues: their use as markers of neuroendocrine differentiation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *80*, 294–301.
- Seddon, J.M., Albert, D.M., Lavin, P.T., and Robinson, N. (1983). A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 *101*, 1894–1899.
- Seddon, J.M., Gragoudas, E.S., Glynn, R.J., Egan, K.M., Albert, D.M., and Blitzer, P.H. (1990). Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma. A case-control study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 *108*, 1274–1280.
- Segura, M.F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., et al. (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1814–1819.
- Seidah, N.G. (2009). PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin. Ther. Targets* *13*, 19–28.
- Seidah, N.G. (2011). The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *768*, 23–57.
- Seidah, N.G., and Chrétien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* *848*, 45–62.
- Seidah, N.G., and Prat, A. (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *85*, 685–696.
- Seidah, N.G., and Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 367–383.

- Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., and Chrétien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* *9*, 415–424.
- Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., and Chrétien, M. (1992). Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *6*, 1559–1570.
- Seidah, N.G., Chrétien, M., and Day, R. (1994). The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* *76*, 197–209.
- Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., and Day, R. (1996). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3388–3393.
- Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Touré, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., et al. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1321–1326.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S.B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 928–933.
- Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., and Prat, A. (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 1111–1125.
- Sekulic, A., Haluska, P., Miller, A.J., Genebriera De Lamo, J., Ejadi, S., Pulido, J.S., Salomao, D.R., Thorland, E.C., Vile, R.G., Swanson, D.L., et al. (2008). Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin. Proc.* *83*, 825–846.

Seregard, S., and Damato, B. (2014). Uveal Malignant Melanoma: Management Options for Brachytherapy. In *Clinical Ophthalmic Oncology*, B. Damato, and A.D. Singh, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 173–188.

Seregard, S., and Kock, E. (1995). Prognostic indicators following enucleation for posterior uveal melanoma. A multivariate analysis of long-term survival with minimized loss to follow-up. *Acta Ophthalmol. Scand.* 73, 340–344.

Shammas, H.F., and Blodi, F.C. (1977). Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 95, 63–69.

Shen, F.S., Seidah, N.G., and Lindberg, I. (1993). Biosynthesis of the prohormone convertase PC2 in Chinese hamster ovary cells and in rat insulinoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 24910–24915.

Shennan, K.I., Taylor, N.A., and Docherty, K. (1994). Calcium- and pH-dependent aggregation and membrane association of the precursor of the prohormone convertase PC2. *J. Biol. Chem.* 269, 18646–18650.

Shields, C.L., Shields, J.A., Materin, M., Gershenbaum, E., Singh, A.D., and Smith, A. (2001). Iris melanoma: risk factors for metastasis in 169 consecutive patients. *Ophthalmology* 108, 172–178.

Shields, C.L., Shields, J.A., Perez, N., Singh, A.D., and Cater, J. (2002). Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: outcomes and limitations. *Ophthalmology* 109, 225–234.

Shields, C.L., Ganguly, A., Bianciotto, C.G., Turaka, K., Tavallali, A., and Shields, J.A. (2011). Prognosis of uveal melanoma in 500 cases using genetic testing of fine-needle aspiration biopsy specimens. *Ophthalmology* 118, 396–401.

Shields, C.L., Kaliki, S., Furuta, M., Mashayekhi, A., and Shields, J.A. (2012). Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina Phila. Pa* 32, 1363–1372.

Shors, A.R., Iwamoto, S., Doody, D.R., and Weiss, N.S. (2002). Relationship of uveal and cutaneous malignant melanoma in persons with multiple primary tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *102*, 266–268.

Shoushtari, A.N., and Carvajal, R.D. (2014). GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma Res.* *24*, 525–534.

Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Khatib, A.-M. (2003a). The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *111*, 1723–1732.

Siegfried, G., Khatib, A.-M., Benjannet, S., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (2003b). The proteolytic processing of pro-platelet-derived growth factor-A at RRKR(86) by members of the proprotein convertase family is functionally correlated to platelet-derived growth factor-A-induced functions and tumorigenicity. *Cancer Res.* *63*, 1458–1463.

Singh, A.D., and Borden, E.C. (2005). Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmol. Clin. N. Am.* *18*, 143–150, ix.

Singh, A.D., Shields, C.L., Shields, J.A., Eagle, R.C., and De Potter, P. (1995). Uveal melanoma and familial atypical mole and melanoma (FAM-M) syndrome. *Ophthalmic Genet.* *16*, 53–61.

Singh, A.D., Shields, C.L., Shields, J.A., and Sato, T. (2000). Uveal melanoma in young patients. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *118*, 918–923.

Singh, A.D., Shields, C.L., and Shields, J.A. (2001). Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res.* *11*, 255–263.

Singh, A.D., Bergman, L., and Seregard, S. (2005). Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol. Clin. N. Am.* *18*, 75–84, viii.

Singh, A.D., Turell, M.E., and Topham, A.K. (2011). Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* *118*, 1881–1885.

Smeekens, S.P., and Steiner, D.F. (1990). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. Biol. Chem.* *265*, 2997–3000.

Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J., and Steiner, D.F. (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 340–344.

Soparker, C.N., O'Brien, J.M., and Albert, D.M. (1993). Investigation of the role of the ras protooncogene point mutation in human uveal melanomas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *34*, 2203–2209.

Spendlove, H.E., Damato, B.E., Humphreys, J., Barker, K.T., Hiscott, P.S., and Houlston, R.S. (2004). BRAF mutations are detectable in conjunctival but not uveal melanomas. *Melanoma Res.* *14*, 449–452.

Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L., and Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* *157*, 697–700.

Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S., and Chan, S.J. (1992). The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J. Biol. Chem.* *267*, 23435–23438.

Sun, X., Essalmani, R., Seidah, N.G., and Prat, A. (2009). The proprotein convertase PC5/6 is protective against intestinal tumorigenesis: in vivo mouse model. *Mol. Cancer* *8*, 73.

Sun, X., Essalmani, R., Day, R., Khatib, A.M., Seidah, N.G., and Prat, A. (2012). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia N. Y. N* *14*, 1122–1131.

Tadros, H., Chrétien, M., and Mbikay, M. (2001). The testicular germ-cell protease PC4 is also expressed in macrophage-like cells of the ovary. *J. Reprod. Immunol.* *49*, 133–152.

Tanaka, S., Kurabuchi, S., Mochida, H., Kato, T., Takahashi, S., Watanabe, T., and Nakayama, K. (1996). Immunocytochemical localization of prohormone convertases PC1/PC3 and PC2 in rat pancreatic islets. *Arch. Histol. Cytol.* *59*, 261–271.

Thomas, G. (2002). FURIN AT THE CUTTING EDGE: FROM PROTEIN TRAFFIC TO EMBRYOGENESIS AND DISEASE. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 753–766.

- Toivonen, P., Mäkitie, T., Kujala, E., and Kivelä, T. (2004). Microcirculation and tumor-infiltrating macrophages in choroidal and ciliary body melanoma and corresponding metastases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *45*, 1–6.
- Torii, S., Yamagishi, T., Murakami, K., and Nakayama, K. (1993). Localization of Kex2-like processing endoproteases, furin and PC4, within mouse testis by in situ hybridization. *FEBS Lett.* *316*, 12–16.
- Tschentscher, F., Hüsing, J., Hölter, T., Kruse, E., Dresen, I.G., Jöckel, K.-H., Anastassiou, G., Schilling, H., Bornfeld, N., Horsthemke, B., et al. (2003). Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Res.* *63*, 2578–2584.
- Turpeinen, H., Kukkurainen, S., Pulkkinen, K., Kauppila, T., Ojala, K., Hytönen, V.P., and Pesu, M. (2011). Identification of proprotein convertase substrates using genome-wide expression correlation analysis. *BMC Genomics* *12*, 1–10.
- Turpeinen, H., Ortutay, Z., and Pesu, M. (2013). Genetics of the First Seven Proprotein Convertase Enzymes in Health and Disease. *Curr. Genomics* *14*, 453–467.
- Van Raamsdonk, C.D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., and Bastian, B.C. (2009). Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* *457*, 599–602.
- Van Raamsdonk, C.D., Griewank, K.G., Crosby, M.B., Garrido, M.C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A.C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., et al. (2010). Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2191–2199.
- Vavvas, D., Kim, I., Lane, A.M., Chaglassian, A., Mukai, S., and Gragoudas, E. (2010). Posterior uveal melanoma in young patients treated with proton beam therapy. *Retina Phila. Pa* *30*, 1267–1271.
- van de Ven, W.J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A.M., van Duijnhoven, H.L., Roebroek, A.J., and Siezen, R.J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* *14*, 265–275.

Vindrola, O. (1994). Rapid cleavage of the endogenous PC3 prosegment and slow conversion to 74 kDa and 66 kDa proteins in AtT-20 cells. *Neuropeptides* 27, 109–120.

Vindrola, O., and Lindberg, I. (1992). Biosynthesis of the prohormone convertase mPC1 in AtT-20 cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 6, 1088–1094.

Virgili, G., Gatta, G., Ciccolallo, L., Capocaccia, R., Biggeri, A., Crocetti, E., Lutz, J.-M., Paci, E., and EUROCARE Working Group (2007). Incidence of uveal melanoma in Europe. *Ophthalmology* 114, 2309–2315.

Wang, F., Wang, L., and Pan, J. (2015). PACE4 regulates proliferation, migration and invasion in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Mol. Med. Rep.* 11, 698–704.

Wang, Z., Nabhan, M., Schild, S.E., Stafford, S.L., Petersen, I.A., Foote, R.L., and Murad, M.H. (2013). Charged particle radiation therapy for uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 86, 18–26.

Weis, E., Shah, C.P., Lajous, M., Shields, J.A., and Shields, C.L. (2006). The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 124, 54–60.

Weiß, N., Stegemann, A., Elsayed, M.A.T., Schallreuter, K.U., Luger, T.A., Loser, K., Metze, D., Weishaupt, C., and Böhm, M. (2014). Inhibition of the prohormone convertase subtilisin-kexin isoenzyme-1 induces apoptosis in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 134, 168–175.

Wilson, M.W., and Hungerford, J.L. (1999). Comparison of episcleral plaque and proton beam radiation therapy for the treatment of choroidal melanoma. *Ophthalmology* 106, 1579–1587.

Winsky-Sommerer, R., Benjannet, S., Rovère, C., Barbero, P., Seidah, N.G., Epelbaum, J., and Dournaud, P. (2000). Regional and cellular localization of the neuroendocrine prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 424, 439–460.

Wolins, N., Bosshart, H., Kster, H., and Bonifacino, J.S. (1997). Aggregation as a determinant of protein fate in post-Golgi compartments: role of the luminal domain of furin in lysosomal targeting. *J. Cell Biol.* 139, 1735–1745.



Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., et al. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318, 1108–1113.

Worley, L.A., Long, M.D., Onken, M.D., and Harbour, J.W. (2008). Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Res.* 18, 184–190.

Xiang, Y., Molloy, S.S., Thomas, L., and Thomas, G. (2000). The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol. Biol. Cell* 11, 1257–1273.

Yaoi, Y., Suzuki, M., Tomura, H., Kurabuchi, S., Sasayama, Y., and Tanaka, S. (2003). Expression and localization of prohormone convertase PC1 in the calcitonin-producing cells of the bullfrog ultimobranchial gland. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 51, 1459–1466.

Zhou, A., and Mains, R.E. (1994). Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2. *J. Biol. Chem.* 269, 17440–17447.

Zhou, Y., and Lindberg, I. (1993). Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J. Biol. Chem.* 268, 5615–5623.

Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J., and Steiner, D.F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 273, 11107–11114.

(1998). Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the collaborative ocular melanoma study COMS report no. 6. *Am. J. Ophthalmol.* 125, 745–766.

## **6 Lebenslauf**

## 7 Danksagung

Ich danke herzlich meinem Betreuer, Dr. Carsten Weishaupt, und meinem Doktorvater, Prof. Markus Böhm, für die Unterstützung und die Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Michael Böhm und PD. Dr. Tilmann Spieker für die Besorgung und die histologische Auswertung der Augepräparate.

Zusätzlich möchte ich mich bei Frau Andra Wissel, für ihre technische Unterstützung im Labor, sowie bei Dr. Christina Sauerland, für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung, bedanken.

Letzlich bedanke ich mich bei Dr. Jeremy Cheret, Dr. Marta Bertolini, Dr. Louisa Toutouna and Dr. Jennifer Gherardini, für die Hilfe bei der Benutzung der angewendeten Softwares.