

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Salvatore Grisanti

**„Verringerte Expression von Adiponectin bei uvealen Melanomen
mit Monosomie 3“**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
Vorgelegt von
Christiane Thieme, geb. Zelk
aus Rostock
Lübeck, 2025

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

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Morten Schütt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.03.2025

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	8
1.1. Das uveale Melanom	8
1.1.1. Einleitung und Definition	8
1.1.2. Ätiologie	10
1.1.3. Symptome	10
1.1.4. Tumorklassifikation	11
1.1.5. Metastasierung	11
1.1.6. Diagnostik	12
1.1.7. Prognosefaktoren und Tumorbiologie	13
1.1.8. Therapie	16
1.2. Adiponectin	19
1.3. Fragestellung der Arbeit	22
2. Methoden und Materialien	23
2.1. Materialien	23
2.2. Patientenauswahl	23
2.3. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	23
2.4. Immunhistochemische Färbungen	24
2.5. Analyse der immunhistochemischen Färbungen durch Farben-Dekonvolution	25
2.6. Immunomagnetische Anreicherung von zirkulierenden Melanomzellen	26
2.7. Immuno-FISH	26
2.8. Prüfung auf Monosomie 3	28
2.9. Kultivierung der uvealen Melanomzellen	29
2.10. Genexpression in der TCGA Kohorte	29
2.11. Statistische Analyse	30
3. Ergebnisse	31
3.1. Erniedrigte Spiegel von Adiponectin und AdipoR1 in Verbindung mit Monosomie 3	31
3.2. Erniedrigte Level von Adiponectin und seinem Rezeptor AdipoR1 im Primärtumor bei metastasierten Patienten	39
3.3. Adiponectin- und AdipoR1-Expression in Abhängigkeit von klinischen Parametern	42
3.4. Expression von Adiponectin in den kultivierten uvealen Melanomzellen mit Bezug auf den Chromosom 3 Status	44
3.5. Genexpression abhängig von der Chromosom 3-Kopienzahl, BAP1- und YAP1-Expression	45
3.6. Genexpression abhängig von klinischen Parametern	48
4. Diskussion	50
5. Zusammenfassung	58

6. Literaturverzeichnis	60
7. Eidesstattliche Erklärung	65
8. Danksagungen	66
9. Anhang.....	67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AdipoR1	Adiponectin Rezeptor 1
AICAR	5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Synonym für Proteinkinase B
AMPK/CRTC	Adenosinmonophosphat aktivierte Proteinkinase / cyclisches Adenosinmonophosphat- regulierter Transkriptionskoaktivator
anti-MCSP	Antikörper-Melanoma-assoziiertes chondroitin sulfat proteoglycan
APPL1	Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting with PH Domain And Leucine Zipper1
A-Scans	Amplitude Scan
ATP	Adenosintriphosphat
B	blau
BAP1	BRCA1 associated protein-1
B-Scans	Brightness Scan
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD3	Cluster of Differentiation 3
CDH13	Cadherin 13
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2 A
CMC	circulating melanoma cells
CNKSr3	Connector Enhancer Of Kinase Suppressor Of Ras 3
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computer Tomographie
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
dd	disc diameters
d.h.	das heißt

DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERP44	endoplasmic reticulum protein 44
etc.	et cetera
EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G	grün
GCL	ganglion cell layer
GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein G (q) subunit alpha
GNA11	G Protein Subunit Alpha 11
gp100	Glykoprotein 100
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HL-Antigene	Humane Leukozyten-Antigene
HMW	high molecular weight
HRP	Horseradish peroxidase
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IMCgp100	Tebentafusp
Immuno-FISH	Immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization
INL	inner nerve layer
KCl	Kaliumchlorid
LMW	low molecular weight
M	Molarität
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCSP	Melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan
Melan-A	Melanoma Antigen

MET	Mesenchymal-epithelial Transition Factor
µg/ml	Mikrogramm/Milliliter
min	Minuten
Min-Max	Minimum-Maximum
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimol
MMW	medium molecular weight
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCSS-Statistiksoftware	Number Cruncher Statistical Systems
N. opticus	Nervus opticus
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
ONL	outer nerve layer
OP	Operation
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
p53	Protein 53
P _{adj}	adjustierte p-Werte
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1-Rezeptor	programmed cell death protein 1 Receptor
PD-L1	programmed death-ligand 1
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
pM	distant metastasis
pN	regional lymphnodes
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-alpha
PPARG	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma
pT	primary tumor

PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R	rot
RAS/RAF/MEK/ERK	rat sarcoma / rapidly accelerated fibrosarcoma / Mitogen-activated protein kinase kinase / Extracellular Signal Regulated Kinases
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
SF3B1	splicing factor 3B subunit 1
SRT	stereotactic radiotherapy
SSC	saline sodium citrate
StAbw	Standardabweichung
TAMS	tumorassoziierte Makrophagen
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
TTT	Transpupillary Thermoerapy
T-Zellen	Thymus-Zellen
u.a.	unter anderem
UCSC	University of California Santa Cruz
U/ml	Units/Milliliter
UM-Medium	Uveales Melanom Medium
UV	ultraviolette Strahlung
VEGF	vascular endothelial growth factor
YAP1	Yes1 associated transcriptional regulator
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Das uveale Melanom

1.1.1. Einleitung und Definition

Das Aderhautmelanom ist der häufigste maligne primäre Tumor des Auges beim Erwachsenen (1). Außerdem ist es das häufigste non-kutane Melanom (2). Die Inzidenzrate liegt bei 1:200.000 pro Jahr in den USA bei Kaukasiern, wobei das Erkrankungsrisiko mit zunehmendem Alter steigt und seinen Höhepunkt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr erreicht (3). Die altersbezogene Häufigkeit des Tumors ist seit 1970 konstant (4). Männer sind geringfügig häufiger betroffen als Frauen (3).

Zunächst zeigt die Krankheit oft einen asymptomatischen Verlauf (4). Das uveale Melanom ist eine hochgradig maligne Erkrankung, die aus entarteten Melanozyten hervorgeht. Die Tumore können sowohl im vorderen Bereich des Auges (Iris), als auch im hinteren Bereich des Auges (Ziliarkörper, Choroidea) entstehen (4). Das Iris-Melanom tritt mit 4 % am seltensten auf und hat die beste Prognose. Das Ziliarkörper-Melanom kommt mit 6 % etwas häufiger vor und hat die schlechteste Prognose. Die meisten uvealen Melanome (90 %) entstehen in der Choroidea (2). Sie ordnet sich zwischen der Netzhaut und der Lederhaut ein. Es ist ein dichtes Geflecht aus Blutgefäßen und dient der Ernährung der Netzhaut, dem eigentlichen Sinnesorgan (5). Die uvealen Melanome stellen zumeist eine erhabene und kugelförmige, subretinale Masse dar. Der Grad der Pigmentierung liegt zwischen dunkel braun und total amelanotisch (4).

Mittlere Augenhaut Uvea

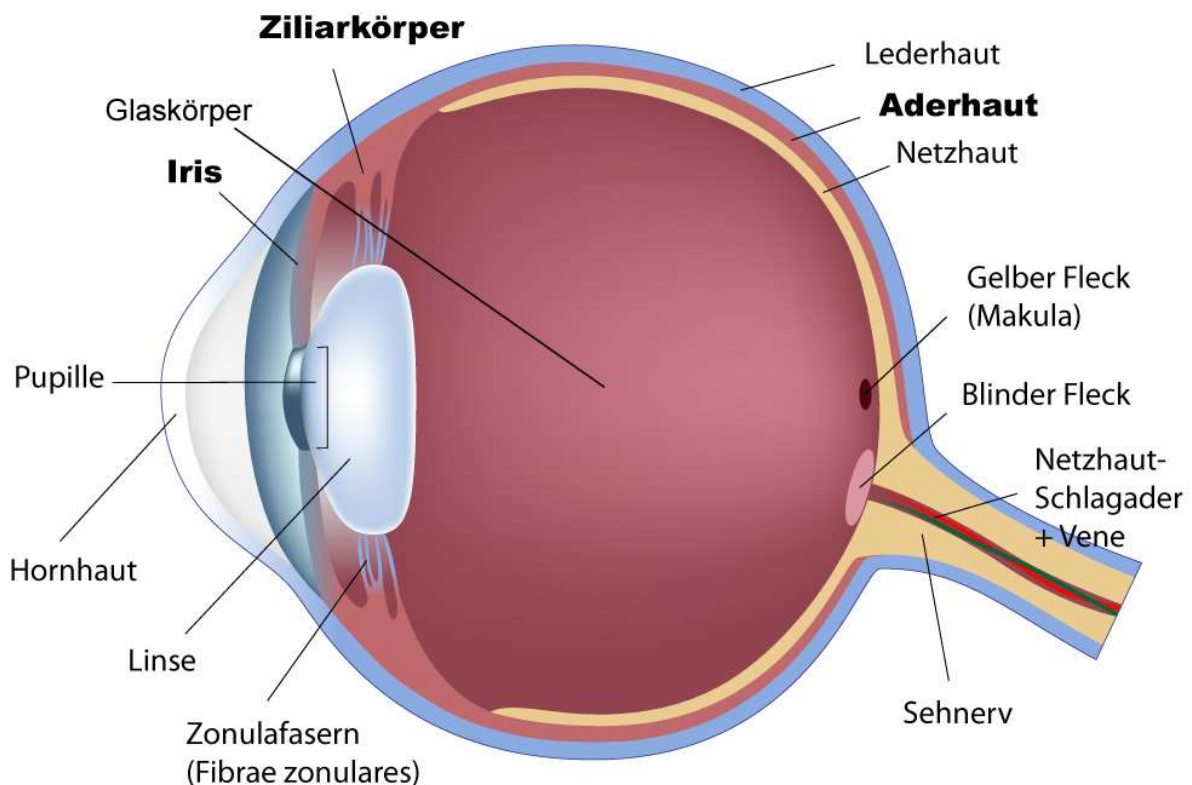


Abb. 1 Anatomie des Auges. Uveale Melanome gehen von den drei zur Uvea gehörenden Strukturen Aderhaut, Ziliarkörper und Iris aus (6).

Der Tumor neigt zur Metastasierung in die Leber. Knochen und Lunge können ebenfalls betroffen sein. Da die Aderhaut über keine Lymphgefäße verfügt, erfolgt die Metastasierung zunächst rein hämatogen. So nutzen die Tumorzellen das Immunprivileg des Sehapparates. Am häufigsten kommt es zur Metastasierung bei Monosomie 3. Die Erkrankung kann innerhalb weniger Monate tödlich verlaufen (3).

Neben zahlreichen Verbesserungen im Bereich der Behandlung uvealer Melanome, stellen die Prävention und Therapie systemischer Metastasen ein Problem dar. Prognostische Indikatoren können die Entwicklung und den Verlauf der Krankheit immer besser vorhersagen (siehe 1.1.7.). Es sterben jedoch Patienten durch Metastasen, sowohl bei früh diagnostiziertem Primärtumor, als auch viele Jahre nach erfolgreicher Tumorentfernung. Es ist also wichtig, das Risiko der Tumorzellausbreitung zu reduzieren, in dem der Tumor im möglichst frühen Stadium entdeckt wird (7).

1.1.2. Ätiologie

Uveale Melanome kommen mit 98 % am häufigsten in der kaukasischen Weltbevölkerung vor. Die restlichen 2 % werden zum einen von Hispaños, den spanischstämmigen Einwohnern Amerikas, und zum anderen von Asiaten, Afrikanern und indigenen Amerikanern gebildet. In Europa zeigt sich ein absteigendes Gefälle von Nord nach Süd, was auf die protektiven Eigenschaften der Pigmente hindeuten könnte (2). Häufig betroffen sind Menschen der Hauttypen I und II nach Fitzpatrick mit heller Augenfarbe, heller Haut und mit der Unfähigkeit zur Bräunung (4). Es gibt allerdings keinen Zusammenhang zwischen der Tumorentstehung und dem Grad der UV-Exposition (2). Eine solche kausale Verbindung konnte von bisherigen Studien nur als schwach bzw. widersprüchlich dargelegt werden (4). Durch Schweißen verursachte künstliche UV- Strahlung und intensives, blaues Licht stellen jedoch einen Risikofaktor dar (8, 9).

5 %-10 % der Kaukasier haben Nävi in den Augen. Einer von 8845 Nävi entwickelt sich zu einem uvealen Melanom (2). Man geht davon aus, dass alle choroidalen Melanome von gutartigen, differenzierten Nävi ausgehen, sich zu weniger differenzierten Nävi entwickeln und schließlich zum Melanom werden. Es ist nicht bekannt, in welchem Stadium/mit welchen Charakteristika sich uveale Nävuszellen zu Melanomzellen transformieren (7).

1.1.3. Symptome

Iris Melanome entstehen zu 80 % im unteren Teil der Iris. Die Tumore in diesem Bereich zeigen eine große Variabilität hinsichtlich der Pigmentierung, Form und Größe (2). Sie gehen mit einer Entrundung der Pupille einher (4). Ziliarkörpermelanome bleiben je nach Größe oft lange unentdeckt und verlaufen zunächst asymptomatisch. Mögliche Symptome sind Abweichung der Linsenachse, Kataraktentwicklung (2) und verschwommenes Sehen (4). Tumore der Choroidea verursachen einen herabgesetzten Visus durch Abhebung der Retina und bei starker Ausprägung führen sie zum Winkelblockglaukom. Diese genannten Symptome können allerdings auch durch andere metastasierende Tumore, posteriore Skleritis und gutartige Tumore wie Nävi und Hämangiome hervorgerufen werden (4).

1.1.4. Tumorklassifikation

Die meisten uvealen Melanome haben eine kugelige oder kuppelförmige Gestalt (75 %). Wird die Bruch Membran durchbrochen und der Tumor wächst weiter subretinal, nimmt er eine pilzförmige Gestalt an (20 %) (2). 5 % der uvealen Melanome haben eine flache und diffuse Begrenzung. Sie infiltrieren einen großen Bereich ohne Erhebung. Sie können leicht mit einem Nävus verwechselt werden (2). Die Tumore sind zu 50 % pigmentiert. 15 % sind nicht pigmentiert und der Rest stellt eine Mischung dar. Das uveale Melanom gilt mit einer apikalen Höhe von 1-3 mm und einem basalen Durchmesser von 5-16 mm als klein. Eine apikale Höhe von 3,1-8 mm und ein basaler Durchmesser, der größer als 16 mm ist, beschreiben einen mittelgroßen Tumor. Ist die apikale Höhe größer als 8 mm oder wenigstens 2 mm mit einem basalen Durchmesser von mehr als 16 mm, ist es ein großer Tumor (4). Auf zellulärer Ebene können uveale Melanome wie folgt unterschieden werden:

- Spindel-A Zellen: spindelförmige Zellen mit kleinem Zellkern und nicht sichtbaren Nukleoli
- Spindel-B Zellen: spindelförmige Zellen mit größerem Zellkern und deutlichen Nukleoli
- Epitheloidzellen: große polygonale Zellen mit einem oder mehreren deutlichen Nukleoli
- Intermediäre Zellen: den Epitheloidzellen ähnlich, aber kleiner

Zu 86 % stellen die Tumore eine Mischform aus Spindel-A Zellen, Spindel-B Zellen und den Epitheloidzellen dar (4). Eine detaillierte Klassifikation wurde von der American Joint Committee on Cancer (AJCC) herausgegeben. Die Unterteilung erfolgt in Tumorgröße (T category: von 1-4), den Lymphknotenstatus (N category: NX, N0, N1) und Grad der Metastasierung (M category: MX, M0, M1a, M1b, M1c) (2), woraus sich wiederum die klinischen Stadien von I bis IV ableiten. Eine detaillierte Darstellung der Einteilung der Tumore nach der AJCC-Klassifikation findet sich im Anhang.

1.1.5. Metastasierung

Zur Zeit der Diagnose des primären Melanoms sind bestehende Metastasen in nur ca. 2 % der Fälle nachweisbar (7). Zirka die Hälfte aller Patienten mit posterioren uvealen Melanomen entwickeln Metastasen (10). Ihr Entstehen ist von verschiedenen klinischen Faktoren abhängig. So spielen die Beteiligung des Ziliarkörpers, des lymphatischen Gewebes und die Tumorgröße eine Rolle. Die 5-Jahres Überlebensrate nach Enukleation beträgt bei kleinen

Tumoren 84 %, bei mittleren Tumoren 68 % und bei großen Tumoren 47 % (2). Die Tumorausbreitung erfolgt lokal und über Blutgefäße, da die Aderhaut über keine Lymphgefäße verfügt. Erst nach einer Ausdehnung in die Konjunktiva und ihre Lymphgefäße würde eine lymphogene Ausbreitung erfolgen. Das ist allerdings sehr selten (4). Die Metastasierung betrifft mit 95 % am häufigsten die Leber (10). Gründe dafür sind nicht bekannt (7). Patienten mit Lebermetastasen überleben in der Regel nur etwa 4-6 Monate. 10-15 % der Betroffenen leben noch nach 1 Jahr (2). Des Weiteren können Lungen (24 %), Knochen (16 %) und andere Organe betroffen sein (2). Eine Sehnervbeteiligung einschließlich seiner Meningen ist sehr unwahrscheinlich. Die Metastasierung zur kontralateralen Choroidea findet ebenso wenig statt (4). Es gibt zahlreiche Fortschritte in der Diagnostik und Therapie des Primärtumors. Jedoch entwickeln 50% der Patienten (unabhängig von der Art der Therapie) Metastasen (7). Die Verbreitung von Tumorzellen, durch zirkulierende Melanomzellen (circulating melanoma cells=CMC) ohne klinisch nachweisbare Metastasen, findet lange vor der Erstdiagnose statt (7). Bisher konnte kein Bluttest zur verlässlichen Feststellung einer Metastasierung entwickelt werden, obgleich es einige hierfür untersuchte Proteine gibt (S100-β, „melanoma inhibitory activity“ und Osteopontin). Daher stellt die Schnittbildgebung bisher die beste, aber kostenintensivere Diagnostik zur Detektion von Metastasen dar (11). Früherkennung ist absolut unerlässlich, um die komplette Exzision der Tumormetastasen zu ermöglichen. Es gibt bisher keine adjuvante Chemotherapie um Mikrometastasen zu vermeiden. Die Überlebensrate hat sich innerhalb der letzten 40 Jahre nicht verbessert (2).

1.1.6. Diagnostik

Zur Stellung der Diagnose ist die sorgsame Untersuchung durch einen erfahrenen Augenarzt unerlässlich. Je nach Größe und Lokalisation des Tumors und ob frühe Anzeichen/Symptome vorliegen, ist es oft ein Zufallsbefund bei Routineuntersuchungen. Ein kleines uveales Melanom von einem Nävus zu unterscheiden, ist leider nicht möglich. Dies erfordert weiterführende Beobachtungen in festgelegten Zeitintervallen hinsichtlich ihrer Wachstumstendenz. Hilfreiche Kriterien zur Eingrenzung der Diagnose sind das Vorhandensein von orangem Pigment auf der Tumoroberfläche, subretinale Flüssigkeitsansammlungen, herabgesetzter Ultraschallreflex und eine Tumordicke von mehr als 2 mm (4). Die klinische Untersuchung erfolgt mittels Spaltlampen-Biomikroskopie und indirekter Ophthalmoskopie. Weitere wichtige Untersuchungsmethoden sind

Ultraschalluntersuchung, farbige Fundusphotografie, Fundusfluoreszenz-Angiografie, Indocyanin-Angiografie, optische Kohärenztomografie, Fundusautofluoreszenz, Ultraschallbiomikroskopie, CT und MRT. Außerdem können eine Tumorbiopsie beziehungsweise „liquid biopsy“, bei welcher im Blut des Patienten zirkulierende Melanomzellen aus einer Blutprobe gewonnen werden, durchgeführt werden (2). Die Erkennung und Charakterisierung zirkulierender Melanomzellen wäre hilfreich für die Diagnose, Prognose und das Krankheitsmonitoring. Die „liquid biopsy“ hat bei anderen Krebsarten bereits große Bedeutung erlangt. So könnte sie zum Beispiel bei Auge-erhaltender Therapie, ohne Tumorbiopsie, bei der Unterscheidung von Nävus und Melanom hilfreich sein. Des Weiteren könnten die CMC zur Feststellung von Monosomie 3 dienlich sein und für in-vitro Untersuchungen bezüglich der Ausbreitung und Proliferation von Melanomzellen in der Leber genutzt werden (7).

1.1.7. Prognosefaktoren und Tumorbiologie

Es gibt zahlreiche Faktoren, die eine Einschätzung über den Verlauf und den Ausgang der Krankheit erlauben. Wie bereits erwähnt, spielt beispielsweise der Zelltyp eine Rolle. Spindel-A Zellmelanome haben die beste und Epitheloidzellmelanome haben die schlechteste Prognose. Zumeist sind die Tumore jedoch eine Mischform. Die Tumgröße mit Durchmesser und Dicke ist ebenfalls von Bedeutung. So auch der erhöhte Durchmesser der 10 größten Nukleoli, Ziliarkörperbeteiligung und extraokuläre Ausbreitung verschlechtern die Prognose. Weitere negative Faktoren sind Lymphozyteninfiltration, Tumor infiltrierte Makrophagen, hohe mitotische Aktivität, Metastasen und das Vorhandensein extravaskulärer Matrix (4, 12).

Die Epidemiologie uvealer Melanome unterscheidet sich von der kutaner und mukosaler Melanome. Eine Reihe von chromosomalen Alterationen und somatischen Genveränderungen spielen eine Rolle (12). Von größter Bedeutung hierbei ist die bereits erwähnte Monosomie 3. Sie tritt in 50 % der Krankheitsfälle auf, korreliert stark mit Metastasierung (12), spielt eine Rolle in der Kolonisierung der Leber (7) und steht für einen beschleunigten Krankheitsprogress (13). Nur 31 % der Patienten mit Monosomie 3 leben noch nach 8 Jahren. Bei Disomie 3 sind es hingegen 95 % (2). Die Prognose wird zusätzlich verschlechtert, wenn ebenfalls eine Veränderung im Chromosom 8 vorliegt (12). Diese tritt später auf, da sie von der Monosomie 3 induziert wird (2). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression der HL-Antigene bei Monosomie 3 gegenüber einer Disomie 3 erhöht ist. (14). Eine

verringerte Expression geht mit einer verlängerten Überlebensdauer einher (15). Weitere Veränderungen, die mit einer erhöhten Metastasierungsrate einhergehen, sind der Verlust von Chromosom 1p und 6q. Außerdem verringert ein zusätzliches Chromosom 8q die Überlebensrate (2).

Ebenfalls von großer Bedeutung sind Mutationen im Gen, das die G-alpha Proteine GNAQ oder GNA11 codiert. Diese Mutation ist bei 83 % der Primärtumore zu finden und gilt als frühes oder initiierendes Event zur malignen Transformation uvealer Melanozyten. Es ist aber kein Prognosefaktor, der eine Aussage über die Krankheitsentwicklung erlaubt (1). Diese Mutation sorgt für eine konstitutive Aktivierung von Signalwegen, wie dem zentralen onkologischen Signalweg RAS/RAF/MEK/ERK (RAS-ERK). So wird die Zellproliferation und damit Tumorwachstum- und progression vorangetrieben. GNAQ und GNA11 tragen auch zur Hochregulierung von MAPK (mitogen-activated protein kinase pathway) bei und so zur Entwicklung uvealer Melanome. GNAQ stimuliert zusätzlich den transkriptionellen Co-aktivator YAP, welcher essenziell für die Tumorzellproliferation ist (1). Inaktivierende BAP1 Mutationen treten in 50 % der Fälle auf und korrelieren mit dem Auftreten von Metastasen. Der Mechanismus ist jedoch unbekannt (12). Mutationen im SF3B1 (splicing factor 3B subunit1) und ETF1AX (eukaryotic translation initiation factor 1A) sind weniger aggressiv und kommen zu 19 % und 24 % vor. Liegt allerdings Monosomie 3 vor, treten sie nur in 3 % der Fälle auf (12). CNKSR3 ist in den transepithelialen Natriumtransport involviert. Dessen Verstärkung korreliert mit einem verbesserten Überleben von Patienten mit Primärtumor (12).

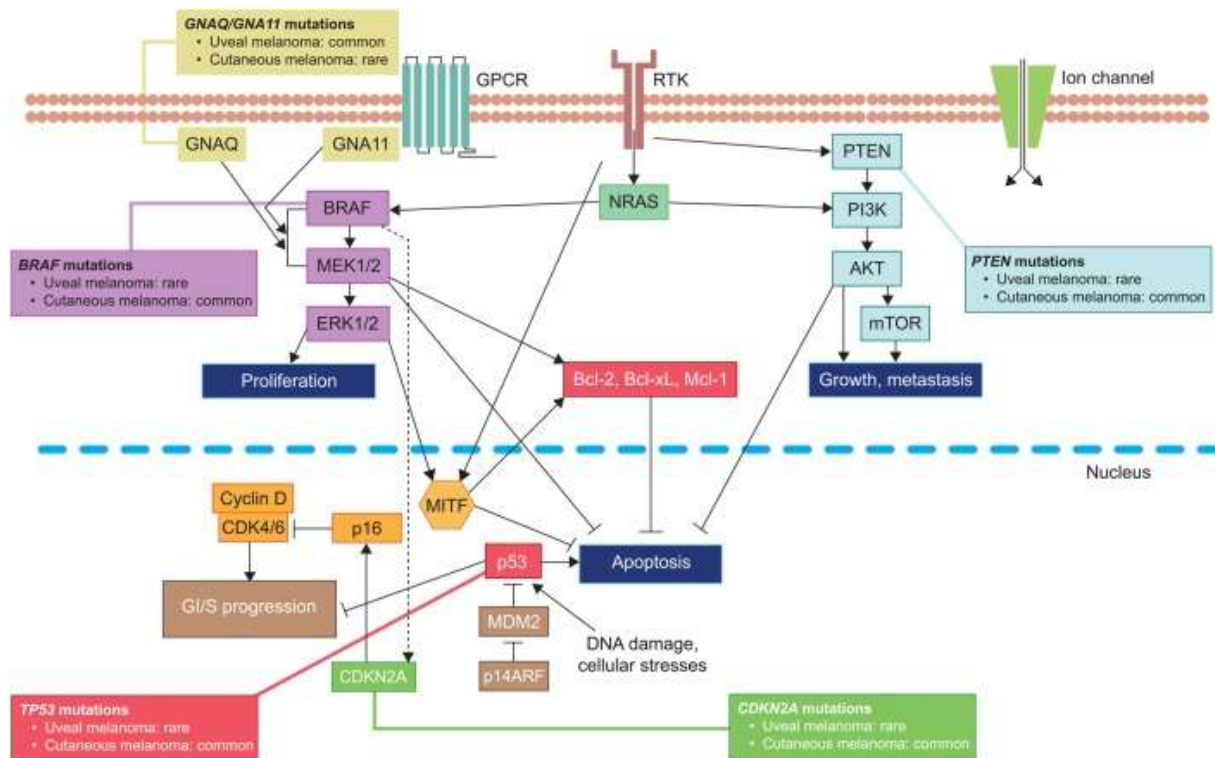


Abb. 2 Mutationsbedingte Signalwegveränderungen beim uvealen Melanom. Zu sehen ist, wie die GNAQ-Mutation zu einer Überstimulierung des MEK/ERK-Signalweges mit vermehrter Proliferation und gehemmter Apoptose führt. Die PTEN-Mutation führt vor allem zu Tumorwachstum und Metastasierung. Mutationen von p53 sowie CDKN2A wirken sich negativ auf die Apoptose und zellzyklusstimulierend aus (12).

Bei verschiedenen Krebsarten, so auch beim uvealen Melanom, ist IGF1R (Insulin-like growth factor 1 Rezeptor) übermäßig stark exprimiert. Er hat einen proliferativen und antiapoptotischen Effekt. Eine hohe Anzahl IGF1R positiver Zellen und hohe Serum IGF1 Level stehen mit skleraler Infiltration, Lebermetastasen und einer verkürzten Überlebensdauer im Zusammenhang. Außerdem führt IGF1R durch Hochregulierung von Wachstumshormonrezeptoren in der Leber und Herabsetzung Insulin bindender Proteine zu einer Erhöhung des VEGF-Levels (vascular endothelial growth factor). VEGF und IGF1 sind mit Insulinresistenz und dem metabolischen Syndrom im Zusammenhang zu sehen und verschlechtern die Prognose (16).

Eine wichtige Rolle, neben den vorliegenden Mutationen, spielt die Tumorumgebung. So konnte gezeigt werden, dass die Induktion tumorabhängiger Lymphozyten und Makrophagen, welche sich immunsuppressiv auswirken, einen wesentlichen Mechanismus zum Schutze des Tumors vor Angriffen des Immunsystems darstellt. So kommt es beispielsweise zur Induktion

regulatorischer T-Zellen, welche beim gesunden eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz spielen (14).

Adiponectin stellt einen möglichen, jedoch nicht etablierten, Prognosefaktor dar. Ein geringer Plasmaspiegel (wird assoziiert mit Insulinresistenz) bedeutet eine schlechte Prognose. Dieses Hormon wirkt Insulin-sensitivierend, ein Mangel scheint proangiogenetisch- und antiapoptotisch zu wirken (16).

1.1.8. Therapie

Bei Diagnosestellung eines uvealen Melanoms sind zumeist noch keine klinisch nachweisbaren Makrometastasen vorhanden. Die Therapie zielt daher zunächst auf die Behandlung des Primärtumors ab. Zu den möglichen Behandlungen gehört z.B. eine Strahlentherapie wie Brachytherapie oder Radiochirurgie, Laser-, Cryotherapie oder die klassische Enukleation des betroffenen Auges. Die Wahl der Behandlung erfolgt in Absprache mit dem Patienten und abhängig von Kenngrößen, wie Tumorgröße, Lokalisation, Malignität, Alter des Patienten, dem Sehvermögen des anderen Auges sowie dem allgemeinen Zustand des Patienten. Es gibt allerdings noch keine effektive systemische Therapie, um das Risiko von Metastasen zu reduzieren (17). Die 1 Jahres Überlebensrate von Patienten mit Metastasen beträgt 15 %. Eine wirkungsvolle Standardtherapie gilt es unbedingt zu entwickeln (2, 12). Bestehende, etablierte Therapien (vor allem des Primärtumors) und mögliche Ansätze zur weiterführenden Behandlung sollen im Folgenden beschrieben werden.

Die Transpupillary Thermotherapy (TTT) ist eine wichtige Therapiemöglichkeit zur Behandlung flacher Tumore (2,5 mm). Mit einem modifizierten Dioden Laser wird der Tumor auf 60-65 °C erhitzt. Die Patienten müssen für dieses Verfahren streng ausgewählt und engmaschig kontrolliert werden. Die durchschnittliche Rezidivrate von kleinen Melanomen liegt bei 17 %. Davon breiten sich 7 % extraskleral aus. Bei einer Kombination aus TTT und Plaque Radiotherapie liegt die Rezidivrate bei 3 % nach 5 Jahren. Mögliche Komplikationen sind Makulaverzerrung, Gefäßverschlüsse und Hämorrhagien (2).

Eine der am häufigsten durchgeführten Therapien, insbesondere bei posterior gelegenen uvealen Melanomen, ist die Radiotherapie. Es können verschiedene Möglichkeiten genutzt werden: beispielsweise das Einbringen einer mit radioaktiven Elementen bestückten Metallplatte (sogenannte radioaktiven Plaque), externe Bestrahlung und stereotaktische Bestrahlung (SRT=stereotactic radiotherapy) (2). Die Plaque Brachytherapie, die am

häufigsten verwendete Methode, findet bei kleinen bis mittleren Tumoren ihre Anwendung. Der Erfolg ist abhängig von der Tumordicke und -lokalisierung. Entweder wird sie als alleinige Therapie bei Melanomen mit einem basalen Durchmesser von bis zu 16 mm und einer Dicke von 6 mm oder in Kombination mit transpupillärer Thermotherapie ab einer Dicke von 8 mm genutzt. Dazu wird vor allem ^{106}Ru (β -Strahler) und ^{125}I (γ -Strahler) angewandt, seltener auch ^{103}Pd (2).

Wird durch die Tumorgöße und -lokalisierung die Brachytherapie unmöglich, kann die Behandlung durch Bestrahlung mit geladenen Teilchen (charged particle irradiation) erfolgen. Sie eignet sich für Tumore bis 14 mm Dicke und einem basalen Durchmesser von bis zu 28 mm. Metastasen treten nach 5 und 10 Jahren zu 18,5 % und 26,6 % auf. Rezidive bilden sich nach 5 Jahren zu 4% und nach 10 Jahren zu 10 % aus. Außerdem zeigt sich nach 5 Jahren bei 68 % der Patienten ein Visusverlust. Andere Nebenwirkungen, die auch bei der Brachytherapie auftreten können, sind Wimpernverlust (12 %), Netzhautablösung (8,5 %), Glaukom (23,4 %), trockene Augen (6 %), Katarakt (15 %), Optikusneuropathie (18 %) und Makulopathie (37 %). Sie bilden sich zumeist nach etwa 8 Jahren aus (2).

Eine weitere Therapiemöglichkeit bietet die bereits erwähnte SRT. Sie wird als Einmalbestrahlung oder fraktioniert in gleichen, kleineren Dosen angewandt. Die Tumorgrenzen können mittels MRT und CT genau festgelegt werden und müssen nicht mittels OP detektiert werden. Es werden gute Ergebnisse mit dem sogenannten Gamma Knife erzielt. Allerdings treten strahlenbedingte Retinopathien und neovaskuläre Glaukome zwischen 8,6 % und 64 % auf. Durch die Nutzung eines Linearbeschleunigers (stereotactic hypofractionated radiotherapy) tritt dagegen weniger Strahlung auf gesundes Gewebe und es gibt weniger Langzeitnebenwirkungen. Jedoch bleiben allgemeine Komplikationen, die bei allen Arten von Radiotherapie auftreten, nicht aus. Durch Schäden am vaskulären Endothel und die daraus resultierende chronisch progressive Vaskulopathie, kommt es zur strahlenbedingten Retinopathie und Optikusneuropathie (2).

Lokale Resektionen sind schwer auszuführen. Sie erfolgen transretinal, als Endoresektion, oder transskleral, als Exoresektion, zur Entfernung choroidaler Melanome. Mögliche Komplikationen beider Techniken sind Netzhautablösung und Glaskörpereinblutung (2). Nehmen die Melanome intraokulär bereits einen großen Teil des Raumes ein, infiltrieren den Sehnerv oder erhöhen den intraokulären Druck, kann eine primäre Eukleation durchgeführt werden. Es wird heute immer mehr versucht Auge-erhaltend zu therapieren, da die Eukleation auf lange Sicht keinen signifikanten Unterschied in der Sterblichkeit

hervorbringt. Eine sekundäre Eukleation wird beispielsweise dann durchgeführt, wenn Rezidive entstanden sind oder wenn Kontraindikationen andere Therapien verbieten (2).

In weit fortgeschrittenen Stadien, erfolgt eine radikale orbitale Exenteration. Hierbei wird das Auge sowie Lider, Muskeln, Nerven und Fett aus der Augenhöhle entfernt. Aufgrund der stark entstellenden OP, werden die Patienten im Anschluss mit Implantaten versorgt. Chemotherapie mit Dacarbazin wird noch bei kutanen Melanomen angewandt. Es sensitiviert den Tumor auf Angriffe des Immunsystems, aktiviert direkt Immunzellen, setzt spezifische Antigene frei und führt zu cross-priming und/oder Reduktion regulatorischer T-Zellen (18). Es wirkt allerdings nicht in allen Fällen bei uvealen Melanomen (12). Patienten die mit einer Kombination von Interferon α -2b (im Mausmodell Verringerung von Metastasen) und Dacarbazin behandelt werden, weisen eine erhöhte natürliche Killerzellaktivität auf (18). Chemotherapeutika mit einer enttäuschenden Wirkung sind Temozolomid, Cisplatin, Treosulfan und Fotemustin (12).

Die Immuntherapie mit sogenannten Checkpoint-Inhibitoren, die beim kutanen Melanom sehr gute Ergebnisse und wesentliche Verbesserungen in der Therapie erbrachte, zeigt beim uvealen Melanom nur ein geringes Ansprechen (19, 20). Ipilimumab, ein menschlicher, monoklonaler Antikörper, der über die Blockade von CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) wirkt, spricht nur bei einem geringen Teil der Patienten an. Außerdem zeigen sich zum Teil hohe Nebenwirkungsraten. Es ergibt sich kein Vorteil gegenüber einer Chemotherapie. Nivolumab, Pembrolizumab und Atezolizumab sind ebenfalls menschliche, monoklonale Antikörper. Sie zielen auf den PD-1-Rezeptor (programmed cell death 1) bzw. dessen Liganden PD-L1 ab. Ihr Ansprechen entspricht etwa dem von Ipilimumab. Erst die Kombination von Ipilimumab und einem PD-1/PD-L1-Inhibitor konnte ein verbessertes Ansprechen und Krankheitskontrolle zeigen. Weiterhin kann die Ansprechrate von Lebermetasen z.B. durch die zusätzliche Durchführung von transarterieller Chemoembolisation oder Radioembolisation erhöht werden (20).

Eine weitere Option ist z.B. der Einsatz von Doppelantikörpern, wie IMCgp100. Dieser erkennt zum einen das Melanozytenprotein gp100 und aktiviert mit seinem anti-CD3 Fragment T-Zellen (14, 12). Tebentafusp, ein Fusionsprotein, wurde gerade zur Behandlung des fortgeschrittenen uvealen Melanoms zugelassen und brachte in der Zulassungsstudie ein signifikant verlängertes Überleben gegenüber einer Immuncheckpointtherapie mit z.B. Pembrolizumab (21).

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die Nutzung von MEK-Inhibitoren wie zum Beispiel Selumetinib und Trametinib. MEK aktiviert den RAS-ERK-Pathway und sorgt damit für eine verstärkte Zellproliferation. MEK selbst wird durch GNAQ aktiviert, welches beim uvealen Melanom häufig überaktiviert ist. Allerdings hat sich das Überleben der Patienten ohne Nachweis von Krankheitsprogress unter Gabe von MEK-Inhibitoren als weniger wirksam erwiesen, als zunächst angenommen (12). Ursächlich scheinen epigenetische Mechanismen zu sein, welche zum Beispiel durch die Gabe des DNA-Methyltransferase Inhibitors Decitabine oder HDAC-Inhibitoren überwunden werden können (22, 23).

Die Phosphorylierung von AKT in über 50 % der uvealen Melanome ist mit Metastasierung assoziiert. Die Nutzung eines AKT-Inhibitors und Trametinib haben im Mausmodell und in Zellkultur eine Tumorreduktion hervorgerufen (12). Abschließende Studien an Menschen stehen allerdings noch aus.

C-Kit wird in über 63 % der uvealen Melanome exprimiert. Dessen Aktivierung erfolgt über Tyrosinkinaserzeptoren, die durch die Behandlung mit Sunitinib gehemmt werden können (12). So hat Sunitinib einen antiangiogenen und antiproliferativen Effekt (18). Außerdem wird vom Tumor vermehrt VEGF exprimiert. Es sorgt für Gefäßneubildung und damit für Tumorstadium. Bevacizumab ist ein VEGF-Inhibitor, der zwar die Tumormasse verringert, klinisch aber keine Verbesserung des Überlebens ermöglicht (12).

GNAQ und GNA11 erhöhen MET (Mesenchymal-epithelial Transition Factor), was mit Metastasierung assoziiert ist. Der Einsatz eines nicht selektiven MET- und VEGF-Inhibitors wie Cabozantinib, zeigte in einer Phase II Studie ein verlängertes Überleben der Patienten ohne Krankheitsprogress um 7,8 Monate gegenüber der Placebogruppe (12).

Zum Zeitpunkt des Todes haben 90 % der Patienten Lebermetastasen. Die Hälfte davon sogar ausschließlich in der Leber. Leberentfernung, intraarterielle Chemotherapie und arterielle Chemoembolisation zeigen in retrospektiven Studien ein besseres Überleben. Jedoch sind diese Behandlungen einer hochselektiven Gruppe vorbehalten, da die meisten nicht OP-fähig sind (12).

1.2. Adiponectin

Das Fettgewebe dient, neben der Speicherung von Energie in Form von Triglyceriden, als wichtiges endokrines Organ. Es sezerniert zahlreiche Hormone (z.B. Adipozytokine, Adipokine) ins Serum (24). Dazu gehört das Adiponectin, welches in multiplen Isoformen im

Blut zirkuliert. Es wird unterschieden in low molecular weight (LMW, Trimer), medium molecular weight (MMW, Hexamer) und high molecular weight (HMW, 12-32mer) (25). HMW fungiert wahrscheinlich als die biologisch aktivste Form. Das Adiponectinlevel eines Menschen hängt von sehr vielen Faktoren ab. Generell gilt, dass der Spiegel bei Frauen höher ist und mit zunehmendem Alter beider Geschlechter steigt. Zudem gibt es eine Variation innerhalb ethnischer Gruppen. Asiaten und Latinos haben weniger als Kaukasier (26). Adiponectin hat sehr viele physiologische Funktionen. Es ermöglicht die Kommunikation des Fettgewebes mit anderen Geweben und Organen wie der Leber, Skelettmuskulatur, pankreatischen β -Zellen, Immunzellen, Herz, Niere, Blutgefäßen und Gehirn (24). Dabei scheint die Funktion im jeweiligen Gewebe unterschiedlich zu sein und möglicherweise von der Isoform abzuhängen. So zeigt Adiponectin neben antiinflammatorischen auch proinflammatorische Effekte, letztere z.B. bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (25).

Adiponectin kann an drei Rezeptoren binden. AdipoR1 ist vor allem in der Skelettmuskulatur vertreten, AdipoR2 in der Leber (27) und T-cadherin im ZNS, der Leber und peripheren Zellen wie der Muskulatur (25). T-cadherin ist im Gegensatz zu AdipoR1 und AdipoR2 nicht in die Zellmembran integriert. Es ist ein extrazellulärer Rezeptor (28) und wirkt als Tumorsuppressor (16).

Durch Stimulierung der Fettsäureoxidation in der skelettalen Muskulatur und Inhibierung der Gluconeogenese in der Leber, führt es zu einer Verbesserung des Körper-Energiehaushalts (25). Zudem kann Adiponectin die Makrophagendifferenzierung inhibieren, die Expression von Toll-like Rezeptor 4 vermindern und so eine antiinflammatorische Wirkung haben. Außerdem wirkt es antiapoptotisch und schützt so Blutgefäße, Herz, Lunge, Colon und Niere während Stress und Verletzung. Zusätzlich wirkt es anti-atherogen, proangiogen, proadipogen (24), antiproliferativ (13) und besitzt antifibrotische Eigenschaften. Dies erklärt, warum Übergewicht und Fettleibigkeit durch Senkung des Adiponectinspiegels das Risiko für diverse Krebsarten, wie Brust-, Pankreas- Ovar- oder Dickdarmkrebs erhöht (25). Es inhibiert Fibrose in Leber und Haut bei Verletzung und Krankheit (24). Zudem begünstigt Adiponectin die Wundheilung und Anti-Aging der Haut (29). Über die Aktivierung des AMPK/CRTC-Signalwegs inhibiert Adiponectin die Melaninsynthese in Melanozyten (29). Die Plasma-Adiponectin-Konzentration ist mit 3 bis 30 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu anderen Peptidhormon hoch. Bei Fettleibigkeit, Diabetes und Arteriosklerose sinkt der Spiegel. Das macht Adiponectin zu einem guten Biomarker für metabolische Krankheiten. Die präzisen

physiologischen Mechanismen, die für die genaue Konzentration verantwortlich sind, sind noch nicht ganz geklärt. Kalorienrestriktion, Gewichtsverlust, Anorexie, aber auch Sport oder Antidiabetika führen wiederum zu einem Anstieg der Serumkonzentration (30-32). Im Gegensatz zu den meisten anderen Adipokinen ist Adiponectin also invers mit Körperfettmasse und Fettleibigkeit assoziiert. Die Energiezufuhr spielt demzufolge eine wichtige Rolle bei der Adiponectin-Genexpression. Wobei subkutanes Fettgewebe positiv und viszerales Fettgewebe negativ mit der Serumkonzentration assoziiert wird (24, 26). Über AMPK und PPAR γ in Hepatozyten, Adipozyten und Myozyten erhöht Adiponectin die Fettsäureoxidation und fährt die Lipogenese runter. Die indirekte Aktivierung von AMPK erfolgt über ein vermindertes Glucose- und Insulinlevel. Außerdem beugt PPAR γ in Adipozyten einer Adipozytenhypertrophie vor und vermindert oxidativen Stress im Endoplasmatischen Retikulum bei chronischer Entzündung wie zum Beispiel Fettleibigkeit (33). Verschiedene Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und verschiedenen Krebsarten mit einem geringen Level an Adiponectin und schlechter Prognose (24). Adiponectin beeinflusst die Kanzerogenese direkt oder indirekt über Insulin (16). Fettleibigkeit korreliert mit verminderter Insulinsensitivität und Insulin reguliert die Genexpression von Adiponectin herunter. Adiponectin erhöht hingegen die Insulinsensitivität (16) über die Bindung an AdipoR1 und den AdipoR2-AMPK-Signalweg in Leber und Skelettmuskulatur (29), im Gewebe und wirkt als Antagonist gegenüber der Insulinresistenz (16).

Adiponectin ist ein wichtiges Zytokin, das im Zusammenhang mit der Pathogenese und dem Fortschreiten bestimmter Krebserkrankungen steht (16). Gute therapeutische Konzentrationen zu erreichen, ist aufgrund seiner Multimerstruktur und hohen Serumkonzentration schwierig. Adiponectin und seine Rezeptoren sind ein wichtiges Ziel in der Medikamentenentwicklung (24).

1.3. Fragestellung der Arbeit

Adiponectin ist ein multifunktionelles Peptidhormon mit insulinsensibilisierender und antikanzergener Aktivität (13). Interessanterweise liegt das Gen, *ADIPOQ*, welches für Adiponectin kodiert auf Chromosom 3q27 (34). Vor dem Hintergrund der höheren Inzidenz von Malignomen im Zusammenhang mit Übergewicht und erniedrigten Adiponectinspiegeln soll in dieser Arbeit die Expression von Adiponectin und seinem Rezeptor AdipoR1 im primären Tumorgewebe von uvealen Melanomen untersucht werden. Weiterhin soll auf das Vorliegen einer Monosomie 3 und deren Einfluss auf Adiponectin und seinen Rezeptor betrachtet werden. Außerdem sollen Daten der internationalen „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA)-Kohorte untersucht werden, in wie weit klinische Parameter Einfluss auf den Adiponectinhaushalt in primären uvealen Melanomen haben. Anschließend soll überprüft werden, ob sich in Verbindung mit den entsprechenden Patientendaten, eine Prognose aus den gewonnenen Daten des Primärtumors ableiten lässt. Zudem sollen ausgewählte Gene und Pathways, welche mit der Adiponectinbereitstellung und dem Signalling im Zusammenhang stehen, untersucht werden. Hierzu wurden mRNA-Expressionsdaten z.B. im Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Monosomie 3 bzw. im Zusammenhang klinischer oder histologischer Daten untersucht.

2.Methoden und Materialien

2.1. Materialien

Siehe Tabellen A1-A5 im Anhang für eine Auflistung der verwendeten Materialien.

2.2. Patientenauswahl

Es wurden 35 Patienten der Klinik für Augenheilkunde der Universität Lübeck mit klinisch diagnostiziertem, uvealem Melanom für diese Arbeit untersucht. Diese befanden sich im Zeitraum von Dezember 2009 bis Januar 2018 dort in Behandlung. Die Diagnosestellung erfolgte klinisch und mittels Ultraschalluntersuchung durch einen erfahrenen Augenarzt. Die Ausbreitungsdiagnostik erfolgte über Laborparameter (alkalische Phosphatase, Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase sowie Bilirubin), Abdomensonografie und Computertomografie von Thorax und Abdomen. Standardisierte A- und B-Scans (I3 eyecubed System-ABD, Ellex Inc, Sacramento, CA, USA) sowie Ultraschallbiomikroskopie (VuMax II, Sonomed Inc, NY, USA) wurden eingesetzt, um Tumorgröße und intraokuläre Lokalisation sowie Ziliarkörperbeteiligung zu erfassen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck autorisiert (Aktenzeichen: 10-200) und entspricht den Richtlinien der Deklaration von Helsinki und deren Revision von Tokyo und Venedig. Alle Patienten erhielten eine entsprechende Aufklärung vor Einschluss in die Studie.

2.3. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist eine der häufigsten Färbungen der Histopathologie. Zur Anwendung kommen der natürliche Farbstoff Hämatoxylin, der aus dem Kernholz des Blauholzbaumes gewonnen wird, sowie der synthetische Farbstoff Eosin. Hämatoxylin färbt dabei alle Säuren oder basophilen Zellstrukturen wie die DNA-haltigen Zellkerne und das ribosomenreiche raue endoplasmatische Retikulum (rER). Eosin hingegen färbt die basischen, azido- oder eosinophilen Zellbestandteile, wie Plasmaproteine, glattes ER oder Mitochondrien. Nach erfolgter Färbung werden die Gewebeschnitte dehydriert, mit einem organischen Lösungsmittel geklärt und mit einem Eindeckmittel sowie Deckglas abgedeckt. Somit ist der Schnitt für lange Zeit mikroskopierbar (35). Die HE-Färbung wurde zur Beurteilung der Zellmorphologie angefertigt und wie folgt gefärbt.

Die Tumorproben, welche zunächst in 4 % Formalin fixiert wurden, wurden in einer Ethanolreihe dehydriert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 6 µm dicke Schnitte am

Mikrotom (Leica, Model RM2125RT) geschnitten und auf Fisherbrand SuperFrost Plus Objektträger (Fisher Scientific, Houston, TX) aufgetragen. Die Entparaffinierung erfolgte dreimalig in Xylol für fünf Minuten mit anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe von 100 % bis 50 %. Anschließend erfolgte eine acht minütige Inkubation in Mayers Hämatoxylin. Die Schnitte wurden dann kurz mit dreifach destilliertem Wasser und dann unter Laufendem Leitungswasser für fünf Minuten gewaschen. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin für eine Minute, abermals gefolgt von einem Waschschrift mit dreifach destilliertem Wasser. Die Dehydratation erfolgte mit 96 % Ethanol gefolgt von zwei Inkubationen in Ethanol absolut für fünf Minuten. Abschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten in Xylene gewaschen und mit Eukitt sowie einem Deckglas abgedeckt. Diese Arbeit erfolgte durch Fr. Christine Örün.

2.4. Immunhistochemische Färbungen

Da die HE-Färbung nur eine Übersicht über den histologischen Aufbau gibt, wurden zum Nachweis spezifischer Proteine immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Immunhistochemische Färbungen nutzen dabei die Antigen-Antikörper-Reaktion, d.h. es wird ein spezifischer Antikörper, der den gesuchten Oberflächenmarker erkennt, auf die Proben gegeben. Es gibt diese primären Antikörper mit gekoppeltem Farbstoff oder einem Enzym, wie der Meerrettichperoxidase (HRP), dass ein Chromogensubstratgemisch umsetzt und so zur Farbreaktion führt. Neben dieser Methode, kann auch ein zweiter Antikörper eingesetzt werden, der den ersten erkennt. An diesen Zweiten ist wiederum ein Enzym oder ein Farbstoff gekoppelt. Es existieren noch weitere Verfahren, wie Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode, die Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode oder Polymermethoden. Neben der Markierung der gesuchten Antigene mit einem Farbstoff kann hierfür auch ein Radioisotop gewählt werden (36, 37). Die von uns durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden nach Folgendem Protokoll angefertigt.

Die Gewebeproben aus Biopsien, Resektionen und Enukleationen der primären Tumore (n=39) der 35 eingeschlossenen Patienten wurden in 4,5 % Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 6 µm Schnitte auf Superfrost Ultraplus Objektträger aufgetragen. Die Deparaffinierung erfolgte über drei Waschschriffe in Xylol, zwei Waschschriffe in Ethanol absolut, gefolgt von Waschschriffen in absteigenden Ethanolkonzentrationen von 90 % bis 50 % für fünf Minuten, sowie drei Waschschriffe für jeweils fünf Minuten in dreifach destilliertem Wasser. Die Antigendemaskierung erfolgte

durch Inkubation der entparaffinierten Schnitte in erwärmtem 10 mM Natriumcitratpuffer, pH 6,0 mit 0,025 % Tween 20 für 20 min in einem Dampfgerat. Dann wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt, dreimalig mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, mit steril gefiltertem Blockpuffer inkubiert (3 % bovines Serumalbumin in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 sowie 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100) und mit 5 % Ziegen Serum für 30 min bei Raumtemperatur ergänzt. Danach erfolgte die Proteindetektion mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Adiponectin (Abcam, ab62551; 1:150 Verdünnung in Blockpuffer) oder AdipoR1 (Abcam; ab126611; 1:50 Verdünnung in Blockpuffer) über Nacht bei 4 °C. Die Negativkontrollen wurden nur mit Blockpuffer inkubiert. Nach dreimaligem waschen der Schnitte mit PBS für fünf Minuten, wurden diese mit frisch hergestellten 3 % Wasserstoffperoxid in PBS für 15 min inkubiert, wieder zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertem sekundärem anti-Kaninchen Ziegenantikörper (Jackson ImmunoResearch; Cambridgeshire, UK; 111-035-003; 1:250 Verdünnung in Blockpuffer) für eine Stunde inkubiert. Die Schnitte wurden danach wieder dreimalig mit PBS für fünf Minuten gewaschen und anschließend für zehn Minuten mit HRP-Grünsubstrat, frisch hergestellt durch das Mischen von 90 µl grünem HRP-Chromogen mit 1 ml HRP-Grünchromogenpuffer nach Angaben des Herstellers (42 Life Sciences, Bremerhaven, Germany), inkubiert, gefolgt von drei Waschstufen mit dreifach destilliertem Wasser für jeweils fünf Minuten. Die Zellkerne wurden mit nuklear fast red für zehn Minuten gegengefärbt. Abschließend erfolgte das Waschen der Schnitte mit dreifach destilliertem Wasser für jeweils eine Minute, die Dehydratation für 30 s in einer aufsteigenden Ethanolreihe (75 %, 96 % und zweimal 100 %) gefolgt von zweimal fünf Minuten in Xylol, sowie Eindeckelung mit nichtwässrigem Medium. Diese Arbeitsschritte wurden von Fr. Christine Örün durchgeführt.

2.5. Analyse der immunhistochemischen Färbungen durch Farben-Dekonvolution

Um die Intensität der immunhistochemischen Färbung und damit der Antigenpräsentation besser zu erfassen, wurden die mit dem Mikroskop gewonnenen Bilder einer Dekonvolution der Farben unterzogen. Wie dies genau geschah, ist folgend aufgeführt.

Für jeden Patienten wurde die gesamte Tumorfläche unter 200-facher Vergrößerung durch Lichtmikroskopie (Leica, Wetzlar, Germany) erfasst. Die Farbdekonvolution erfolgte durch den Einsatz von Fiji-Software (Version 2.0.0-rc-54/1.51g) zur verbesserten Trennung von Nuklei, Pigment und IHC mit minimaler Überlappung und Hintergrund. Die Farbdekonvolutionsparameter wurden durch anfängliche Auswahl von Bereichen optimiert,

die nur eine der genannten Färbung zeigten. Die rot (R), grün (G) und blau (B) Werte, für die Dekonvolution konnten wir wie folgt einstellen: Magenta für Nuclei (R1: 0.482, G1: 0.719, B1: 0.501); grün für IHC (R2: 0.776, G2: 0.501, B2: 0.382); braun für Pigment (R3: 0.446, G3: 0.616, B3: 0.649). Die Grauwerte wurden invertiert, sodass sich Bereiche mit starker Immunreaktivität heller und mit höherer Pixelintensität als der Hintergrund darstellen. Die Tumorbereiche wurden dann im Originalbild umrissen und die integrierte optische Dichte (Bereich x Intensität) der ausgewählten Bereiche wurde bestimmt, indem die Messungen auf das invertierte immunhistochemische Bild übertragen wurden. Die Farbdekonvolution wurde anschließend mit den oben genannten nutzerdefinierten Werten auf allen Bildern eines Tumors durchgeführt. Die Summe der integrierten optischen Dichten wurde dann durch die Gesamtfläche geteilt, um die Durchschnittsintensität jedes Tumors zu bestimmen. Die Durchschnittsintensität der Negativkontrollen wurde abschließend von den Intensitäten der Tumore abgezogen. Für Adiponectin wurden insgesamt 2272 Bilder und für AdipoR1 2568 Bilder ausgewertet. Diese Daten wurden durch die Autorin der vorliegenden Arbeit generiert und ausgewertet.

2.6. Immunomagnetische Anreicherung von zirkulierenden Melanomzellen

Zirkulierende Melanomzellen wurden innerhalb von drei Stunden nach Blutentnahme aus Vollblut mittels eines immunmagnetischen Assays gewonnen (38). Die isolierten Zellen wurden zu Cytospins verarbeitet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Diese Anreicherung wurde von Prof. Dr. Aysegül Tura, Fr. Anna Kraus, und Fr. Christine Örün durchgeführt.

2.7. Immuno-FISH

Gefrorene Cytospins mit zirkulierenden oder kultivierten Melanomzellen, welche zuvor 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurden, wurden für Immuno-FISH vorbereitet wie in Quelle 38 beschrieben. Die Zellen wurden in 2 % Paraformaldehyd-PBS für zehn Minuten fixiert und anschließend dreimalig in PBS gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation mit steril filtriertem Blockpuffer bei Raumtemperatur für 30 min (wie unter Immunhistochemie beschrieben). Danach wurden die primären Antikörper Maus anti-MCSP (Abcam; ab78284; 1/5 Verdünnt in Blockpuffer) oder Kaninchen anti-Adiponectin (Abcam, 1/10 Verdünnung) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht dazugegeben. Als Negativkontrolle diente ein nur mit Blockpuffer inkubierter Cytospin. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS folgte eine Inkubation mit Alexa 488-komjugiertem Ziegen Anti-Maus- (ThermoFisher, Waltham, MA; A-11001; 1:100 Verdünnung in Blockpuffer) oder Ziegen Anti-Kaninchenantikörper (Abcam, 1:100

Verdünnung in Blockpuffer). Diese Inkubation und alle folgenden Schritte wurden unter Schutz vor direktem Licht durchgeführt. Die Cytospins wurden erneut dreimalig in PBS gewaschen und dann abermalig für 10 Minuten in Methanol sowie in 2 % Paraformaldehyd-PBS für eine Minute fixiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS. Zur Vorbereitung der Schnitte wurden diese dreimalig für fünf Minuten in zweifachem SSC-Puffer (ROTH, Karlsruhe, Germany) inkubiert, sowie anschließend zweimalig in 70 % Ethanol gefolgt von zweimalig in 96% Ethanol jeweils für fünf Minuten dehydriert. Danach erfolgte eine Trocknung für 2-3 min bei Raumtemperatur. Hiernach wurden die Schnitte in einem Coplinglas, gefüllt mit zweifachem SSC-Puffer bei Raumtemperatur, gegeben und dann in einem Wasserbad bei 70 °C für 45 min inkubiert. Es folgte eine Trocknung der Cytospins wie oben beschrieben, gefolgt von einer Denaturierung in 0,1 M NaOH für zehn Minuten, sowie Waschen mit zweifachem SSC-Puffer, zweimalig für eine Minute und einmalig für fünf Minuten. Nach der Dehydrierung und Trocknung wurden die Schnitte für zwei Minuten auf einem Schnittwärmer bei 46 °C platziert. Die CEP3-Sonde (Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany), die an das Zentromer von Chromosom 3 bindet, wurde wie vom Hersteller angegeben vorbereitet. Die Denaturierung erfolgte im Wasserbad bei 73 ± 1 °C für fünf Minuten. Danach wurden die Schnitte auf dem Wärmer bei 46 °C belassen, bis sie weiterverwendet wurden. Die CEP3-Sonde wurde auf die Zellen gegeben (4 µl/Cytospin). Danach wurden diese umgehend mit Ethanol gewaschenen Deckgläsern bedeckt. Die Negativkontrollen wurden lediglich mit dem Verdünnungspuffer der CEP3-Sonde gefolgt von Deckgläsern bedeckt. Anschließend wurden die Schnitte in vorgewärmten Feuchtboxen bei 42 °C für zwei Stunden belassen. Dann wurden die Deckgläser entfernt und die Zellen wurden mit 0,4-fachem SSC-Puffer mit 0,3 % NP-40, pH 7,0-7,5 bei 73 ± 1 °C für zwei Minuten gewaschen. Es folgte dann ein weiterer Waschschrift mit zweifachem SSC-Puffer mit 0,1 % NP-40, pH $7,0 \pm 0,2$ für eine Minute wie vom Hersteller angegeben. Die Zellkerne wurden mit 0,5 µg/ml DAPI in PBS für zehn Minuten gegengefärbt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und es wurde Mowiol aufgetragen. Es folgte die Fluoreszenzmikroskopie (Leica DMI 6000 B) unter Verwendung geeigneter Filter (A4: Ex: 360/40, Em: 470/40 nm; L5: Ex: 460/40, Em: 527/30 nm; Cy3: Ex: 545/30, Em: 610/75 nm). Die Aufnahmen erfolgten über eine monochrome Digitalkamera (DFC 350 FX; Leica), welche mit dem Mikroskop und der Leica Application Software (Advanced Fluorescence 2.3.0, build 5131) verbunden ist. Die Intensität der Adiponectin-Immunreaktivität in den Zellen wurde mit Fiji Software durch umreißen des Zytoplasmas, unter Aussparung des

Nukleus, mit Korrektur für den Hintergrund durch Subtraktion der Durchschnittsintensität der Negativkontrollen, ermittelt.

Die Immuno-FISH-Analyse wurde zusätzlich zum Nachweis von Chromosom 3 in den primären uvealen Melanomen durchgeführt. Dafür wurden Paraffinschnitte von primärem Tumorgewebe entparaffiniert, für die Antigenfärbung vorbereitet, mit Blockpuffer geblockt (wie unter Immunhistochemie beschrieben) und mit anti-Melan-A (Abcam, ab210546; 1:100 verdünnt in Blockpuffer) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Dann wurden Alexa 488-konjugierte sekundäre Ziegen anti-Kaninchenantikörper (Abcam, ab150077; 1:100 verdünnt in Blockpuffer) unter Lichtschutz für eine Stunde dazugegeben. Die weitere Fixierung, Denaturierung, Hybridisierung und das Waschen und Gegenfärben der Zellkerne wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierungszeit wurde auf 72 Stunden unter der Anwendung von 10 µl CEP3-Sonde/cm² verlängert. Immuno-FISH wurde von Prof. Dr. Aysegül Tura und Fr. Dr. Siranush Vardanyan durchgeführt.

2.8. Prüfung auf Monosomie 3

Die Kopienanzahl von Chromosom 3 in den Tumorproben wurde in den Überlappungsbildern von Melan-A positiven Zellen bestimmt. Signale auf der Retina von drei Patienten wurden ebenfalls quantifiziert und als Positivkontrollen für Diploidie verwendet. Zellen mit nur einem klaren Signal oder einem Doppelsignal (zwei Signalen die durch einen Abstand von weniger als dem doppelten Durchmesser eines Signals getrennt sind) wurden als Monosomie 3 positiv gewertet. Die Quantifizierung erfolgte durch Auswertung der Monosomie 3 positiven Zellen als Prozentwert innerhalb eines Bereichs und des chromosomalen Index wie in Quelle 39 beschrieben. Für die zuvor genannte Methode wurde die Prozentzahl der Zellen mit Monosomie 3 und zwei oder mehr Signalen innerhalb eines bestimmten Bereichs mit einem Minimum von 203 nicht überlappenden Nuklei kalkuliert. Ein Patient mit einer sehr kleinen Gewebeprobe und nur 88 quantifizierten Nuklei ist ausgenommen. Der chromosomale Index wurde über die Anzahl der totalen Hybridisierungssignale, geteilt durch die Anzahl der Zellkernzahlen für den betrachteten Bereich, bestimmt. Der Median beider Quantifizierungen wurde ermittelt. Tumore mit genauso vielen oder mehr Monosomie 3 positiven Zellen als der Median oder einem chromosomalen Index gleich oder unter dem Median erhielten einen Score von 1. Jene Tumore, die in beiden Kategorien den Score von 1 erhielten, wurden als „hoch Monosomie 3 positive Tumore“ klassifiziert. Proben, die einen Score von 0 in beiden Kategorien erhielten, wurden als „wenig Monosomie 3 positive Tumore“ und Proben mit

einem Score von 1 in einer der beiden Kategorien wurden als „intermediär Monosomie 3 positive Tumore“ klassifiziert. Für die abschließende statistische Analyse wurden die wenig und intermediär positiven Tumore zu den gering positiven Monosomie 3 Tumoren zusammengefasst. Die Prüfung auf Monosomie 3 erfolgte durch Prof. Dr. Aysegül Tura und Fr. Dr. Siranush Vardanyan.

2.9. Kultivierung der uvealen Melanomzellen

Uveale Melanomzellkulturen wurden aus dem Eukleationsgewebe von zwei Patienten angelegt (40). Zuvor wurde die Hälfte jedes Tumors in Paraffin eingebettet und für die immunhistochemische Färbung genutzt. Das übrige Gewebe wurde zweimalig mit 1× PBS (Biochrom) mit Penicillin/Streptomycinzusatz gewaschen, um anschließend einzelne Zellen mit Hilfe eines Gewebeverdaus für neuronales Gewebe auf Basis von Papain (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) zu isolieren. Die Zellen wurden in einer 25 cm² großen Kulturflasche auf UM-Medium ausgesät und wuchsen bei 37°C mit 5% CO₂ im Inkubator. Ca. alle zwei bis drei Tage wurden etwa 80 % des Mediums ausgetauscht. Die Zellernte für weitere Subkulturen bzw. Experimente erfolgte durch die Inkubation der Zellen in Dispase (1 U/mL in DMEM/F-12) bei 37°C bis das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop zu erkennen war. Cytospins für die Immuno-FISH-Analyse wurden durch das Herunterzentrifugieren der Zellen auf einem Superfrost Ultra Plus-Glas (1000–3000 Zellen/Glas) bei 135 g für 8 min in einer Zellzentrifuge (Tharmac, Waldsolms, Germany) mit anschließendem Trocknen über Nacht und Lagerung bei –20 °C, hergestellt. Diese Arbeitsschritte wurden von Prof. Dr. Aysegül Tura durchgeführt.

2.10. Genexpression in der TCGA Kohorte

Zur Validierung der erhaltenen Daten wurde die mRNA-Expression von Genen, die einen Einfluss auf die Adiponectinbereitstellung haben, in der Uvealmelanomkohorte der TCGA-Studie, welche 80 Patienten umfasst, untersucht. Die Genexpressionsdaten wurden von der Xena Platform der Universität von California Santa Cruz (<https://xena.ucsc.edu/>) heruntergeladen. Die grafischen Zusammenfassungen der genetischen Veränderungen, klinischer Faktoren und Genexpressions Heat Maps wurden mit Hilfe des cBioPortals generiert (<https://www.cbioportal.org/>) (41, 42, 43). Die Datenbankrecherche und Auswertung dieser Daten erfolgte durch die Autorin der vorliegenden Arbeit.

2.11. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte durch die NCSS-Statistiksoftware (Version 8.0.13, NCSS, LLC, Kaysville, UT) unter Windows 7 bzw. GraphPad Prism 7 unter Windows 10. Logistische Regressionsanalyse erfolgte unter der Annahme eines nicht vorhandenen Referenzwertes (Baseline). Die Normalverteilung und die Gleichheit der Varianzen wurden mithilfe des Shapiro-Wilk- bzw. Brown-Forsythe-Tests überprüft. Für den Vergleich der Adiponectin-Spiegel im Hinblick auf den Monosomie 3 Status kultivierter Zellen wurde ein zweiseitiger t-Test mit gleicher Varianz durchgeführt. Der Mann-Whitney U-Test wurde verwendet, um die Assoziation zwischen den restlichen binären Faktoren und kontinuierlichen Variablen zu bewerten. Fisher's exact-Test wurde angewandt, um das Verhältnis von kategorischen Variablen mit der Entwicklung von Metastasen und extraokulärem Wachstum zu untersuchen. Die Genexpressionsdaten wurden je nach Datenskalierung Korrelationskoeffizienten nach Pearson oder Spearman berechnet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch die Autorin der vorliegenden Arbeit.

3. Ergebnisse

3.1 Erniedrigte Spiegel von Adiponectin und AdipoR1 in Verbindung mit Monosomie 3

Die Adiponectin- und AdipoR1-Expression konnte in 39 Proben des uvealen Melanoms, von 35 Patienten, untersucht werden. Bei vier Patienten stammten zwei Proben von unterschiedlichen Zeitpunkten (Biopsie, Endoresektion und Enukleation). Metastasen oder extraokuläres Wachstum lagen nur bei einem Patienten in Form von Lebermetastasen zum Zeitpunkt der Probengewinnung vor. 21 Patienten und damit auch die Proben waren zuvor bestrahlt worden. Tabelle 1 zeigt die klinischen Daten sowie die histologischen Eigenschaften.

Tabelle 1. Patienten- und Tumordaten

Patientendaten (n=35)	
Geschlecht, Anzahl (%)	
Frauen	16 (45,71)
Männer	19 (54,29)
<hr/>	
Alter in Jahren*	
Mittelwert (StAbw)	66,94 (11,87)
<hr/>	
Tumor Lokalisation, Anzahl (%)*	
Ziliarkörper	2 (5,88)
Aderhaut	32 (94,12)
<hr/>	
Tumorgröße in mm, Mittelwert (StAbw)*	
Basiswert 1*	14,98 (7,69)
Basiswert 2*	11,92 (6,41)
Erhebung*	7,87 (4,67)
<hr/>	
Tumorproben (n=39)	
Probengewinnung, Anzahl (%)*	
Biopsie	2 (5,13)
<hr/>	

Resektion	15 (38,46)
Enukleation	21 (53,85)
<hr/>	
Bestrahlung, Anzahl (%)	
Nein	18 (46,15)
Ja	21 (53,85)
<hr/>	
Vorherrschender Zelltyp, Anzahl (%)	
Spindelzellig	6 (15,38)
Gemischtzellig	20 (51,28)
Epitheloidzellig	13 (33,33)
<hr/>	
Monosomie 3 positive Zellen, %	
Median	27,74
Min-Max	8,82-85,45
<hr/>	
Chromosom 3 Index	
Median	1,08
Min-Max	0,65-1,63
<hr/>	
Monosomie 3 Status, Anzahl (%)	
Wenig	14 (35,90)
Mittel	9 (23,08)
Viel	16 (41,03)
<hr/>	
Monosomie 3 Status in unbestrahlten Tumoren (n=18), Anzahl (%)	
Wenig	5 (27,78)
Mittel	3 (16,67)
Viel	10 (55,56)
<hr/>	
Monosomie 3 Status in bestrahlten Tumoren (n=21), Anzahl (%)	
Wenig	9 (42,86)
Mittel	6 (28,57)
<hr/>	

* Daten eines Patienten fehlen, Tabelle angelehnt an (13). Max: Maximum; Min: Minimum; mm: Millimeter; StAbw: Standardabweichung.

Paraffinschnitte der Tumore, welche für Adiponectin und AdipoR1 gefärbt wurden, zeigten in allen Proben positive Signale für beide Marker. Die Färbungsintensität und das Färbungsmuster variierten allerdings sehr, was das subjektive Scoring stark erschwerte. Für eine standardisierte und reproduzierbare Bestimmung wurde die gesamte Tumorfläche unter 200x Vergrößerung erfasst. Anschließend erfolgte die Farbdekonvolution der Bilder, um die immunhistochemischen Signale von Kernfärbung und Pigmentierung mit minimaler Überschneidung zu unterscheiden. Hierzu wurde die integrierte Dichte (Intensität x Fläche) der gefärbten Flächen eines jeden Tumors erfasst und durch die gesamte Tumorfläche geteilt. Das Ergebnis stellt die mittlere Intensität jeder Probe dar (Abbildung 3A).

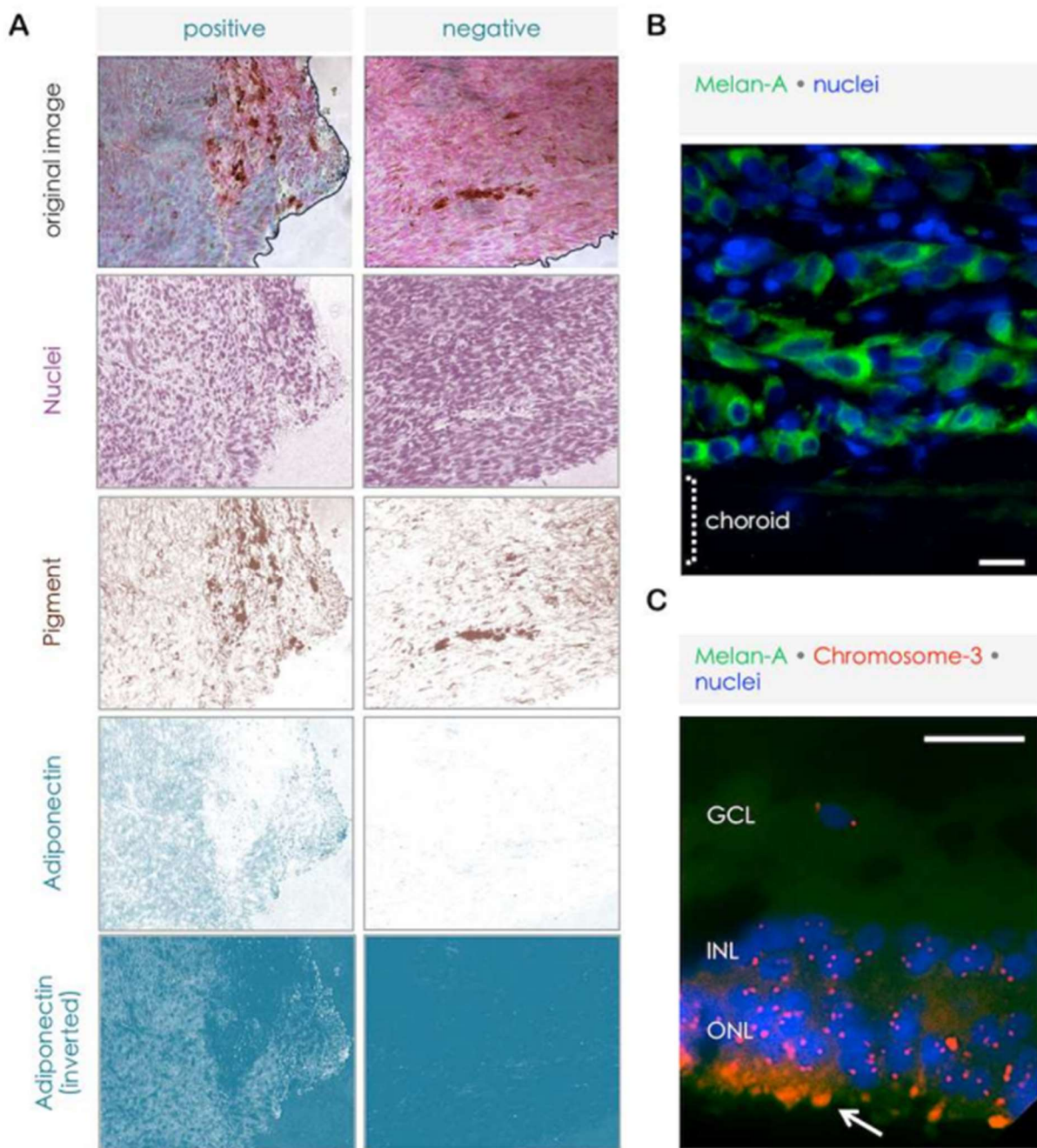


Abb. 3. Farbdekonvolution der lichtmikroskopischen Bilder zur Auswertung der immunhistochemischen Signale im Tumorgewebe. (A) zeigt die immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte in 200x Vergrößerung für Adiponectin sowie die angefärbten Kerne und das nicht gefärbte Pigment. Ganz oben ist das kombinierte Bild zu sehen (rechts jeweils Negativkontrolle). Ganz unten ist ein invertiertes Bild abgebildet, welche später zur Bestimmung der integrierten Dichte mittels Farbdekonvolution genutzt wurden, um die Adiponectinfärbung ohne große Überlappung mit Kern und Pigmentierung zu erfassen. Die Grauwerte der Adiponectinfärbung wurden invertiert, sodass immunhistochemisch gefärbte Bereiche heller wurden. Anschließend wurde die Probe im Originalbild umrissen (schwarze Linien), sodass die integrierte Dichte aus der Fläche der Probe sowie der invertierten Intensität der immunhistochemischen Färbung errechnet werden konnte. Dies ermöglicht eine gute Messbarkeit selbst bei nur schwach gefärbten Proben. (B) zeigt die Färbung für Melan-A und Kerne, welche genutzt wurde, um Melanomzellen vom umgebenden Gewebe für die Immun-FISH-Analyse zu unterscheiden. (C) zeigt die Färbung für Melan-A, Chromosom 3 und Kerne an einer Netzhaut als eine negative Kontrolle für Melanommarkerproteine und positive Kontrolle für

diploide Zellen. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nerve layer, ONL: outer nerve layer. Maßstäbe in B und C= 25 μ m. (13). Der Pfeil deutet auf die Autofluoreszenz der retinalen Pigmentepithelzellen.

Das Vorhandensein und die Ausprägung einer Monosomie 3 wurde durch Immuno-FISH bestimmt, welches für die Detektion von Chromosom 3 in Melan A positiven Zellen optimiert wurde (Abbildung 3B und C). Dabei ergab sich, dass Tumore mit vielen Monosomie 3 positiven Zellen, ein wesentlich geringeres Signal für Adiponectin in der immunhistochemischen Färbung zeigten (n=16), verglichen mit den Tumoren mit einem niedrigen oder mittleren Anteil Monosomie 3 positiver Zellen (Abbildungen 4 und 5A). Letztere wurden daher als „schwach Monosomie 3 positiv“ bezeichnet (n=23; p=0,0086, Abbildung 5A). Die Untersuchung auf zirkulierende Melanomzellen wurde bei 33 von 35 Patienten durchgeführt und zeigte sich bei 31 von diesen 33 Patienten positiv. Bei Patienten mit zwei oder mehr Tumorproben wurde die Assoziation von zirkulierenden Melanomzellen und Adiponectin- bzw. AdipoR1-Expression jeweils nur für die zuerst gewonnene Tumorprobe durchgeführt. Leider konnte in zwei Fällen kein verwertbares Signal für die Bestimmung der Chromosom 3-Anzahl der zirkulierenden Melanomzellen festgestellt werden. Bei den übrigen 31 Fällen zeigte sich, dass Patienten mit hoher Anzahl an zirkulierenden Melanomzellen mit Monosomie 3 (n=15) signifikant weniger Adiponectin in den primären Tumorproben exprimierten, als Patienten die keine oder wenige zirkulierenden Melanomzellen mit Monosomie 3 aufwiesen (n=16, p=0,0021, Abbildungen 5B und C) (13).

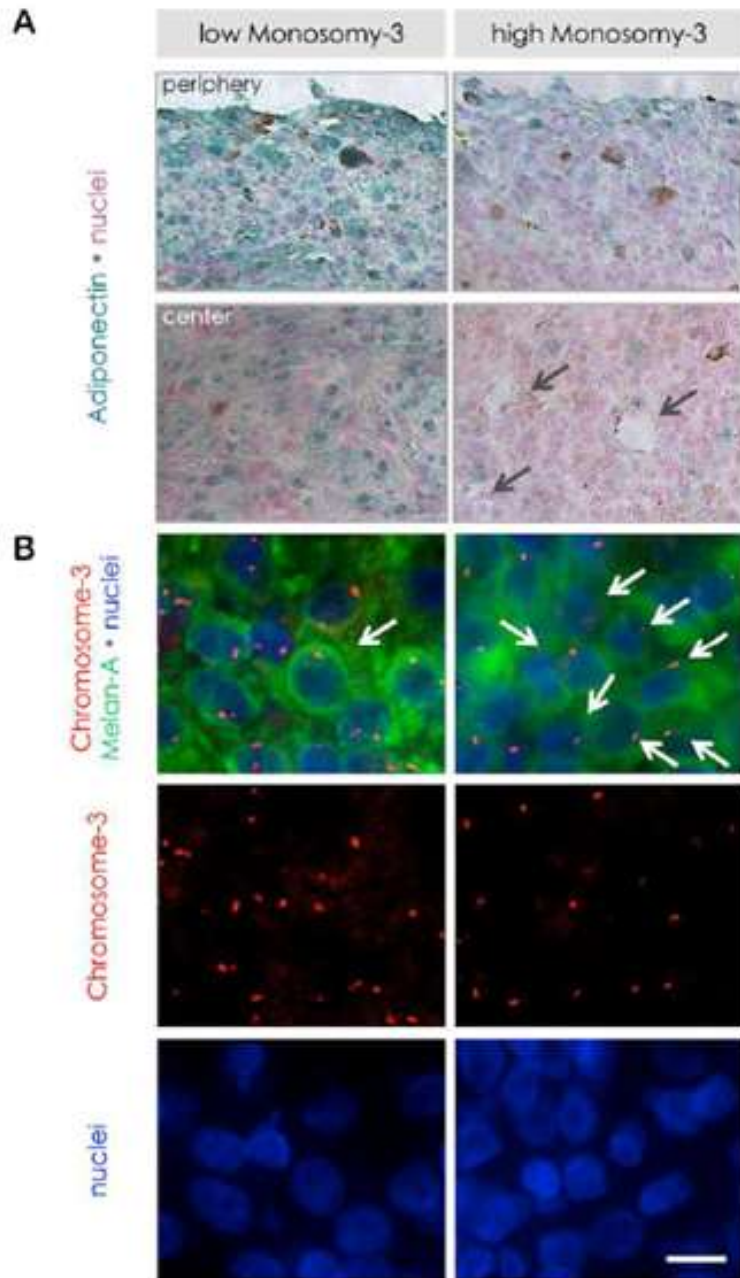


Abb. 4. Monosomie 3 und Adiponectinspiegel im Tumorgewebe. (A) zeigt die immunhistochemische Färbung für Adiponectin, wobei sich ein starkes und homogenes Signal für die Verteilung in Zentrum und Peripherie der Melanomproben zeigt. Diese wurden als schwach Monosomie 3 positiv gewertet. Im Gegensatz dazu findet sich bei dem dargestellten, stark Monosomie 3 positiven Tumor, eine weniger starke Färbung für Adiponectin in der Peripherie, welche zum Zentrum hin sogar noch weiter abnimmt. Die wenigen Adiponectin positiven Zellen befinden sich um Blutgefäße herum (schwarze Pfeile) und machen nur ca. 10 % der Tumorzellmasse aus. (B) zeigt mittels der Immuno-FISH-Analyse die Kopienanzahl von Chromosom 3 in Melan-A positiven Zellen (13). Pfeile deuten auf die Zellen mit Monosomie 3 hin.

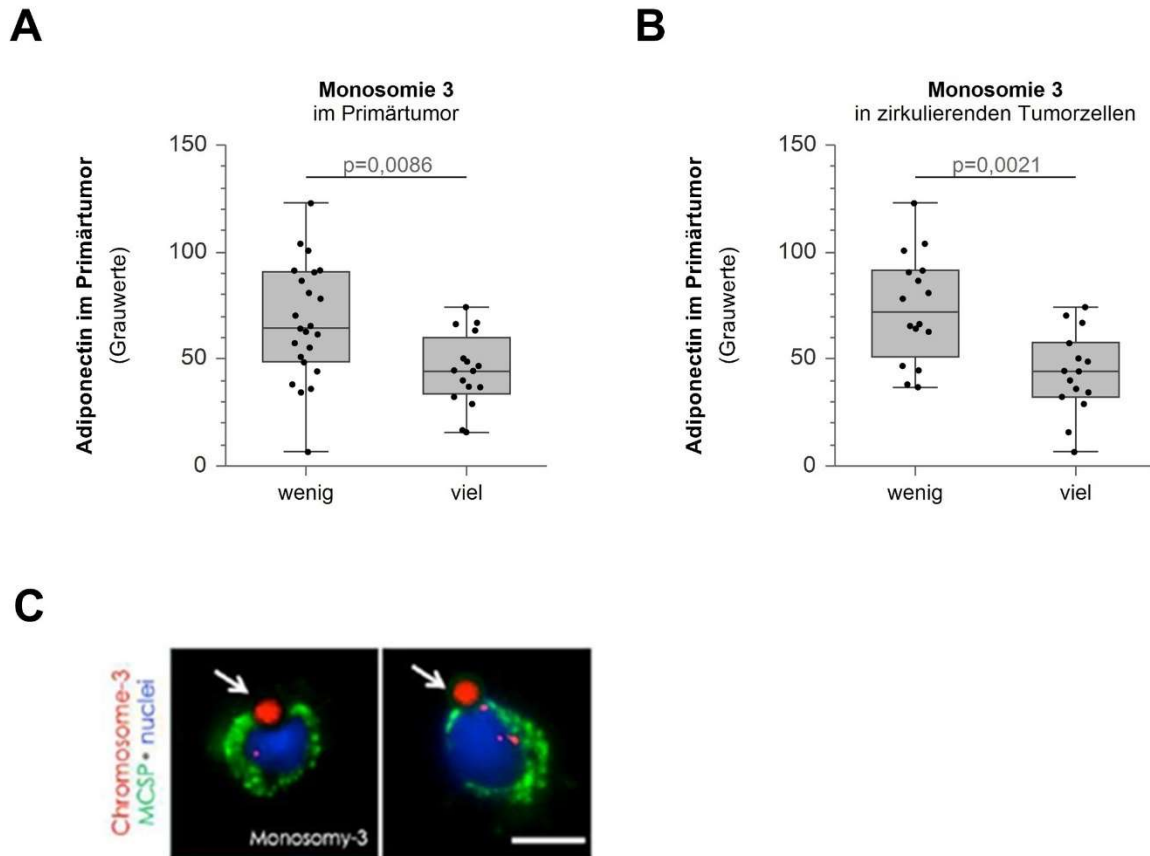


Abb. 5. Bezugnahme von Adiponectinpositivität der gesamten Tumorfläche zum Monosomie 3-Status des Primärtumors und der zirkulierenden Tumorzellen. (A) Tumore mit vielen Monosomie 3 positiven Zellen (n=16 von 39) zeigen niedrigere Adiponectinlevel. (B) Patienten mit vielen Monosomie 3 positiven-zirkulierenden Tumorzellen (n=15 von 31; >Median) hatten ebenfalls niedrigere Adiponectinlevel in ihren Primärtumoren (angelehnt an 13). Die P-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Tests ermittelt. (C) Zirkulierende Melanomzellen von Patient Nr. 14 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Die Pfeile zeigen die Immunobeads, mit welchen die Zellen ausgelesen wurden. Maßstäbe in B und E=10 μ m. MCSP: Melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan. (13).

Die zuvor bestrahlten Tumore zeigten dabei ein wesentlich intensiveres Signal für Adiponectin (n=21; Median: 63,36; Mittelwert \pm Standardabweichung: 68,13 \pm 23,97) als die unbestrahlten (n=18; Median: 42,24; Mittelwert \pm Standardabweichung: 45,85 \pm 22,78; p=0,0096; Mann-Whitney U Test). Die Expression von AdipoR1 folgte einem ähnlichen Muster wie die des Adiponectins. Signifikant niedrigere Level zeigten sich bei stark Monosomie 3 positiven Tumoren (n=16), verglichen mit den schwach Monosomie 3 positiven Proben (n=23; p=0,0067; Abbildungen 6A und B). Patienten mit einer hohen Anzahl an zirkulierenden Melanomzellen oder Prävalenz der Monosomie 3 innerhalb dieser (n=16 bzw. 15) zeigten auch eine niedrigere AdipoR1-Expression in den primären Tumoren verglichen mit Patienten, die weniger zirkulierende Melanomzellen oder eine niedrigere Prävalenz der Monosomie 3 bei diesen aufwiesen (n=17 bzw. 16; p<0.03, Abbildungen 6C und D). Die AdipoR1-Level korrelierten dabei stark mit der Menge des Adiponectins in den zugehörigen

primären Tumoren ($p=0,0001$; Abbildung 6E). Verglichen mit den unbestrahlten Proben ($n=18$; Median: 33,29; Mittelwert \pm Standardabweichung: $37,66 \pm 27,60$ Grauwerte), zeigten bestrahlte Tumore ($n=21$) ebenfalls eine stärkere Immunreaktivität für AdipoR1 (Median: 43,46; Mittelwert \pm Standardabweichung: $45,82 \pm 10,72$ Grauwerte; $p=0,0301$; Mann-Whitney U Test) (13).

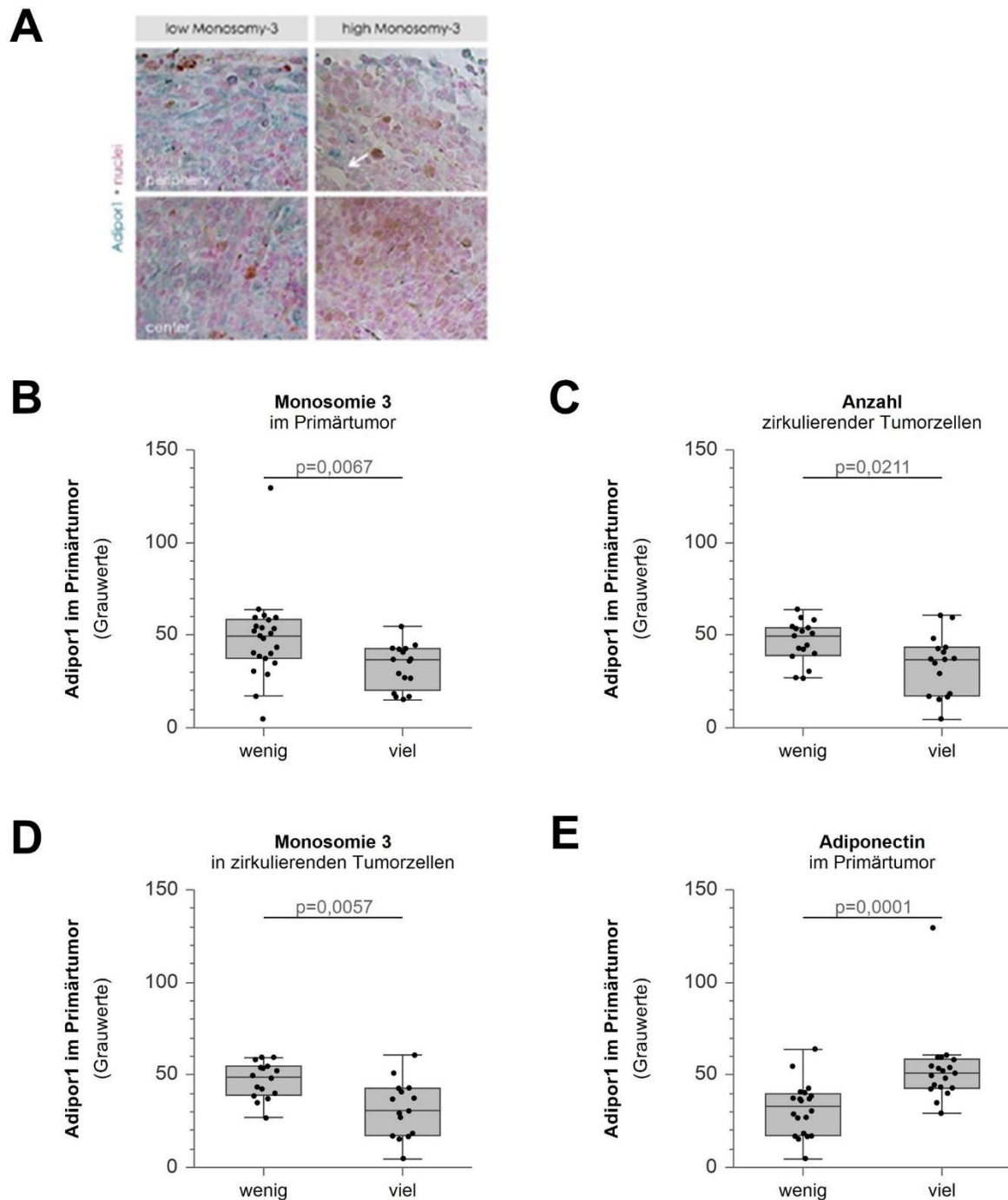


Abb. 6. Expression des Adiponectinrezeptors AdipoR1 in primären uvealen Melanomen. (A) Lichtmikroskopische Bilder der primären uvealen Melanome nach dem immunhistochemischen Nachweis von AdipoR1. Der bestrahlte und schwach Monosomie 3 positive Tumor von Patient Nr. 3 zeigt eine starke und homogene AdipoR1-Expression in Peripherie und Zentrum. Im Gegensatz dazu war die AdipoR1-Expression bei dem unbestrahlten und stark Monosomie 3 positiven Tumor von Patient Nr. 14 in der Peripherie geringer und im Zentrum nahezu nicht vorhanden. Einzig um die Blutgefäße herum (weißer Pfeil) zeigt sich eine höhere AdipoR1-Expression (13). **(B)** Die AdipoR1-Expression im Bereich der gesamten Tumorfläche zeigte sich wesentlich geringer bei Patienten mit stark Monosomie 3-positiven Tumoren (n=16 von 39) und **(C)** hoher Anzahl zirkulierender Tumorzellen (n=16 von 33; >Median) (angelehnt an 13) **(D)** sowie hoher Anzahl Monosomie 3 positiver zirkulierender Tumorzellen (n=15 von 31; >Median). **(E)** AdipoR1-Level korrelieren positiv mit dem Adiponectinlevel im Primärtumor (n=20 wenig, n=19 viel; nach Median-Adiponectinexpression sortiert) (angelehnt an 13). Die P-Werte bei **(B-E)** wurden mittels Mann-Whitney U Tests ermittelt.

3.2 Erniedrigte Level von Adiponectin und seinem Rezeptor AdipoR1 im Primärtumor bei metastasierten Patienten

Der Zusammenhang zwischen Adiponectin- und AdipoR1-Expression in den Primärtumoren mit dem Risiko der Metastasierung oder extraokulärem Wachstum konnte bei 27 von 35 Patienten untersucht werden, da diese zwei bis neun Jahren nachbeobachtet wurden. Die übrigen acht Patienten wurden aufgrund der kürzeren Nachbeobachtungszeit ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass Adiponectin und AdipoR1 bei Patienten die Metastasen oder ein extraokuläres Wachstum entwickelt hatten, in wesentlich geringeren Mengen gefunden wurde (n=14; p=0,0256 beziehungsweise p=0,0226). Monosomie 3 war signifikant häufiger in den primären Tumoren und zirkulierenden Melanomzellen der Patienten, welche Metastasen oder extraokuläres Wachstum zeigten (p=0,0018 beziehungsweise p=0,0017). Zwischen Metastasierungsrisiko und anderen klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, betroffenem Auge, Tumorgröße, Nervus opticus oder Ziliarkörperbeteiligung, Bestrahlung oder das Vorhandensein bzw. der Anzahl an zirkulierenden Melanomzellen, konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2. Patientendaten und Metastasierung

	Patienten N=27	Keine Metastasen N=13	Metastasen/ Extraokuläres Wachstum N=14	P*
Alter bei Diagnosestellung				
Median (Min-Max)	69 (39-83)	67 (53-82)	72 (39-83)	0,7522
Geschlecht, Anzahl (%)				
Frauen	14 (58,33)	6 (46,15)	8 (57,14)	0,7064
Männer	13 (41,66)	7 (53,85)	6 (42,86)	
Auge, Anzahl (%)				
Rechts	12 (44,44)	7 (53,85)	5 (35,71)	0,4495
Links	15 (55,55)	6 (46,15)	9 (64,29)	
Tumorgröße in mm Median (Min-Max)				
Basiswert 1	13,11 (1,4-27)	12,5 (5-27)	13,49 (1,4-25)	0,8461
Basiswert 2	12,47 (1,4-25)	13,20 (6-25)	11,65 (1,4-17,5)	0,2856
Erhebung	7,5 (0,5-17,81)	7,90 (0,5-15)	6,52 (0,9-17,81)	0,5934
Beteiligung des N. opticus, Anzahl (%)				
Nein	23 (85,18)	12 (92,31)	11 (78,57)	0,5956
Ja	4 (14,81)	1 (7,69)	3 (21,43)	
Ziliarkörperbeteiligung, Anzahl (%)				
Nein	25 (92,59)	11 (84,62)	14 (100)	0,2222
Ja	2 (7,41)	2 (15,38)	0 (0)	
Bestrahlung, Anzahl (%)				
Nein	10 (37,04)	4 (30,77)	6 (42,86)	0,6946
Ja	17 (62,96)	9 (69,23)	8 (57,14)	
Zirkulierende Tumorzellen, Anzahl (%)				
Nein	2 (7,41)	2 (15,38)	0 (0)	0,2222
Ja	25 (92,59)	11 (84,62)	14 (100)	
Zirkulierende Tumorzellen/				

50 ml Blut				
Median (Min-Max)	7.8 (0-51)	4 (0-51)	9.3 (3,8-37,5)	0,1500
Monosomie 3 bei den zirkulierenden Tumorzellen, Anzahl (%)[#]				
Nein	8 (32,00)	8 (61,54)	0 (0)	0,0017
Ja	17 (68,00)	5 (38,46)	12 (100)	
% an zirkulierenden Tumorzellen mit Monosomie 3[#]				
Median (Min-Max)	25 (0-100)	0 (0-33,3)	38.75 (11,8-100)	0,0001
Monosomie 3 im Primärtumor, Anzahl (%)				
Wenig / Mittel	14 (51,85)	11 (84,62)	3 (21,43)	0,0018
Viel	13 (48,15)	2 (15,38)	11 (78,57)	
Adiponectin im Primärtumor	50,31 (6,56-	78,19 (6,56-	45,61 (15,80-	0,0256
Median (Min-Max)	122,81)	122,81)	74,26)	
AdipoR1 im Primärtumor	40,85 (4,83-	52,23 (4,83-	37,03 (15,34-	0,0226
Median (Min-Max)	64,01)	60,69)	64,01)	

*P-Werte für die numerischen Werte und die Proportionen der kategorischen Werte wurden mittels Mann-Whitney U-Test bzw. Fisher's Exact Test bestimmt. Angelehnt an (13). [#] Untersuchung war für 2 Patienten nicht durchführbar.

3.3 Adiponectin- und AdipoR1-Expression in Abhängigkeit von klinischen Parametern

Um Rückschlüsse der klinischen Parameter bzw. Vorbehandlung durch Bestrahlung auf die festgestellten Adiponectin und AdipoR1-Werte im Tumorgewebe gewinnen zu können, wurden die Patientendaten mit den entsprechenden Expressionswerten für Adiponectin (Tabelle 3 und 4) und AdipoR1 auf Peptid- bzw. Proteinebene (Tabelle 5 und 6) korreliert.

Tabelle 3. Korrelation von Adiponectin-Expression auf Peptid-Ebene mit kategorischen Daten

Parameter	Spearman´s rank rho	P _{adj} Bonferroni	P _{adj} Benjamini- Hochberg
Geschlecht	0,3382	0,5984	0,0889
Auge	-0,0215	1,0000	0,9008
Sehnerveninvasion	0,1568	1,0000	0,4658
Ziliarkörperinvasion	-0,0792	1,0000	0,7364
Bestrahlung	0,4962	0,0221	0,0111
Monosomie 3 im Primärtumor	-0,4261	0,1156	0,0385
Monosomie 3 in CMC	-0,3769	0,6222	0,0889
BAP1 im Zytoplasma	0,3658	0,4063	0,0813
BAP1 im Zellkern	0,1998	1,0000	0,3246
Morphologie	0,1735	1,0000	0,3803
Pigmentierung	-0,6910	<0,0001	<0,0001
Metastasen/extraokuläres Wachstum	-0,4378	0,3808	0,0813

Tabelle 4. Korrelation von Adiponectin-Expression auf Peptid-Ebene mit intervallskalierten Daten

Parameter	Pearson´s rho	P _{adj} Bonferroni	P _{adj} Benjamini- Hochberg
Alter	-0,2358	1,0000	0,2909
Basisdurchmesser 1	-0,2844	1,0000	0,2437
Basisdurchmesser 2	-0,0715	1,0000	0,7358
Prominenz	-0,2225	1,0000	0,3626
CMC-Anzahl	-0,1853	1,0000	0,3874

Nach Bestrahlung der Tumorzellen fand sich in den untersuchten Proben eine signifikant erhöhte Immunreaktivität für das Adiponectin-Peptid. Eine starke Pigmentierung des Tumors war mit einer niedrigeren Detektion von Adiponectin verbunden. Je nach statistischer Korrektur, Bonferroni oder Benjamini-Hochberg, ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Monosomie 3 im Primärtumor und einer erniedrigten Adiponectinexpression auf Peptidebene (Tabelle 3). Für die übrigen Parameter konnte keine Beeinflussung des Adiponectingehalts der Zellen gefunden werden (Tabellen 3 und 4).

Die Expression des Adiponectinrezeptors AdipoR1 im untersuchten Tumorgewebe verhält sich ähnlich wie die des Adiponectins. Allerdings zeigt sich eine größere Abhängigkeit der Ergebnisinterpretation von der Korrekturmethode. Lediglich bei der Pigmentierung und dem Patientenalter zeigen sich signifikante Unterschiede sowohl nach der Bonferroni-, als auch nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur. In beiden Fällen korrelieren diese negativ mit den Untersuchten Tumor- bzw. Patientendaten. Bestrahlung des Primärtumors und BAP1-Level im Zytoplasma, sind mit einer erhöhten Expression verbunden. Monosomie 3 im Primärtumor und den zirkulierenden Melanomzellen sowie Metastasierung bzw. extraokuläres Wachstum sind mit einer erniedrigten Expression verbunden. Es zeigt sich hier nur nach Benjamini-Hochberg ein signifikanter Zusammenhang mit der AdipoR1-Expression. Alle anderen Parameter zeigen keinen Einfluss (Tabellen 5 und 6).

Tabelle 5. Korrelation von AdipoR1-Expression auf Protein-Ebene mit kategorischen Daten

Parameter	Spearman´s rank rho	P_{adj} Bonferroni	P_{adj} Benjamini- Hochberg
Geschlecht	0,1782	1,0000	0,5245
Auge	0,1345	1,0000	0,6150
Sehnerveninvasion	-0,0165	1,0000	0,9463
Ziliarkörperinvasion	-0,0233	1,0000	0,9463
Bestrahlung	0,4411	0,0833	0,0217
Monosomie-3 im Primärtumor	-0,4400	0,0867	0,0217
Monosomie-3 in CMCs	-0,4297	0,2703	0,0451
BAP1 im Zytoplasma	0,4296	0,1207	0,0241
BAP1 im Zellkern	0,1340	1,0000	0,6150

Morphologie	0,0368	1,0000	0,9463
Pigmentierung	-0,5741	0,0017	0,0017
Metastasen/extraokuläres Wachstum	-0,4378	0,3281	0,0469

Tabelle 6. Korrelation von AdipoR1-Expression auf Protein-Ebene mit intervallskalierten Daten

Parameter	Pearson´s rho	P_{adj} Bonferroni	P_{adj} Benjamini-Hochberg
Alter	-0,4744	0,0442	0,0385
Basisdurchmesser 1	-0,1403	1,0000	0,6286
Basisdurchmesser 2	-0,0167	1,0000	0,9678
Prominenz	0,0105	1,0000	0,9678
CMC-Anzahl	-0,1617	1,0000	0,6268

3.4. Expression von Adiponectin in den kultivierten uvealen Melanomzellen mit Bezug auf den Chromosom 3 Status

Die entnommenen und kultivierten uvealen Melanomzellen wurden hinsichtlich ihrer basalen Adiponectinbildung untersucht. Hierzu wurden die unbehandelten Zellen in normalem Zellmedium mit 10 % FCS weiterkultiviert, um die Umgebung zu simulieren, welcher zirkulierende Melanomzellen ausgesetzt sind. Es folgte ein Immuno-FISH Assay für Adiponectin und Chromosom 3. Hierbei zeigte sich, dass Zellen mit Monosomie 3 ca. 22 % niedrigere Adiponectinlevel zeigen, als Zellen mit Disomie-3 ($p = 0.03$). Nebenbei zeigte sich, dass die Monosomie 3 positiven Zellen größere Nucleoli aufweisen, als in der blauen DAPI-Färbung zu erkennen ist (Abb. 7).

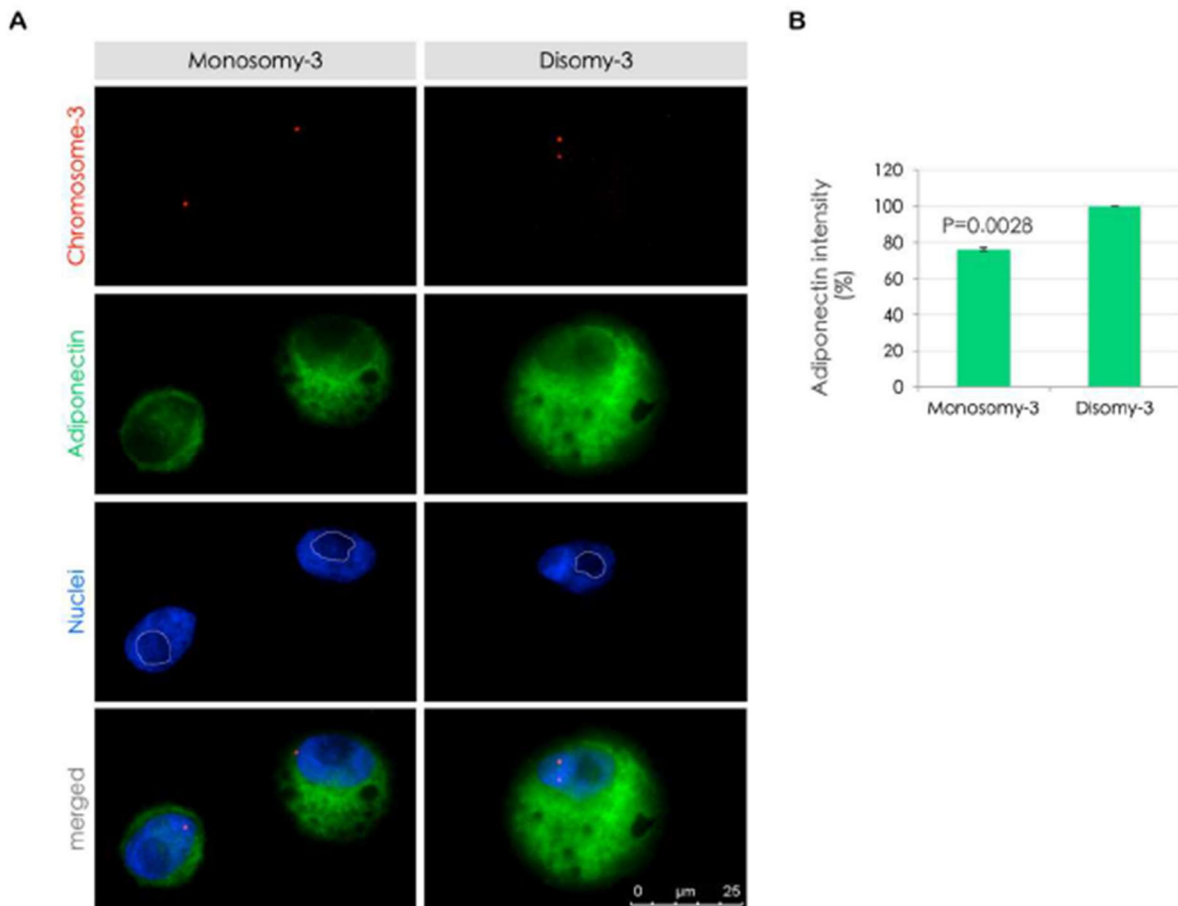


Abb. 7. Expression von Adiponectin im Hinblick auf den Chromosom 3 Status in kultivierten uvealen Melanomzellen. (A) Immuno-FISH-Analyse von kultivierten Melanomzellen. Auffallend sind die vergrößerten Nukleoli bei Chromosom 3 monosomen Zellen (weiß umrandet in der Kernfärbung). (B) Schwächeres Signal für Adiponectin auch in kultivierten Melanomzellen mit Monosomie 3. Die Analyse erfolgte wie bei den Primärtumoren, wobei hier das Zytoplasma umrissen und die Kerne ausgeschnitten wurden, um die Fläche für die integrierte Dichte zu erhalten. Die Werte für die disomen Melanomzellen wurden dabei als 100 % Referenz verwendet. Der P-Wert wurde mittels zweiseitigem t-Test mit gleicher Varianz ermittelt (13).

3.5 Genexpression abhängig von der Chromosom 3-Kopienzahl, BAP1- und YAP1-Expression

Unter Verwendung von Genexpressionsdaten der uvealen Melanom Kohorte der TCGA Studie (n=80 Patienten, UCSC Xena) wurde die Genexpression verschiedener für die Adiponectinlevel relevanter Gene in Abhängigkeit der Chromosom 3-Kopienzahl sowie der Expression von BAP1 und YAP1 untersucht. Tabelle 7 zeigt die Expression dieser Gene in Abhängigkeit der Chromosom 3-Anzahl.

Tabelle 7. Genexpression abhängig von der Chromosom 3-Kopienzahl

Gen	Lokus	Spearman´s rank rho	P _{adj} Bonferroni	P _{adj} Benjamini-Hochberg
<i>ADIPOQ</i>	3q27.3	0,2518	0,1944	0,0389
<i>ADIPOR1</i>	1q32.1	0,0838	1,0000	0,4598
<i>ADIPOR2</i>	12p13.33	-0,1869	0,7759	0,1108
<i>APPL1</i>	3p14.3	0,5548	<0,0001	<0,0001
<i>APPL2</i>	12q23.3	0,2270	0,3434	0,0572
<i>CDH13</i>	16q23.3	-0,3355	0,0189	0,0047
<i>ERP44</i>	9q31.1	-0,4494	0,0002	0,0001
<i>PPARG</i>	3p25.2	0,3863	0,0032	0,0011

Es zeigt sich, dass die Monosomie 3 mit einer niedrigeren Expression von APPL1 assoziiert ist. APPL1 ist für die intrazelluläre Signalweiterleitung nach Bindung von Adiponectin an seine Rezeptoren ADIPOR1/2 verantwortlich (44, 45). Weiterhin zeigte sich, dass T-Cadherin (CDH13) sowie ERP44 positiv mit einer Monosomie 3 korrelieren. T-Cadherin stellt dabei einen Rezeptor für Adiponectin dar, welcher dieses bindet und damit die Serumlevel erniedrigt. Die Zelle bindet also vermehrt Adiponectin und dabei insbesondere die biologisch aktivere high molecular weight-Form (u.a. in kardiovaskulärem Gewebe) (28, 46). ERP44 hingegen ist an der posttranslationalen Modifizierung von Adiponectin beteiligt und kann dieses binden, weshalb eine verstärkte Expression zu einer niedrigeren Adiponectin-Freisetzung führt (47). Hier können wir zeigen, dass die Monosomie 3 zu höheren ERP44-Expression führt. Dies wird möglicherweise mit der erniedrigten Expression von PPARG bei Monosomie 3 zusammenhängen. PPARG reguliert die Expression von ERP44 (31). Die Expressionsdaten der untersuchten Gene zeigen, dass eine Monosomie 3 über die o.g. Gene wahrscheinlich zu einer verringerten Signalübertragung (*APPL1*) sowie zu niedrigerer Sekretion von Adiponectin führt (*CDH13*, *ERP44*, *PPARG*). Unter Nutzung der Benjamini-Hochbergkorrektur zeigt sich zusätzlich ein signifikanter, negativer Zusammenhang von Monosomie 3 und Adiponectingenexpression (*ADIPOQ*, Tabelle 7).

BAP1 ist ein Tumorsuppressorgen, das seine Wirkung wahrscheinlich über Chromatinmodulierung, transkriptionelle Regulation und andere Eingriffe in die Zellproliferation entfaltet. Keimzellmutationen von *BAP1* sind mit dem Tumor Predisposition Syndrom assoziiert, wobei es zum vermehrten Auftreten von melanozytären Tumoren, Meningiomen, und malignen Mesotheliomen kommt (48, 49). Unsere Daten zeigen ähnliche Ergebnisse für die Expression der betrachteten Gene in Bezug auf die *BAP1*-Expression wie für die Disomie 3 (Tabelle 8). Eine niedrigere *BAP1*-Expression ist daher wahrscheinlich ebenso mit einer verringerten Signalübertragung (*APPL1*) sowie mit niedrigerer Freisetzung von Adiponectin verbunden (*CDH13*, *ERP44*, *PPARG*). Auch hier zeigt sich unter Verwendung der Benjamini-Hochbergkorrektur ein weiterer signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der *BAP1*-Expression und der AdipoR1-Genexpression (*ADIPOR1*).

Tabelle 8. Genexpression abhängig von *BAP1*-Transkription

Gen	Lokus	Pearson's rho	P _{adj} Bonferroni	P _{adj} Benjamini-Hochberg
<i>ADIPOQ</i>	3q27.3	0,1776	0,9208	0,1535
<i>ADIPOR1</i>	1q32.1	0,2685	0,1284	0,0257
<i>ADIPOR2</i>	12p13.33	-0,0941	1,0000	0,4643
<i>APPL1</i>	3p14.3	0,3444	0,0141	0,0047
<i>APPL2</i>	12q23.3	0,0496	1,0000	0,6622
<i>CDH13</i>	16q23.3	-0,3327	0,0206	0,0052
<i>ERP44</i>	9q31.1	-0,5020	<0,0001	<0,0001
<i>PPARG</i>	3p25.2	0,3665	0,0067	0,0033

Im Gegensatz zu *BAP1* handelt es sich bei *YAP1* um ein Protoonkogen, dessen Überexpression zur Expansion von Tumorstammzellen und zur Therapieresistenz führt (50). Eine verstärkte Expression von *YAP1* führt zu einer Herabregulierung der *ADIPOR1*-Expression, allerdings nicht der *ADIPOR2*-Expression (Tabelle 9). Weiterhin wird vermehrt *APPL2* gebildet (Tabelle 9), welches als natürlicher Konkurrent von *APPL1* dieses verdrängt und dessen Wirkung damit inhibiert (44). *ERP44* wird ebenfalls vermehrt exprimiert, sodass eine erhöhte *YAP1*-Expression wahrscheinlich vor allem mit einer schlechteren

Adiponectinsignaltransduktion (ADIPOR1 und APPL2) und einer geringeren Adiponectinbildung (ERP44) einhergeht. Nutzt man die Benjamini-Hochbergkorrektur zeigt sich zudem ein negativer signifikanter Zusammenhang mit der PPARG-Expression, was zu erniedrigten Adiponectinspiegeln führen würde (Tabelle 9).

Tabelle 9. Genexpression abhängig von YAP1-Transkription

Gen	Lokus	Pearson's rho	P _{adj} Bonferroni	P _{adj} Benjamini-Hochberg
<i>ADIPOQ</i>	3q27.3	-0,1003	1,0000	0,3759
<i>ADIPOR1</i>	3q27.3	-0,4519	0,0002	0,0002
<i>ADIPOR2</i>	1q32.1	0,2592	0,1623	0,0302
<i>APPL1</i>	12p13.33	0,3064	0,0458	0,0114
<i>APPL2</i>	3p14.3	0,5401	0,0019	0,0006
<i>CDH13</i>	12q23.3	0,1351	1,0000	0,2653
<i>ERP44</i>	16q23.3	0,4170	0,0010	0,0005
<i>PPARG</i>	9q31.1	-0,2547	0,1811	0,0302

3.6 Genexpression abhängig von klinischen Parametern

Unter Verwendung klinischer Daten sowie den dazugehörigen Genexpressionsdaten aus der TCGA-Studie konnten folgende Ergebnisse, welche im Anhang in Tabelle A6 abgebildet sind, gewonnen werden. Betrachtet wurde die Genexpression von *ADIPOQ*, verantwortlich für die Bildung von Adiponectin, *ADIPOR1* und *ADIPOR2*, welche für die Adiponectinrezeptor 1 und 2 kodieren, *APPL1* und *APPL2*, welche für Proteine kodieren, die für die intrazelluläre Signalweiterleitung nach Bindung von Adiponectin an seine Rezeptoren verantwortlich sind (44), *CDH13*, das für das Oberflächenprotein T-Cadherin kodiert, welches Adiponectin binden und damit die Serumspiegel senken kann (28, 46) sowie *ERP44*, welches als Protein für die posttranslationale Modifizierung des Adiponectins verantwortlich ist. Eine höhere Expression dieses Gens wird mit niedrigeren Adiponectinspiegeln assoziiert (47). *PPARG* steuert als Protein die Aktivität von ERP44 (31). Die Ergebnisse in Klammern zeigen den adjustierten p-Wert nach Bonferroni bzw. Benjamini-Hochberg sowie Pearson's r oder Spearman's rho. Sollten die adjustierten p-Werte gleich sein, ist nur eine Zahl angegeben.

Es zeigte sich in der TCGA-Kohorte, dass ein Zusammenhang zwischen Augenfarbe und ADIPOR1-Expression besteht. Die Expression korreliert dabei negativ mit der Pigmentierung, d.h. die Expression ist bei braunen Augen geringer, als bei blauen Augen ($p_{\text{adj}}=0,02$ bzw. $0,0192$, Spearman rho $-0,5336$). Bei der Pigmentierung des Primärtumorgewebes zeigen sich starke Effekte auf die APPL1- und APPL2-Expressionen, welche negativ mit stärkerer Pigmentierung korrelieren ($p_{\text{adj}}=0,0024$ bzw. $0,0012$, Spearman rho $-0,3931$ und $p_{\text{adj}}<0,0001$, Spearman rho $-0,4476$). Der gleiche Effekt zeigt sich bei einer zunehmenden Anzahl an tumorinfiltrierenden Macrophagen (TAMS). Auch hier sinkt die Expression von APPL1 und APPL2 mit zunehmender Infiltration ($p_{\text{adj}}=0,004$ bzw. $0,002$, Spearman rho $-0,3832$ und $p_{\text{adj}}=0,0032$ bzw. $0,002$, Spearman rho $-0,3896$).

Bei der Dicke des Primärtumors zeigt sich, dass, umso dicker dieser bei Diagnosestelle war, desto niedriger war die Expression von PPARG, welches negativ ERP44 reguliert und damit für höhere Adiponectinspiegel sorgt (31) ($p_{\text{adj}}=0,0032$, Pearson r $-0,3937$). Das Stadium nach AJCC korreliert ebenfalls negativ mit der PPARG-Expression (zeigt sich nur in der Benjamini-Hochbergkorrektur) ($p_{\text{adj}}=0,0592$ bzw. $0,0296$, Spearman rho $-0,2974$) und positiv mit der CDH13-Expression ($p_{\text{adj}}=0,0064$, Spearman rho $0,3667$).

Bei der Morphologie zeigt sich, dass eine Entdifferenzierung vom spindeligen hin zu einem epitheloidzellartigem Phänotyp mit weniger Expression von PPARG, aber mehr Expression von CDH13 assoziiert ist. Das bedeutet, dass diese Zellen weniger Adiponectin produzieren und dieses auch vermehrt aktiv aus dem Serum entfernen würden ($p_{\text{adj}}<0,0001$, Spearman rho $-0,4878$ und $p_{\text{adj}}=0,0064$ bzw. $0,0032$, Spearman rho $0,3684$).

Beim Vorliegen von Metastasen konnte ebenfalls ein negativer Einfluss auf die PPARG-Expression gefunden werden ($p_{\text{adj}}=0,0424$, Spearman rho $-0,3092$). Gleiches gilt für den Vitalstatus zum Zeitpunkt des Studienabschlusses (lebend, verstorben am uvealen Melanom oder verstorben aus anderen Gründen) ($p_{\text{adj}}=0,0344$, Spearman rho $-0,3163$).

Zusammenfassend gehen die Parameter dickerer Primärtumor, höheres AJCC-Stadium, Metastasierung und negativer Vitalstatus (verstorben am uvealen Melanom), wie sie vor allem bei fortgeschrittenen Tumoren vorkommen sowie eine stärkere Entdifferenzierung der Tumorzellen mit einer negativen Expression von PPARG einher, was bei diesen Tumorzellen zu niedrigeren Adiponectinspiegeln führen würde. Höhere Entdifferenzierung sowie scheinbar ein höheres AJCC-Stadium gehen mit einer erhöhten CDH13-Expression einher, welches Adiponectin aus dem Serum entfernt und so die Adiponectinspiegel senkt (46).

4. Diskussion

Die Seltenheit des uvealen Melanoms und die damit verbundene geringe Verfügbarkeit an Untersuchungsmaterial und Patienten macht die Entwicklung effizienter Therapien für diese Tumorentität schwierig. Wenig ist über die Mechanismen, welche für das eigenartige Verhalten zirkulierender uvealer Melanomzellen, nach Jahren der Inaktivität hoch aggressive Metastasen zu bilden, bekannt. Die Monosomie 3 ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren für die Bildung von Metastasen. Der Einfluss dieser auf die Aktivierung ruhender Melanomzellen und welche weiteren pathophysiologischen Faktoren den Verlauf beeinflussen, sind bisher unbekannt (13). Einen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz, dargestellt durch erniedrigte Serumlevel von Adiponectin, und einer ungünstigen Prognose beim uvealen Melanom, konnten erstmals 2016 Sevim und Kiratli (16) zeigen.

Adiponectin ist ein Peptidhormon und unter den Serumadipokinen (3-30 µg/ml der Plasmaproteine) das häufigste (32). Es reguliert unter anderem das Hungergefühl, wirkt antiarteriogen und antiinflammatorisch (31) und wird von einem Gen auf Chromosom 3 kodiert.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die Mengen von Adiponectin und AdipoR1 in den primären uvealen Melanomen mit einer hohen Anzahl von Monosomie 3 positiven Zellen signifikant erniedrigt sind (13). Das Ausmaß der Adiponectinrezeptorexpression AdipoR1 korrelierte sehr gut mit der Menge des Adiponectins im zugehörigen Tumor, was auf einen Adiponectinmangel mit Herabregulation von AdipoR1 in den uvealen Melanomzellen und damit auf eine lokale Insulinresistenz hindeuten könnte. Eine Unterscheidung, ob das Adiponectin in den Paraffinschnitten der primären Tumore von diesen selbst stammt oder es sich um gebundenes, zirkulierendes Adiponectin handelte, konnte leider nicht erfolgen (13). Hier hätte eine Immunfärbung für Cadherin 13 mehr Klarheit verschaffen können.

In einigen Tumoren mit einem schwachen Signal für Adiponectin und AdipoR1 konnten einzelne Zellen mit einer starken Immunfärbung für beide identifiziert werden, welche sich hauptsächlich in der Nähe von Blutgefäßen befanden (Abbildung 4A und 6A). Dies weist darauf hin, dass diese Zellen möglicherweise viel Adiponectin aus dem Blut erhielten und dadurch ihre AdipoR1-Expression beibehielten. Dennoch zeigte sich, dass die Tumore mit einem geringeren Anteil Monosomie 3 positiver Zellen generell ein intensiveres und einheitlicheres Signal für Adiponectin, auch in schwach vaskularisierten Regionen, besaßen.

Dies weist darauf hin, dass die Melanomzellen in der Lage sind, ihr eigenes Adiponectin zu produzieren (13). Eine Bestrahlung geht mit einer Heraufregulation der Expression von Adiponectin und seines Rezeptors AdipoR1 einher. Gleichzeitig führt eine Monosomie 3 sowie eine ausgeprägte Pigmentierung zu einer verringerten Bildung von Adiponectin und seinen Rezeptor.

Zusätzlich ist die Rezeptormenge auf Peptidebene negativ mit Metastasierung, Monosomie 3 positiven zirkulierenden Melanomzellen und dem Alter korreliert. Eine vermehrte BAP1 Expression geht mit einer vermehrten Expression von AdipoR1 einher. Die verringerten mRNA-Expressionen von Adiponectin und seines Rezeptors bei Vorliegen einer Monosomie 3 bzw. eines BAP1-Mangels in der TCGA-Studie decken sich sehr gut mit den in den immunhistochemischen Färbungen nachgewiesenen Mengen von Adiponectin und AdipoR1 bei Vorliegen einer Monosomie 3 bzw. eines BAP1-Mangels in unserer Kohorte.

Doch nicht nur die Monosomie 3 führt zu einem verringerten Vorkommen von Adiponectin und seinem Rezeptor in den immunhistochemischen Färbungen. Weitere Mechanismen führen möglicherweise zu einem erhöhten Umsatz und/oder einer gestörten postrationalen Modifikation mit anschließendem Abbau der unfertigen Proteine. So zeigen stärker entdifferenzierte Tumore höhere Expressionsraten von ERP44, dass die posttranslationale Modifikation von Adiponectin negativ beeinflusst (47), bei gleichzeitig erhöhter T-Cadherinexpression (CDH13), welches als Adiponectinrezeptor dieses aus dem Serum bindet (46), da die intrazelluläre Bereitstellung durch ERP44-Herauf- und PPARG-Herabregulation gestört ist. Die Daten der TCGA-Kohorte legen ein gestörtes intrazelluläres Signalling nahe, da eine erhöhte Pigmentierung dort einen negativen Einfluss auf die Genexpression der Signallingmoleküle APPL1 und APPL2 hat, was wiederum zu einem stärkeren Umsatz führen kann. Gleiches gilt für eine starke Infiltration mit tumorassoziierten Makrophagen (TAMS). Die Daten decken sich sehr stark mit den Daten zur Pigmentierung, sodass unklar ist, ob die Pigmentierung einen Einfluss auf die Infiltration oder umgekehrt hat und ob beide Parameter oder nur einer für das gestörte intrazelluläre Signalling verantwortlich sind.

Innerhalb der Nachbeobachtungsphase von 2-9 Jahren zeigte sich, dass ein erniedrigtes Vorkommen von Adiponectin und AdipoR1 auf Peptid/Proteinebene im Primärtumor hoch signifikant mit dem vermehrten Vorkommen von Monosomie 3 in den zirkulierenden Melanomzellen, Metastasierung oder extraokulärem Wachstum verbunden ist. Dies zeigt, dass möglicherweise ein gestörter Adiponectinsignalweg innerhalb des Primärtumors, das Metastasierungspotential disseminierter Zellen erhöht (13). Dies deckt sich mit den aus der

TCGA-Kohorte gefundenen negativen Einflüssen einer Monosomie 3 auf die Genexpression von Adiponectin (ADIPOQ), sein intrazelluläres Signallingmolekül APLL1 sowie der Genexpression von den die posttranslationale Modifikation betreffenden Proteine ERP44 und PPARG.

Nach Aussaat der zirkulierenden Melanomzellen, sind diese einer beträchtlichen Menge Serumadiponectin ausgesetzt. Dies könnte sie in einen inaktiveren Status führen. Sinkt das Serumadiponectinlevel wiederum, wie es bei Insulinresistenz der Fall ist (16, 51), würde sich dieser Mechanismus abschwächen. Melanomzellen mit Monosomie 3 würden also eher in einen aktiveren Status übergehen (13).

Die Zunahme der nukleolaren Größe ist ein weiterer, etablierter prognostischer Faktor, der eine positive Korrelation mit der Bösartigkeit uvealer Melanome aufweist. Dieser ist ein Merkmal epitheloider uvealer Melanome mit hohem Metastasierungspotenzial, mit allerdings bislang nur geringer klinischer Bedeutung (wahrscheinlich aufgrund der aufwendigen Bestimmungsmethoden) (52-54). Der Nukleolus ist ein hochspezialisierter, dynamischer Zellkernteil, in welchem die Ribosomenproduktion, die für die Translation essentiell sind, stattfindet (53). Dabei stellt die Biosynthese von Ribosomen einen der energieintensivsten Prozesse in humanen Zellen dar, welcher in Krebszellen dauerhaft hochreguliert ist. Daher zeigen nahezu alle Krebszellen eine Zunahme in Größe und/oder Anzahl der Nukleoli, während zellulärer Stress oder Seneszenz die Schrumpfung der Nukleoli hervorruft (55-59). Die Kernfärbungen uvealer Melanomzellen zeigte größere Nukleoli bei Monosomie 3 positiven Zellen (Abbildung 7), was allerdings noch durch spezifische Nukleolimarker quantifiziert werden muss. Die bestrahlten Tumorzellen zeigten hierbei signifikant höhere Level an Adiponectin und AdipoR1, was die Hypothese des Energiemangels in diesen Zellen unterstützt (13).

Adiponectin selbst bewirkt hauptsächlich eine Aktivierung der AMP-Kinase (AMPK), welcher den Hauptenergiesensor der Zellen darstellt. AMPK reagiert dabei auf eine Zunahme der AMP/ATP-Ratio mit dem Auslösen einer Kaskade kataboler Stoffwechselwege. Diese wiederum versetzen die Zelle in einen energiesparenden Zustand (60). Eine Hemmung des mutierten GNAQ-Signalwegs führt zur Induktion der AMPK-abhängigen Autophagie von uvealen Melanomzellen (61), was die zentrale Rolle der AMPK in den Anpassungsvorgängen bei Energiemangel stützt. Gleichfalls kann der AMPK-Aktivator Aminoimidazolecarboxamidribonukleotid (AICAR) die Proliferation von uvealen Melanomzellen signifikant unterdrücken. Weiterhin kann AMPK direkt den

Hipposignalweegeffektor YAP an mehreren Stellen phosphorylieren und damit die translationale Aktivität in Nicht-Melanomzellen hemmen (59). Der YAP-Signalweg ist ein direkter Regulator des überaktivierten GNAQ/GNA11-Signalwegs in uvealen Melanomzellen (61-63) und wir konnten anhand der TCGA-Kohorte zeigen, dass eine stärkere Expression von YAP1 in den Tumorzellen einen negativen Einfluss auf den Adiponectinstoffwechsel hat. Gleichzeitig scheint es eine Art Regulationskreis zwischen YAP und Adiponectin zu geben, denn unsere Gruppe konnte ebenfalls eine Abnahme des YAP-Levels bei mit Adiponectin behandelten Melanomzellen zeigen (13).

BAP1 scheint einen genau gegenteiligen Effekt auf den Adiponectinhaushalt zu haben. Eine stärkere Expression dieses Tumorsuppressors ging mit einem positiven Effekt auf die Genexpression des Adiponectinrezeptors 1 sowie des ERP44 hemmenden PPARG einher, was zu einer ungestörten posttranslationalen Modifikation beitragen könnte. Eine Stärkung der BAP1-Expression stellt somit zumindest einen neuen experimentellen Ansatz dar, der weiterverfolgt werden sollte. Ebenso wie Studien zur Aktivität von AMPK und YAP, welche zu einer Klärung der molekularen Mechanismen der Adiponectinwirkung bei uvealen Melanomzellen führen könnten.

Bezogen auf die Genexpressionsdaten der TCGA-Kohorte fallen die teils unterschiedlichen Methoden der p-Wertanpassung auf. In dieser Arbeit werden sowohl die nach Bonferroni, als auch die nach Benjamini-Hochberg berechneten Werte angegeben. Beide Methoden wurden angewendet, um Zusammenhänge, welche durch die strenge Bonferronimethode verloren gehen können, dennoch darzustellen. Der Unterschied der Methoden besteht darin, dass die Bonferronimethode sehr gut falsch positive Ergebnisse vermeidet, dies aber durch das Übersehen von falsch negativen Ergebnissen erkaufte. Die Berechnung ist simpel. Man multipliziert lediglich den p-Wert z.B. eines Genexpressionskorrelationskoeffizienten mit der Anzahl der untersuchten Gene. Es erschließt sich, dass bei einer sehr großen Anzahl untersuchter Gene alle nicht stark signifikanten Ergebnisse zu nicht signifikanten werden. Die Benjamini-Hochbergmethode hingegen lässt mehr falsch positive Ergebnisse zu, was zu weniger falsch negativen Ergebnissen führt. Die Berechnung ist aufwändiger. Den p-Werten werden zunächst Ränge zugeteilt. Sie werden dann mit dem Quotienten aus Rang und untersuchter Genanzahl multipliziert, was beim jeweils niedrigsten p-Wert einer Bonferronikorrektur entspricht. Die mit der Benjamini-Hochbergmethode erhaltenen p-Werte müssen dann einer strengen logischen Prüfung unterzogen werden, da diese eben auch mehr falsch positive Ergebnisse enthalten können, da sich bei steigender Anzahl untersuchter Gene

der Korrekturfaktor rasch verkleinert. Am auffälligsten ist dieser Effekt bei den durch Immunhistochemie festgestellten AdipoR1-Spiegeln bezogen auf die genannten Parameter. Dort zeigen sich nach der Benjamini-Hochbergmethode signifikante Ergebnisse für Bestrahlung, Monosomie-3 im Primärtumor sowie in den zirkulierenden Melanomzellen, BAP1-Spiegel im Zytoplasma sowie bei Metastasierung bzw. extraskleralem Wachstum, während diese Ergebnisse nach der Bonferroni-Methode nicht signifikant sind (Tabelle 5). Die nach der Benjamini-Hochbergmethode erhaltenen Ergebnisse decken sich allerdings sehr gut mit den anderen Ergebnissen und Erkenntnissen aus der Literatur, weshalb diese nicht verworfen werden sollten und eine größere Stichprobe hier auch zu signifikanten Ergebnissen nach der Bonferroni-Methode führen sollte.

Eine weitere Einschränkung dieser Arbeit ist, dass der Monosomie 3-Status in den Tumorgeweben der Lübeck-Kohorte lediglich durch Immuno-FISH bestimmt wurde, ohne weitere, dieses Ergebnis bestätigende Untersuchungen. Dadurch konnten partielle Deletionen des Chromosoms oder Isodisomie nicht abgegrenzt werden. Des Weiteren kann FISH auf der Grundlage von Paraffinschnitten auch zu einer zu geringen Detektion diploider Zellen, durch den Verlust von Kernbestandteilen beim Schneiden von nur 4 µm oder dünneren Schnitten, führen (64). Daher wurden 6 µm dicke Schnitte, um das oben genannte Problem und falsch positive Ergebnisse für eine Monosomie 3 zu minimieren, verwendet. Dabei unterstützten die Positivkontrollen für Diploidie aus der Retina die Richtigkeit der Ergebnisse. Darüber hinaus konnte mit dem Immuno-FISH Assay auch der Melanommarker Melan A bestimmt werden, um Tumorzellen Immun- oder Endothelzellen zu unterscheiden. Aufgrund der teilweise nur geringen Probenmengen gab es nicht genug Material zur Analyse weiterer chromosomaler Aberrationen. Primäre uveale Melanome zeigen allerdings häufig Aberrationen der Chromosomen 1, 6 und 8, neben der bereits genannten Monosomie 3. (13, 53). Weitere Studien, die die Menge von Adiponectin und seinen Rezeptoren mit Hinblick auf diese chromosomalen Aberrationen beachten, könnten tiefere Einblicke in das Verhalten uvealer Melanomzellen bei Insulinresistenz sowie die Entstehung chromosomenspezifischer Kopienzahlanomalien bei diesen Tumoren erbringen.

Weiterhin stellt die Seltenheit des uvealen Melanoms eine Limitation dar. Bei einer Inzidenz von 1:100.000 werden in Lübeck statistisch gesehen ca. 2,2 Erkrankungen pro Jahr beobachtet (65). Der Zugang zu entsprechendem Gewebe ist also schwierig. Hinzu kommt, dass eine das Auge erhaltende Therapie immer mehr angestrebt wird und die chirurgische Exzision ohnehin sehr schwierig ist und nicht überall durchgeführt wird. Dementsprechend bietet die TCGA-

Kohorte eine Bereicherung von Daten von nur 80 Patienten mit uvealem Melanom aus 3 Zentren.

Der Verbleib disseminierter Melanomzellen in einem inaktiven Status über mehrere Jahre bleibt ein ungelöstes Rätsel. So auch die auslösenden Prozesse und die Bedingungen, welche zu einem Wechsel in einen aktiven Status verursachen (66, 67). Ein besseres Verständnis der Wirkung von Adiponectin könnte helfen, diese Ereignisse zu verstehen. Ein direkter Wirkmechanismus des Adiponectins ist die Erhöhung der Insulinsensibilität durch Hemmung der Glucosefreisetzung durch die Leber (13, 34, 68). Eine Aufnahme von Adiponectin innerhalb der Leber von uvealen Melanomzellen könnte zunächst dazu führen, dass diese Mikrometastasen in einem inaktiveren Status verbleiben.

Im Verlauf könnten die metastasierten Zellen jedoch die Glucosefreisetzung aus der Leber durch ihren Adiponectin-Konsum verstärken, um ihren eigenen Energiebedarf zu decken. Tatsächlich dient die Leber als größter Glucosespeicher des Körpers, der elementar an der Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels beteiligt ist und diese durch Freisetzung oder Einlagerung von Glucose an den Bedarf des Körpers anpasst. So ist die Leber verantwortlich für 80 % der freigesetzten Glucose nach dem nächtlichen Fasten (69). Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die Leber einen idealen Nährboden für energiehungrige Tumorzellen dar. Kommt es dann aufgrund zunehmender Insulinresistenz, z.B. im Rahmen des metabolischen Syndroms, zu einer Abnahme des Adiponectinspiegels, erhalten die Leberzellen nicht mehr genug Adiponectin um die Glucosefreisetzung zu begrenzen und damit die uvealen Melanomzellen in ihrem inaktiven Status zu halten. Die Tendenz der uvealen Melanommetastasen bis zum Tod des Patienten in der Leber schnell zu wachsen legt nahe, dass diese Zellen mit Monosomie 3 eine ihnen eigene Fähigkeit besitzen von der Glucosefreisetzung aus der Leber zu profitieren. Auch dies sollte dringend durch weitere Studien untersucht werden (13).

Als Antwort auf die zunehmende Insulinresistenz werden kompensierende physiologische Mechanismen aktiviert, um normale Blutglucosespiegel zu erreichen. Es kommt zu einer Zunahme von Signalstoffen mit insulinartiger Wirkung im Serum, wie Insulin-like growth factor-1 (IGF1) (16, 70, 71). Von diesem wird angenommen, dass es das Hauptchemoattractant für uveale Melanommetastasen darstellt, da IGF1 hauptsächlich von Leberzellen freigesetzt wird (72). Die Insulinresistenz trägt damit wahrscheinlich nicht nur aufgrund der Schaffung einer adiponectindefizienten Umgebung, sondern auch durch eine erhöhte Verfügbarkeit von IGF1 zum ungünstigen Verlauf beim uvealen Melanom bei. Die

Adiponectinspiegel bei älteren Männern sind niedriger, während die IGF1-Spiegel höher liegen, als bei Frauen des gleichen Alters (73, 74), was geschlechtsspezifische Unterschiede bei beiden Hormonen nahelegt. Dies wiederum kann ursächlich für die höhere Inzidenz und die schlechtere Prognose bei männlichen Patienten erklären (3, 75). Genauso wie die uvealen Melanommikrometastasen nimmt auch die Insulinresistenz zunächst über Jahre einen schleichenden und unerkannten Verlauf, bis die systemischen Änderungen akkumulieren und sich in einer metabolischen Erkrankung wie dem Diabetes mellitus Typ 2 manifestieren (13, 76). Patienten mit uvealem Melanom oder anderen melanozytären Läsionen sollten daher über den Einfluss der Insulinresistenz auf den Erkrankungsverlauf und über präventive Maßnahmen aufgeklärt werden. Weiterhin ist die Insulinresistenz mit weiteren Erkrankungen vergesellschaftet, wie Bluthochdruck oder Hyperlipidämie, womit das Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen oder anderen Krebsarten zu erkranken ebenfalls zunimmt (13, 16, 77, 78).

Daher kann davon ausgegangen werden, dass Änderungen des Lebensstils das gesamte Wohlbefinden der Patienten mit einem uvealen Melanom verbessert. Diätetischen Maßnahmen und Lebensstiländerungen zur Erhöhung des Serumadiponectins beinhalten eine niederglykämische Diät mit hohem Ballaststoffanteil, tägliche Einnahme von Fisch oder eine Omega-3-Supplementation, moderater aerober Sport bzw. eine mediterrane Diät mit hohem Fruchtanteil, gelbem Gemüse, Nüssen und Kaffee (13, 34, 79-81). Rauchen hingegen ist mit niedrigeren Adiponectinspiegeln verbunden und sollte vermieden werden (13, 82). Das Antidiabetikum Metformin, welches einen inhibitorischen Effekt auf uveale Melanomzellen in Kultur zeigte (83), kann dazu beitragen, die Adiponectinspiegel anzuheben (13, 84). Allerdings gibt es bisher keine Studien, die einen Vorteil von Metformin bei uvealen Melanompatienten zeigen können. Weitere Nachforschungen zu adiponectinvermittelten Signalwegen und deren Einfluss auf uvealen Melanomzellen stellt eine gute Möglichkeit dar, neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge bei dieser Erkrankung zu erlangen und dann ggf. neue Therapieformen zu entwickeln (13).

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben neue Einsichten in einen Mechanismus, der wahrscheinlich am hoch aggressiven Metastasierungsverhalten bei uvealen Melanomen mit Monosomie 3 beteiligt ist und sie zeigen die wichtige Rolle, die die Insulinresistenz für den Krankheitsverlauf hat. So können wir hier zeigen, dass eine Monosomie 3 direkt zu erniedrigter Transskription der Gene für Adiponectin, des mit einem positiven Signalling verbundenen APPL1 und dem für eine reibungslose Posttranslation notwendigen PPARG

einhergeht. Gleichzeitig findet sich vermehrt Cadherin 13 sowie die Posttranslation negativ beeinflussende ERP44. Es verwundert nicht, dass eine verringerte BAP1-Expression den gleichen Effekt zeigt, liegt das Gen für BAP1 schließlich auf Chromosom 3. Das Protoonkogen YAP1 hingegen führt zu einer verminderten Rezeptorexpression (AdipoR1), verstärkter Expression des für das Signalling negativen APPL2 sowie einer verringerten Expression des für die Posttranslation wichtigen PPARG und verstärkter Expression von ERP44.

Melanomzellen mit Monosomie 3 sind also möglicherweise weniger in der Lage Adiponectin zu bilden, entnehmen dieses vermehrt aus dem Serum über Cadherin 13 und besitzen gleichzeitig eine Überaktivierung von YAP1 und den mutierten GNA11/GNAQ-Signalweg, welcher über MAPK die Proliferation der Tumorzellen befeuert. Durch den Mangel an Adiponectin könnte die Aktivität der AMPK sinken, sodass die Zellen in einen stoffwechselaktiven Zustand übergehen und vermehrt proliferieren (85). Pharmakologisch stellt Adiponectin einen Ansatzpunkt dar, um der Überproliferation der Tumorzellen über die Aktivierung der AMPK und damit die Aktivierung kataboler Stoffwechselwege, welche antiproliferativ wirken, zu entgegenen.

Präventiv könnten Maßnahmen, die sich gegen die Insulinresistenz richten, in Form von Änderungen des Lebensstils oder medikamentöser Behandlung mit z.B. Metformin, die Metastasierung beim uvealen Melanom verhindern oder verzögern. Dies würde auch eine Verbesserung der Lebensqualität und neue Hoffnung für von dieser Erkrankung betroffenen Patienten bedeuten.

5. Zusammenfassung

Das uveale Melanom stellt für Patienten weiterhin eine mit einer infausten Prognose verbundene Erkrankung dar. Die häufig bei uvealen Melanomen gefundene Monosomie 3 ist mit einer schlechteren Prognose und frühzeitiger Metastasierung verbunden. Jedoch sind die molekularen Mechanismen der Monosomie 3-vermittelten Metastasierung nicht ausreichend erforscht, um wirksame und vorbeugende Therapien entwickeln zu können. Adiponectin (Locus: 3q27.3) ist ein Peptidhormon mit antikanzerogenen Eigenschaften, findet sich bei Übergewicht und Insulinresistenz häufig erniedrigt und stellt damit zum einen eine Verbindung zwischen Übergewicht und Krebsentstehung her und zum anderen einen neuen potentiellen Ansatzpunkt für die Behandlung dieses bisher schwer therapierbaren Tumors dar.

In dieser Arbeit wurde Monosomie 3 auf ihren Einfluss auf das Vorhandensein von Adiponectin und seinem Hauptrezeptor AdipoR1 im Tumorgewebe untersucht und mit den Patientendaten in Beziehung gesetzt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die primären Tumore der Lübeck-Kohorte sowie die dazu gehörigen Patientendaten genutzt, um Rückschlüsse auf klinische und histopathologische Prädiktoren gewinnen zu können. Hierfür wurden immunhistochemische Analysen der Adiponectin und AdipoR1 Expression unter Anwendung der Bilddekonvolution durchgeführt. Zudem wurde die Adiponectin-Expression in kultivierten uvealen Melanomzellen untersucht. Der Monosomiestatus wurde mittels Immuno-FISH bestimmt. Zur weiteren Vertiefung wurden zusätzlich die transkriptomischen Daten einer großen Patientenkohorte (The Cancer Genome Atlas, TCGA) aus US-amerikanischen sowie europäischen Zentren genutzt, um klinische und genetische Interaktionen hinsichtlich des Einflusses einer Monosomie 3 auf anti- und prokanzerogene Pathways sowie auf am Signalling oder der Postprozessierung von Adiponectin beteiligte Gene untersucht. Konkret wurde der Einfluss einer Monosomie 3, einer vermehrten Expression von BAP1 oder YAP1 sowie der Präsenz von weiteren etablierten klinischen und histopathologischen Prognosefaktoren auf die mRNA-Expression von Adiponectin, seiner Rezeptoren AdipoR1 und 2, der Signallingpeptide APPL1 und 2, des Rezeptors Cadherin 13 sowie der an der Postprozessierung beteiligten Proteine ERP44 und PPARG hin untersucht.

Hier konnte gezeigt werden, dass sich Monosomie 3 negativ auf die Adiponectinspiegel und die AdipoR1-Detektion auf Peptid- bzw. Protein-Ebene in der Lübecker-Kohorte auswirkt, während Bestrahlung die Adiponectinspiegel und AdipoR1-Expression erhöht. Erniedrigte Mengen an Adiponectin und seinem Rezeptor fanden sich in metastasierten Tumoren, ebenso wie in stark pigmentierten Tumoren. Neben einer Bestrahlung findet sich vermehrt

Adiponectin bei erhöhten BAP1-Spiegeln im Zytoplasma, wobei dies mit zunehmendem Alter abnimmt.

Die Daten der TGCA-Kohorte bestätigten den negativen Einfluss der Monosomie 3 auf Adiponectin direkt, durch dessen verringerte Expression und indirekt durch dessen Wirkung auf für das Adiponectin-Level relevante Gene. Stärkere BAP1-Expression wirkte sich positiv auf Adiponectin-Rezeptor aus, während erhöhte YAP1-Expression einen gegenteiligen Effekt ausübte. Zu den Mechanismen von BAP1- und YAP1-vermittelten Signalwegen in der Pathogenese des uvealen Melanoms sind weitere Studien notwendig. Sollte sich Adiponectin als wichtiger Einflussfaktor auf z.B. die Metastasierung erweisen, können Induktoren von BAP1 oder Inhibitoren von YAP1 interessante pharmakologische Ansatzpunkte darstellen. Mehr Arbeiten zur Tumorbilogie sowie die Korrelation klinisch-pathologischer Daten sind notwendig, um zukünftig wirksame Therapien einer bisher nur schlecht behandelbaren und sehr häufig tödlich verlaufenden Erkrankung zu entwickeln. Unbedingt sollten Patienten darüber aufgeklärt werden, dass eine aufkommende Insulinresistenz, damit ein sinkendes Serum-Adiponectin-Level, den Verlauf der Erkrankung stark negativ beeinflusst. Eine entsprechend gesunde Ernährung und Verzicht auf Rauchen sind zwei wichtige Möglichkeiten dem entgegen zu wirken-auch um andere metabolische Erkrankungen zu vermeiden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdel Karim, N., Eldessouki, I., Taftaf, A., Ayham, D., Gaber, O., Makramalla, A., & Correa, Z. M. (2018). *GNQ-209P* Mutation in Metastatic Uveal Melanoma and Treatment Outcome. *Case reports in oncological medicine*, 2018, 4256365. <https://doi.org/10.1155/2018/4256365>
2. Grisanti, S. and Tura, A. Noncutaneous Melanoma Chapter 1 Uveal Melanoma Codon Publications; 2018 Mar. Bookshelf ID: NBK506991 PMID: 29874018
3. Krantz, B. A., Dave, N., Komatsubara, K. M., Marr, B. P., & Carvajal, R. D. (2017). Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 11, 279–289. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S89591>
4. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Intraocular (Uveal) Melanoma Treatment (PDQ®): Patient Version. 2023 Sep 15. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65836/>
5. Bernhard N. Tillmann: Atlas der Anatomie. 2. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg 2010, ISBN 978-3-642-02679-9.
<https://www.augenarzt.com/auge/anatomie/augapfel/mittlere-augenhaut.html> aufgerufen am 05.04.2021
7. Tura A, Lueke J, Grisanti S. Liquid Biopsy for Uveal Melanoma. In: Scott JF, Gerstenblith MR, editors. Noncutaneous Melanoma [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Mar. Chapter 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK506985/> doi: 10.15586/codon.noncutaneoumelanoma.2018.ch3
8. Falcone, L. M., & Zeidler-Erdely, P. C. (2019). Skin cancer and welding. *Clinical and experimental dermatology*, 44(2), 130–134. <https://doi.org/10.1111/ced.13783>
9. Logan, P., Bernabeu, M., Ferreira, A., & Burnier, M. N., Jr (2015). Evidence for the Role of Blue Light in the Development of Uveal Melanoma. *Journal of ophthalmology*, 2015, 386986. <https://doi.org/10.1155/2015/386986>
10. Woodman S. E. (2012). Metastatic uveal melanoma: biology and emerging treatments. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 18(2), 148–152. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31824bd256>
11. Triozzi, P. L., & Singh, A. D. (2012). Blood biomarkers for uveal melanoma. *Future oncology (London, England)*, 8(2), 205–215. <https://doi.org/10.2217/fon.11.150>
12. Carvajal, R. D., Schwartz, G. K., Tezel, T., Marr, B., Francis, J. H., & Nathan, P. D. (2017). Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *The British journal of ophthalmology*, 101(1), 38–44. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-309034>
13. Tura, A., Thieme, C., Brosig, A., Merz, H., Ranjbar, M., Vardanyan, S., Zuo, H., Maassen, T., Kakkassery, V., & Grisanti, S. (2020). Lower Levels of Adiponectin and Its Receptor Adipor1 in the Uveal Melanomas With Monosomy-3. *Investigative ophthalmology & visual science*, 61(5), 12. <https://doi.org/10.1167/iovs.61.5.12>
14. Basile, M. S., Mazzon, E., Fagone, P., Longo, A., Russo, A., Fallico, M., Bonfiglio, V., Nicoletti, F., Avitabile, T., & Reibaldi, M. (2019). Immunobiology of Uveal Melanoma: State of the Art and Therapeutic Targets. *Frontiers in oncology*, 9, 1145. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01145>
15. Souri, Z., Wierenga, A. P. A., Mulder, A., Jochemsen, A. G., & Jager, M. J. (2019). HLA Expression in Uveal Melanoma: An Indicator of Malignancy and a Modifiable Immunological Target. *Cancers*, 11(8), 1132. <https://doi.org/10.3390/cancers11081132>
16. Sevim, D. G., & Kiratli, H. (2016). Serum adiponectin, insulin resistance, and uveal melanoma: clinicopathological correlations. *Melanoma research*, 26(2), 164–172. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000226>
17. Rantala, E. S., Hernberg, M. M., Piperno-Neumann, S., Grossniklaus, H. E., & Kivelä, T. T. (2022). Metastatic uveal melanoma: The final frontier. *Progress in retinal and eye research*, 90, 101041. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101041>
18. Triozzi, P. L., & Singh, A. D. (2014). Adjuvant Therapy of Uveal Melanoma: Current Status. *Ocular oncology and pathology*, 1(1), 54–62. <https://doi.org/10.1159/000367715>
19. Fritsch, P. und Schwarz, T.: Dermatologie Venerologie, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin 2018, ISBN 978-3-662-53646-9
20. Tran, D. H., Shanley, R., Giubellino, A., Tang, P. H., Koozekanani, D. D., Yuan, J., Dusenbery, K., & Domingo-Musibay, E. (2024). Radiation and systemic immunotherapy for metastatic uveal melanoma: a

- clinical retrospective review. *Frontiers in oncology*, 14, 1406872. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1406872>
21. Nathan, P., Hassel, J. C., Rutkowski, P., Baurain, J. F., Butler, M. O., Schlaak, M., Sullivan, R. J., Ochsenschlager, S., Dummer, R., Kirkwood, J. M., Joshua, A. M., Sacco, J. J., Shoushtari, A. N., Orloff, M., Piulats, J. M., Milhem, M., Salama, A. K. S., Curti, B., Demidov, L., Gastaud, L., Mauch, C., Yushak, M., Carvajal, R. D., Hamid, O., Abdullah, S. E., Hollnad, C. Goodall, H., Piperno-Neumann, S. IMCgp100-202 Investigators (2021). Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *The New England journal of medicine*, 385(13), 1196–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103485>
 22. Gonçalves, J., Emmons, M. F., Faião-Flores, F., Aplin, A. E., Harbour, J. W., Licht, J. D., Wink, M. R., & Smalley, K. S. M. (2020). Decitabine limits escape from MEK inhibition in uveal melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 33(3), 507–514. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12849>
 23. Faião-Flores, F., Emmons, M. F., Durante, M. A., Kinose, F., Saha, B., Fang, B., Koomen, J. M., Chellappan, S. P., Maria-Engler, S. S., Rix, U., Licht, J. D., Harbour, J. W., & Smalley, K. S. M. (2019). HDAC Inhibition Enhances the *In Vivo* Efficacy of MEK Inhibitor Therapy in Uveal Melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(18), 5686–5701. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3382>
 24. Fang, H., & Judd, R. L. (2018). Adiponectin Regulation and Function. *Comprehensive Physiology*, 8(3), 1031–1063. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170046>
 25. Choi, H. M., Doss, H. M., & Kim, K. S. (2020). Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1219. <https://doi.org/10.3390/ijms21041219>
 26. van Andel, M., Heijboer, A. C., & Drent, M. L. (2018). Adiponectin and Its Isoforms in Pathophysiology. *Advances in clinical chemistry*, 85, 115–147. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.02.007>
 27. Parida, S., Siddharth, S., & Sharma, D. (2019). Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2519. <https://doi.org/10.3390/ijms20102519>
 28. Kita, S., Fukuda, S., Maeda, N., & Shimomura, I. (2019). Native adiponectin in serum binds to mammalian cells expressing T-cadherin, but not AdipoRs or calreticulin. *eLife*, 8, e48675. <https://doi.org/10.7554/eLife.48675>
 29. Bang, S., Won, K. H., Moon, H. R., Yoo, H., Hong, A., Song, Y., & Chang, S. E. (2017). Novel regulation of melanogenesis by adiponectin via the AMPK/CRTC pathway. *Pigment cell & melanoma research*, 30(6), 553–557. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12596>
 30. Otu, L. I., & Otu, A. (2021). Adiponectin and the Control of Metabolic Dysfunction: Is Exercise the Magic Bullet?. *Frontiers in physiology*, 12, 651732. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.651732>
 31. Begum, M., Choubey, M., Tirumalasetty, M. B., Arbee, S., Mohib, M. M., Wahiduzzaman, M., Mamun, M. A., Uddin, M. B., & Mohiuddin, M. S. (2023). Adiponectin: A Promising Target for the Treatment of Diabetes and Its Complications. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(11), 2213. <https://doi.org/10.3390/life13112213>
 32. Swarbrick, M. M., & Havel, P. J. (2008). Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metabolic syndrome and related disorders*, 6(2), 87–102. <https://doi.org/10.1089/met.2007.0029>
 33. Long, Q., Lei, T., Feng, B., Yin, C., Jin, D., Wu, Y., Zhu, X., Chen, X., Gan, L., & Yang, Z. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma increases adiponectin secretion via transcriptional repression of endoplasmic reticulum chaperone protein ERp44. *Endocrinology*, 151(7), 3195–3203. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1501>
 34. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1784–1792. <https://doi.org/10.1172/JCI29126>
 35. Godwin Avwioro (2011): Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. In: International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences. Bd. 1, S. 24–34
 36. Lottspeich, F. und Zorbas, H.: Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1998, ISBN 3-8274-0041-4.

37. Rehm, H. und Letzel, T.: Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009, ISBN 978-3-8274-2312-2
38. Tura, A., Merz, H., Reinsberg, M., Lüke, M., Jager, M. J., Grisanti, S., & Lüke, J. (2016). Analysis of monosomy-3 in immunomagnetically isolated circulating melanoma cells in uveal melanoma patients. *Pigment cell & melanoma research*, 29(5), 583–589. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12507>
39. Sandinha, M. T., Farquharson, M. A., & Roberts, F. (2004). Identification of monosomy 3 in choroidal melanoma by chromosome in situ hybridisation. *The British journal of ophthalmology*, 88(12), 1527–1532. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.044768>
40. Hu, D. N., McCormick, S. A., Ritch, R., & Pelton-Henrion, K. (1993). Studies of human uveal melanocytes in vitro: isolation, purification and cultivation of human uveal melanocytes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34(7), 2210–2219.
41. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*, 6(269), p11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
42. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
43. UCSC Xena (xenabrowser.net) zuletzt aufgerufen am 05.08.2021
44. Engin A. (2017). Adiponectin-Resistance in Obesity. *Advances in experimental medicine and biology*, 960, 415–441. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_18
45. Thundyil, J., Pavlovski, D., Sobey, C. G., & Arumugam, T. V. (2012). Adiponectin receptor signalling in the brain. *British journal of pharmacology*, 165(2), 313–327. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01560.x>
46. Clark, J. L., Taylor, C. G., & Zahradka, P. (2017). Exploring the Cardio-metabolic Relevance of T-cadherin: A Pleiotropic Adiponectin Receptor. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 17(3), 200–206. <https://doi.org/10.2174/1871530317666170818120224>
47. Wang, Z. V., Schraw, T. D., Kim, J. Y., Khan, T., Rajala, M. W., Follenzi, A., & Scherer, P. E. (2007). Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Molecular and cellular biology*, 27(10), 3716–3731. <https://doi.org/10.1128/MCB.00931-06>
48. Murali, R., Wiesner, T., & Scolyer, R. A. (2013). Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology*, 45(2), 116–126. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e32835d0efb>
49. <https://omim.org/entry/614327>
50. Shibata, M., Ham, K., & Hoque, M. O. (2018). A time for YAP1: Tumorigenesis, immunosuppression and targeted therapy. *International journal of cancer*, 143(9), 2133–2144. <https://doi.org/10.1002/ijc.31561>
51. Baldelli, S., Aiello, G., Mansilla Di Martino, E., Campaci, D., Muthanna, F. M. S., & Lombardo, M. (2024). The Role of Adipose Tissue and Nutrition in the Regulation of Adiponectin. *Nutrients*, 16(15), 2436. <https://doi.org/10.3390/nu16152436>
52. Lindström, M. S., Jurada, D., Bursac, S., Orsolich, I., Bartek, J., & Volarevic, S. (2018). Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene*, 37(18), 2351–2366. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0121-z>
53. Kaliki, S., Shields, C. L., & Shields, J. A. (2015). Uveal melanoma: estimating prognosis. *Indian journal of ophthalmology*, 63(2), 93–102. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.154367>
54. Quin, J. E., Devlin, J. R., Cameron, D., Hannan, K. M., Pearson, R. B., & Hannan, R. D. (2014). Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(6), 802–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.009>
55. Pfister A. S. (2019). Emerging Role of the Nucleolar Stress Response in Autophagy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 156. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00156>
56. Ke, R., Xu, Q., Li, C., Luo, L., & Huang, D. (2018). Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell biology international*, 42(4), 384–392. <https://doi.org/10.1002/cbin.10915>

57. Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
58. Ambrosini, G., Musi, E., Ho, A. L., de Stanchina, E., & Schwartz, G. K. (2013). Inhibition of mutant GNAQ signaling in uveal melanoma induces AMPK-dependent autophagic cell death. *Molecular cancer therapeutics*, 12(5), 768–776. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1020>
59. Al-Moujahed, A., Nicolaou, F., Brodowska, K., Papakostas, T. D., Marmalidou, A., Ksander, B. R., Miller, J. W., Gragoudas, E., & Vavvas, D. G. (2014). Uveal melanoma cell growth is inhibited by aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) partially through activation of AMP-dependent kinase. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(7), 4175–4185. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12856>
60. Wang, W., Xiao, Z. D., Li, X., Aziz, K. E., Gan, B., Johnson, R. L., & Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature cell biology*, 17(4), 490–499. <https://doi.org/10.1038/ncb3113>
61. Yu, F. X., Luo, J., Mo, J. S., Liu, G., Kim, Y. C., Meng, Z., Zhao, L., Peyman, G., Ouyang, H., Jiang, W., Zhao, J., Chen, X., Zhang, L., Wang, C. Y., Bastian, B. C., Zhang, K., & Guan, K. L. (2014). Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer cell*, 25(6), 822–830. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.017>
62. Jager, M. J., Dogrusöz, M., & Woodman, S. E. (2017). Uveal Melanoma: Identifying Immunological and Chemotherapeutic Targets to Treat Metastases. *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)*, 6(2), 179–185. <https://doi.org/10.22608/APO.201782>
63. Field, M. G., & Harbour, J. W. (2014). GNAQ/11 mutations in uveal melanoma: is YAP the key to targeted therapy?. *Cancer cell*, 25(6), 714–715. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.028>
64. Rauser, S., Weis, R., Braselmann, H., Feith, M., Stein, H. J., Langer, R., Hutzler, P., Hausmann, M., Lassmann, S., Siewert, J. R., Höfler, H., Werner, M., & Walch, A. (2007). Significance of HER2 low-level copy gain in Barrett's cancer: implications for fluorescence in situ hybridization testing in tissues. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(17), 5115–5123. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0465>
65. 1.Vierteljahresschrift 2022 Statistische Nachrichten Nr. 50, Hansesstadt Lübeck Bekanntmachungen
66. Nichols, E. E., Richmond, A., & Daniels, A. B. (2016). Disparities in Uveal Melanoma: Patient Characteristics. *Seminars in ophthalmology*, 31(4), 296–303. <https://doi.org/10.3109/08820538.2016.1154176>
67. Ossowski, L., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2010). Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment cell & melanoma research*, 23(1), 41–56. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00647.x>
68. Combs, T. P., & Marliss, E. B. (2014). Adiponectin signaling in the liver. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 15(2), 137–147. <https://doi.org/10.1007/s11154-013-9280-6>
69. Gerich J. E. (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 27(2), 136–142. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x>
70. Cohen, D. H., & LeRoith, D. (2012). Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocrine-related cancer*, 19(5), F27–F45. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0374>
71. Clemmons D. R. (2012). Metabolic actions of insulin-like growth factor-I in normal physiology and diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 41(2), 425–viii. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.017>
72. Binoux M. (1995). The IGF system in metabolism regulation. *Diabete & metabolisme*, 21(5), 330–337.
73. Song, H. J., Oh, S., Quan, S., Ryu, O. H., Jeong, J. Y., Hong, K. S., & Kim, D. H. (2014). Gender differences in adiponectin levels and body composition in older adults: Hallym aging study. *BMC geriatrics*, 14, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2318-14-8>
74. Chigogora, S., Zaninotto, P., Kivimaki, M., Steptoe, A., & Batty, G. D. (2016). Insulin-like growth factor 1 and risk of depression in older people: the English Longitudinal Study of Ageing. *Translational psychiatry*, 6(9), e898. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.167>

75. Zloto, O., Pe'er, J., & Frenkel, S. (2013). Gender differences in clinical presentation and prognosis of uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*, *54*(1), 652–656. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10365>
76. Singh, B., & Saxena, A. (2010). Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World journal of diabetes*, *1*(2), 36–47. <https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i2.36>
77. Arcidiacono, B., Iiritano, S., Nocera, A., Possidente, K., Nevolo, M. T., Ventura, V., Foti, D., Chiefari, E., & Brunetti, A. (2012). Insulin resistance and cancer risk: an overview of the pathogenetic mechanisms. *Experimental diabetes research*, *2012*, 789174. <https://doi.org/10.1155/2012/789174>
78. Djiogue, S., Nwabo Kamdje, A. H., Vecchio, L., Kipanyula, M. J., Farahna, M., Aldebasi, Y., & Seke Etet, P. F. (2013). Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. *Endocrine-related cancer*, *20*(1), R1–R17. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0324>
79. Silva, F. M., de Almeida, J. C., & Feoli, A. M. (2011). Effect of diet on adiponectin levels in blood. *Nutrition reviews*, *69*(10), 599–612. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00414.x>
80. Tsukinoki, R., Morimoto, K., & Nakayama, K. (2005). Association between lifestyle factors and plasma adiponectin levels in Japanese men. *Lipids in health and disease*, *4*, 27. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-4-27>
81. Esfahani, M., Movahedian, A., Baranchi, M., & Goodarzi, M. T. (2015). Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. *Iranian journal of basic medical sciences*, *18*(5), 430–442.
82. Kotani, K., Hazama, A., Hagimoto, A., Saika, K., Shigeta, M., Katanoda, K., & Nakamura, M. (2012). Adiponectin and smoking status: a systematic review. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, *19*(9), 787–794. <https://doi.org/10.5551/jat.11833>
83. Zhuang, A., Chai, P., Wang, S., Zuo, S., Yu, J., Jia, S., Ge, S., Jia, R., Zhou, Y., Shi, W., Xu, X., Ruan, J., & Fan, X. (2022). Metformin promotes histone deacetylation of optineurin and suppresses tumour growth through autophagy inhibition in ocular melanoma. *Clinical and translational medicine*, *12*(1), e660. <https://doi.org/10.1002/ctm2.660>
84. Su, J. R., Lu, Z. H., Su, Y., Zhao, N., Dong, C. L., Sun, L., Zhao, S. F., & Li, Y. (2016). Relationship of Serum Adiponectin Levels and Metformin Therapy in Patients with Type 2 Diabetes. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, *48*(2), 92–98. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569287>
85. Yang, S., Sun, Y., Guo, Y., Zhao, Z., Hu, F., & Cong, L. (2024). The glycolysis-related AMPK/ULK signaling pathway mediates the inhibitory effect of adiponectin in prostate cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*, *593*, 112338. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112338>

7. Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides statt, dass die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe, abgesehen von den Hilfestellungen, auf die in der Danksagung hingewiesen wird, verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Lübeck, den

.....

Christiane Thieme

8. Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir das Schreiben dieser Arbeit ermöglicht haben.

Vielen Dank Herr Prof. Dr. med Grisanti für die zugrunde liegende Forschungsstruktur an der Klinik für Augenheilkunde in Lübeck. Bei der Bewerbung auf eine medizinische Doktorarbeit erhielt ich von Ihrem Institut die schnellste und strukturierteste Antwort.

Ich bedanke mich herzlichst bei Frau Prof. Aysegül Tura für einen ganz kleinen Blick in eine mir unbekanntere Wissenschaftswelt. Ich wünsche Ihnen für Ihr gesamtes Arbeitsleben viel Spannendes und Neues! Vielen Dank für Ihre Zeit und Mühe vom ersten Treffen bis zum letzten Korrekturlesen.

Natürlich möchte ich mich bei meinem Mann und meinen zwei Söhnen bedanken. Ihr habt mir die nötige Zeit gegeben und mich motiviert.

Dankeschön auch an meine Eltern. Schon immer habt ihr für meine Entlastung gesorgt und in diesem Fall konntet ihr dafür sogar Zeit mit euren Enkeln verbringen.

9. Anhang

Klassifikation des uvealen Melanoms nach AJCC

Quelle: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/eyeuveatnmuvealmelanoma.html> zuletzt aufgerufen am 03.01.2020

Primary tumor (pT)

Iris:

- **pTX:** primary tumor cannot be assessed
- **pT0:** no evidence of primary tumor
- **pT1:** tumor limited to the iris
 - **pT1a:** tumor limited to the iris, not more than 3 clock hours in size
 - **pT1b:** tumor limited to the iris, more than 3 clock hours in size
 - **pT1c:** tumor limited to the iris, with secondary glaucoma
- **pT2:** tumor extending into the ciliary body, choroid or both
 - **pT2a:** tumor extending into the ciliary body, without secondary glaucoma
 - **pT2b:** tumor extending into the ciliary body and choroid, without secondary glaucoma
 - **pT2c:** tumor extending into the ciliary body, choroid or both, with secondary glaucoma
- **pT3:** tumor extending into the ciliary body, choroid or both, with scleral extension (but without extrascleral extension)
- **pT4:** tumor with extrascleral extension
 - **pT4a:** tumor with extrascleral extension ≤ 5 mm in largest diameter
 - **pT4b:** tumor with extrascleral extension > 5 mm in largest diameter

Ciliary body and choroid:

- **pT1:** tumor size category 1
 - **pT1a:** tumor size category 1 without ciliary body involvement or extraocular extension
 - **pT1b:** tumor size category 1 with ciliary body involvement
 - **pT1c:** tumor size category 1 without ciliary body involvement but with extraocular extension ≤ 5 mm in largest diameter
 - **pT1d:** tumor size category 1 with ciliary body involvement and extraocular extension ≤ 5 mm in largest diameter
- **pT2:** tumor size category 2
 - **pT2a:** tumor size category 2 without ciliary body involvement or extraocular extension
 - **pT2b:** tumor size category 2 with ciliary body involvement
 - **pT2c:** tumor size category 2 without ciliary body involvement but with extraocular extension ≤ 5 mm in largest diameter
 - **pT2d:** tumor size category 2 with ciliary body involvement and extraocular extension ≤ 5 mm in largest diameter

- **pT3:** tumor size category 3
 - **pT3a:** tumor size category 3 without ciliary body involvement or extraocular extension
 - **pT3b:** tumor size category 3 with ciliary body involvement
 - **pT3c:** tumor size category 3 without ciliary body involvement but with extraocular extension \leq 5 mm in largest diameter
 - **pT3d:** tumor size category 3 with ciliary body involvement and extraocular extension \leq 5 mm in largest diameter
- **pT4:** tumor size category 4 or any tumor with extraocular extension $>$ 5 mm
 - **pT4a:** tumor size category 4 without ciliary body involvement or extraocular extension
 - **pT4b:** tumor size category 4 with ciliary body involvement
 - **pT4c:** tumor size category 4 without ciliary body involvement but with extraocular extension \leq 5 mm in largest diameter
 - **pT4d:** tumor size category 4 with ciliary body involvement and extraocular extension \leq 5 mm in diameter
 - **pT4e:** any tumor size category with extraocular extension $>$ 5 mm in largest diameter

Notes:

- Largest basal diameter and tumor thickness are used to determine size category (see [table](#) above), required to assign pT category to melanomas of the ciliary body and choroid
- Proper grossing technique is required to obtain largest basal diameter and tumor thickness in enucleation specimens
- Globe should be transilluminated with strong light source to map out the tumor shadow on the sclera in order to determine the best orientation of pupil-optic nerve section
- Pupil-optic nerve section should capture the largest basal diameter based on the shadow
- In clinical practice, largest basal diameter may be estimated in optic disc diameters (dd) (average 1 dd = 1.5 mm) and tumor thickness may be estimated in diopters (average 3 diopters = 1 mm)

Regional lymph nodes (pN)

- **pNX:** regional lymph nodes cannot be assessed
- **pN0:** no regional lymph node metastasis
- **pN1:** regional lymph node metastasis or discrete orbital tumor deposits
 - **pN1a:** metastasis in one or more regional lymph nodes
 - **pN1b:** discrete orbital tumor deposits discontinuous with the globe without regional lymph node metastases

Notes:

- Regional lymph nodes include preauricular, submandibular and cervical

Distant metastasis (pM)

- **pM0:** no distant metastasis
- **pM1:** distant metastasis

- **pM1a**: largest diameter of the largest metastasis is ≤ 3 cm
- **pM1b**: largest diameter of the largest metastasis is 3.1 - 8.0 cm
- **pM1c**: largest diameter of the largest metastasis is > 8 cm

Prefixes

- **y**: preoperative radiotherapy or chemotherapy
- **r**: recurrent tumor stage

AJCC prognostic stage groups

Stage group I:	T1a	N0	M0
Stage group IIA:	T1b - d	N0	M0
Stage group IIA:	T2a	N0	M0
Stage group IIB:	T2b	N0	M0
Stage group IIB:	T3a	N0	M0
Stage group IIIA:	T2c - d	N0	M0
Stage group IIIA:	T3b - c	N0	M0
Stage group IIIA:	T4a	N0	M0
Stage group IIIB:	T3d	N0	M0
Stage group IIIB:	T4b - c	N0	M0
Stage group IIIC:	T4d - e	N0	M0
Stage group IV:	any T	N1	M0
Stage group IV:	any T	any N	M1

Tabelle A1-A5 Verwendete Materialien angelehnt an (13)

Tabelle A1. Chemikalien		
Item	Hersteller	Katalognummer
CEP3 Chromosome 3 Sonde, Spectrum Orange	Abbott Molecular (Wiesbaden, Deutschland)	06J36-003
DAPI	Thermo Fisher Scientific (Bremen, Deutschland)	D1306
Eosin	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)	X883.2
Ethanol	ROTH	9065.4
Eukitt	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	03989
Formalin, 4,5%	ROTH	2213.4
Fetales Rinderserum	Thermo Fisher Scientific	10500-064
Hank's balanced salt solution	Thermo Fisher Scientific	
Hematoxylin (Mayer's)	ROTH	T865.2
HRP-Green Solution Set	42 Life Sciences	S-99056-103
Hydrophobischer Marker	Science Services, München, Deutschland	N71310-N
Isopropanol	ROTH	T910.1
Methanol	ROTH	KK39.2
Mowiol	ROTH	0713.1
Neural Tissue Dissociation Kit (P)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	130-092-628
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)	1040051000
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), für Zellkultur	Thermo Fisher Scientific	14190250
SSC, 20x	ROTH	1054.1
Triton X-100	ROTH	3051.3
Xylene	Merck	1.08633

Tabelle A2. Antikörper

Primäre Antikörper				
Antigen	Typ	Klon	Hersteller	Katalognummer
Adiponectin	Kaninchen IgG, polyklonal	-	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab62551
AdipoR1	Kaninchen IgG, polyklonal	-	Abcam	ab126611
MelanA	Kaninchen IgG, monoklonal	EPR20380	Abcam	ab210546
Melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP)	Maus IgG, monoklonal	9.2.27	Abcam	ab78284
Sekundäre Antikörper				
Reaktivität	Typ	Label	Hersteller	Katalognummer
Kaninchen IgG	Goat IgG (H+L)	Cy3	Jackson Immunoresearch, Dianova (Hamburg, Deutschland)	111-165-003
Maus IgG	Goat IgG (H+L)	Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	A-11001

Tabelle A3. Verbrauchsmaterialien und Glasgefäße

Item	Hersteller	Katalognummer
Färbekasten, Glas	ROTH	H550.1
Färbekasten, Kunststoff	ROTH	HA44.1
Kryoröhrchen	Thermo-Fisher Scientific	368632
Pasteurpipetten mit Wattestopfen, 230 mm	ROTH	E327.1
Pipettenspitzen, 0.1-10 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	70.1115.210
Pipettenspitzen, 2-100 µl	Sarstedt	70.760.217
Pipettenspitzen, 50-1000 µl	Sarstedt	70.762.216
Reaktionsgefäß, 0.5 ml	Sarstedt	72.704.700
Reaktionsgefäß, 1.5 ml	Sarstedt	72.706.700
Sterile Pipetten, 5 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)	606-180

Sterile Pipetten, 10 ml	Greiner Bio-One	607-180
Superfrost plus Objektträger	ROTH	H867.1
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	188271
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	210261

Tabelle A4. Instrumente

Item	Hersteller	Model
Autoklav	Systemec (Linden, Deutschland)	DX-23
Einfrierbox	Thermo-Fisher Scientific	5100-0001
Fluoreszenzmikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)	DMI 6000b
Flüssigstickstofftank	Taylor-Wharton (Mildstedt, Deutschland)	20XT
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr (Biberach an der Riß, Deutschland)	Comfort NoFrost
Gefrierschrank, -80°C	Sanyo (Hamburg, Deutschland)	MDF-U20865
Kühlschrank, 4°C	Liebherr	Comfort NoFrost
Mikropipette, 0.5-10 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Research Plus 3120000020
Mikropipette, 10-100 µl	Eppendorf	Research Plus 3120000046
Mikropipette, 100-1000 µl	Eppendorf	Research Plus 3120000062
Objektträger-Trockner	StörkTronic (Stuttgart, Deutschland)	
Wasserdestillator	Heraeus (Hanau, Deutschland)	Destamat
Wasserbad	GFL (Burgwedel, Deutschland)	1083
Zentrifuge (15-50 ml Röhrchen)	Heraeus	Biofuge Primo
Zentrifuge (0,5-2 ml Röhrchen)	Neolab (Heidelberg, Deutschland)	3-1820
Zytozentrifuge	Tharmac (Limburg an der Lahn, Deutschland)	

Tabelle A5. Software

Name (Zweck)	Entwickler	Version
Fiji (Bildanalyse)	National Institutes of Health, Bethesda, MD	2.0.0-rc-54/1.51g
GraphPad Prism (statistische Analyse)	GraphPad Software, San Diego, CA	7
Leica Application Software Advanced Fluorescence (Fluoreszenzmikroskopie)	Leica, Wetzlar, Deutschland	2.3.0, build 5131
NCSS (statistische Analyse)	LLC, Kaysville, UT	8.0.13

Tabelle A6 Genexpression abhängig von klinischen Parametern

Gene symbol	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Locus	3q27.3	1q32.1	12p13.33	3p14.3	12q23.3	16q23.3	9q31.1	3p25.2
Median expression (range), n=80	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (19,8-21,3)	19,7 (18,8-20,9)	16,0 (14,1-17,9)	17,9 (16,8-18,9)	12,68 (8,686-15,31)	18,3 (16,9-19,3)	15,3 (11,7-19,3)
Age (n=80)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Pearson, r	0,158	-0,0320	-0,1651	-0,1374	-0,1279	-0,0006	-0,1347	-0,041
P-value (Pearson)	0,1616	0,7784	0,1433	0,2242	0,2583	0,9958	0,2337	0,718
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,4133	0,8896	0,4133	0,4133	0,4133	0,9958	0,4133	0,8896
Gender (n=80)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Female (n=35)	0,0 (0,0-8,0)	20,5 (19,9-21,3)	19,8 (18,8-20,7)	16,0 (14,9-17,6)	18,0 (16,8-18,9)	12,65 (8,686-13,99)	18,3 (17,0-19,1)	16,1 (11,7-19,3)
Male (n=45)	0,0 (0,0-9,7)	20,3 (19,8-21,2)	19,7 (18,8-20,9)	16,1 (14,1-17,9)	17,9 (16,8-18,9)	12,71 (10,91-15,31)	18,3 (16,9-19,3)	15,1 (12,0-19,3)
Spearman, rho	-0,0580	-0,1986	-0,1113	0,0344	-0,0764	0,1244	-0,1981	-0,1129
P-value (Spearman)	0,6095	0,0773	0,3256	0,7621	0,5006	0,2716	0,0781	0,3185

P adj. Bonferroni	1,0000	0,62	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,62	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,6966	0,3124	0,5210	0,7621	0,6675	0,5210	0,3124	0,5210
Eye color (n=30)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Brown (n=15)	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (20,0-21,3)	19,6 (18,9-20,6)	15,8 (14,1-17,3)	17,7 (16,8-18,5)	12,94 (11,94-14,74)	18,3 (16,9-19,1)	15,8 (12,6-19,3)
Green (n=6)	0,0 (0,0-0,0)	20,3 (20,0-20,4)	19,9 (18,8-20,1)	16,0 (15,0-17,3)	18,1 (17,4-18,3)	12,85 (12,23-14,27)	18,2 (18,0-18,8)	13,9 (13,2-18,7)
Blue (n=9)	0,0 (0,0-6,8)	20,7 (20,2-21,2)	19,8 (19,5-20,3)	16,1 (14,5-17,1)	17,4 (16,8-18,6)	12,56 (12,06-15,31)	18,1 (17,0-19,1)	14,2 (12,1-18,7)
Spearman, rho	-0,0671	-0,5336	-0,0375	-0,1565	0,2221	0,2707	-0,3537	-0,0138
P-value (Spearman)	0,7247	0,0024	0,844	0,4089	0,2382	0,1479	0,0552	0,9422
P adj. Bonferroni	1,0000	0,02	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,44	7,54
P adj. Benjamini-Hochberg	0,9422	0,0192	0,9422	0,6542	0,4764	0,3944	0,2208	0,9422
Body-Mass-Index	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Pearson, r	-0,0583	-0,0343	-0,0431	-0,0191	0,0100	0,0798	-0,0085	-0,1985
P-value (Pearson)	0,6784	0,8073	0,7591	0,892	0,9431	0,5702	0,9521	0,1542
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,9521	0,9521	0,9521	0,9521	0,9521	0,9521	0,9521	0,9521
Largest Basal Diameter (n=74)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Pearson, r	0,0197	-0,0961	-0,0526	-0,1293	-0,0706	0,2247	0,1404	-0,2089
P-value (Pearson)	0,868	0,4152	0,6561	0,2724	0,55	0,0543	0,2328	0,0741

P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,4344	1,0000	0,5928
P adj. Benjamini-Hochberg	0,868	0,6643	0,7498	0,5448	0,7333	0,2964	0,5448	0,2964
Tumor thickness (n=76)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Pearson, r	-0,0815	-0,0836	-0,1512	-0,1349	-0,0982	0,1815	0,0768	-0,3937
P-value (Pearson)	0,484	0,4726	0,1924	0,2452	0,3987	0,1167	0,5097	0,0004
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9336	1,0000	0,0032
P adj. Benjamini-Hochberg	0,5097	0,5097	0,4904	0,4904	0,5097	0,4668	0,5097	0,0032
AJCC Stage (Clinical, n=80)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Stage IIA and -B (n=36)	0,0 (0,0-8,0)	20,4 (19,9-21,3)	19,7 (18,8-20,6)	16,2 (14,6-17,6)	18,0 (16,9-18,9)	12,61 (10,29-14,15)	18,3 (17,2-19,3)	16,8 (11,7-19,3)
Stage IIIA-C (n=40)	0,0 (0,0-9,7)	20,3 (19,8-21,2)	19,8 (18,2-20,9)	15,9 (14,1-17,9)	17,9 (16,8-18,9)	12,72 (8,686-15,31)	18,4 (16,9-19,1)	14,8 (11,9-19,3)
Stage IV (n=4)	0,0 (0,0-0,0)	20,6 (20,1-20,8)	19,7 (19,2-20,3)	15,9 (15,1-16,1)	17,8 (17,0-17,9)	12,39 (11,7-13,48)	18,8 (18,6-19,0)	13,4 (12,1-15,0)
Spearman, rho	-0,1491	-0,0728	-0,0377	-0,1642	-0,1705	0,3667	0,0451	-0,2974
P-value (Spearman)	0,1868	0,5208	0,7397	0,1457	0,1304	0,0008	0,6915	0,0074
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0064	1,0000	0,0592
P adj. Benjamini-Hochberg	0,2989	0,6944	0,7397	0,2914	0,2914	0,0064	0,7397	0,0296
Extrascleral Extension	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
No (n=71)	0,0 (0,0-9,7)	20,3 (19,8-21,3)	19,7 (18,8-20,9)	16,0 (14,1-17,9)	17,9 (16,8-18,9)	12,72 (8,686-15,31)	18,3 (16,9-19,3)	15,8 (11,7-19,3)
Yes (n=9)	0,0 (0,0-6,7)	20,4 (20,0-	19,8 (19,3-	16,0 (14,6-	17,7 (17,0-	12,56 (11,79-	18,5 (18,0-	13,8 (12,1-

		21,0)	20,7)	16,4)	18,2)	14,74)	19,0)	16,2)
Spearman, rho	-0,0483	0,0583	0,1354	-0,1062	-0,1705	0,1362	0,0917	-0,2356
P-value (Spearman)	0,6708	0,6077	0,2313	0,3484	0,1306	0,2283	0,4186	0,0354
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2832
P adj. Benjamini-Hochberg	0,6708	0,6708	0,4626	0,5574	0,4626	0,4626	0,5581	0,2832
Morphology (n=80)	ADIPOQ	ADIPOR 1	ADIPOR 2	APPL 1	APPL2	CDH13	ERP44	PPAR G
Spindle (n=43)	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (19,8-21,3)	19,8 (18,8-20,6)	16,1 (15,0-17,9)	18,0 (16,8-18,9)	12,56 (10,66-14,74)	18,2 (16,9-19,1)	17,0 (11,7-19,3)
Mixed / Spindle (n=14)	0,0 (0,0-7,9)	20,3 (20,0-21,2)	19,7 (19,1-20,6)	15,9 (14,1-17,3)	17,9 (17,2-18,5)	12,91 (10,29-15,31)	18,1 (17,5-19,0)	14,9 (11,9-19,3)
Mixed / Epithelioid (n=7)	0,0 (0,0-6,7)	20,4 (20,1-20,6)	19,5 (19,3-20,2)	15,5 (14,4-17,0)	17,5 (16,8-18,6)	12,66 (8,686-13,99)	18,7 (18,3-19,1)	13,9 (12,8-16,7)
Epithelioid (n=16)	0,0 (0,0-6,7)	20,2 (20,0-21,0)	19,8 (19,4-20,9)	15,9 (15,4-16,9)	17,8 (17,4-18,9)	12,76 (11,1-15,17)	18,6 (18,2-19,3)	13,6 (12,0-17,1)
Spearman, rho	-0,063	-0,1707	0,0417	-0,1894	-0,1027	0,3684	-0,0007	-0,4878
P-value (Spearman)	0,5789	0,1301	0,7137	0,0925	0,3648	0,0008	0,9948	<0,0001
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	0,74	1,0000	0,0064	1,0000	<0,0001
P adj. Benjamini-Hochberg	0,7719	0,2602	0,8157	0,2467	0,5837	0,0032	0,9948	<0,0001
Closed connective tissue loops (n=80)	ADIPOQ	ADIPOR 1	ADIPOR 2	APPL 1	APPL2	CDH13	ERP44	PPAR G
Absent (n=38)	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (19,8-21,3)	19,8 (18,8-20,6)	16,1 (14,5-17,9)	17,8 (16,8-18,9)	12,64 (8,686-15,17)	18,2 (16,9-19,3)	16,3 (11,7-19,3)
Present (n=42)	0,0 (0,0-7,9)	20,3 (19,9-21,0)	19,7 (18,8-20,9)	15,9 (14,1-17,7)	18,0 (16,8-18,9)	12,69 (10,29-15,31)	18,5 (17,5-19,0)	14,9 (11,9-19,3)
Spearman, rho	-0,0401	-0,1393	0,0206	-0,1919	0,0683	0,1171	-0,1274	-0,1626

P-value (Spearman)	0,7237	0,2177	0,8561	0,0882	0,5472	0,301	0,2601	0,1496
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	0,7056	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,8271	0,4816	0,8561	0,4816	0,7296	0,4816	0,4816	0,4816
Mitotic count	ADIPOQ	ADIPOR 1	ADIPOR 2	APPL 1	APPL2	CDH13	ERP44	PPAR G
0-5	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (19,8-21,3)	19,8 (18,8-20,7)	16,0 (14,4-17,9)	17,9 (16,8-18,9)	12,65 (10,29-15,17)	18,3 (16,9-19,3)	15,8 (11,7-19,3)
>5-10	0,0 (0,0-7,9)	20,3 (20,0-20,8)	19,8 (19,1-20,9)	16,1 (14,1-17,0)	18,0 (17,0-18,9)	12,45 (11-14,74)	18,4 (17,5-19,0)	14,7 (12,0-18,7)
>11	0,0 (0,0-0,0)	20,3 (19,9-20,4)	19,6 (19,4-19,8)	15,9 (14,6-17,1)	17,8 (17,2-18,5)	12,75 (8,686-15,31)	18,6 (18,3-18,9)	13,9 (12,6-17,5)
Spearman, rho	-0,0651	-0,1462	-0,0612	-0,0609	-0,006	0,1954	-0,2633	-0,1654
P-value (Spearman)	0,566	0,1955	0,5897	0,5917	0,9581	0,0824	0,0183	0,1425
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,6592	0,1464	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,6762	0,391	0,6762	0,6762	0,9581	0,3296	0,1464	0,38
Tumor infiltrating lymphocytes density	ADIPOQ	ADIPOR 1	ADIPOR 2	APPL 1	APPL2	CDH13	ERP44	PPAR G
Mild (n=71)	0,0 (0,0-9,7)	20,3 (19,8-21,3)	19,7 (18,8-20,9)	16,1 (14,1-17,9)	18,0 (16,8-18,9)	12,71 (10,66-15,31)	18,3 (16,9-19,1)	15,7 (11,7-19,3)
Moderate (n=7)	0,0 (0,0-6,7)	20,4 (20,2-21,0)	19,8 (19,3-20,7)	15,7 (15,4-16,4)	17,5 (16,9-18,0)	12,46 (8,686-13)	19,0 (17,8-19,3)	13,9 (12,9-17,5)
Heavy (n=2)	0,0 (0,0-0,0)	20,4 (20,3-20,5)	20,1 (19,6-20,6)	15,0 (14,6-15,4)	17,5 (17,4-17,7)	12,72 (12,56-12,88)	18,6 (18,4-18,8)	12,9 (12,8-12,9)
Spearman, rho	-0,0534	0,1086	0,0934	-0,2577	-0,2388	0,101	0,0605	-0,2191
P-value (Spearman)	0,638	0,3375	0,4099	0,021	0,0329	0,3729	0,5938	0,0509
P adj.	1,0000	1,0000	1,0000	0,168	0,2632	1,0000	1,0000	0,4072

Bonferroni

P adj. Benjamini-Hochberg 0,638 0,5465 0,5465 0,1316 0,1316 0,5465 0,638 0,1357

Tumor infiltrating macrophages density	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPARG</i>
Mild (n=40)	0,0 (0,0-8,0)	20,3 (19,8-21,1)	19,7 (18,8-20,9)	16,2 (15,0-17,9)	18,1 (16,8-18,9)	12,68 (10,91-14,27)	18,3 (17,0-19,1)	15,6 (11,7-19,3)
Moderate (n=29)	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (20,0-21,0)	19,9 (18,8-20,7)	15,8 (14,1-16,8)	17,8 (16,9-18,7)	12,59 (8,686-14,74)	18,4 (16,9-19,3)	15,0 (12,6-18,7)
Heavy (n=11)	0,0 (0,0-0,0)	20,7 (20,0-21,3)	19,6 (19,3-20,0)	15,7 (14,4-17,3)	17,4 (16,8-18,3)	12,91 (11,64-15,31)	18,3 (17,2-18,9)	14,8 (12,7-17,9)
Spearman, rho	-0,1014	0,2175	0,02	- 0,3832	-0,3896	0,1132	0,1496	-0,1074
P-value (Spearman)	0,3707	0,0526	0,8602	0,0005	0,0004	0,3174	0,1852	0,3431
P adj. Bonferroni	1,0000	0,4208	1,0000	0,004	0,0032	1,0000	1,0000	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,4237	0,1403	0,8602	0,002	0,002	0,4237	0,3704	0,4237

Pigmentation (n=80)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPARG</i>
Mild (n=39)	0,0 (0,0-7,7)	20,3 (19,8-21,1)	19,8 (19,1-20,9)	16,3 (15,0-17,9)	18,1 (16,8-18,9)	12,46 (8,686-13,96)	18,3 (17,0-19,1)	16,5 (11,7-19,3)
Moderate (n=27)	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (20,0-21,2)	19,7 (18,8-20,7)	15,8 (14,1-16,5)	17,5 (16,9-18,7)	12,73 (10,66-15,31)	18,5 (16,9-19,3)	15,0 (12,1-19,3)
Heavy (n=14)	0,0 (0,0-7,9)	20,3 (20,0-21,3)	19,6 (18,8-20,6)	15,8 (14,4-17,3)	17,7 (16,8-18,3)	12,79 (11,19-15,17)	18,2 (17,2-18,8)	15,5 (12,6-18,7)
Spearman, rho	-0,0323	0,1139	-0,2004	- 0,3931	-0,4476	0,1082	0,0749	-0,1592
P-value (Spearman)	0,7761	0,3143	0,0746	0,0003	<0,0001	0,3394	0,5094	0,1584
P adj. Bonferroni	1,0000	1,0000	0,5968	0,0024	<0,0001	1,0000	1,0000	1,0000
P adj. Benjamini-Hochberg	0,7761	0,4525	0,1989	0,0012	<0,0001	0,4525	0,5822	0,3168

Hochberg

Metastases (n=80)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
No (n=54)	0,0 (0,0-9,7)	20,4 (19,8-21,3)	19,8 (18,8-20,9)	16,1 (14,1-17,9)	18,03 (16,8-18,9)	12,73 (8,686-15,31)	18,2 (16,9-19,3)	16,4 (11,7-19,3)
Yes (n=26)	0,0 (0,0-6,7)	20,2 (20,0-21,0)	19,7 (19,2-20,6)	15,9 (14,4-16,8)	17,76 (16,8-18,5)	12,49 (10,91-15,17)	18,6 (17,7-19,1)	13,8 (11,9-18,7)
Spearman, rho	-0,0921	-0,1879	-0,0324	-0,2121	-0,2393	0,2271	-0,0295	-0,3092
P-value (Spearman)	0,4165	0,0952	0,7757	0,0589	0,0326	0,0428	0,7952	0,0053
P adj. Bonferroni	1,0000	0,7616	1,0000	0,4712	0,2608	0,3424	1,0000	0,0424
P adj. Benjamini-Hochberg	0,5553	0,1523	0,7952	0,1178	0,1141	0,1141	0,7952	0,0424
Disease specific survival (n=78)	<i>ADIPOQ</i>	<i>ADIPOR 1</i>	<i>ADIPOR 2</i>	<i>APPL 1</i>	<i>APPL2</i>	<i>CDH13</i>	<i>ERP44</i>	<i>PPAR G</i>
Alive or dead due to other causes (n=58)	0,0 (0,0-9,7)	20,9 (19,8-21,3)	19,8 (18,8-20,9)	16,1 (14,1-17,9)	18,03 (16,8-18,9)	12,62 (10,29-15,31)	18,3 (16,9-19,3)	16,3 (11,7-19,3)
Dead due to UM-metastases (n=20)	0,0 (0,0-6,7)	20,2 (20,0-21,0)	19,6 (19,2-20,6)	15,9 (14,4-16,5)	17,68 (16,8-18,5)	12,76 (8,686-13,79)	18,5 (17,7-19,1)	13,8 (11,9-17,9)
Spearman, rho	-0,0986	-0,1763	-0,2044	-0,1988	-0,2532	0,2263	-0,06	-0,3163
P-value (Spearman)	0,3842	0,1177	0,0689	0,0771	0,0235	0,0436	0,5969	0,0043
P adj. Bonferroni	1,0000	0,9416	0,5512	0,6168	0,188	0,3488	1,0000	0,0344
P adj. Benjamini-Hochberg	0,4391	0,1569	0,1234	0,1234	0,094	0,1163	0,5969	0,0344