

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

**Expression von Caveolin-1 und der
Phosphoinositol-3-Kinase in primären uvealen
Melanomen**

Inauguraldissertation

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck**



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Miriam Gundi Stenzel

aus Wuppertal

Lübeck 2015

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Julia Lücke

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.04.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

***„Es gibt zwei Arten, sein Leben zu leben,
entweder so als wäre nichts ein Wunder
oder so als wäre alles eines.“***

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Okuläre Strukturen und ihr embryonaler Ursprung	1
1.2. Epidemiologie des primären uvealen Melanoms	2
1.3. Ätiologie und Risikofaktoren des uvealen Melanoms	2
1.4. Klinisches Erscheinungsbild des uvealen Melanoms	3
1.5. Makroskopisches Wachstumsmuster des uvealen Melanoms	3
1.6. Histologische Einteilung des uvealen Melanoms	4
1.7. Diagnostik des uvealen Melanoms	4
1.8. Prognostische Faktoren	5
1.8.1. Blutversorgung des uvealen Melanoms	6
1.8.2. Regulationsfaktoren der Blutversorgung	7
1.9. Behandlungsmöglichkeiten	11
1.9.1. Chirurgische Therapie	12
1.9.2. Konservative Therapie	13
1.10. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Probenmaterial und Patientenkollektiv	17
2.1.1. Positivkontrollen	19
2.1.2. Primärantikörper	20
2.1.3. Sekundärantikörper	20
2.1.4. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	21
2.1.5. Laborgeräte	23
2.1.6. EDV	24
2.2. Allgemeine Methoden	24
2.2.1. Verschlüsselung der Patientendaten	24
2.2.2. Beobachter	24
2.3. Vorbereitung der Gewebeproben auf die Färbung	25
2.3.1. Einbettung in Paraffin und Herstellung der Schnitte	25
2.3.2. Entparaffinierung	25
2.4. Färbung mit PI3K und Caveolin-1	25

2.4.1.	Protokoll der Färbung	25
2.4.2.	Auswertung am Mikroskop	27
2.4.3.	Computergestützte Auswertung der Bilder	29
2.5.	Färbung mit CD31 und Perjod Acid Schiff	31
2.5.1.	Protokoll der Färbung	31
2.5.2.	Auswertung am Mikroskop	33
2.6.	Färbung mit vWF und Endoglin	34
2.6.1.	Protokoll der Färbung	34
2.6.2.	Auswertung der Bilder	35
2.7.	Statistische Auswertung	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Expression von Caveolin-1 und Phosphoinositol-3-Kinase in primären uvealen Melanomen	37
3.1.1.	Vergleich der Caveolin-1-Expressionsrate der metastasierten und der nicht metastasierten Tumore	37
3.1.2.	Vergleich der PI3K-Expressionsrate der metastasierten und der nicht metastasierten Tumore	41
3.1.3.	Korrelation zwischen den Zellzahlen Caveolin-1 positiver und PI3K positiver Zellen	45
3.2.	Analyse des <i>vasculogenic mimicry</i> in primären uvealen Melanomen	46
3.2.1.	Korrelation zwischen VM und Metastasierung	46
3.2.2.	Korrelation zwischen VM und bekannten Prognosefaktoren	46
3.2.3.	Korrelation zwischen VM und den Expressionsraten von PI3K und Cav-1	47
3.3.	Auswertung Endoglin und vWF	48
3.3.1.	Expression von Endoglin in tumorösen und nicht tumorösen Geweben	48
3.3.2.	Expression von vWF in tumorösen und nicht tumorösen Geweben	48
3.3.3.	Korrelation von Endoglin und vWF mit Cav-1	48
3.3.4.	Korrelation von Endoglin und vWF mit PI3K	48
4.	Diskussion	49
4.1.	Zur Bedeutung der Blutversorgung beim primären uvealen Melanom	49
4.2.	Zur Caveolin-1-Expression im primären uvealen Melanom	50
4.3.	Zur Korrelation von Cav-1 mit anderen Prognosefaktoren des primären uvealen Melanoms	53
4.4.	Zur PI3K-Expression im primären uvealen Melanom	53
4.5.	Zur Korrelation von PI3K mit anderen Prognosefaktoren des primären uvealen Melanoms	55
4.6.	Zum <i>vasculogenic mimicry</i> im primären uvealen Melanom	56
4.7.	Bedeutung von Cav-1 und PI3K für die Angiogenese	57

4.8. Ausblick	59
5. Zusammenfassung	61
A. Anhang	I
A.1. Abkürzungsverzeichnis	I
A.2. Abbildungsverzeichnis	III
A.3. Tabellenverzeichnis	IV
B. Danksagung	V
C. Curriculum Vitae	VI
Literatur	VII

Kapitel 1.

Einleitung

1.1. Okuläre Strukturen und ihr embryonaler Ursprung

Das maligne uveale Melanom ist eine Neoplasie der Gefäßhaut des menschlichen Auges, Aderhaut genannt, die dem hinteren Teil des Auges anliegt. Zu Beginn dieser Arbeit möchte ich mich mit dem Ursprung derjenigen Strukturen befassen, die bei den weiteren Ausführungen im Fokus des Interesses stehen. Das menschliche Auge ist ein so komplexes Gebilde faszinierender Strukturen, deren Entwicklung jeden in Staunen versetzen kann. Um für das zentrale Objekt meiner Arbeit zu begeistern, möchte ich die erstaunliche Entstehung dieser wunderbaren Strukturen zunächst beschreiben. Im Rahmen der embryonalen Entwicklung des Auges stülpt sich der Augenbecher in der fünften Woche aus. Die darüber liegenden ektodermalen Zellen verdichten sich in dieser Zeit der Entwicklung zur Lidplakode und bilden im weiteren Verlauf die Linse. Der Augenbecher selbst besteht aus zwei Schichten. Die äußere der beiden Schichten bildet das retinale Pigmentepithel, also jene Struktur, die später für den Stoffaustausch und die Versorgung der Nervenzellen der neuronalen Retina sorgt. Die innere Schicht des Augenbechers, die aus Neuroepithelzellen entsteht, entwickelt sich in ihrem hinteren Teil zu eben dieser neuronalen Retina mit den ersten drei Neuronen der Sehbahn. Der vordere Teil bildet während der Ausreifung des Auges den Ziliarkörper und Teile der Iris. Der Augenbecher ist in seiner frühen Phase der Entwicklung über den Augenbecherstiel mit dem Zentralen Nerven System (ZNS) verbunden. Dieser Augenbecherstiel füllt sich später mit den Axonen der Gliazellen, der Neuroretina, auf und verdichtet sich zum Nervus opticus. Diese frühe Entwicklung des menschlichen Sehorgans findet eingebettet in Mesenchym neuroektodermalen Ursprungs statt. Dieses Mesenchym dringt zum Teil in den Augenbecher ein und bildet dort die Vasa hyaloidia, die das Auge intrauterin mit Blut versorgen und später als Arteria centralis retinae persistieren. Darüber hinaus bildet das eingedrungene Mesenchym ein zartes Fasernetz aus, das die Grundstruktur des fertigen Glaskörpers darstellt. Das Mesenchym, das außen verbleibt, bildet eine äußere und innere Schicht, die mit der Pia- und der Dura mater des Gehirns zu vergleichen sind. Die äußere, der Dura mater ähnliche Schicht,

bildet sich zur Sklera aus und umgibt den proximalen Anteil des Nervus opticus so, wie die Dura mater das Gehirn umgibt. Die innere der beiden mesenchymalen Schichten ähnelt der Pia mater und entwickelt sich zur gefäßreichen, pigmentierten Choroidea, jener Struktur, deren maligne Veränderungen im Focus dieser Arbeit stehen sollen.[1, 2]

1.2. Epidemiologie des primären uvealen Melanoms

Das primäre uveale Melanom ist mit sechs bis sieben Patienten pro einer Millionen Einwohner und Jahr insgesamt ein eher seltener Tumor. Es ist jedoch der häufigste primär bösartige Tumor des Augeninnerens.[3] Der Erkrankungsgipfel liegt in der fünften bis sechsten Lebensdekade. Es sind wenige Fälle beschrieben, in denen auch junge Menschen am primär uvealen Melanom erkranken.[4] Sehr selten, nur in ca. 0,1 % der Fälle, können auch Kinder vor dem zehnten Lebensjahr erkranken. Das Aderhautmelanom tritt sowohl im rechten als auch im linken Auge gleich häufig auf, wobei ein beidseitiges Auftreten eher selten ist. Es gibt Hinweise für eine etwas höhere Inzidenz bei Männern.[5–7]

In Europa kann ein Nord-Süd-Gefälle beobachtet werden. Während in Norwegen und Dänemark mehr als acht uveale Melanome pro Million Einwohner registriert werden, sind es in Südeuropa (Spanien und Süditalien) weniger als zwei pro Million Einwohner.[8] Für die 5 Jahres-Überlebensrate (5-JÜ) lässt sich ein gegenläufiges Nord-Süd-Gefälle beobachten. Sie ist in England (72,6 %) und Irland (73,4 %) am höchsten und in Südeuropa 63,7 % am niedrigsten.[9] In einer Studie aus den USA konnte gezeigt werden, dass es große Unterschiede beim Auftreten des uvealen Melanoms in verschiedenen ethnischen Gruppen gibt. Die Inzidenz war bei Kaukasiern mit 6,02 pro Millionen Einwohnern am höchsten. Interessanterweise ist sie sowohl bei Afroamerikanern mit 0,31 Melanomen pro Million Einwohner, als auch bei Asiaten mit 0,38 Fällen pro Million Einwohnern etwa gleich niedrig.[10]

1.3. Ätiologie und Risikofaktoren des uvealen Melanoms

Die Ätiologie des uvealen Melanoms ist noch ungeklärt. Es wird diskutiert, dass sich uveale Melanome aus Schwann-Zellen der Ziliarnerven und aus choroidalen Melanocyten entwickeln; beides sind Zellreihen neuroektodermalen Ursprungs.[5] Ein möglicher Trigger für die maligne Entartung sind exogene oder endogene Entzündungen. Auch von kleineren Verletzungen und Narben können pigmentierte Raumforderungen ausgehen, die dann im weiteren Verlauf entarten. Den wichtigsten allein stehenden Risikofaktor stellt die Melanosis oculi dar. Patienten mit einer bestehenden okulären Melanozytose haben ein dreißigfach erhöhtes Risiko an malignen Melanomen der Aderhaut zu erkranken.[5] Auch Patienten mit dysplastischem Nävusyndrom haben ein erhöhtes Risiko ein Aderhautmelanom zu ent-

wickeln.[11] Neben diesen beiden prädisponierenden Erkrankungen konnte auch für die Neurofibromatose ein erhöhtes Risiko für das Aderhautmelanom gefunden werden.

1.4. Klinisches Erscheinungsbild des uvealen Melanoms

Das klinische Erscheinungsbild und die sich daraus ergebende Symptomatik für den Patienten hängen von der Lokalisation und der Wachstumsart des Tumors ab. Die Häufigkeit des Auftretens im Auge nimmt vom anterioren zum posterioren Pol zu. Die meisten uvealen Melanome sind am hinteren Pol der Uvea lokalisiert (28 %), gefolgt von der hinteren und mittleren Uvea mit 24 %. Weitere 16 % treten nur in der mittleren Uvea auf. Die Gruppe der Tumore, die in der mittleren Uvea und dem Ziliarkörper auftreten, hat einen Anteil von 15% an allen uvealen Melanomen. Zehn Prozent treten nur im Ziliarkörper auf und 8 % wachsen am hinteren Pol und reichen bis zum Ziliarkörper.[5]

Bei der großen Gruppe der uvealen Melanome, die am hinteren Pol wachsen, hängen die klinischen Beschwerden des Patienten von dem primären Wachstumsort und der Ausbreitungsrichtung ab. Während Aderhautmelanome am hinteren Fundus sehr früh Sehstörungen hervorrufen, verursachen peripher wachsende Tumore erst Beschwerden, wenn sie in die axiale Bulbusregion oder den Ziliarkörper vorwachsen. Häufig werden diese peripher wachsenden Neoplasien der Aderhaut auch erst durch das Auftreten sekundärer Komplikationen bemerkt. Eine wichtige sekundäre Komplikation ist die Amotio retinae. Sie kann durch direkte Tumorinvasion oder als Begleitamotio auch in tumorfernen Netzhautarealen ausgelöst werden. Durch spontan nekrotisierende Tumore kann durch entzündliche Exsudationen ein Offenwinkelglaukom ausgelöst werden. Dies stellt eine der beiden schmerzhaften Komplikationen dar. Darüber hinaus können Schmerzen bei Reizung des Ziliarkörpers auftreten. Alle weiteren Komplikationen sind mit Sehstörungen assoziiert. Weit vorwachsene Tumore können Glaskörperblutungen auslösen.[12] Auch eine Katarakt oder eine Linsensubluxation können eine sekundäre Tumorkomplikation sein.

1.5. Makroskopisches Wachstumsmuster des uvealen Melanoms

Das Wachstumsmuster von uvealen Melanomen kann in zwei Wachstumstypen eingeteilt werden: einerseits die diffus wachsenden und andererseits die lokalisiert wachsenden malignen Melanome. Die meisten malignen Melanome sind der Gruppe der lokalisiert wachsenden Melanome zuzuordnen. Diese Gruppe wächst diskoid und kugelig. Von der Aderhaut ausgehend werden sie zunächst durch die Leitstruktur der Bruchmembran lokal begrenzt. Die neoplas-

tische Auftreibung wächst weiter bis es zu einer fokalen Perforation der Bruchmembran kommt. Der Tumor strebt nach einer solchen Eröffnung weiter in seiner Wachstumsrichtung und dringt pilzförmig unter die sensorische Netzhaut. Diese pilzförmige Austreibung einer neoplastischen Struktur der Aderhaut ist pathognomonisch für das uveale Melanom.

Diffus wachsende Melanome orientieren sich zunächst an den Leitstrukturen, breiten sich aber in eher flacher Wachstumsrichtung in der gesamten Uvea aus. Sie durchdringen die Sklera und brechen in die Vortexvenen ein. Nach anterior kommt es zu einer diffusen Aussaat von Tumorzellen in den Glaskörperraum und das Kammerwasser. Dieser diffuse Wachstumstyp maskiert sich oft hinter sekundären Komplikationen wie der kollateralen Amotio retinae und dem akuten sekundären Glaukom.[5]

1.6. Histologische Einteilung des uvealen Melanoms

Die ursprüngliche und am weitesten verbreitete Einteilung war die Callender-Klassifikation. Sie teilt uveale Melanome in sechs Gruppen ein. Der diagnostische Prädiktionswert der Klassifikation wurde schließlich angezweifelt und 1983 die modifizierte Callender-Klassifikation publiziert.[13] Diese Einteilung ist immer noch für die Histologie uvealer Melanome gängig. Die Tumore werden in drei Gruppen eingeteilt: Melanome vom Spindelzell-Typ, epitheloidzellige und gemischtzellige Melanome. Die Spindelzellen werden wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt: Spindel-A- und Spindel-B-Zellen. Beide sind von weniger scharfen Zellgrenzen umrissen. Die Spindel-A Zellen sind länglich bis spindelförmig. Das feine Chromatin zeigt eine nukleare Fältelung, die als longitudinaler Streifen entlang der Längsachse der Zelle imponiert. Spindel-B Zellen erscheinen plumper und runder mit einem prominenten Nucleolus im Zellzentrum. Die Epitheloidzellen erscheinen als plumpe ovale Zellen mit deutlich umrissenen Zellgrenzen und großen ovalen Zellkernen, die einen prominenten Nucleolus umschließen.[14] Tumore dieses Zelltypes haben eine schlechte Prognose. Solche Melanome, in denen sich beide Zelltypen finden lassen, werden als gemischtzellig klassifiziert, wobei nicht entscheidend ist zu welchen Anteilen die Zelltypen auftreten.

Die häufigste histologische Erscheinungsform ist die der gemischtzelligen Melanome (86 %), gefolgt von dem Spindelzelltyp (9 %). Die prognostisch schlechtesten epitheloidzelligen uvealen Melanome sind mit einem Anteil von 5 % gleichzeitig auch die seltensten.[15]

1.7. Diagnostik des uvealen Melanoms

Die Diagnostik des uvealen Melanoms ist oft schwierig, da das uveale Melanom sich in seiner klinischen Ausprägung, wie bereits beschrieben, oft hinter anderen Pseudo-Symptomen verschleiert. Die Malignität tritt bei den Sekundärsymptomen dann in den Hintergrund. Die

Ophthalmoskopie sowie die Spaltlampenmikroskopie stellen die Basisdiagnostik des uveal Melanoms dar. Der Untersucher hat die Möglichkeit, die maligne Veränderung direkt zu erkennen oder indirekte Zeichen zu sehen. So ist das sogenannte „Orange Pigment“, Lipofuszin-haltiges Pigment, ein Abbauprodukt des retinalen Pigmentepithels, als orange-farbene Flecken zu erkennen. Ist der Tumor bereits durch die Bruchmembran gewachsen, lässt sich die ebenfalls sehr typische Pilzkonfiguration erkennen. Die ophthalmoskopische Untersuchung und ggf. eine Fotodokumentation eignen sich wegen der Einfachheit und der geringen Belastung für den Patienten sehr gut für Verlaufsbeobachtungen.[5]

Die Ultraschallsonographie ist ebenfalls eine nicht-invasive Methode und wird zur routinemäßigen Verlaufskontrolle eingesetzt.[16] Darüber hinaus können mit Hilfe der Ultraschallsonographie uveale Melanome von Metastasen sehr gut abgegrenzt werden. Um zwischen Melanomen und Pseudomelanomen zu unterscheiden und eine Beurteilung der Tumorvaskularisation vorzunehmen, ist die Darstellung mit der Indozyaningrün-Angiographie besser geeignet als die Fluoreszeinangiographie.[17] Beide Methoden kommen zum Einsatz, um auf dem Weg der Diagnosestellung weitere Bausteine zu liefern. Tumore der Iris und des Ziliarkörpers lassen sich gut mit dem Hochfrequenzultraschall (50 MHz) beurteilen.[18] Die Darstellung des Tumors mit der Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht eine gute Volumenbestimmung, eine Aussage über die intra- bzw. extrasklerale Ausdehnung und eine Abgrenzung der möglichen Infiltration des Sehnervs.[19]

1.8. Prognostische Faktoren

Die Sterblichkeit der Patienten, die primär am uveal Melanom erkranken, ist trotz der aktuellen Therapieverfahren mit 50 bis 60 % sehr hoch. Nur bei frühzeitigem Erkennen und geringer Ausdehnung (T1NOMO) kann durch gute lokale Tumorkontrolle eine 10-Jahres Überlebensrate von 81 % erreicht werden. Wenn zum Zeitpunkt der Diagnose schon Metastasen bestehen, liegt die Lebenserwartung bei 12 bis 14 Monaten.[20]

Bei der großen Auswahl an Therapiemöglichkeiten mit einer ebenso großen Variabilität an Nebenwirkungen, welche die Lebensqualität mehr oder weniger beeinflussen, ist die genaue Einschätzung des Tumors sehr wichtig. Unter diesem Aspekt kommt den im Folgenden aufgeführten Prognosefaktoren auch für die Therapieplanung eine große Bedeutung zu.

Zu den wichtigsten bisher bekannten Prognosefaktoren zählen die Tumorgöße, gemessen am größten Tumordurchmesser (GTD) und der Tumorhöhe, die Ziliarkörperbeteiligung, das Vorhandensein einer Sklerainvasion, eines extraskleralen Wachstums, die Invasion von Bruchmembran und Sehnerv und histopathologische und zytogenetische Faktoren inklusive des epitheloiden Zelltyps, erhöhter mitotischer Aktivität, größere Nukleoli, infiltrierende Lymphozyten und Gefäßnetzwerke.[5, 21, 22]

Ein weiterer wichtiger Faktor, der in enger Beziehung mit der Prognose des Tumors steht,

ist die Chromosomenveränderung der Zellen. Hier hat wiederum die Monosomie 3 eine herausragende Rolle unter den verschiedenen chromosomalen Aberrationen, da ca. 50 % der uvealen Melanome diese chromosomale Veränderung aufweisen.[23]

Für die Monosomie 3 konnte eine signifikant erhöhte Metastasierungsrate der von der chromosomalen Veränderung betroffenen Tumoren gefunden werden und in der Folge auch eine schlechtere Prognose *quo ad vitam*. Unter Tumoren, die nur ein Chromosom 3 besitzen, liegt die tumorfreie 3-Jahresüberlebensrate nur bei 50 %.

Es wurden für uveale Melanome auch Monosomien der Chromosome 6 und 8 beschrieben. Da diese seltener sind, spielen sie als Prognosefaktoren nur eine untergeordnete Rolle. [24]

1.8.1. Blutversorgung des uvealen Melanoms

Da die Metastasierung des uvealen Melanoms hauptsächlich hämatogen erfolgt, spielt die Blutversorgung nicht nur für die Ausdehnung des Primärtumors eine entscheidende Rolle, sondern vor allem für die Ausbreitung in anderen Geweben. [25]

Die eigene Blutversorgung und somit die grundlegende Voraussetzung für weiteres Tumorstadium, kann das maligne Gewebe durch die Rekrutierung embryonal bereits angelegter Blutgefäße sicher stellen.[26] Dieser Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet und über eine Vielzahl von Botenstoffen reguliert.

1.8.1.1. *Vasculogenic Mimicry*

Folberg beschreibt bereits 1993 neun verschiedene histologisch erkennbare Gefäßmuster.[4] Nicht alle diese Gefäßmuster korrelieren mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko. So konnte eine erhöhte Assoziation mit der Metastasierung vor allem für Gefäßnetze („*vascular networks*“) und geschlossene Gefäßschleifen („*loops*“) gefunden werden.

In dem 1999 publizierten Paper konnten Maniotis et al. zeigen, dass die aggressiven uveal Melanome auch in der Lage sind, *in vitro* in Abwesenheit von Endothelzellen solche Gefäßkanäle zu bilden und so für eine endothelfreie Vasculogenese zu sorgen. Die endothelfreien Gefäßkanäle können lichtmikroskopisch als PAS-positive Strukturen mit typischen Mustern, („*loops and vessels*“) und immunhistochemisch durch nicht ausgeprägte CD-31 Expression gesehen werden.[25] Der Nachweis der Endothelfreiheit dieser Strukturen konnte sowohl mit immunhistochemischer Färbung als auch in der Elektronenmikroskopie erbracht werden. Dieser Vorgang der endothelfreien Vasculogenese wird als „*vasculogenic mimicry*“ (VM) bezeichnet.[26] Es gibt eine positive Korrelation zwischen aggressivem Wachstum und Neigung zur Metastasierung und dem Vorhandensein von *vasculogenic mimicry*. Es ist noch unklar, welche Bedeutung das *vasculogenic mimicry* als Prognosefaktor einnimmt und durch welche molekularen Mechanismen es reguliert wird.

1.8.1.2. Endothelausgekleidete Gefäße

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Gefäßversorgung des uvealen Melanoms können neben den beschriebenen endothelfreien Gefäßkanälen in immunhistochemischen Färbungen auch solche Gefäße nachgewiesen werden, die sich mit Faktor-VIII-Antigen und dem „*cluster of differentiation*“ 31 (CD31) gleichmäßig anfärben lassen. Für den Nachweis von Endothelzellen in gefäßähnlichen Strukturen oder Gefäßen eignet sich die Anfärbung mit einer immunhistochemischen Färbung gegen CD31. Dieses Protein ist auch bekannt als „*platelet endothelial cell adhesion molecule*“ (PECAM-1). PECAM-1 ist ein 120-130 kDa großes Protein, das an den Zellbindungen endothelialer Zellen gefunden werden kann. Somit kommt es in Endothel ausgekleideten Strukturen ubiquitär vor und ist ein guter Marker für Endothel.[27] Der Nachweis von Gefäßen mit diesem Endothelmarker und solchen ohne gleichmäßige Anfärbbarkeit mit Endothelmarkern zeigt die Coexistenz beider Phänomene, der Vaskulo- und Angiogenese einerseits und dem *vasculogenic mimicry* andererseits.[25, 28]

1.8.2. Regulationsfaktoren der Blutversorgung

Die Blutversorgung durch neu entstehende Gefäße wird in uvealen Melanomen wie auch in anderen Malignomen von einer Vielzahl von Faktoren reguliert.[28] Die Vaskulogenese und die Angiogenese in malignen Strukturen kann sich ausbilden, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen Angiogeneseaktivatoren und Angiogeneseinhibitoren, dem sogenannten „*angiogenic switch*“ kommt.[29] Das *vasculogenic mimicry* wird ebenfalls von einem komplexen Regulationsmechanismus gesteuert. Zwei Proteine, die mutmaßlich an diesem Regulationsmechanismus beteiligt sind, werden im Folgenden näher beschrieben.

1.8.2.1. Caveolin-1

Das Protein Caveolin-1 (Cav-1) ist ein 21-24 kDa großes Molekül aus der Familie der Caveolinproteine mit bisher 3 bekannten Isoformen, Caveolin-1, Caveolin-2 und Caveolin-3.[30, 31] Die Caveolin-1 Proteine werden in fast allen Geweben exprimiert. Am häufigsten sind sie jedoch in Adipozyten, Muskelgewebe, Fibroblasten, in Epithelzellen und im Endothel präsent. In seiner Funktion als integriertes Membranprotein kann Caveolin-1 Teil von kolbenartigen Einziehungen der Biomembran sein, darüber hinaus liegt es in den Zellen als zytosolisches Caveolin-1 vor und kann u.a. an der Formation von Vesikeln beteiligt sein.[32]

1.8.2.1.1 Caveolin-1 Ultrastruktur

Das Molekül Cav-1 wird in zwei Isoformen gebildet (alpha und beta, siehe Abb. 1.1). Beide Isoformen werden von der gleichen messenger Ribonukleinsäure (mRNA) translatiert und

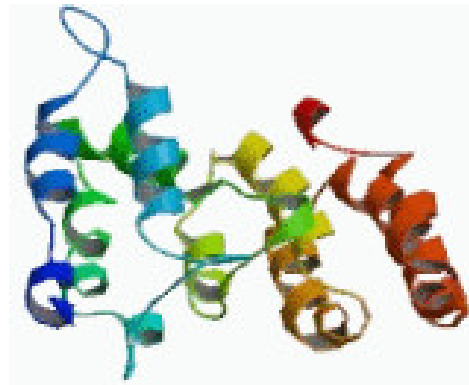


Abbildung 1.1.: Bänderdiagramm Caveolin-1 (beta-Isoform)[33]

unterscheiden sich nur in ihrer Länge. Die alpha-Isoform wird dabei in der vollen Länge translatiert und besteht aus 178 Aminosäuren. Die beta-Isoform ist das kürzere Molekül mit 31 Aminosäuren. Bei beiden Isoformen wird die hydrophobe zentrale Domäne von jeweils einem hydrophilen C-terminalen- und N-terminalen-Ende flankiert. Bei membranständigen Proteinen reichen die hydrophilen Enden in das Zytosol.

1.8.2.1.2 Physiologische Funktionen

Cav-1 interagiert sowohl mit Lipiden, als auch mit Lipid-Ankern. Diese Eigenschaft gibt ihm die Möglichkeit, sowohl beim Lipid- und Membrantransport, als auch bei der Signaltransduktion Aufgaben zu übernehmen.[32] Cav-1 spielt eine entscheidende Rolle beim intra- und extrazellulären Transport von Lipiden. Es dient dabei nicht nur als Lipidträgermolekül sondern übernimmt auch Aufgaben beim Transport der Lipide zwischen den Organellen einer Zelle. Dabei interagiert es mit rezeptorvermittelten Tyrosinkinasen und spielt eine Rolle bei der Aufnahme von „*epidermal growth factor*“ (EGF) oder dem „*autocrine motility factor*“ (AMF) in die Zellen.[32] Weiterhin ist Cav-1 an der Transcytose von Makromolekülen durch Membranen und endothelialer Zellen, so z.B. bei der rezeptorvermittelten Aufnahme von 5-Methyltetrahydrofoleat in Endothelzellen beteiligt. Cav-1 interagiert mit vielen Signalmolekülen und ist dadurch in Signaltransduktionen eingebunden.[32, 34] Es interagiert unter anderem mit dem EGF-Rezeptor und kann diesen inhibieren. Darüber hinaus kann es die Aktivierung des „*platelet derived growth factor*“ (PGF) Rezeptors hemmen, die „*mitogen-activated protein kinase*“ (MAPK) herunterregulieren, das Zellwachstum hemmen und die Apoptose hochregulieren. Eine Interaktion, mit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) im Sinne einer Hochregulation ist ebenfalls für Cav-1 nachgewiesen (siehe Abb. 1.3).[35]

1.8.2.1.3 Weitere Funktionen

Bei der Tumorgenese und Metastasierung verschiedener Tumorentitäten wurde eine Beteiligung von Cav-1 nachgewiesen.[36, 37] Während Cav-1 in gesundem Prostatagewebe

nicht nachgewiesen werden kann, zeigt sich im Prostatakarzinom eine erhöhte Expression, Caveolin-1 wird in androgen-intensiven Karzinomen Golgi unabhängig aus Proteasomen ausgeschüttet und ist assoziiert mit einer antiapoptotischen Wirkung und einem aggressiverem Tumorwachstum.[38]

Unter anderem wird für das Mammakarzinom eine vermehrte Caveolin-1-Expression in aggressiv wachsenden Tumorzelllinien beobachtet.[39]

Auch für das Magenkarzinom wurde nachgewiesen, dass die Caveolin-1-Expression mit einer negativen Prognose assoziiert ist. Es wurde eine positive Korrelation für Cav-1 mit einem fortgeschrittenen TMN-Stadium Lymphknotenmetastasen und einer schlechteren Überlebensrate gefunden.[40]

Auch beim kutanen Melanom korreliert das Expressionslevel von Cav-1 mit einer erhöhten Invasivität und Migration von Tumorzellen.[31]

1.8.2.2. Phosphoinositol-3-Kinase



Abbildung 1.2.: Bänderdiagramm der PI3K[41]

1.8.2.2.1 Ultrastruktur

Die Phosphoinositol-3-Kinase ist ein Enzym aus der Familie der Lipidkinasen (siehe Abb. 1.2). Es besteht aus einer 85 kDa großen regulatorischen und einer weiteren 110 kDa großen katalytischen Untereinheit. Unter Verbrauch von ATP phosphoryliert es Phosphatidyl-Inositol an verschiedenen Stellen, unter anderem Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat und

Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat. Es wird auf dem Chromosom 3q26,3 kodiert und gilt als Onkogen.[41]

1.8.2.2 Funktionen der PI3K

Die Phosphoinositol-3-Kinase reguliert mehrere Wachstumsprozesse. Unter anderem ist sie mit dem Platelet-derived growth factor assoziiert. Die Lipidkinase hat über viele verschiedene Signaltransduktionswege Einfluss auf die Teilung, Proliferation und Apoptose von Zellen.[44] Daneben spielt die PI3K auch eine Rolle bei der Vermittlung der Effekte des Insulins in dem Glucose- und Fettstoffwechsel.[42]

Zudem ist sie in eine Signalkaskade eingebunden, die unter anderem Einfluss auf mitogene und onkogene Prozesse durch Signaltransduktion und Feedbackmechanismen hat.[43] Bei Melanomen ist die PI3K-Signalkaskade durch genetische Alterationen häufig aktiviert.[44] Die Aktivität der PI3K-Kaskade ist auch aufgrund des Funktionsverlustes des Phosphatase und Tensin Homologs (PTEN) entweder durch Mutationen und Deletion oder Methylation hochreguliert. PTEN gilt als ein zentraler negativer Regulator von AKT mit nachfolgender Inhibition der PI3K Kaskade.[45] Der Verlust der PTEN Funktion wurde bei 10% bis 30% der Melanome gefunden.[46–48]

Bei der Entstehung des VM ist die PI3K eingebunden in eine Signalkaskade, die sich über die Hochregulation der Aktivität der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP2) und der membranständigen „*membrane type-1 matrix metalloproteinase*“ (MT1-MMP) fortsetzt (siehe Abb. 1.3).[49]

1.8.2.3. Hypothetischer Signaltransduktionsweg von PI3K im Rahmen des VM

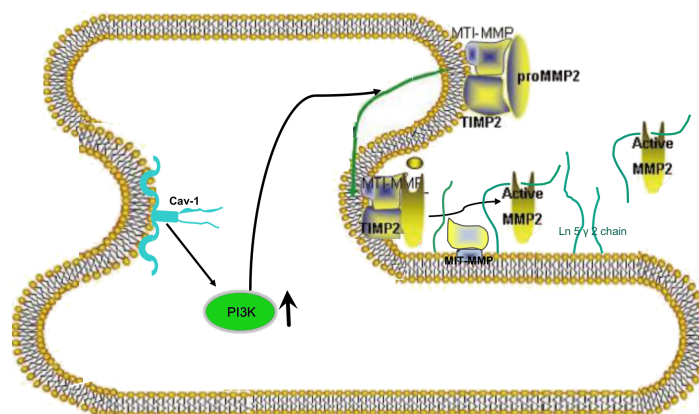


Abbildung 1.3.: Hypothetischer Signaltransduktionsweg der PI3K im Rahmen des VM. Die Aktivierung des Proteins Caveolin-1 induziert eine Hochregulation der PI3-Kinase. Die PI3K ihrerseits beeinflusst die Matrixmetalloproteinase. Beide Moleküle Caveolin-1 und PI3K nehmen über diese Signaltransduktion Einfluss auf die Entstehung des *vasculogenic mimicry*.

1.8.2.4. Endoglin

Endoglin ist ein 90-95 kDa großes transmembranäres Glykoprotein, welches auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Es besitzt eine homodimere Struktur. Im menschlichen Körper wird es vor allem in den Endothelzellen von Synziotrophoblasten der Plazenta exprimiert. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Entwicklung des Herzens. Beim Erwachsenen wird es unter anderem im Knochenmark, in weißen Blutkörperchen und in Fibroblasten exprimiert. Es bindet mit einer hohen Affinität an den Transforming Growth Factor (TGF)-beta-1 und -beta-3. Über die TGF-beta-Signalkaskade ist Endoglin als Co-Rezeptor an der Angiogenese beteiligt.[50] Endoglin zeigt eine hohe Expression im Endothel von tumorassoziierten Gefäßen und eignet sich daher gut als Marker zur Detektion der Angiogenese.[51]

1.8.2.5. vWF

Der nach dem finnischen Internisten Erik Adolf von Willebrand benannter von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein großes Glykoprotein.[52] Die Primärstruktur hat eine Größe von 225,7 kDa. Es liegt in multimerer Struktur vor. Der vWF wird in den Endothelzellen und in Megakaryozyten der Gefäßwände gebildet und in speziellen Zellorganellen, den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und Megakaryozyten sowie in den alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert. Er kann von hier aus auch in das Plasma ausgeschüttet werden. Er ist als Co-Faktor der Gerinnung sowohl an der zellulären als auch an der plasmatischen Gerinnung beteiligt. Er sorgt für eine Zell-Zell-Adhäsion der Thrombozyten bei der zellulären Gerinnung und schützt bei der plasmatischen Gerinnung den Faktor VIII vor dem Zerfall im Plasma.[53, 54] Aufgrund seiner Gefäßspezifität dient die Anfärbung des vWF hier der Detektion der Gefäße innerhalb der Melanome.

1.9. Behandlungsmöglichkeiten

Für die Behandlung des primären uvealen Melanoms haben sich während der letzten Dekade neue therapeutische Optionen ergeben. Es steht nun eine größere Fülle an therapeutischen und adjuvanten Maßnahmen zur Verfügung. Die Bandbreite reicht von der Enukleation und der chirurgischen Resektion bis hin zu konservativen Maßnahmen wie Thermotherapie und verschiedenen Formen der Radiotherapie so wie zu adjuvanten Therapien.[55] Darüber hinaus machen die akurateren diagnostischen Möglichkeiten eine Diagnosesicherung durch eine histopathologische Begutachtung unnötig.[56] Mit einer verlässlichen Diagnose im Vorfeld der Therapie kann das Hauptaugenmerk auf die therapeutischen Ziele -rezidivfreies Weiterleben und Erhalt der Sehfunktion- gerichtet werden. Der Therapeut kann aus der Fülle der Optionen ein individuelles Konzept finden und so in Absprache mit dem gut informierten

Patienten gemeinsam therapeutische Wege beschreiten. Hierbei sollte die höchste mögliche Lebensqualität für den Patienten im Vordergrund stehen. Wegweiser bei der Therapieplanung sind die Faktoren Größe und Lokalisation des Tumors, das Vorhandensein von Malignitätszeichen, wie subretinaler Flüssigkeit und Orange-Pigment, das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten sowie die Funktionsfähigkeit des betroffenen Auges und des Partnerauges. So können kleine und flache Läsionen (< 2 mm) ohne Malignitätszeichen zunächst nach dem Prinzip des „Watch and Wait“ engmaschig kontrolliert werden.[5, 21] Bei vorhandenen Malignitätszeichen oder nachgewiesenem Wachstum der Läsion sollte ein Screening und Staging erfolgen, um Fernmetastasen auszuschließen. Anschließend sollte eine Therapie eingeleitet werden. Hierzu stehen die im Folgenden beschriebenen Therapieoptionen zur Verfügung.

1.9.1. Chirurgische Therapie

Bei der chirurgischen Therapie des uvealen Melanoms sind grundsätzlich zwei therapeutische Wege zu unterscheiden: zum einen die Enukleation als das älteste und radikalste Therapieverfahren, zum anderen die bulbuserhaltende Exzision des Tumors.

1.9.1.1. Enukleation

Die Enukleation, bei der das Auge und Teile des Nervus opticus entfernt werden, ist als Therapieverfahren zunehmend in den Hintergrund getreten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Enukleation keine statistisch signifikanten Vorteile für das Überleben der Patienten mit sich bringt. Eine Enukleation ist allerdings weiterhin bei irreversiblen Sehverlust oder schlechter Sehfunktion des betroffenen Auges in Erwägung zu ziehen.[57]

1.9.1.2. Chirurgische Exzision

Durch weiterentwickelte mikrochirurgische Techniken kann auch die Resektion von Melanomen als bulbuserhaltende Therapie durchgeführt werden. Hierbei sind wiederum zwei wesentliche Techniken zu unterscheiden, die Exo- und die Endoresektion.[58] Beide Techniken unterscheiden sich vor allem durch die Art des Zugangs und werden im Folgenden in ihren Einzelheiten beschrieben. Grundsätzlich bietet die chirurgische Entfernung Vorteile gegenüber der konservativen Therapie, v.a. bei Tumoren mit einer anterior-posterioren Ausdehnung > 8 mm. Bei solchen Tumoren kann ein toxisches Tumorsyndrom und die Induktion eines sekundären Glaukoms vermieden werden. Zusätzlich besteht der Vorteil der Gewinnung histologischen Materials, was wiederum eine zytologische und zytogenetische Differenzierung erlaubt.[58] Ebenso kann die chirurgische Exzision bei unzureichendem An-

sprechen auf andere Therapien versucht werden. Okuläre Kontraindikationen sind diffuses extraokuläres Wachstum, eine Sehnervenerbeteiligung und eine Beteiligung des Ziliarkörpers von mehr als einem Drittel oder ein inoperabler Winkel.[59] Weiterhin sind natürlich post- und intraoperative Komplikationen bei der Risikoabwägung mit zu bedenken.

1.9.1.2.1 Endoresektion

Die Endoresektion zeigte sich in Studien als gute Therapieoption bei Melanomen am posterioren Pol und als sogenannte neoadjuvante Kombinationstherapie nach vorangegangener Bestrahlung zur Vermeidung eines toxischen Tumorsyndromes.[58] Bei der Endoresektion wird zunächst eine Vitrektomie durchgeführt, um einen tranretinalen Zugang zu erreichen. Im Anschluss wird die Netzhaut über dem Tumor durchtrennt und der darunter liegende Tumor exziiert. Die Netzhaut wird im Anschluß mittels Endolaser und Kryokoagulation fixiert und zur Stabilisierung wird der Auginnenraum für mehrere Wochen mit Silikonöl gefüllt.[58, 59]

1.9.1.2.2 Exoresektion

Bei der Exoresektion wird ein transskleraler Zugang gewählt. Zunächst wird die Sklera über dem Tumoreal präpariert und die Ränder des durchscheinenden Tumors werden markiert. Anschließend wird der Tumor mit dem anhaftenden Skleranteil von der Netzhaut abgelöst. Die Defektdeckung erfolgt durch eine vorher präparierte Skleralamelle. Eine anschließende Vitrektomie und Gastamponade sorgen für das Anhaften der übrigen Retina.[58, 59]

1.9.2. Konservative Therapie

Die ersten bulbuserhaltenden Therapieversuche wurden bereits 1930 von Forster und More unternommen. Ihnen gelang es, durch die transsklerale Implantation von Radiopartikeln in ein ziliochoroidales Melanom eine Verkleinerung der Tumorgöße um 75 % zu erreichen. Der in Wuppertal geborene Augenarzt Dr. Mayer-Schwickenrath führte 1953 die erste Xenon-Photokoagulation zur Behandlung eines Aderhautmelanoms durch. Bereits 1960 beschreibt der Londoner Augenchirurg H.B. Stallard die episklerale Anbringung von Kobalt-60 Plaques.[60, 61] Inzwischen stellen die konservativen Therapieverfahren eine gute Alternative dar und schneiden in Studien im Vergleich zu chirurgischen Verfahren auch hinsichtlich der Überlebensrate gleich gut oder besser ab.[57] Ziel der im Folgenden beschriebenen Therapieverfahren ist immer, Volumenverminderung und eine weitgehende Zerstörung des Tumorgewebes bei gleichzeitigem Funktionserhalt des Auges zu erreichen.

1.9.2.1. Brachytherapie

Bei der Brachytherapie werden kleine Strahlenapplikatoren, sog. Plaques, direkt über dem Tumor auf die Sklera aufgenäht. Die Brachytherapie ist aufgrund ihrer guten Gewebspenetration und der guten Steuerbarkeit der Gewebsdosis sehr geeignet zur Therapie von uvealen Melanomen. Bei diesem Therapieverfahren wird der Strahlenträger in direkten Kontakt mit dem erkrankten Auge gebracht.[57] Grundsätzlich werden zwei Radioisotope für die Therapie verwendet: Ruthenium-106 und Jod-125. Beide Radioisotope können vor allem an der Tumorbasis besonders hohe Strahlendosen erzielen und damit eine gute lokale Tumorkontrolle erreichen. Als Nebenwirkungen dieser Therapie treten Makulopathie, Katarakt und ein sekundäres Glaukom auf.[57]

1.9.2.2. Teletherapie

Zur Teletherapie zählen die Protonenbestrahlungen mit dem Teilchenbeschleuniger und die stereotaktische Photonenbestrahlung. Im Gegensatz zur Brachytherapie besteht hierbei kein direkter Kontakt zwischen Strahlenquelle und Gewebe.[3]

1.9.2.2.1 Bestrahlung mit Protonen

Die im Teilchenbeschleuniger (Zyklotron) mit hohen Energien beschleunigten Teilchen, können bei der Behandlung auf ein sehr kleines Zielvolumen gelenkt werden. Die Protonenstrahlung hat einen genau umschriebenen Dosisverlauf. Es kann eine möglichst geringe Eindringdosis gewählt werden und die abgegebene Energiedosis nähert sich außerhalb des Zielgebietes fast Null. Dadurch ist der Schaden für das umgebende Gewebe sehr gering. So können auch Tumore in der Nähe von strahlenempfindlichen Strukturen, z.B. Makula oder Papille bestrahlt werden. Diese Therapie erfordert allerdings einen hohen logistischen Aufwand und eine enge Zusammenarbeit zwischen Augenarzt, Strahlentherapeut und Medizin-Physiker und ist daher nur wenigen Patienten zugänglich.[62]

1.9.2.2.2 Stereotaktische Bestrahlung

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Präzisionsbestrahlung mit ionisierenden Strahlen. Die ionisierende Strahlung erzeugt einen DNA-Schaden im Zielgewebe und bewirkt so eine Volumenverkleinerung des Tumors. Bei der stereotaktischen Bestrahlung oder dem Gamma-Knife werden die räumliche Lokalisation des Tumors berechnet und entweder in einer Einzelbestrahlung (Gamma-Knife) oder in einer fraktionierten Bestrahlung appliziert. Auch dieses Therapieverfahren erreicht eine gute Tumorkontrolle.[57]

1.9.2.2.3 Transpupilläre Thermotherapie (TTT)

Diese Therapie wurde ursprünglich als adjuvante Therapie zur Brachytherapie entwickelt und stellt nun vor allem für kleinere posterior gelegene Tumore eine echte Alternative zur Brachytherapie dar. Bei der transpupillären Thermotherapie wird durch eine Infrarotdiode-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 810 nm eine Hyperthermie (46 – 60°C) im Tumorgewebe erzeugt. Durch diese Hyperthermie kann das weniger hitzebeständige Tumorgewebe zerstört und das Volumen des Tumors so verringert werden.[63]

1.9.2.2.4 Charged-particle therapy

Bei dieser Therapie wird mit Helium (He⁺) oder Carbon-Ionen behandelt. Die Besonderheit dieser Bestrahlung ist, dass durch die Ionen ihr Dosismaximum im Zielgewebe erreicht wird und dann sehr schnell absinkt. So kann das Umgebungsgewebe geschont werden und dadurch kommt es bei dieser Therapie zu weniger Retinopathien und Katarakten.[57]

1.10. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Das primäre uveale Melanom besitzt trotz einer erfolgreichen lokalen Tumorkontrolle eine Letalität von 50%. Daher ist die Identifikation von Regulationsfaktoren und Prognosefaktoren von zentraler Bedeutung. Die Blutversorgung des uveal Melanoms ist ein wichtiger Prognosefaktor nicht nur für das Wachstum des Tumors selbst sondern auch für die Metastasierungsrate, welche wiederum ein wichtiger Faktor für die Prognose *quo ad vitam* ist. Es ist bekannt, dass maligne Melanome der Aderhaut ihre Blutversorgung neben einer Gefäßeinsprossung aus bereits vorbestehenden Gefäßen auch über das sogenannte *vasculogenic mimicry* beziehen.[26] Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Metastasierungsrate mit einem erhöhten VM verbunden ist. Die PI3K stellt ein wichtiges Schlüsselprotein in der Kaskade zur Hochregulation der VM dar. Die PI3K ihrerseits wird durch ein Protein aus der Caveolinfamilie, Caveolin-1, reguliert.[49]

Zielsetzung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression von Cav-1 und PI3K und der Metastasierungsrate gibt. Zudem soll die Regulation des *vasculogenic mimicry* in primären uveal Melanomen durch die Caveolin-1 / Phosphoinositol-3-Kinase untersucht werden. Es soll die Korrelation zwischen der Expression von Cav-1 und PI3K einerseits und den bekannten Prognosefaktoren andererseits gezeigt werden. Darüber hinaus wurde in die Ausprägung von VM an den Präparaten der zu untersuchenden Gruppe mittels einer Färbung mit CD31 und Perjod-Schiff-Acid (PAS) nachgewiesen. Eine Analyse der Angiogenese erfolgte anhand der Expression von Endoglin. Das Vorhanden-

sein von VM und Angiogenese wurde ebenfalls als Tumorprognosefaktoren mit den Proteinen PI3K und Caveolin-1 korreliert.

Kapitel 2.

Material und Methoden

2.1. Probenmaterial und Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden 51 Parafinschnitte von malignen Aderhautmelanomen immunhistochemisch gefärbt. Es handelte sich um Präparate von enukleierten Augen, die im Zeitraum 1978 und 2003 an der Universitätsaugenklinik Tübingen operiert wurden. Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war ein ausreichender Nachuntersuchungszeitraum von mindestens 6 Jahren. Es wurden enukleierte Augen aus klinisch und pathologisch gut charakterisierten Fällen eingeschlossen. Unter den 51 untersuchten Fällen waren 30 (56,9 %) metastasierte Tumore und 21 (41,2 %) nicht-metastasierte Tumore. Bei den 30 metastasierten Fällen traten die Metastasen durchschnittlich nach 3 Jahren (Median $\pm$ StA: 3 $\pm$ 2,3 Jahre) auf und die Patienten verstarben im Verlauf an den Folgen der Metastasen. Die nicht metastasierten Fälle wurden für 10 Jahre (Median $\pm$ StA: 10 $\pm$ 2,7 Jahre) nachbeobachtet. Im Patientenkollektiv sind 20 Frauen und 31 Männer und der Altersmedian lag bei 64 Jahren (Spannweite: 31-90).

Ohne weitere Vorbehandlung wurden 35 Tumore reseziert. Die übrigen 16 Tumore wurden vor der Entfernung mit einer Bestrahlung vorbehandelt.

Alle weiteren klinischen und histologischen Charakteristika mit Ausnahme eines Tumors, zu dem die Basisdaten nicht vorlagen, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.[64]

Tabelle 2.1.: Klinische Daten und Tumorcharakteristika der untersuchten Tumore

Variabel	Insgesamt	Metastasen	Keine Metastasen	p-Wert
	51	30	21	
Anzahl (Jahre)				0,856
Median	64	64	64	
Spannweite	31-90	31-90	38-85	
Geschlecht				0,711
Weiblich	20 (39,2 %)	12 (23,5 %)	8 (15,7 %)	
Männlich	31 (60,8 %)	18 (35,3 %)	13 (25,5 %)	
GTD (mm)¹				0,162
Median	15,5	16	15	
Spannweite	5-30	10-30	5-28	
Höhe (mm)⁸				0,258
Median	7	7,5	6	
Spannweite	2-22	2-22	2-12	
TNM-Klassifikation³				0,258
Stadium 1	5 (10,4 %)	0 (0,0 %)	5 (10,4 %)	
Stadium 2	10 (20,8 %)	6 (12,5 %)	4 (8,3 %)	
Stadium 3	18 (37,5 %)	13 (27,1 %)	5 (10,4 %)	
Stadium 4	15 (31,3 %)	10 (20,8 %)	5 (10,4 %)	
Ziliarkörperbeteiligung¹	22 (44,0 %)	16 (32,0 %)	6 (12,0 %)	0,107
Sklerainvasion¹	48 (96,0 %)	28 (56,0 %)	20 (40,0 %)	0,243
Extrasklerale Extension²	8 (16,3 %)	6 (12,2 %)	2 (4,1 %)	0,325
Invasion				
der Bruchmembran¹	29 (58,0 %)	18 (36,0 %)	11 (22,0 %)	0,728
des Sehnerven¹	3 (6,0 %)	2 (4,0 %)	1 (2,0 %)	0,788
Histologischer Subtyp¹				
Epithelioid	9 (17,7 %)	9 (17,7 %)	0 (0,0 %)	0,006
Gemischtzellig	22 (43,1 %)	11 (21,6 %)	11 (21,6 %)	
Spindelzell-Typ	20 (39,2 %)	10 (19,6 %)	10 (19,6 %)	
<i>vasculogenic mimicry</i>	26 (51,0 %)	20 (39,2 %)	6 (11,8 %)	0,018

GTD: Größter Tumordurchmesser, mm: Millimeter, *hochgestellte Zahlen*: fehlende Daten, p-Wert nach Mann-Whitney-U-Test, TNM: Tumor Nodes Metastases

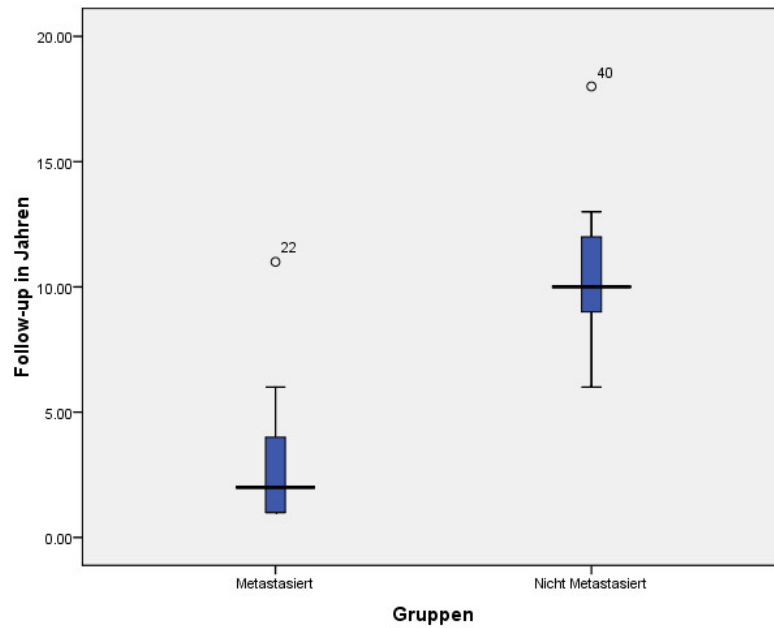


Abbildung 2.1.: Boxplot Diagramm: Follow-up in Jahren für metastasierte und nicht metastasierte Tumore

2.1.1. Positivkontrollen

Caveolin-1	Cervixcarcinom; Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck
CD 31	Magenmukosa; Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck
Endoglin	Appendix; Institut für Pathologie, Eberhard Karls Universität Tübingen
PAS	Magenmukosa; Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck
PI3K	Cervixcarcinom; Institut für Pathologie, Universität zu Lübeck
vWF	Appendix; Institut für Pathologie, Eberhard Karls Universität Tübingen

2.1.2. Primärantikörper

Caveolin-1	Mouse monoclonal[7C8]to Caveolin-1 (ab17052) abcam, Cambridge, UK
CD31	Mouse monoclonal, Mouse-Anti-Human CD31 Endothelial Cal, Clone JC70A, Dako, Glostrup, Denmark
Endoglin	Mouse Mab, Clone SN6h, Dako, Glostrup, Denmark
PI3K	Rabbit polyclonal p85 alpha (ab71952) abcam, Cambridge, UK
vWF	Mouse Mab, Clone F8/86, Dako Glostrup, Denmark

2.1.3. Sekundärantikörper

Alexa-488 (Goat Anti-Mouse) IgG	Invitrogen, Kalifornien, USA
Anti Mouse Monoklonal	Dako, Glostrup, Denmark
Cy-3 (Anti Rabbit Polyclonal)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Goat Anti-Mouse IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.4. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.1.4.1. Chemikalien

3-Diaminobenzidine	Fluka Chemie Buchs, St. Gallen, Schweiz
Alkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aqua Dest	Eigenherstellung, Labor der Klinik für Augen- heilkunde, Universität zu Lübeck
Bovines-Serum-Albumin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAB-Substratpuffer	DCS-Chromoline, Hamburg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entalan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure, 1 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formalin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCL)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka Chemie Buchs, St. Gallen, Schweiz
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mowiol-488	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	McComick, VWR, USA
Perjodsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Trizma Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Mullinkordt Barker, Holland
Zitronensäuremonohydrat (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4.2. Rezepte für angesetzte Lösungen

Bleichlösung:	3 % H_2O_2 ,5 % KOH; 1 % , Na_2HPO_4
Blockierungspuffer:	3 g Bovines Serum Albumin mit 100 ml PBS + 0,3 ml Tritan-X-100 mischen, steril filtrieren und bei 4 ° C lagern
Hämalaun nach Mayer[65]:	1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest gelöst, 0,2g Natriumiodat (NaJO_3), 50 g Kaliumalumi- niumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronen- säure
Mowiol:	6,0g Glycerin, mit 2,4g Mowiol 4-88 mit 6,0ml Aqua dest, 12,0 ml Tris-HCL (pH 8,5) 2 h bei 50 °C inkubieren und alle 20 min für 2 min auf dem Magnetrührer rühren 8,9 g NaCl, 0,2 g KCl
PBS:	1,15 g Na_2HPO_4 0,2 g KH_2PO_4 100 ml Aqua dest
Sulfitwasser:	100 ml Aqua dest; 5 ml 1 N HCL; 5 ml Na-Disulfit 10 % 6,5 g tris
TBS:	8,77g NaCl, 1000 ml Aqua dest auf pH5 einstellen
Tris-Puffer:	12,114 g tris in 1 L Auqua dest lösen
Zitratpuffer:	2,1 g Zitronensäuremonohydrat in 1000 ml Aqua dest mit 2 N NaOH; pH 6 einstellen mit 2 N NaOH

2.1.4.3. Verbrauchsartikel

Alufolie	lab logistics group, Meckenheim, Deutschland
Deckgläser 20 x 40 mm; 24 x 60 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Monovetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger Superfrost	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Wischtücher (WYPALL)	Kimberly Clark, Koblenz, Deutschland

2.1.5. Laborgeräte

Auflichtmikroskop Standard 20	Zeiss, Oberkochen, Deutschland,
Feinwaage (BP 121 S)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzkamera (DFC 350)	Leica, Wetzlar, Deutschland,
Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 6000B)	Leica, Wetzlar, Deutschland,
Fotodose	Deutschland
Kühlschrank 4°C (Liebherr Comfort)	Liebherr International GmbH, Bierbach, Deutschland
Kühlschrank -20°C (Liebherr No Frost)	Liebherr International GmbH, Bierbach, Deutschland
Labor Mixer (RS 2)	Werner Hasse GmbH, Lübeck, Deutschland
Laborwaage (Sartorius portable)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Mikroskop (Leica DMI 6000B)	Leica, Wetzlar, Deutschland
PH-Meter (Multi Cal pH 538)	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu, INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Reiskocher (Multi Gourmet 31226)	Braun, Neu-Isenburg, Deutschland
Rührer (MR 3001)	Heildorph GmbH und Co KG, Deutschland
Schüttler (Unimax 2010)	Heildorph GmbH und Co KG, Deutschland

2.1.6. EDV

Bildauswertung (Image -J)	National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA
Mikroskopische Bildverarbeitung (Leica AF)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Statistik (SPSS für Windows)	Version 16, Icn, Chicago, Illinois, USA

2.2. Allgemeine Methoden

Die Untersuchung bestand aus zwei verschiedenen immunhistochemischen Färbereien, deren Protokolle im Folgenden beschrieben werden.

Die Auswertung war entsprechend der Färbungen unterschiedlich. Die verschiedenen Methoden der Auswertung werden ebenfalls im Einzelnen beschrieben.

2.2.1. Verschlüsselung der Patientendaten

Allen in die Studie eingeschlossenen Präparaten wurde beim Eingang ins Labor eine fortlaufende Nummer zugeordnet. Die Untersuchungsdaten sind nun nur noch mit dieser Nummer verknüpft.

2.2.2. Beobachter

Die Auswertung am Mikroskop wurde von zwei unabhängigen Beobachtern [Julia Lüke (JL), Miriam Stenzel (MS)] vorgenommen. Beide Beobachter wurden vorher in den Grundlagen der Mikroskopiertechnik, in der Bedienung des Bildbearbeitungsprogrammes Image J, sowie in der Bedienung der zur Auswertung benötigten Software geschult. Beide Beobachter konnten unter den gleichen Bedingungen mikroskopieren, die Bilder betrachten und unabhängig voneinander ihr Ergebnis finden.

Bei abweichenden Ergebnissen schauten die Beobachter gemeinsam ein drittes Mal das Präparat an und das häufiger gewählte Ergebnis wurde als richtig betrachtet.

Die Beobachter waren hinsichtlich der klinischen und histologischen Daten der präparierten Tumore verblindet. Die Tumordaten wurden erst im späteren Verlauf des Experimentes eingesehen.

2.3. Vorbereitung der Gewebeproben auf die Färbung

Die enuklierten Augen wurden zur Fixierung mindestens 48 Stunden (h) in vier prozentigem Formalin gelagert. Vor der weiteren Fixierung wurden die Augen angeschnitten und in einer aufsteigenden Reihe mit siebenzigprozentigem bis hundertprozentigem Isopropylalkohol entwässert.

2.3.1. Einbettung in Paraffin und Herstellung der Schnitte

Die entwässerten Präparate wurden dreimalig mit flüssigem Paraffin übergossen und über Nacht ruhen gelassen. Die in Paraffinblöcke eingebetteten Augen wurden im nun folgenden Schritt in vier µm dünne Scheiben geschnitten und auf Superfrost Objektträger gezogen.

2.3.2. Entparaffinierung

Die in den beiden bereits beschriebenen Schritten hergestellten Präparate mussten vor der Färbung wieder entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurde die absteigende Alkoholreihe benutzt.

Die absteigende Alkoholreihe bestand aus insgesamt 11 Küvetten, von denen jeweils drei mit Xylol gefüllt waren, je zwei mit 100 prozentigem Alkohol, weitere zwei mit 90 prozentigem Alkohol, und jeweils eine mit 80 prozentigem, 70 prozentigem und 50 prozentigem Alkohol. In jede der Küvetten wurden die Präparate zum Entparaffinieren für 5 Minuten eingetaucht. Im Anschluss an das Bad in 50 prozentigem Alkohol konnten die Schnitte dann für 5 Minuten in Aqua dest überführt werden.[65]

2.4. Färbung mit PI3K und Caveolin-1

Die hier verwendeten Antikörper wurden gemäß der Vorgaben der Hersteller gelagert. Soweit nicht anders beschrieben wurden bei Konzentrationen und Einwirkzeiten jeweils die Empfehlungen des Herstellers gewählt.

2.4.1. Protokoll der Färbung

Die 51 Schnitte wurden als erstes in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend für fünf Minuten in Aqua dest auf dem Schüttler gewaschen. Zur Demaskierung

wurden die Präparate dann im 20 Minuten (min) vorgeheizten Reiskocher in Zitratpuffer (Rezept siehe 2.1.4.2) für 30 Minuten gekocht. Nach dem Kochen konnten die Präparate für 20 Minuten in dem Zitratpuffer abkühlen, bevor sie weiter behandelt wurden.

Anschließend wurden die Schnitte in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), dreimalig für jeweils fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen.

Danach wurde jeder Schnitt mit 500 µl Blockierungspuffer bedeckt und für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Der Blockierungspuffer setzte sich zusammen aus 3 % bovinem Serum-Albumin (BSA) in PBS gelöst und 0,3 % Tritan-X-100. Bei diesem Schritt werden unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper blockiert, um Störsignale auszuschalten.

Im Anschluss wurden die Antikörper Caveolin-1 und PI3K (siehe 2.1.2) jeweils in der Konzentration 1:100 mit dem oben beschriebenen Blockierungspuffer angesetzt. Die Präparate wurden alle mit 250 µl der angesetzten Antikörperlösung bedeckt und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden alle Präparate zunächst dreimalig für je fünf Minuten auf dem Schüttler in PBS gewaschen.

Es folgte die Färbung mit den Sekundärantikörpern. Die Sekundärantikörper tragen die Fluoreszenzmarkierung. Es handelt sich um Immunglobulin G (IgG) Antikörper, die sich gegen die Spezies des Primärantikörpers richten. Sie binden an den Primärantikörper und machen alle Bindungsstellen des Primärantikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Da die Fluoreszenzfarbstoffe sehr empfindlich gegenüber Licht sind, mussten alle folgenden Färbeschritte im Dunklen durchgeführt werden.

Der Sekundärantikörper CY-3 richtet sich gegen Kaninchen und markiert alle Stellen, an denen vorher PI3K gebunden hat. Der Antikörper Alexa-488 richtet sich gegen die Spezies Maus und markiert alle Stellen, an denen zuvor Caveolin-1 gebunden hat.

Beide Sekundärantikörper wurden im bereits beschriebenen Blockierungspuffer angesetzt, CY-3 in der Konzentration 1:200 und Alexa-488 in der Konzentration 1:100. Die Objektträger wurden gleichmäßig mit ca. 300 µl der Lösung bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert.

Im Anschluss folgte wieder ein Waschschrift auf dem Schüttler dreimal für je fünf Minuten in PBS. Auch hier wurden die Küvetten in Alufolie gewickelt, um die Präparate möglichst nicht mit Licht in Kontakt kommen zu lassen.

Als nächstes wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Dies diente zur besseren Orientierung beim Mikroskopieren. Der Farbstoff DAPI wurde zu 1 µg / ml in PBS gelöst und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit in der feuchten Kammer inkubiert. Nun wurden alle Präparate ein weiteres Mal in PBS gewaschen und auf dem Schüttler zweimal für je fünf Minuten platziert.

Zuletzt wurden die Präparate mit dem wasserlöslichen, nicht fluoreszierenden Eindeckmedium Mowiol luftblasenfrei eingedeckt und bei 4°C in lichtundurchlässigen Kästen gelagert.[65]

2.4.2. Auswertung am Mikroskop

Die Auswertung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Präparate wurde spätestens vier Tage nach der Färbung vorgenommen. Eine zügige Auswertung am Mikroskop ist wichtig, da die fluoreszierenden Anteile des Farbstoffes sonst verblassen würden. Die Präparate wurden in einem verdunkelten Raum unter dem Leica-Mikroskop, DMI 6000 mit der Fluoreszenzkamera DFC 350 betrachtet. Die Fluoreszenzkamera war mit dem Mikroskop verbunden und übertrug das Okularbild auf einen angeschlossenen Monitor. Die übertragenen Daten wurden von dem Programm Leica AF 6000 verarbeitet.

An der Kamera wurden folgende Einstellungen gewählt:

Für den Fluoreszenzfarbstoff CY-3 (Bindungsstellen von PI3K):

- Lampenfilter: Y3, Ex: 545/30
- Intensität: 4
- Exposition: 292 s
- Gain: 2

Für Alexa-488 (Bindungsstellen von Caveolin-1):

- Lampenfilter: L5, Ex: 460/40
- Intensität: 5
- Exposition: 410 s
- Gain: 2,7

Durch diese Einstellung wurde erreicht, dass die Bindungsstellen des PI3K unter dem Filter Y3 in rot leuchtend zu sehen waren und die Bindungsstellen von Caveolin-1 unter dem Filter L-5 grün leuchtend zu sehen waren. Die Zellkernfärbung leuchtete unter dem für DAPI vorgesehenen Filter in blau.

Zunächst wurden, sofern es möglich war, Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung Aufnahmen von folgenden Strukturen gemacht:

- Hornhaut (HH)
- Iris
- Ziliarkörper (Cil)
- Netzhaut (NH)
- Aderhaut (AH)

Nicht in allen Präparaten konnten alle Gewebe gleich gut abgebildet werden, da die Gewebe teilweise schon durch die zytotoxische Behandlung der Patienten zerstört worden waren. Weiterhin waren nicht immer alle Teile des Auges mit angeschnitten und somit nicht immer auf dem Objektträger gut sichtbar. Die fotografierten Gewebe wurden mit ausgewertet und die Anzahl der ausgewerteten Präparate wurde für jedes Gewebe mit angegeben (siehe Abb. 2.2-2.5).

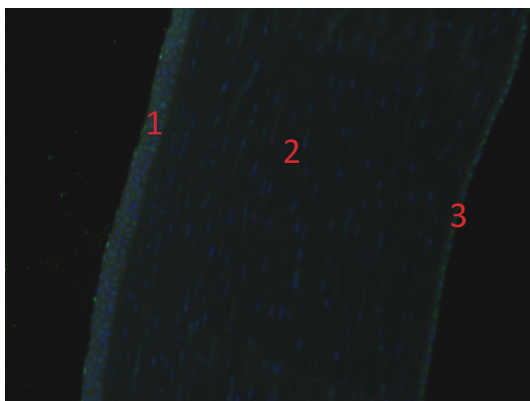


Abbildung 2.2.: Fluoreszenz-Aufnahme der HH in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild. Auf diesem Bild der HH kann man am linken Bildrand (1) das Epithel mit einer deutlichen DAPI Kernfärbung und einer schwachen Caveolin-1 Färbung erkennen. Auch im Stroma (2) und im Endothel (3) sind die in blau angefärbten Zellkerne deutlich erkennbar.

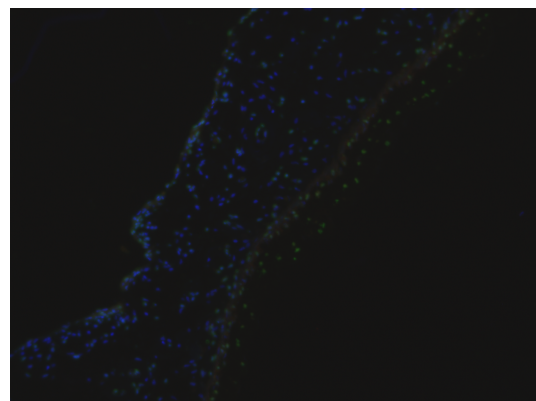


Abbildung 2.3.: Fluoreszenz-Aufnahme der Iris in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild. Diese Abbildung zeigt die Iris eines von einem metastasierenden Tumor betroffenen Auges. Das Auge wurde nach erfolgter Strahlenbehandlung enukleiert. Auch hier erkennt man die mit DAPI angefärbten Zellkerne in blau und wenige grüne Caveolin-1 positive Zellen.

Danach wurde der Tumor selbst aufgesucht und mit allen drei oben beschriebenen Filterlampen wurden in 400-facher Vergrößerung 10 randomisierte Aufnahmen aus dem Tumorgewebe gemacht (siehe Abb. 2.7- 2.10).

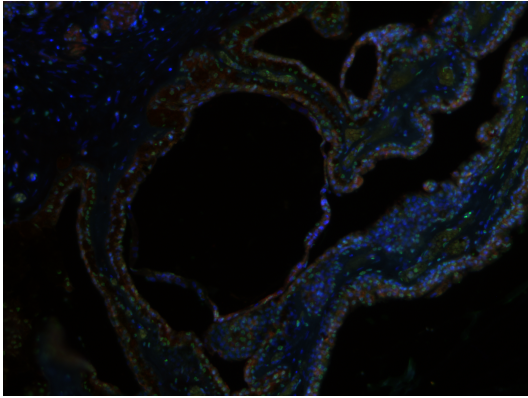


Abbildung 2.4.: Fluoreszenz-Aufnahme des Ziliarkörpers in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild: Ziliarkörper eines präparierten Auges mit metastasiertem Tumor und Ziliarkörper-Invasion. Neben der Kernfärbung (blau) sind auch Caveolin-1 positive Zellen (grün) und PI3K positive (rot) zu sehen. Die Tumordinvasion ist auf diesem Bildausschnitt nicht sicher zu erkennen.

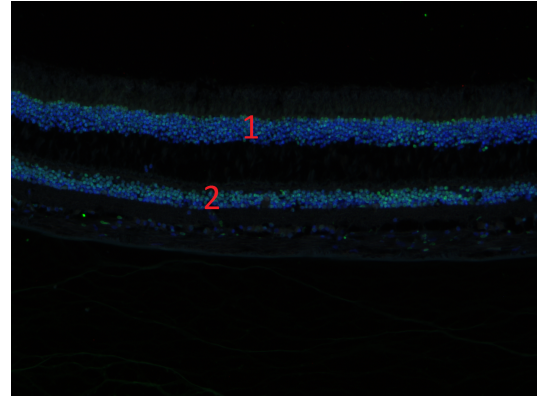


Abbildung 2.5.: Fluoreszenz-Aufnahme der NH in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild: Präparat eines Tumors, der im Verlauf metastasierte. Gut zu erkennen sind das Stratum nucleare internum (1) mit den blau leuchtenden Zellkernen des 2. Neurons der Sehbahn und das Stratum nucleare externum (2) mit den blau gefärbten Zellkernen der Photorezeptorzellen.

Zu jedem Präparat wurden sowohl die 3 Filter übereinander gelagerten Bilder als auch die Einzelkanal-Aufnahmen als Tagged Image File Format (TIFF) Bilddatei gespeichert.

2.4.3. Computergestützte Auswertung der Bilder

Die Bilder wurden von zwei unabhängigen Beobachtern (JL und MS) mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image-J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) ausgewertet. Beide Beobachter waren hinsichtlich der Metastasierung und der weiteren klinischen und histologischen Daten verblindet. Sie arbeiteten mit dem gleichen Programm und folgenden festgelegten Einstellungen:

- 10 Bilder pro Präparat als Imagestack zusammengefasst
- Grid: 3,5 Inch

Auf diese Weise wurden über jedes Bild ein Raster (Grid) gelegt und für jedes Präparat konnten 680 quadratische Kästchen mit einer Kantenlänge von 3,5 Inch ausgezählt werden. Es war festgelegt, dass ein Kästchen dann als positiv gewertet wird, wenn mindestens 50 % der Bildfläche positiv war. Die prozentuale Expressionsrate wurde aus der Zahl der positiven Felder $\cdot 100 / \text{Anzahl aller Felder}$ errechnet. Ebenfalls wurde die prozentuale zelluläre Expressionsrate bestimmt gemäß folgender Formel: die Zahl der positiven Felder $\cdot 100 / \text{Anzahl aller}$

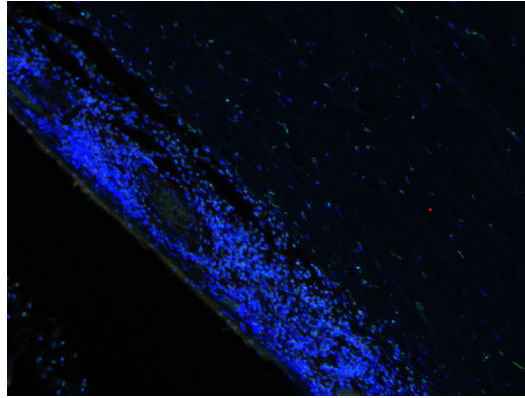


Abbildung 2.6.: Fluoreszenz-Aufnahme der AH in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild. Hier ist die Aderhaut eines Präparates mit einem nicht metastasiertem Tumor gezeigt. Das Auge dieses Präparates wurde mit Bestrahlung behandelt. Man erkennt die blaue, von vielen Gefäßen durchsetzte Struktur. Auch hier ist die Hauptfärbung die blauen Zellkerne der DAPI Färbung. Die Gefäße sind schwach positiv mit Caveolin-1 angefärbt.

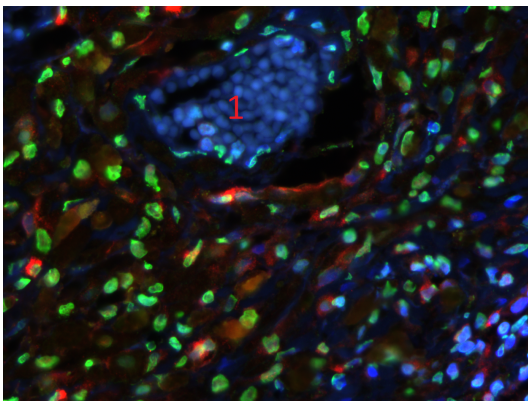


Abbildung 2.7.: Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung; 3 Kanalbild. Diese Abbildung zeigt die Zellen eines Tumors einer 74 Jahre alten Frau. Der Tumor wurde mit Bestrahlung behandelt und metastasierte. Am oberen Bildrand ist ein quer angeschnittenes Blutgefäß zu erkennen.(1) Die Kerne der darin verbliebenen Leukozyten färben sich blau.

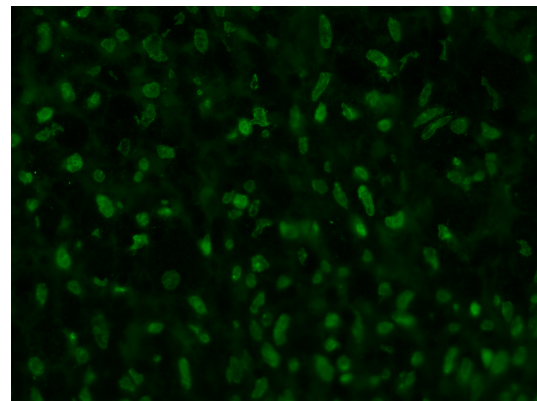


Abbildung 2.8.: Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter L5. Hier sind die Bindungsstellen des Caveolin-1 mit Alexa-488 angefärbt, sie leuchten unter dem Filter grün. Es ist das Präparat eines metastasierten Tumors vom gemischtzelligen Typ.

Felder. Die Präparate wurden ihrer Intensität entsprechend in 4 Gruppen unterteilt: niedrige Expression (0-24 %): 1; moderate Expression (25-49 %): 2; mittelgradige Expression (50-74 %): 3 und hohe Expression (> 75 %): 4.

Eine zusätzliche objektive Auswertung wurde mit Image-J vorgenommen, hierbei errechnet das Programm mit der Formel, $V = (R+G+B)/3$, Helligkeitswerte aus den Bildpunkten (pixel).[66] Dieser objektive Mittelwert wurde ebenfalls von beiden Beobachtern ermittelt und in die Tabelle eingetragen. Am Ende des Auszählens wurde die prozentuale mittlere Intensität

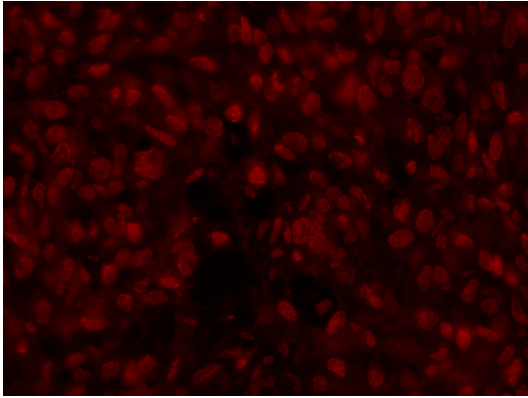


Abbildung 2.9.: Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter Y3. Hier sind die Bindungsstellen der PI3K erkennbar; der gebundene sekundäre Antikörper CY3 in rot. Das Präparat entstammt einem metastasierten Tumor vom gemischtzelligen Typ, der extrasklerales Wachstum zeigte und den Ziliarkörper invadierte.

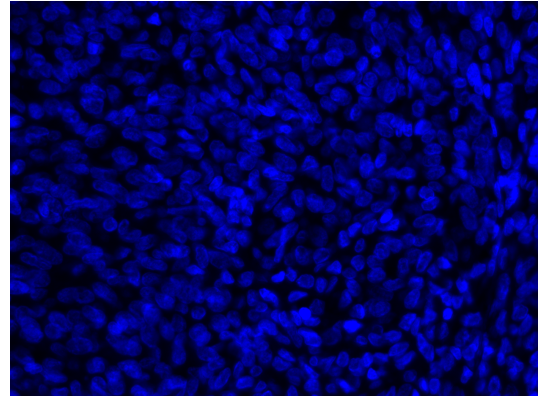


Abbildung 2.10.: Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter für DAPI. Diese Abbildung zeigt die Kernfärbung mit DAPI. Hier leuchten alle Zellkerne gleichmäßig blau.

der Fluoreszenz als Mittelwert der Helligkeit der gefärbten Flächen für jeden Marker in der Einzelkanalaufnahme bestimmt. Die Eingruppierung der Intensität erfolgte entsprechend der zellulären Expressionsrate. Aus der zellulären Expressionsrate $\cdot$ Expressionsintensität $\cdot 100/16$ wurde die finale prozentuale Expressionsrate ermittelt.

Des Weiteren erfolgte noch eine subjektive Eingruppierung der Zellzahl und der Fluoreszenzintensität durch beide Beobachter unabhängig voneinander. Präparate mit abweichenden Eingruppierungen wurden von beiden Beobachtern gemeinsam betrachtet. Die ermittelten Zahlen wurden, entsprechend dem bereits für die objektiven Werte beschriebenen Verfahren, ausgewertet. Die Studienauswertungen waren konform zu den Richtlinien der Erklärung von Helsinki, wie sie in Tokyo und Venedig überarbeitet wurden und erfolgten nach Genehmigung durch das zuständige Ethikinstitut.

2.5. Färbung mit CD31 und Perjod Acid Schiff

2.5.1. Protokoll der Färbung

Für die Doppelfärbung mit CD31 und Perjod Acid Schiff (PAS) wurden die Schnitte zunächst in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Im Anschluss wurden alle Präparate für mindestens fünf Minuten in Aqua dest gelagert. Stärker pigmentierte Tumore wurden nun mit 3 % H_2O_2 , 0,5 % KOH und 1 % Na_2HPO_4 gebleicht. Die Bleichzeit war abhängig vom Grad

der Pigmentierung und der Reaktion auf das Bleichmittel. So wurden die Präparate während des Bleichens unter dem Mikroskop (Zeiss Standard 20) bei 200-facher und 400-facher Vergrößerung beurteilt und die Bleichzeit entsprechend angepasst. Es ergaben sich Bleichzeiten von 10 bis 90 Minuten. Für jedes Präparat wurde die genaue Bleichzeit notiert (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2.: Bleichzeiten der Präparate für die Färbung mit CD31 und PAS

Präparat Nr.	Bleichzeit in min.	Präparat Nr. (ohne Bleichen)
21647	56	2329
22000	17	22187
22937	60	22244
23440	55	23561
23794	90	25210
24056	50	25579
24310	83	25859
24836	59	26158
25281	70	26876
25640	65	27104
25778	70	27488
25789	60	28283
25987	57	28539
26104	113	28369
26234	80	28517
27329	68	28558
27449	90	28762
27459	130	28775
28465	49	28830
28470	60	28842
28930	30	29039
28978	57	
29647	30	

Im Anschluss an das Bleichen wurden die Präparate in einprozentiger Essigsäure gewaschen und in Aqua dest überführt. Nun wurden die Schnitte mit 0,3 % H_2O_2 in TBS dreimal für fünf Minuten gequench und anschließend in Tris-buffered Saline (TBS) gewaschen. Für alle Waschschrte in TBS wurden die Küvetten mit den Präparaten auf den Schüttler gestellt. Zur Vorbehandlung wurden die Präparate im vorgeheizten Reiskocher (Braun Multi Gourmet Type 31226) für 30 Minuten in 10 mmol Tris-Puffer (Rezept siehe 2.1.4.2) mit 1 mmol Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 9,0) gekocht. Der Puffer wurde jeweils zu 1000 ml angesetzt und der pH Wert wurde mit dem pH-Meter eingestellt. Nach dem 30minütigen Kochen kühlten die Präparate, weiterhin in dem Tris-Puffer gelagert, für ebenfalls 30 Minuten ab. Nach dieser Vorbehandlung folgte ein weiterer Waschschrte in TBS auf dem Schüttler für fünf Minuten. Im Anschluss wurden mit in TBS gelöstem BSA unspezifische Bindungsstel-

len des Antikörpers blockiert. Hierfür wurde mit dreiprozentigem BSA für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper CD31. Der Antikörper wurde in der Konzentration 1:40 in BSA angesetzt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf den Präparaten inkubiert. Es folgte ein Waschschrift, dreimal für je fünf Minuten in TBS. Die Schnitte wurden über Nacht in einer Küvette mit TBS im Kühlschrank gelagert.

Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst in TBS gewaschen und die Präparate so behutsam wieder an die Raumtemperatur angeglichen. Als nächstes wurde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:250 in BSA für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hier handelt es sich bei dem Sekundärantikörper um einen IgG-Antikörper, der sich gegen die Spezies des Primärantikörpers richtet, in diesem Fall Maus, und der den Farbstoff trägt. Es folgte ein weiterer Waschschrift dreimalig für drei Minuten in TBS. Anschließend wurde mit dem Substratpuffer DAB (DCS-Chromoline, PCI36RI00 und DCI 35C006) für 60 Minuten inkubiert. Anders als vom Hersteller empfohlen, wurde das Konzentrat und der Puffer im Verhältnis zwei Tropfen auf 1 ml gemischt.

In den Probefärbungen hat sich gezeigt, dass bei diesem Protokoll einer höheren Konzentration des Substratpuffers ein besseres Färbeergebnis resultiert. Nach diesem Schritt wurden die Präparate in Wasser gewaschen und eine PAS Gegenfärbung nach Hotchkiss und McManus durchgeführt. Als letzten Schritt wurden alle Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und zum Schluss luftblasenfrei eingedeckt.

Als Kontrolle wurden in jeder Färbung ein Positiv- und eine Negativkontrollpräparat der menschlichen Magenmukosa mitgeführt.

2.5.2. Auswertung am Mikroskop

Ziel der Auswertung war es, die Präparate einzuteilen in solche mit VM und solche ohne. Dazu betrachteten wir vornehmlich die Gefäße in großer Vergrößerung (200fach bzw. 400fach), um zu beurteilen, ob sie mit dem Gefäßwandantikörper CD31 angefärbt waren. Wenn dies nicht der Fall war, wurden die gefäßformenden Zellen als Tumorzellen angesehen und das Präparat als VM positiv eingestuft. Des Weiteren wurde in den Präparaten nach den von Folberg et al. bereits beschriebenen Strukturen gesucht, welche auch als Hinweis auf VM positive Präparate angesehen wurden.[67]

Alle Schnitte wurden unter dem Leica DMI AF 6000 im Bright Field (BF) Modus in der Auflichtmikroskopie angeschaut. Die Auswertung sowie die Bilddatenspeicherung erfolgten über das

Programm Leica AF 6000.

Alle Präparate wurden von zwei unabhängigen Beobachtern (JL, MS) unter den gleichen Bedingungen angesehen und beurteilt. Beide Beobachter mussten sich einigen, ob ein Schnitt als positiv oder negativ bewertet wurde.

Alle Schnitte wurden zunächst in 100-facher Vergrößerung (100ter) betrachtet, der Bereich des Melanoms wurde aufgesucht und in 200-facher Vergrößerung (200ter) scharf gestellt.

Als nächstes wurde nach den von Folberg et al. beschriebenen Strukturen, Loops und Tubes, gesucht.[67] Konnten solche Strukturen identifiziert werden, so wurden sie im Einzelnen noch einmal in 400-facher Vergrößerung (400ter) betrachtet, um sicher zu gehen, dass die Wände der Strukturen nicht mit dem Gefäßantikörper CD31 angefärbt waren.

Auch alle anderen Gefäße im Bereich des Melanoms wurden in 200-facher Vergrößerung (200ter) und in 400-facher Vergrößerung (400ter) angeschaut und die Färbung der Wände mit CD31 beurteilt.

Entsprechend der Ergebnisse wurde das Präparat als VM positiv oder negativ in einer Excel Tabelle vermerkt.

Zwei Präparate konnten nicht ausgewertet werden, da sie sich im Verlauf der vielen Färbeschritte zu sehr aus der Fixierung gelöst hatten und der Tumor daher nicht mehr mit allen seinen Gefäßstrukturen beurteilt werden konnte. Diese beiden Präparate wurden aus der Wertung genommen.

2.6. Färbung mit vWF und Endoglin

2.6.1. Protokoll der Färbung

Die Immunfärbung für Endoglin und vWF erfolgte wie bereits beschrieben und entsprechend den Empfehlungen der Hersteller der Antikörper. Auch für diese Färbung wurden stärker pigmentierte Tumore nun mit 3 % H₂O₂, 0,5 % KOH und 1 % NA₂HPO₄ gebleicht. Zunächst wurden alle Präparate in Vorbereitung auf die Färbung einer Proteolyse unterzogen. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Pferdeserum inkubiert. Danach wurden alle Präparate mehrfach in PBS gewaschen. Schließlich wurden die vorbereiteten Schnitte mit den Primärantikörpern spezifisch für Endoglin (Mouse Mab, Clone SN6h, Dako) und für den vWF (Mouse Mab, Clone F8/86, Dako) für 12 h bei 4°C inkubiert. Im Anschluss

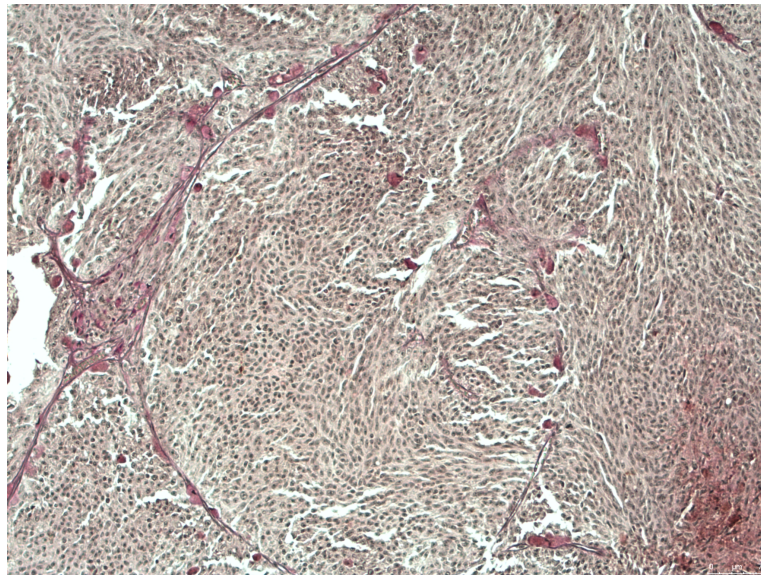


Abbildung 2.11.: Lichtmikroskopische Aufnahme eines CD31+PAS gefärbten Präparates in 200ter Vergrößerung. Hier sind die endothelfreien Gefäßschleifen (loops) in der Bildmitte zu sehen. Dieser Tumor zeigt das Phänomen des *vasculogenic mimicry*.

folgten wiederum Waschschrte. Auch bei dieser Färbung folgte eine zusätzliche Färbung mit den Sekundärantikörpern. In diesem Fall handelt es sich um IgG-Antikörper, die sich gegen die Spezies Maus richten und mit Peroxidase konjugiert sind. Sie binden auch hier an den Primärantikörper und machen alle Bindungsstellen des Primärantikörpers sichtbar. Alle Präparate wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Goat anti-mouse IgG) inkubiert. Nun folgte nach erneutem Waschen die Entwicklung der Färbung mit 3-Diaminobenzidine und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Alle Präparate wurden mit Deckgläschen bedeckt und dunkel und trocken gelagert.

2.6.2. Auswertung der Bilder

In der Auswertung sollten alle Präparate beurteilt werden, ob sie vWF und Endoglin anfärbten oder nicht. Alle Schnitte wurden unter dem Leica DMI AF 6000 im Bright Field (BF) Modus in der Auflichtmikroskopie angeschaut. Die Auswertung sowie die Bilddatenspeicherung erfolgten über das Programm Leica AF 6000.

Alle Präparate wurden von zwei unabhängigen Beobachtern unter den gleichen Bedingungen angesehen und beurteilt. Beide Beobachter mussten sich einigen, ob ein Schnitt als positiv oder negativ bewertet wurde.

Alle Schnitte wurden zunächst in 100-facher Vergrößerung (100ter) betrachtet, der Bereich des Melanoms wurde aufgesucht und in 200-facher Vergrößerung (200ter) scharfgestellt. In

dieser Vergrößerung wurden die Präparate auf Positivität von Endoglin oder vWF durchgemustert.

Entsprechend der Ergebnisse wurde das Präparat als vWF und Endoglin positiv oder negativ in einer Excel Tabelle vermerkt. Auch hier mussten beide unabhängigen Beobachter zum identischen Ergebnis kommen.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik Software SPSS für Windows (Version 16, Icn, Chicago, Illinois, USA). Als deskriptive Statistik wurden der Median, die Spannweite und die Standardabweichung ermittelt. Als Teststatistik wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt und die p-Werte als Unterschiede zwischen den Analysegruppen betrachtet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen. Zur Korrelationsbestimmung wurde die Pearson-Korrelation berechnet. Auch hierbei wurden p-Werte kleiner als 0,05 als signifikant betrachtet.

Kapitel 3.

Ergebnisse

3.1. Expression von Caveolin-1 und Phosphoinositol-3-Kinase in primären uvealen Melanomen

3.1.1. Vergleich der Caveolin-1-Expressionsrate der metastasierten und der nicht metastasierten Tumore

3.1.1.1. Subjektive Auswertung der Caveolin-1-Expression

Alle untersuchten Tumore exprimierten Caveolin-1. Die Anzahl der positiven Zellen in allen Präparaten wurde von beiden Beobachtern mit einem Mittelwert von 89,03 % gesehen. Hierbei lag die Spannweite für positive Zellen bei 6,5 - 100 %. Es wurde insgesamt eine intensivere Caveolin-1-Expression im Zytoplasma beobachtet. Der Mittelwert der subjektiv eingeschätzten zytoplasmatischen Expression beider Beobachter lag bei 3,03 (subjektive Skala von 1-4, Spannweite: 0,6-3,8). Für die Expression im Nucleus ergab sich ein Mittelwert von 2,3 (Spannweite: 0,5-3,8).

Für die Anzahl der positiven Zellen der metastasierten Präparate wurde ein Mittelwert von 90,52 % ermittelt. Die Spannweite für positive Zellen betrug 45 - 100 %. Die subjektive Intensität wurde im Mittel mit 2,81 (Spannweite 1,55-4) eingeschätzt. Bei den metastasierten Präparaten wurde eine intensivere Caveolin-1-Expression im Zytoplasma beobachtet. Der Mittelwert der subjektiv eingeschätzten zytoplasmatischen Expression beider Beobachter lag für die metastasierten Tumore bei 2,23 (subjektive Skala von 1-4, Spannweite: 0,3-3,2). Für die Expression im Nucleus ergab sich ein Mittelwert von 2,99 (Spannweite: 0,8-3,9).

Es konnten Unterschiede zwischen der Caveolin-1-Expression der Tumoren, die im wei-

teren klinischen Verlauf metastasierten und der Tumoren, die im klinischen Verlauf keine Metastasen bildeten, gezeigt werden. So lag der Mittelwert der Anzahl positiver Zellen für die nicht metastasierten Tumore bei 86,5 % mit einer Spannweite von 6,5 % - 98 %, der Median lag bei 93,5 und die Standardabweichung bei 13,82. Die subjektive zytoplasmatische Expression lag bei 2,35 (Spannweite: 0,2-3,8). Für die Expression im Nukleus fand sich in der subjektiven Einschätzung ein Mittelwert von 3,03 mit einer Spannweite von 0,3-3,8 (siehe Tabelle 3.1). Zwar zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse, jedoch war eine Tendenz zu einer vermehrten Caveolin-1-Expression in den metastasierten Fällen erkennbar, wie es in Abbildung 3.1 visuell verdeutlicht werden kann.

3.1.1.2. Objektive Auswertung der Caveolin-1-Expression

Auch in der objektiven Auswertung konnte die Caveolin-1-Expression in allen untersuchten Präparaten nachgewiesen werden. Durchschnittlich waren 90,53 % (Spannweite: 3,23-100 %, Median: 96,67 % $\pm$ 17,08 %) der Zellen Cav-1 positiv. Die objektive Intensität der Expression lag bei 3,61 (Skala von 1-4, Spannweite: 0,13-4,0 %)

Bei den nicht metastasierten Präparaten lag der Mittelwert der angefärbten Zellen bei 88,5 % (Spannweite: 11,5-100 %, Median: 92,29 % $\pm$ 22,84 %). Die objektive Intensität war in der Gruppe der nicht metastasierten Präparate bei 3,53 und hatte eine Spannweite von 0,13-4,0.

In der Gruppe der metastasierten Tumore färbten sich 91,44 % der Zellen an (Spannweite: 49,38-100 %, Median: 96,06 % $\pm$ 11,69 %). In dieser Gruppe lag die objektive Intensität der Expression bei 3,65 und die Spannweite erstreckte sich über die Werte 1,98-4,0.

Es zeigte sich eine geringere Caveolin-1-Expression in den nicht metastasierten uvealen Melanomen. Dieser Unterschied zwischen den Untergruppen war jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 3.1.: Caveolin-1-Expressionsraten für metastasierte und nicht metastasierte Tumore

	Caveolin-1-Expressionsrate:		p-Wert	r-Wert
	metastasierter Tumore	nicht metastasierter Tumore		
Subjektive Intensität	2,81 ($\pm$ 0,63)	3,5 ($\pm$ 0,87)	0,936	-0,064
Subjektive Anzahl	65,05 ($\pm$ 19,89)	63,47 ($\pm$ 20,4)	0,701	0,023
Objektive Intensität	3,65 ($\pm$ 0,48)	3,53 ($\pm$ 0,62)	0,358	-0,033
Objektive Anzahl	32,43 ($\pm$ 21,59)	21,59 ($\pm$ 18,9)	0,342	-0,003

p-Wert: Mann-Whitney Test, r-Wert: Spearman Test, Intensität: Angaben in Skala von 1-4, Anzahl: Angaben in %

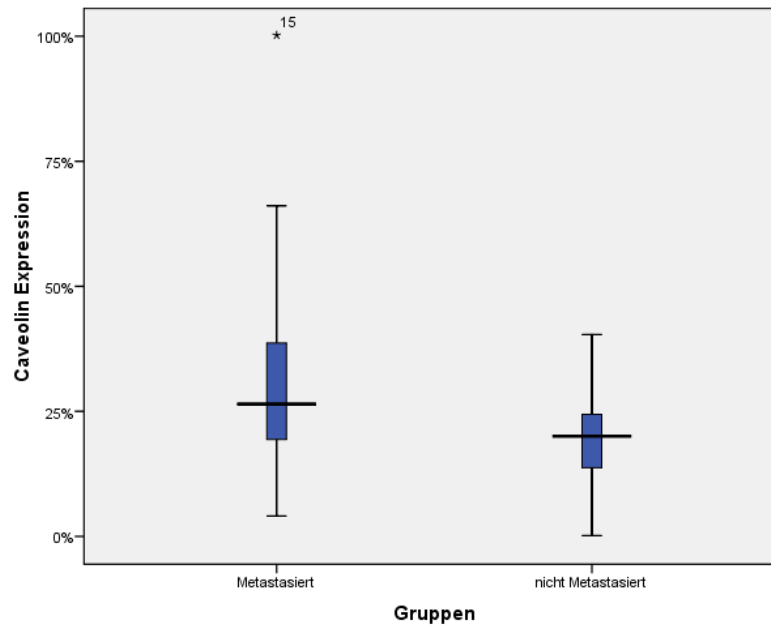


Abbildung 3.1.: Boxplot Diagramm: Cav-1-Expression für metastasierte und nicht metastasierte Tumore

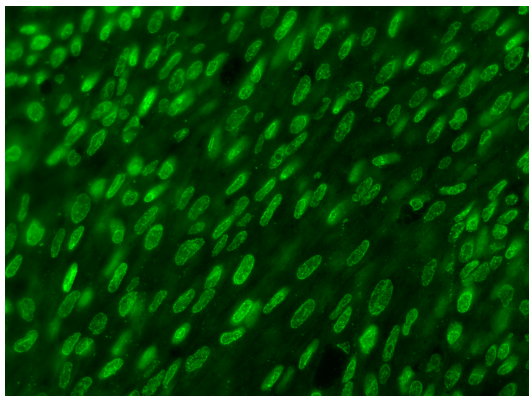


Abbildung 3.2.: Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter L5 eines Präparates mit einer intensiven Caveolin-1-Färbung (Intensität: 3,8; 100 % der Zellen Cav-1 positiv). Der Tumor vom Spindelzelltyp bildet in einem Nachbeobachtungszeitraum von 3 Jahren Metastasen aus.

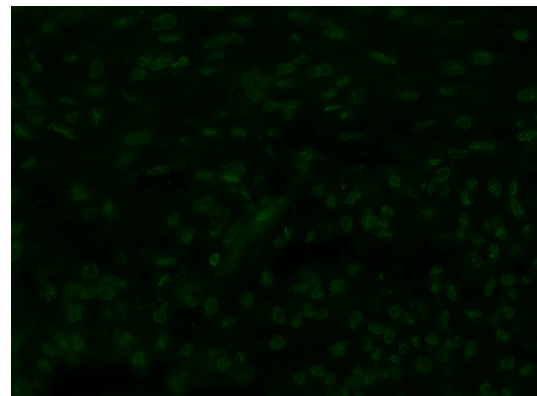


Abbildung 3.3.: Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter L5 eines Präparates eines Tumors vom Spindelzelltyp, welches eine geringe Caveolin-1-Expression (Intensität: 1,8) präsentiert. 72,4 % der Zellen wurden als Cav-1 positiv beurteilt. Der Tumor bildete innerhalb eines Jahres Metastasen.

3.1.1.3. Korrelationen der Caveolin-1-Expression mit weiteren Prognoseparametern

Bei dem Vergleich zwischen den Mittelwerten der subjektiven Caveolin-1-Expression und den bekannten Tumorprognosefaktoren findet sich eine signifikante Korrelation (Pearson Korrelation) für den größten Tumordurchmesser ($p = 0,022$) und die Invasion des Sehnerven ($p = 0,048$). Eine hoch signifikante Korrelation konnten wir für die Caveolin-1-Expression

und das Tumorstadium entsprechend der TMN-Klassifikation nachweisen ($p = 0,008$). Die TMN-Klassifikation stellt einen sehr sensitiven Tumorprognoseparameter dar und korreliert in unseren Versuchen hoch signifikant mit der Caveolin-1-Expressionsrate.

Alle weiteren Werte für die Korrelationen zwischen bekannten Tumorprognosefaktoren und der objektiven und der subjektiven Caveolin-1-Expression sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2.: Korrelationen der Caveolin-1-Expression mit bisher bekannten Tumorprognosefaktoren

Prognosefaktor	p-Wert:		r-Wert:	
	obj. Cav-1- Expression	subj. Cav-1- Expression	obj. Cav-1- Expression	subj. Cav-1- Expression
Patientenalter	0,965	0,988	0,006	-0,002
Geschlecht	0,114	0,075	-0,229	-0,257
Bestrahlung	0,811	0,644	-0,035	0,068
GTD	0,515	0,022	0,100	0,340
Höhe (mm)	0,679	0,436	-0,065	0,122
Ziliarkörperbeteiligung	0,883	0,663	0,022	0,064
Extrasklerale Extension	0,067	0,963	0,269	-0,007
Invasion				
der Sklera	0,218	0,509	0,181	0,098
der Bruchmembran	0,152	0,905	-0,210	-0,018
des Sehnerven	0,482	0,048	-0,104	-0,287
TMN Klassifikation	0,236	0,008	0,178	0,386
Histologischer Subtyp	0,454	0,633	0,110	0,070

p- und r-Wert: Pearson Korrelation; GTD: größter Tumordurchmesser; mm: Millimeter; TMN (Tumor, Nodes, Metastases): System zur Tumorklassifikation; $p < 0,05$

3.1.1.4. Expression von Caveolin-1 in den nicht tumorösen Geweben

3.1.1.4.1 Hornhaut

Für die Caveolin-1-Färbung der Hornhaut konnten insgesamt 23 Präparate ausgewertet werden. Die Anzahl der positiven Zellen wurde im Mittel mit 50 % eingeschätzt. Für die Intensitätsbeurteilung (Skala von 1-4) lag der Mittelwert bei 0,83 ($\pm 0,29$). Die Intensität der zytoplasmatischen Expression lag im Mittel bei 0,4. Die nukleäre Expression war mit einem Mittelwert von 0,93 etwas intensiver.

3.1.1.4.2 Iris

Die Iris war in 14 Präparaten gut zu beurteilen. Es ergab sich ein Mittelwert der Caveolin-1 positiven Zellen von 40 % mit einer mittleren Intensität von 0,7 ($\pm 0,27$). Auch hier war die

Caveolin-1-Expression im Nukleus mit einem Mittelwert von 0,97 ($\pm 0,22$) gegenüber 0,2 ($\pm 0,26$) im Zytoplasma etwas intensiver.

3.1.1.4.3 Ziliarkörper

Die Caveolin-1-Expression im Ziliarkörper konnte in 28 Präparaten ausgewertet werden. Im Mittel waren 83,5 % der Zellen Caveolin-1 positiv. Für die subjektiv eingeschätzte Intensität ergab sich ein Mittelwert von 1,01 ($\pm 0,34$). Die zytoplasmatische Expression wurde mit 0,61 ($\pm 0,26$) gesehen und die nukleäre Expression war auch hier mit einem Mittelwert von 1,06 ($\pm 0,28$) etwas intensiver.

3.1.1.4.4 Netzhaut

In 16 Präparaten konnte die Caveolin-1-Expression auch in der Netzhaut beurteilt werden. 68 % der Zellen exprimierten im Mittel Caveolin-1. Der Mittelwert der Intensität insgesamt wurde mit 0,89 ($\pm 0,29$) eingeschätzt. Die Expression im Zytoplasma war mit 0,45 ($\pm 0,18$) etwas schwächer als die Expression im Nukleus mit einem Mittelwert von 0,99 ($\pm 0,21$).

3.1.1.4.5 Aderhaut

Die Aderhaut war nur in 3 Präparaten gut erkennbar. Eine Auswertung ist bei der geringen Anzahl der Präparate nicht sinnvoll.

3.1.2. Vergleich der PI3K-Expressionsrate der metastasierten und der nicht metastasierten Tumore

3.1.2.1. Subjektive Auswertung der PI3K-Expression

PI3K wurde ebenfalls in allen uvealen Melanomen der Untersuchungsreihe exprimiert. Der Mittelwert der positiven Zellen lag bei 89,14 % (Spannweite: 6,5 - 100 %). Es ergab sich ein Mittelwert für alle untersuchten Tumore von 2,97 ($\pm 0,79$), wobei die zytoplasmatische Expression (2,90) gegenüber der Expression im Nucleus (2,65) etwas ausgeprägter war.

Die metastasierten uvealen Melanome zeigten eine mittlere Expressionsrate von 2,9 ($\pm 0,73$), wobei der Mittelwert der positiven Zellen bei 89,5 % (Spannweite: 42,5 - 100 %) lag. In dieser Untergruppe war ebenfalls die nukleäre Expression mit 2,63 (Skala von 1-4) etwas schwächer gegenüber einem Wert von 2,82 für die Expression im Zytoplasma ausgeprägt.

In der Untergruppe der nicht metastasierten Melanome sahen beide Beobachter die Intensität mit dem Mittelwert 2,83 ($\pm 0,71$) und die Anzahl positiver Zellen im Mittel bei 86,5 % (Spannweite 6,5 - 98,5 %). In dieser Untergruppe ist die nukleäre Expression (3,03) gegenüber

der zytoplasmatischen (2,35) ausgeprägter.

In Tabelle 3.3 sind die einzelnen Werte der subjektive Expressionsrate und der p-Wert im Mann-Whitney-Test für beide Gruppen (metastasierte und nicht metastasierte Tumore) aufgeführt. Die p-Werte weisen keine signifikanten Ergebnisse auf. So kann auch für die PI3K-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen metastasierten Melanomen und nicht metastasierten Melanomen gezeigt werden. Schaut man sich jedoch die grafische Darstellung im Boxplot-Diagramm an, so ist für die PI3K-Expression eine deutlichere Tendenz als für Caveolin-1 erkennbar (siehe Abbildung 3.6).

3.1.2.2. Objektive Auswertung der PI3K-Expression

Auch in der objektiven Auswertung konnte die Expression von PI3K in allen Präparaten nachgewiesen werden. Die Anzahl der positiven Zellen in allen Präparaten hatte einen Mittelwert von 88,5 % . Hierbei lag die Spannweite für positive Zellen bei 46,46 - 100 %. Der Mittelwert der objektiv eingeschätzten Intensität der Expression beider Beobachter lag bei 3,44 (Skala von 1-4, Spannweite: 0,46-4,0).

Für die Anzahl der positiven Zellen der metastasierten Präparate wurde ein Mittelwert von 86,09 % ermittelt. Die Spannweite für positive Zellen betrug 46,46 - 100 %. Die Intensität wurde im Mittel mit 3,44 (Spannweite 1,86-4) eingeschätzt.

Der Mittelwert der Anzahl positiver Zellen, für die nicht metastasierten Tumore lag bei 88,5 % mit einer Spannweite von 11,15 - 100 %. Der Median lag bei 92,29 und die Standardabweichung bei 18,69. Die objektive Intensität der Expression lag bei 3,54 (Spannweite: 0,45-4).

Tabelle 3.3.: PI3K-Expressionsraten metastasierter und nicht metastasierter Tumore

	PI3K-Expressionsrate:		p-Wert	r-Wert
	metastasierter Tumore	nicht metastasierter Tumore		
Subjektive Intensität	3,76 ($\pm 0,57$)	2,91 ($\pm 0,862$)	0,954	0,018
Subjektive Anzahl	69,03 ($\pm 21,77$)	67,72 ($\pm 25,22$)	0,613	-0,008
Objektive Intensität	3,44 ($\pm 0,65$)	3,54 ($\pm 0,74$)	0,172	-0,069
Objektive Anzahl	41,33 ($\pm 26,48$)	32,16 ($\pm 23,92$)	0,419	0,068

p-Wert: Mann-Whitney Test, r-Wert: Spearman Test, Intensität: Angaben in Skala von 1-4, Anzahl: Angaben in %

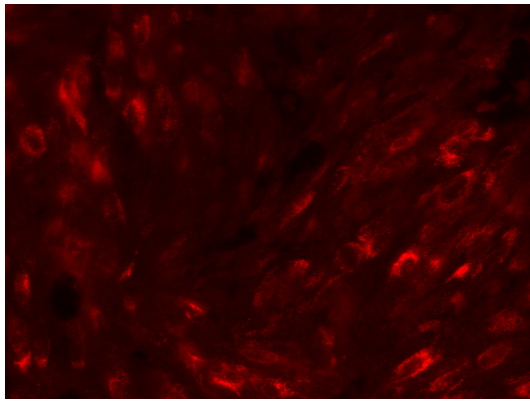


Abbildung 3.4.: Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter Y3. 93,75 % der Zellen wurden als PI3K positiv gesehen und insgesamt wurde die Intensität mit 3,75 beurteilt. Das Präparat stammt aus einem Tumor vom Spindelzelltyp. Er bildete trotz Bestrahlung noch 3 Jahre nach Enukleation Metastasen aus.

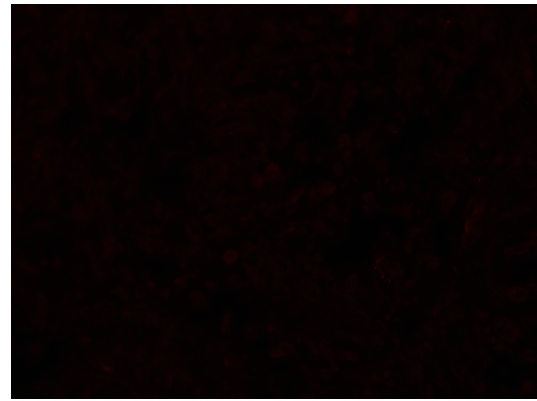


Abbildung 3.5.: Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter Y3. 65 % der Zellen wurden als PI3K positiv beurteilt und mit einer Intensität von 0,9 gesehen. Der Tumor dieses Präparates war epitheloidzellig und metastasierte frühzeitig innerhalb eines Jahres.

3.1.2.3. Korrelationen der PI3K-Expression mit weiteren Prognoseparametern

Auch für die Expression der PI3K wurden die Korrelationen mit den bisher bekannten Tumorprognoseparametern ermittelt. Hier zeigte sich mit $p = 0,042$ eine signifikante Korrelation für die subjektive PI3K-Expression und die Tumorthöhe. Darüber hinaus korreliert die Expression von PI3K hoch signifikant ($p = 0,016$) mit der TMN-Klassifikation der untersuchten Präparate. Für die Korrelation mit dem GDT und der subjektiven PI3K-Expression konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden ($p = 0,95$).

In Tabelle 3.4 sind die Korrelationen der subjektiven und der objektiven PI3K-Expression mit allen bisher bekannten Tumorprognosefaktoren aufgeführt.

3.1.2.4. Expression von PI3K in nicht tumorösen Geweben

3.1.2.4.1 Hornhaut

Die PI3K-Expression in der Hornhaut konnte in 20 Präparaten ausgewertet werden. Im Mittel waren 19 % der Zellen PI3K positiv. Für die subjektiv eingeschätzte Intensität ergab sich ein Mittelwert von 0,375 ($\pm 0,3$). Die zytoplasmatische Expression wurde mit 0,3 ($\pm 0,32$) gesehen und die nukleäre Expression war mit einem Mittelwert von 0,07 ($\pm 0,32$) sehr schwach.

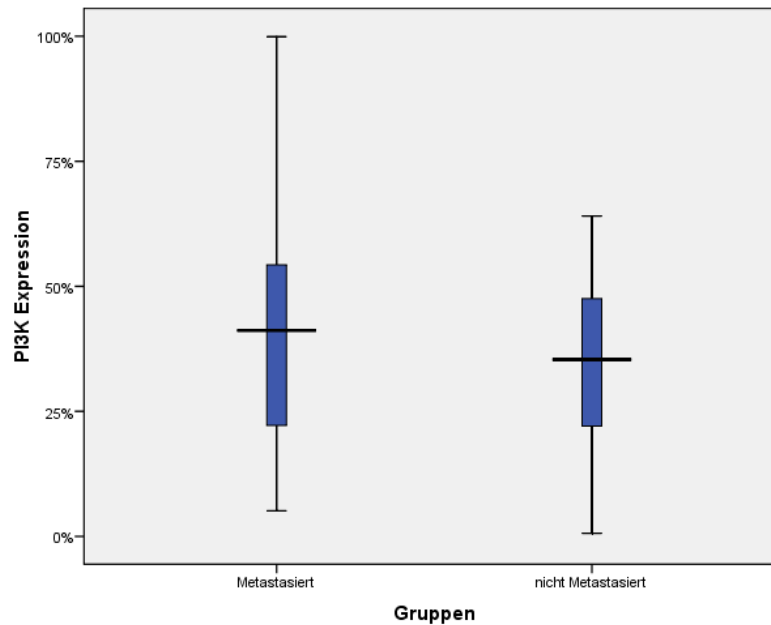


Abbildung 3.6.: Boxplot Diagramm: PI3K-Expression für metastasierte und nicht metastasierte uveale Melanome; PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase.

3.1.2.4.2 Iris

In 14 Präparaten konnte die PI3K-Expression auch in der Iris beurteilt werden. 36,7 % der Zellen exprimierten im Mittel PI3K. Der Mittelwert der Intensität insgesamt wurde mit 0,44 ($\pm 0,55$) eingeschätzt. Die Expression im Zytoplasma und im Nukleus annähernd ausgeglichen mit Werten von 0,242 ($\pm 0,24$) im Zytoplasma und 0,246 ($\pm 0,368$) im Nukleus.

3.1.2.4.3 Ziliarkörper

Für die PI3K Färbung des Ziliarkörpers konnten insgesamt 28 Präparate ausgewertet werden. Die Anzahl der positiven Zellen wurde im Mittel mit 72 % eingeschätzt. Für die Intensitätsbeurteilung (Skala von 1-4) lag der Mittelwert bei 0,76 ($\pm 0,41$). Die Intensität der zytoplasmatischen Expression lag im Mittel bei 0,67 ($\pm 0,37$), die nukleäre Expression war mit einem Mittelwert von 0,43 ($\pm 0,34$) etwas schwächer.

3.1.2.4.4 Netzhaut

Die Netzhaut war in 16 Präparaten gut zu beurteilen. Es ergab sich ein Mittelwert der PI3K positiven Zellen von 55 % mit einer mittleren Intensität von 0,4 ($\pm 0,43$). Die PI3K-Expression war im Nukleus mit einem Mittelwert 0,33 ($\pm 0,37$) gegenüber 0,28 ($\pm 0,29$) im Zytoplasma etwas intensiver.

Tabelle 3.4.: Korrelation der PI3K-Expression mit bisher bekannten Prognosefaktoren

Prognosefaktor	p-Wert:		r-Wert:	
	obj. PI3K-Expression	subj. PI3K-Expression	obj. PI3K-Expression	subj. PI3K-Expression
Patientenalter	0,041	0,271	0,295	-0,160
Geschlecht	0,904	0,183	0,018	-0,193
Bestrahlung	0,570	0,745	0,084	-0,048
GTD	0,100	0,095	0,251	0,252
Höhe (mm)	0,433	0,042	0,124	0,311
Ziliarkörperbeteiligung	0,133	0,755	-0,222	0,046
Extrasklerale Extension	0,134	0,941	0,224	0,011
Invasion				
der Sklera	0,859	0,502	-0,027	0,099
der Bruchmembran	0,283	0,711	0,160	0,055
des Sehnerven	0,647	0,033	-0,068	-0,309
TNM Klassifikation	0,062	0,016	0,281	0,354
Histologischer Subtyp	0,210	0,266	-0,184	-0,162

p- und r-Wert: Pearson Korrelation; GTD: größter Tumordurchmesser; mm: Millimeter; TNM (Tumor, Nodes, Metastases): System zur Tumorklassifikation; **p** < 0,05

3.1.2.4.5 Aderhaut

Die Aderhaut war nur in 3 Präparaten gut erkennbar. Eine Auswertung ist bei der geringen Anzahl der Präparate nicht sinnvoll.

3.1.3. Korrelation zwischen den Zellzahlen Caveolin-1 positiver und PI3K positiver Zellen

Betrachtet man die Korrelation der Caveolin-1 exprimierenden Zellen mit denen, die PI3K exprimieren, als Mittelwert der subjektiven Beobachtung von beiden unabhängigen Beobachtern so zeigt sich mit $p = 0,008$ ein hochsignifikantes Ergebnis.

Die Korrelation der objektiven Expressionsrate in % von Caveolin-1 und PI3K hat einen Wert von $p = 0,96$ und ist damit nicht als signifikant anzusehen.

3.2. Analyse des *vasculogenic mimicry* in primären uvealen Melanomen

3.2.1. Korrelation zwischen VM und Metastasierung

Insgesamt zeigten 26 (52 %) der untersuchten Tumore *vasculogenic mimicry*. Zwanzig (40 %) bildeten Metastasen und nur sechs (12 %) wiesen innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums keine Metastasen auf. Wir fanden also in der untersuchten Gruppe eine positive Korrelation ($p = 0,016$) zwischen Metastasierung und VM.

3.2.2. Korrelation zwischen VM und bekannten Prognosefaktoren

Neben der Metastasierungsrate konnten wir eine positive Korrelation zwischen VM und dem GTD nachweisen ($p = 0,021$). In der Tabelle 3.5 ist eine Zusammenfassung der Korrelationswerte gelistet.

Tabelle 3.5.: Korrelation des VM mit bisher bekannten Tumorprognosefaktoren

Prognosefaktor	<i>vasculogenic mimicry</i>	
	p-Wert:	r-Wert:
Patientenalter	0,802	-0,037
Geschlecht	0,519	0,094
Bestrahlung	0,232	-0,174
Metastasen im Verlauf	0,016	0,342
Nachbeobachtungszeit	0,278	-0,158
GTD	0,021	0,344
Höhe (mm)	0,494	0,107
Ziliarkörperbeteiligung	0,235	0,175
Extrasklerale Extension	0,825	0,033
Invasion		
der Sklera	0,121	0,227
der Bruchmembran	0,173	0,200
des Sehnerven	0,906	-0,017
TNM Klassifikation	0,201	0,192
Histologischer Subtyp	0,786	0,040

p- und r-Wert: Pearson Korrelation; GTD: größter Tumordurchmesser; mm: Millimeter; TNM (Tumor, Nodes, Metastases): System zur Tumorklassifikation; $p < 0,05$

3.2.3. Korrelation zwischen VM und den Expressionsraten von PI3K und Cav-1

Bei der Korrelation der Expression von PI3K und dem VM können nur Werte knapp oberhalb des Signifikanzniveaus erreicht werden. Die Werte zeigen jedoch mit $r = 0,076$ für die subjektive PI3K-Expression und $r = 0,064$ für die objektive Expression eine deutliche Tendenz zur positiven Korrelation an. Auch bei der Korrelation der Caveolin-1-Expression und dem VM können keine signifikanten Werte erreicht werden. Mit r -Werten von $0,072$ für die subjektive Bewertung und $r = 0,097$ für die objektive Bewertung ist jedoch auch hier eine Tendenz zur positiven Korrelation zwischen beiden gemessenen Parametern erkennbar.

Tabelle 3.6.: Korrelation der Expression von PI3K und Caveolin-1 mit VM

Expression von PI3K und Cav-1	<i>vasculogenic mimicry</i>	
	p-Wert:	r-Wert:
Subjektive Anzahl der PI3K-positiven Zellen	0,601	-0,076
Objektive Anzahl der PI3K-positiven Zellen	0,658	0,064
Subjektive Anzahl der Cav-1-positiven Zellen	0,617	0,072
Objektive Anzahl der Cav-1-positiven Zellen	0,504	0,097

p- und r-Wert: Pearson Korrelation

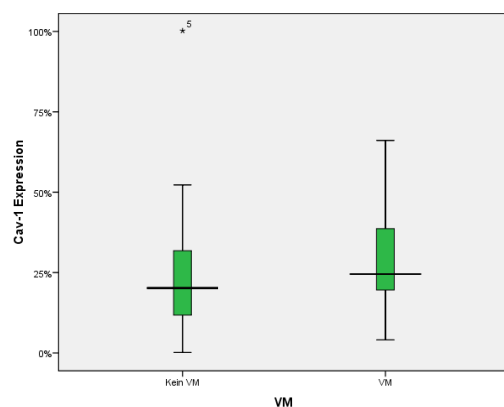


Abbildung 3.7.: Boxplot Diagramm: Cav-1-Expressionsrate für VM positive und VM negative Tumore; VM: *vasculogenic mimicry*, Cav-1: Caveolin-1.

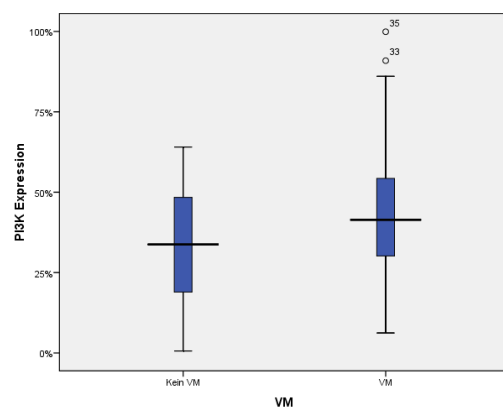


Abbildung 3.8.: Boxplot Diagramm: PI3K-Expressionsrate für VM positive und VM negative Tumore, VM: *vasculogenic mimicry*, PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase

3.3. Auswertung Endoglin und vWF

3.3.1. Expression von Endoglin in tumorösen und nicht tumorösen Geweben

Die Tumore wurden hinsichtlich ihrer Endoglin-Expression in 2 Gruppen (geringe Expression versus hohe Expression) eingeteilt. Insgesamt zeigten 52,0 % der Tumore eine hohe Endoglin-Expression, hierunter metastasierten 36 % im weiteren klinischen Verlauf, 8 % zeigten im Follow-up keine Metastasen. Eine geringe Endoglin-Expression fand sich insgesamt bei 48 % der Tumore, hiervon waren 22 % in der Gruppe der metastasierten Tumore und 26 % in der Gruppe der nicht metastasierten Tumore.

3.3.2. Expression von vWF in tumorösen und nicht tumorösen Geweben

Für die Expression von vWF wurden die Präparate ebenfalls eingeteilt, in solche mit geringer vWF-Expression und solche mit hoher vWF-Expression. In insgesamt 51 % der Tumore zeigte sich eine hohe Expression von vWF und in 49 % eine niedrige vWF-Expression. Aufgeteilt in die metastasierten und nicht metastasierten Tumore fand sich in der Gruppe mit Metastasen in 23,5 % eine geringe Expression von vWF und in 35,3 % eine hohe vWF-Expression. Bei den Präparaten ohne Metastasierung im Follow-up war in 15,7 % der Fälle vWF hoch exprimiert und in 25,5 % gering exprimiert.

3.3.3. Korrelation von Endoglin und vWF mit Cav-1

In dieser Studie konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von vWF und Cav-1 ($p = 0,642$) gefunden werden. Auch die Korrelationen von Cav-1 mit der Endoglin-Expression zeigte keine signifikant positive Korrelation ($p = 0,460$).

3.3.4. Korrelation von Endoglin und vWF mit PI3K

Für die Expressionen der PI3K und vWF konnten die p-Werte das Signifikanzlevel von $p < 0,05$ ebenfalls nicht erreichen. Auch für Endoglin und PI3K zeigte sich mit $p = 0,107$ keine signifikant positive Korrelation.

Kapitel 4.

Diskussion

4.1. Zur Bedeutung der Blutversorgung beim primären uvealen Melanom

Das uveale Melanom entspringt einem der am besten durchbluteten Gewebe unseres Körpers und metastasiert überwiegend hämatogen. Für das Verständnis der Tumorentwicklung und –progression bzw. für die Entwicklung innovativer therapeutischer Ansätze ist daher das Wissen um Faktoren von entscheidender Bedeutung, die die Blutversorgung dieser Tumore regulieren.[68]

Ein entscheidender Faktor für das Wachstum von Tumoren ist die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen. Ab einer Tumorgröße von 1 bis 2 mm ist eine gesteigerte Blutzufuhr nötig, um den größeren Bedarf von Tumorzellen zu decken.

Uveale Melanome können ihren steigenden Bedarf über die Angiogenese, die Vaskulogenese und das *vasculogenic mimicry* decken.[69] Die Versorgungssysteme haben Anschluss an den systemischen Blutkreislauf. Durch die Blutversorgung des Tumors wird gleichzeitig das Risiko der hämatogenen Tumorzellaussaat gesteigert.[70] Die Assoziation von VM und der Angiogenese mit einer vermehrten Invasivität der uvealen Melanome wurde schon vielfach belegt. Die genauen Zusammenhänge, die zu einer schlechteren Gesamtprognose der Erkrankung führen, sind noch nicht vollständig verstanden.

Folberg et al. vermuteten 2004, dass VM für eine bessere Perfusion des Tumors sorgt. Die darüber hergestellte Anbindung an das Gefäßsystem sollte dann für eine höhere hämatogene Streuung der Tumorzellen sorgen.[71] Neuere Studien kommen zu dem Schluss, dass Initialisierungszellen der malignen Melanome durch die Induktion von VM das Tumorstadium steigern können.[72] Diese Initialisierungszellen haben die genetischen Eigenschaften pluripotenter Stammzellen. Sie beteiligen sich an der Bildung der VM-Gefäßformationen und

beeinflussen so das Tumorwachstum.[67]

Neben dem VM spielt auch die Angiogenese bei uvealen Melanomen eine wichtige Rolle. Der Zusammenhang zwischen beiden Systemen war bisher im Fokus des Interesses bei Tumoren verschiedener Gewebe. Unter anderem zeigte sich ein Zusammenhang bei Tumoren des Ovars,[73] der Mamma,[74] der Lunge,[75] dem Glioblastom[76] sowie dem kutanen und primär uvealen malignen Melanom.[77] Für das uveale Melanom konnten vorangegangene Studien auch die zentrale Bedeutung des *Vascular Endothelial Growth Factors* in der Isoform A (VEGF) für die molekulare Beeinflussung der Angiogenese des uvealen Melanoms *in vitro* nachweisen.[68, 78–82]

Ergänzende *In-vitro*-Untersuchungen zeigten zudem kürzlich die Bedeutung von Cav-1 für die Angiogenese. Liu et al. wiesen anhand einer Zelllinie der menschlichen Nabelschnur nach, dass Cav-1 *in vivo* als negativer Regulator der VEGF Signal-Transduktion dient[83] und damit in die VEGF-induzierte Angiogenese eingreift. Der Einfluss der Cav-1-Expression wird über die MAPK-Signalkaskade vermittelt.[83] Die entscheidende Rolle der PI3K für Wachstum und Entwicklung von Tumoren wurde bereits mehrfach in Studien nachgewiesen. Die PI3K ist ihrerseits in eine Signalkaskade eingebettet.[49] Die angestoßene PI3K-Signalkaskade hat eine supportive Wirkung der zellproliferationsfördernden MAPK-Signalkaskade, über den auch das Cav-1 seine Wirkung entfaltet.[84] Kürzlich wurde die PI3K als regulierender Faktor des VM in aggressiven kutanen und uvealen Melanomen identifiziert.[85] Aber die PI3K/Akt-Signalkaskade wird nicht nur im Rahmen der VM-Formation aktiviert sondern ist auch eine wichtige Signalkaskade, die von VEGF/VEGFR-2 im Rahmen der Angiogenese angesteuert wird.[86] Es wird bei der Beeinflussung Proliferation und Invasion der Tumorzellen ein Zusammenspiel zwischen Cav-1 und der PI3K vermutet, welches bisher nicht für das primär uveale Melanom ausführlich untersucht wurde.[49] Für verschiedene Tumore wurde eine Wechselwirkung bereits festgestellt.[87] Es ist jedoch wenig über die prognostische Bedeutung dieser beiden Faktoren, deren Wechselwirkung und ihre Rolle im Rahmen der Angiogenese und der Induktion des VMs beim uvealen Melanom bekannt.

4.2. Zur Caveolin-1-Expression im primären uvealen Melanom

Die Rolle verschiedener Regulationsfaktoren bei der Tumorprogression des primären uvealen Melanoms ist weiterhin Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Einerseits belegen die Studiendaten eine Assoziation der Cav-1-Expression mit aggressiverem Tumorwachstum und schlechterem klinischen Verlauf für verschiedene Tumorentitäten wie dem Mamma-,

dem Prostata- und dem Kolonkarzinom.[87–90] Es wurde eine Interaktion mit den Matrixmetalloproteinasen für die Tumorzellinvasion nachgewiesen.[91] Auch wurde eine Beteiligung des Cav-1 an dem Remodelling der Extrazellulärmatrix in Studien gezeigt. Wiederum zeigen andere Daten eine inhibierende Wirkung des Caveolin-1 auf das Tumorwachstum an Cav-1 -/- Mäusen.[87]

In der vorliegenden Studie wurde eine erhöhte Cav-1-Expression in metastasierten primär uvealen Melanomen beobachtet. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Studien überein, die eine Assoziation der Cav-1-Expression mit einer vermehrten Tumoraggressivität und einer schlechteren klinischen Prognose zeigen.[89, 90] Caveolin-1 scheint über die Modulation verschiedener Zellfunktionen Einfluss auf die Zellproliferation und das Zellüberleben zu nehmen. Darüber hinaus kann es in Tumoren die Therapieresistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie beeinflussen.[92] Caveolin-1 übernimmt somit eine tumorgene Rolle im fortgeschrittenen Tumorstadium.

Das Protein Cav-1 wurde bereits mit einer vermehrten Metastasierungsrate beim Kolon-, Rektum-, Mamma- sowie dem Prostatakarzinom in Verbindung gebracht.[93, 94] Für das Mamma- und Rektumkarzinom wurde gezeigt, dass die Rho/Rock-Signalkaskade von phosphoryliertem Cav-1 angestoßen wird und eine Tumorprogression bewirkt.[95] In Hautmelanomen führt eine Cav-1-Expression zu einer Hochregulation von Metalloproteinasen wie MMP2 und MMP9, die wiederum positiv mit einem stärker invasiven Phänotyp der Tumorzellen korreliert ist.[91] Für Hautmelanome zeigte sich entsprechend eine höhere Expression von Cav-1 sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen. Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen Cav-1 und einer höheren Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-9 beobachtet.[96] Auch wiesen Cav-1 exprimierende Tumoren eine höhere Metastasierungsrate auf. Für Hautmelanome wurde gezeigt, dass Phospho-Caveolin-1 eine Signalkaskade anstößt, die Tumorprogression und Metastasierung fördert.[96] Diese Daten stimmen mit den hier vorgestellten Ergebnissen einer erhöhten Expressivität von Caveolin-1 in metastasierten uvealen Melanomen überein.

Die Wirkung von Cav-1 scheint auch von der Tumorart abhängig zu sein. Wie bereits beschrieben wird Cav-1 im Prostatakarzinom aber auch im Blasenkarzinom und im Ösophaguskarzinom hochreguliert. Für diese Tumore ist eine erhöhte Cav-1-Expression mit einem aggressiveren Wachstum und einer vermehrten Metastasierung assoziiert.[97–99] Wiederum agiert Cav-1 für einige andere Tumorarten als Tumorsuppressor. Hierunter finden sich das Zervixkarzinom[100] und das Ovarialkarzinom.[101]

Verschiedene *In-vitro*-Studien untersuchten die Rolle von Cav-1 als Tumorsuppressor. So zeigten Williams et al. erstmals an einem Tiermodell mit Cav-1 -/- Mäusen, dass Caveolin-1

auch einen suppressiven Einfluss auf das Tumorwachstum beim Mammakarzinom haben kann.[87] Welche Rolle Cav-1 im Tumor übernimmt ist von seinen Interaktionspartnern, dem Zellkontext und dem Tumorstadium abhängig. Die unterschiedlichen Wirkungen des Cav-1 in Tumoren werden durch Änderungen auf nachfolgende Signalkaskaden in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus des Cav-1 induziert.[96] Diese posttranslationale Modifikation findet an verschiedenen Proteindomänen statt. Die Src-Familienkinase phosphoryliert am Tyrosin-14-Ende. Diese führt zu einer Translokation und einer Clusterung mit Integrinen zu fokalen Adhäsionen, welche ihrerseits an der Zelladhäsion, -migration und -invasion beteiligt sind.[102, 103] Phospho-Caveolin-1 vermittelt so die Integrin gesteuerte Internalisation von Membrandomänen.[104] Falicetti konnte für das kutane Melanom eine Abhängigkeit der Zellinvasion, -migration und -adhäsion von phosphoryliertem Cav-1 nachweisen. So verhielten sich Zelllinien, auf die ein nicht phosphorylierbares Cav-1Y14A übertragen wurde, weniger aggressiv und invasiv.[96] Hingegen demonstrierten Williams et al. am Mausmodell für das Mammakarzinom eine tumorsuppressive Rolle des Cav-1. Über die Heraufregulation von Cyclin-D1 in der Abwesenheit von Cav-1 und vermehrter Phosphorylierung des Retinoblastomproteins wurde eine schnelle Transformation der Tumorzellen aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt, was wiederum für ein schnelleres und aggressiveres Tumorwachstum sorgt.[93]

Zhang et al. zeigten, dass Cav-1 eine inhibitorische Wirkung auf den *Epidermal Growth Factor* hat, sodass dieser seine lamellipode und pro-migratorische Wirkung nicht entfalten kann. Cav-1 kann die EGF-induzierte Ausbildung von F-Aktinfilamenten an den Lamellipoden hemmen. Außerdem zeigte sich in dieser *In-vitro*-Studie an motilen und non-motilen Zelllinien des Mammaadenokarzinoms, dass Cav-1 die chemotaktische Wirkung des EGF hemmen kann. Diese Wirkung wird über eine Inhibition der p42/44-MAP-Kinase-Signalkaskade vermittelt.[105] Während der Tumorprogression insbesondere von hochmalignen Zellen des Kolonkarzinoms bzw. von Melanomen verliert Cav-1 die Fähigkeit, E-Cadherin zu supprimieren. In der Abwesenheit von E-Cadherin verliert Cav-1 seine potentiell tumorsuppressiven Eigenschaften.[89] Der Verlust der Fähigkeit der Zellverankerung ist eine Voraussetzung für das Tumorwachstum und die Ausbildung von Metastasen. Dies erklärt die im Rahmen dieser Studie beobachtete vermehrte Expression von Cav-1 in den maligneren, metastasierenden Tumoren dieser Serie der uvealen Melanome.

Weitere *In-vitro*-Studien konnten ebenfalls zeigen, dass die Internalisation und Adhäsion der abgesiedelten Zellen phosphoryliertes Cav-1 als Mediator braucht. So war *in vitro* eine hohe Cav-1-Expression mit erhöhter lymphonodularer Metastasierung assoziiert, während Zelllinien, die mit dem Src-Familien-Kinase-Inhibitor-PP1 kultiviert wurden, herabgesetzte chemotaktische Fähigkeiten zeigten. Eine posttranslationale Modifikation verschiedener Proteindomänen wie die Phosphorylierung von Tyrosine-14 durch die Src-Familienkinase bewirkt

eine Modifikation der tumorsuppressiven Rolle des Cav-1.[96–103] Die Phosphorylierung an der Proteindomäne Thyrosin-14 bewirkt nach einer fokalen Adhäsion, eine Migration, eine Invasion und eine Aufnahme der sogenannten *cholesterol-enriched membrane microdomains* (CEMM). Es vermittelt die Inhibition einer folgenden Signalkaskade, an der auch die Phosphoinositol-3-Kinase beteiligt ist.[102] Neben der Expression von Cav-1 untersuchten wir auch die Interaktion von Cav-1 und der PI3K mit dem VM (siehe 3.2.3).

4.3. Zur Korrelation von Cav-1 mit anderen Prognosefaktoren des primären uvealen Melanoms

In verschiedenen vorausgegangenen Studien wurden für verschiedene Tumore die Korrelation zwischen einer erhöhten Caveolin-1-Expression und einem aggressiven Tumorwachstum bzw. einer erhöhten Metastasierungsrate und frühzeitigem Tod der Patienten gezeigt.[90, 106]

Von Falicetti et al. konnte einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von Ph-Cav-1, einer vermehrten Invasion in andere Gewebe und einer erhöhten Migrationsfähigkeit des kutanen Melanoms nachweisen.[96] In dieser Studie konnte eine signifikante Korrelation zwischen bekannten Prognosefaktoren und einer erhöhten Caveolin-1-Expression im uvealen Melanom gezeigt werden. So war eine erhöhte Caveolin-1-Expression mit einem größeren Tumordurchmesser und einer Invasion des Nervus Optikus assoziiert. Eine signifikante Korrelation zeigte sich außerdem für die Caveolin-1-Expression in einem fortgeschrittenen Stadium der TNM-Klassifikation. Wir haben gezeigt, dass eine Assoziation zwischen erhöhter Caveolin-1-Expression und aggressivem Tumorwachstum auch für die hier untersuchten uvealen Melanome gilt.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein. Schatz et al. kamen in einer *In-vitro*-Studie zu dem Ergebnis, dass Cav-1 bei Zelllinien humaner Karzinome, die multiple Resistenzen gegen Chemotherapeutika aufweisen, mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert ist und in metastasierten Tumoren vermehrt exprimiert wird.[91]

4.4. Zur PI3K-Expression im primären uvealen Melanom

Eine weitere hochrelevante Rolle für die Tumorgenese und Metastasierung von Melanomen spielt die Phosphoinositol-3-Kinase. Park et al. zeigten, dass die Signalkaskade der PI3K durch Cav-1 angestoßen werden kann.[49] Dieser Zusammenhang wurde jedoch noch nicht für das primäre uveale Melanom untersucht.

Es konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die PI3K von allen primären uvealen Melanomen dieser Tumorseerie exprimiert wird. Durchschnittlich waren 89,14 % der Zellen positiv. Es lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der PI3K-Expressionsrate der metastasierten und nicht-metastasierten Tumore vor. Eine graphische Darstellung zeigt eine Tendenz, dass PI3K vermehrt in metastasierten uvealen Melanomen exprimiert wird (siehe Abb. 3.6).

PI3K gehört zu einer Familie von intrazellulären Signalproteinen, die durch ihr Zusammenwirken die Apoptose regulieren. Die PI3K phosphoryliert das Phosphoinositol und erzeugt so das Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3). PIP3 verlagert die Serin/ Threonin-Kinase AKT (auch Proteinkinase-B, PKB) in die Zellmembran. Die Aktivierung der AKT induziert eine Phosphorylierung durch die PDK1. Die aktivierte AKT unterdrückt proapoptotische Proteine wie Caspase 9 und BAD und aktiviert den Tumornekrosefaktor NF- κ B.[107] Eine Aktivierung der PI3K- und PKB-Signalkaskade wurde schon mehrfach für verschiedene Tumorentitäten beobachtet. Testa und Bellacosa interessierten sich zunächst für den tumorigenen Einfluss der AKT und fanden ein enges Zusammenspiel mit der nachgeschalteten PI3K-Signalkaskade.[108] Für kutane Melanome ist die Initialisierung der AKT-Signalkaskade durch PI3K ein ausschlaggebender Faktor.[109] Durch die PI3K-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin konnte die AKT/PKB-Phosphorylierung inhibiert werden. Die verminderte AKT-Aktivität führt zu einer proportional gesteigerten Apoptose in Zellen mit aktiver Akt/PKB.[110] Eine solche Hemmung der PI3K hemmt Melanome im Wachstum.[111] Diese Hemmung ist schon mittels des PI3K-Hemmstoffs LY-294002 an *In-vitro*-Modellen gelungen; hier konnte ein vermindertes Zellwachstum der Melanome beobachtet werden.[112]

Ein physiologischer Gegenspieler der PI3K ist das Tumorsuppressorprotein *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN). Die PTEN funktioniert sowohl als Lipid als auch als Protein-Phosphatase.[113] Es kann die PI3K/AKT-Signalkaskade hemmen und so für eine gesteigerte Apoptose und eine Verminderung der Tumorigenese sorgen. Wie in vorausgegangenen Studien am kutanen Melanom konnte für viele invasiv wachsende, maligne Melanome ein Verlust der PTEN-Funktion nachgewiesen werden.[114] Dazu passend wurde beobachtet, dass PTEN-negative Zellen eine höhere AKT/PKB-Aktivität und in der Folge weniger Apoptose zeigen.[115]

Die PI3K phosphoryliert nach ihrer Aktivierung nicht nur die AKT/PKB sondern auch Tuberin. Hierdurch wird der Hamatin-Tuberin-Komplex inhibiert und als Folge der m-TOR (mammalian target of rapamycin)-Komplex aktiviert.[116] Der m-TOR-Komplex ist ebenfalls an der Regulation der Proteinsynthese und des Zellwachstums beteiligt. Eine Hemmung des m-TOR-Komplexes hat synergetische Effekte bei einer gleichzeitigen PI3K-Hemmung auf die Proliferation von Melanomen.[111]

Eine Reduktion der PI3K-Aktivität führte schon in mehreren Studien sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Inhibition des Melanomwachstums.[111, 117] In einem *In-vitro*-Modell mit der Melanomzelllinie G361 gelang es, durch Einschleusung einer funktionsunfähigen Untereinheit (dem Delta p85) in die Zelle die Aktivität der PI3K zu reduzieren. Zellen mit funktionsunfähiger Untereinheit reagierten auf genotoxischen Stress mit vermehrter Apoptose.[118]

Eine Überexpression der PI3K wurde schon mit vielen anderen Tumorentitäten in Verbindung gebracht. So zeigten auch Magenkarzinome, Pankreaskarzinome, Glioblastome, Mamma- und Ovarialkarzinome erhöhte PI3K-Expressionen.[119–123]

Für den PI3K-Signaltransduktionsweg wurden in vorausgegangenen Studien auch in uvealen Melanomen eine hohe Aktivität beobachtet.[124] PI3K und seine vor- und nachgeschalteten Proteine wurden in Studien schon mehrfach erfolgreich blockiert. Bisher standen dabei die PI3K selbst [112] oder ihre nachgeschalteten Signalproteine des mTOR-Komplexes im Interesse der Studien.[124] So versuchten Babchia et al. neben einer Blockade der PI3K mit dem Inhibitor LY 294002 auch eine Blockade des mTor-Komplexes mit Rapamycin. Es zeigte sich, dass die direkte PI3K-Blockade zu einer deutlichen Reduktion der Zellproliferation der uvealen Melanomzellen führte. Im Gegensatz hierzu führte die Blockade des m-TOR-Komplexes nicht zu einer verminderten Proliferation. [124]

In unserer Studie zeigt sich eine Tendenz zu erhöhter PI3K-Expression in metastasierten uvealen Melanomen. Das beobachtete Ergebnis ist jedoch nicht statistisch signifikant. Daher ist anzunehmen, dass die Hochregulation der PI3K, über einen weiteren Faktor vermittelt, zu vermehrter Metastasierung führt.

4.5. Zur Korrelation von PI3K mit anderen Prognosefaktoren des primären uvealen Melanoms

In der hier untersuchten Tumorserie konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte PI3K-Expression mit einer größeren Tumorphöhe und einem fortgeschrittenen Tumorstadium entsprechend der TNM-Klassifikation assoziiert ist. Auch vorausgegangenen Studien konnten deutliche erhöhte Expressionen von PI3K bzw. phospho-AKT in enuklierten Augen mit Melanomen nachweisen werden.[125]

4.6. Zum *vasculogenic mimicry* im primären uvealen Melanom

Da es im Auge keine Lymphgefäße gibt, ist die einzige Möglichkeit für die Tumorzellaussaat der hämatogene Metastasierungsweg. Der Blutversorgung des uvealen Melanoms kommt also eine besondere Bedeutung zu. Der Zusammenhang zwischen dem *vasculogenic mimicry* und der Metastasierung ist von besonderem Interesse. Tumore, die VM aufweisen, entwickeln signifikant häufiger Metastasen.[26] Dies konnten wir auch in dieser Tumorserie nachweisen. Die im Rahmen dieser Studie untersuchte Serie von 51 uvealen Melanomen wies eine erhöhte Rate von VM in den metastasierten uvealen Melanomen auf. Es gab eine signifikant positive Korrelation (Pearson-Korrelation) zwischen VM und dem Vorhandensein von Metastasen ($p = 0,016$).

Auch haben wir in den untersuchten Tumoren eine positive Korrelation zwischen Tumordurchmesser und VM festgestellt. Die Gefäßkanäle des VM unterstützen durch eine vermehrte Blutversorgung das Tumorstadium. Unsere Ergebnisse lassen sich mit den Resultaten von vorausgegangenen Studien vereinbaren.[126] Unterstützt wird die Hypothese durch die Tatsache, dass für die Ausbildung des VM eine erhöhte migratorische Aktivität der Tumorzellen von Bedeutung ist. Cav-1 ist eine Hauptproteinkomponente, die bei der Migration und Invasion von Zellen eine Rolle spielt.[127] Auch eine Hochregulation der PI3K/ AKT –Kaskade resultiert in einer erhöhten Zellmotilität. Dabei trägt AKT zu einer Polymerisation von Aktinproteinen bei, die die Ausbildung von Lamellipoden induzieren. Dabei scheint Cav-1 über die AKT–Signalkaskade die Ausbildung dieser Lamellipoden zu induzieren.[128]

Zudem wurde nachgewiesen, dass die Anzahl der Lamellipoden mit einem vermehrten Migrationsverhalten von Tumorzellen einhergeht.[129] Auch diese Ergebnisse erklären unsere Beobachtung, dass eine Korrelation von Cav-1, PI3K und VM in dieser Serie von uvealen Melanomen vorliegt.

Weiterhin untersuchten wir die Rolle der PI3K im Zusammenspiel mit Cav-1 als Teil der Signalkaskade für die Ausbildung des VM, welches wiederum mit erhöhter Metastasierung assoziiert ist. Als Hinweis für ein Zusammenspiel kann eine Korrelation der Expressionsraten von Cav-1 und PI3K und dem VM gesehen werden.

In der vorliegenden Studie lässt sich eine deutliche Tendenz für die Korrelation der subjektiven Cav-1-Expressionsrate mit VM mit $p=0,072$ erkennen. Darüber hinaus konnten wir erstmalig eine Korrelation von Caveolin-1 und der PI3K-Expression in uvealen Melanomen feststellen. Möglicherweise induziert Caveolin-1 die PI3K-Signalkaskade und bewirkt darüber

eine Induktion des *vasculogenic mimicry*.

An den Ergebnissen zur Korrelation der PI3K-Expression und der Metastasierungsrate lässt sich erkennen, dass die Phosphoinositol-3-Kinase an Signalwegen beteiligt ist, die in einem aggressiveren Tumorwachstum münden. Vorangegangene *In-vitro*-Studien haben bereits den Zusammenhang postuliert, dass PI3K die Aktivität von MT1-MMP, MMP-2 und die Spaltung der *Laminin-5-gamma-2-Chain* steuert und so zentrale Elemente des Melanom VM reguliert. MT1 und MMP2 wurden in vorausgegangenen Studien als Schlüsselmediatoren für die Ausbildung des VM bei aggressiven Melanomzellreihen beschrieben.[130] Es gelang in einem *In-vitro*-Modell, die Ausbildung von VM durch MT1-MMP- und MMP2-Antikörper zu verhindern. Darüber hinaus zeigte sich eine erhöhte Expression von *Laminin-5-gamma-2-Chain* in Zellreihen aggressiver Melanome. Weiterhin wurde eine negative Korrelation der zerfallenen Elemente des *Laminin-5-gamma-2-Chain* mit der Anwesenheit von MT1-MMP- und MMP2-Antikörpern beobachtet.[130] Die Aktivität des MT1-MMP und MMP2 scheint also wichtig für die Spaltung des *Laminin-5-gamma-2-Chain* zu sein.[130] Kubiakowski et al. untersuchten an Zelllinien des Glioblastoms das Zusammenspiel der MMP2 und PI3K. Sie fanden, dass eine Inhibition von PI3K auch zu einer Inhibition der MMP2 auf der mRNA-Ebene führt.[123] Ähnliche Ergebnisse fanden Zhang et al. bei einem *In-vitro*-Modell des Lewis Lungenkarzinoms. Auch hier wurde die MT1-MMP- und MMP2-Aktivität durch Blockade der PI3K inhibiert. Darüber hinaus fanden sie einen Einfluss des IGF-IR auf die Signalkaskade.[131]

In zusammenführender Betrachtung lässt sich postulieren, dass die PI3K-Aktivität über die MT-MMP1 und MMP2, sowie die Spaltung des *Laminin-5-gamma-2-Chain* Einfluss auf die Ausbildung von VM in aggressiv wachsenden Tumoren nimmt.

In diesen Zusammenhang passen die Ergebnisse unserer Studie, die eine nicht signifikant erhöhte PI3K-Expression in metastasierten uvealen Melanomen und eine deutliche Assoziation zwischen VM und PI3K nachweisen konnten. Möglicherweise beeinflusst die PI3K über VM die Metastasierung der primären uvealen Melanome beeinflusst. Auch die Cav-1-Expression zeigte eine Tendenz zur positiven Korrelation mit VM. Cav-1 und PI3K korrelierten in unserer Studie positiv miteinander. Aufgrund dieser positiven Korrelation von Cav-1 und PI3K mit VM lässt sich vermuten, dass Cav-1 über die PI3K-Signalkaskade das *vasculogenic mimicry* im primären uvealen Melanom beeinflusst.

4.7. Bedeutung von Cav-1 und PI3K für die Angiogenese

Uveale Melanome stellen ihre Blutversorgung auch über die Angiogenese endothelausgekleideter Gefäße sicher. Die Angiogenese ist ein äußerst komplexer Prozess, der ein Zusam-

menspiel vieler Faktoren erfordert. Zunächst reagieren die Wachstumsfaktoren auf den proangiogenetischen Stimulus, ausgewählte Endothelzellen werden aus dem vaskulären Plexus rekrutiert und erfahren Veränderungen ihrer Polarität und des Zytoskeletts. Sie verformen sich in zwei Untergruppen, die schließlich an der Bildung neuer Gefäße beteiligt sind.[132] Für das uveale Melanom konnte schon mehrfach am Tiermodell und *in vitro* beobachtet werden, dass eine pharmakologische Angiogeneseinhibition mit Angiostatin oder Bevacizumab ein vermindertes Auftreten von Lebermetastasen sowie ein vermindertes Zellwachstum erreicht.[133, 134] Notting et al. fanden in uvealen Melanomzelllinien eine erhöhte Expression des *Vascular Endothelial Growth Factors* in der Isoform A (VEGF-A) und des *Basic Fibroblastic Growth Factors*. Ihnen wird eine Schlüsselrolle für die Angiogenese der uvealen Melanome zugeschrieben.[68] In Studien wurde auch eine Erhöhung des messbaren VEGF-A in der Tränenflüssigkeit und in der Glaskörperflüssigkeit bei Patienten mit uvealem Melanom nachgewiesen.[78] *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zellreihen des uvealen Melanoms in der Lage sind, VEGF-A zu produzieren und dass diese Produktion unter hypoxischen Bedingungen ansteigt.[79] Im Tiermodell bei Mäusen konnten sogar erhöhte Serum-VEGF-Spiegel bei Mäusen mit hepatischen Metastasen von uvealen Melanomen gemessen werden. Die Höhe der Serumspiegel an VEGF korrelierte bei den Tieren mit der Anzahl der hepatischen Metastasen.[80] Die prozentuale VEGF-A Expression in primären uvealen Melanomen wurde in verschiedenen Studien sehr unterschiedlich gesehen. So fanden Boyd et al. VEGF-A in 22 % der 20 untersuchten Tumore[81], während Sheidow et al. VEGF in 93,6 % der untersuchten Tumoren nachwiesen.[82] Für die Pathogenese des uvealen Melanoms ist also die Betrachtung der Angiogenese nicht zu vernachlässigen. Zur Ausbildung der Angiogenese übernimmt das VEGF eine Schlüsselrolle in der molekularen Signalkaskade.[134] Ein weiteres wichtiges Schlüsselmolekül für die Angiogenese ist der endothel-spezifische Marker Endoglin (CD105). Als Rezeptor des Transforming-growth-factor- β (TGF- β) ist er an der Steuerung der Gefäßformation der Endothelzellen in der Kollagenmatrix beteiligt.[126] Das Membranglycoprotein wird in hohem Maße in den Endothelzellen exprimiert und ist daher ein guter Marker für die Detektion der Angiogenese.[135] Ein weiterer sehr verbreiteter Endotheldetektor ist der von-Willebrandt-Faktor. Der vWF ist ein Plasmaglycoprotein, das eine wichtige Rolle bei der Plättchenadhäsion der Hämostase übernimmt. Der vWF wird in Endothelzellen gebildet und dort intrazellulär gespeichert.[132] Die immunhistochemische Abfärbung der vWF ist ein guter Marker für die Anwesenheit von Endothel und damit matura Gefäße.

In vorausgegangenen Studien wurde an Nierenkarzinommodellen eine Korrelation zwischen erhöhter Angiogenese und der Expression von Cav-1 aufgezeigt.[136] Auch für Prostatakarzinommodelle wurde nachgewiesen, dass Cav-1 eine zentrale Rolle bei der VEGF / VEGF-2 induzierten Angiogenese spielt.[137] Es lässt sich eine Beteiligung von Cav-1 an der Angiogenese während der Tumorgenese vermuten. In unserer Studie konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden. Es gab weder für vWF ($p=0,642$) noch für Endoglin ($p=0,460$) eine

positive Korrelation mit Cav-1. Auch mit PI3K konnte keine positive Korrelation mit vWF und Endoglin gesehen werden. Die PI3K-AKT-Kaskade wird von VEGF induziert und reguliert auf diesem Weg die Endothelzellmigration und Röhrenformation durch Veränderungen der Zelloberflächenstruktur und des Zytoskeletts während der Angiogenese.[138] Weitere Studien postulieren eine Beteiligung der PI3K durch die antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen an der Angiogenese.[139] In dieser Studie konnte jedoch für die PI3K-Expression keine Korrelation mit vWF oder Endoglin (CD 105) gezeigt werden.

Bei der hier untersuchten Serie von uvealen Melanomen handelt es sich um sehr große Tumore mit einer durchschnittlichen Tumorbasis von 1,6 cm. Da in stark wachsenden Tumoren das VM zunächst im Vordergrund steht und erst im Anschluss an die schnelle Wachstumsphase die Anzahl der Endothel ausgekleideten Gefäße zunimmt und die Bedeutung des VM abnimmt, ist davon auszugehen, dass eine homogenere Tumorgefäßentwicklung nachweisbar wäre.

4.8. Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat Bedeutung für das Verständnis des Metastasierungsprozesses beim uvealen Melanom. Bisherige Therapiemaßnahmen der uvealen Melanome zielen vor allem auf die lokale Tumorkontrolle ab. Gerade beim uvealen Melanom erkranken und versterben über 50 % der Patienten an Metastasen. Daher ist gerade für die primären uvealen Melanome ein Verständnis der Metastasierungsprozesse von großer Bedeutung für neue, verbesserte therapeutische Ansätze.

Die beteiligten Faktoren in den an der Metastasierung beteiligten Signalkaskaden könnten Angriffspunkte für Therapien sein. Ein umfassendes Verständnis der Angiogenese und Metastasierung auf molekularer Ebene ist daher von entscheidender Wichtigkeit. Zu diesem Verständnis leistet diese Arbeit einen Beitrag. Es gibt bereits Studien zur therapeutischen Beeinflussung der Signalkaskade. Die Zellproliferation von malignen Melanomzellreihen konnte *in vitro* durch die kombinierte Blockade mit MEK und PI3K erreicht werden. Gleichzeitig wurde gesehen, dass eine alleinige Blockade der PI3K nicht zu einer Verminderung der Proliferation der uvealen Malignomzellen führte.[140] Bei einer vollständigen Blockade der PI3K mit LY24002 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der Übergang der Zellen in die S-Phase blockiert wird, wenn der Inhibitor in der G1-Phase hinzugefügt wird.[141] Andere Studien beobachteten *in vitro* eine B-Raf/ERK-Kaskade bei vollständiger Blockade der PI3K.[141] Es scheint also ein Zusammenspiel der beiden Kaskaden zu geben, sodass eine einseitige Blockade therapeutisch nicht erfolgreich ist.[142] Mit dem oral verfügbaren Inhibitor der PI3K, GSK2126458, welcher gleichzeitig die PI3K sowie den m-Tor-Komplex inhibiert, wurde

bereits in präklinischen *In-vivo*-Studien ein therapeutischer Effekt auf die Proliferation von uvealen Melanomen gezeigt. Klinische Studien stehen allerdings noch aus.[142]

Eine mögliche therapeutische Verwendbarkeit wurde jedoch nicht nur für PI3K nachgewiesen, sondern wird auch für Cav-1 vermutet. *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass monoklonale Antikörper, die gegen Cav-1 gerichtet sind, das Zellwachstum von Tumorzellen der Prostata in Zellkultur und in einem Mausmodell inhibieren.[143]

Der von uns aufgezeigte Zusammenhang zwischen Cav-1 und PI3K und ihr Einfluss auf das VM und damit die Blutversorgung des Tumors bieten neue Ansätze für Therapien. Möglicherweise können weitere synergetische Effekte für eine Kombination der bereits erprobten PI3K-Blockade genutzt werden.

Kapitel 5.

Zusammenfassung

Diese Arbeit untersucht die immunhistochemische Expression von Cav-1 und PI3K an 51 Paraffinschnitten primärer uvealer Melanome. Bei 30 der an einem uvealen Melanom erkrankten Patienten wurde eine systemische Metastasierung klinisch diagnostiziert. Während eines durchschnittlichen Nachuntersuchungszeitraums von 10 Jahren wurden bei den verbleibenden Patienten keine systemischen Metastasen nachgewiesen.

In der vorliegenden Versuchsreihe exprimierten alle untersuchten Tumoren Cav-1. Der prozentuale Anteil der Caveolin exprimierenden Zellen lag zwischen 3,23 % und 100 % (Durchschnitt: 90,34 %). Es zeigte sich eine Tendenz zu einer vermehrten Caveolin-1-Expression bei Tumoren, die Metastasen im weiteren klinischen Verlauf entwickelten. Die Korrelation mit den bekannten Prognosefaktoren ergab eine signifikante Assoziation (Pearson-Korrelation) für die subjektive Expressionsrate von Caveolin-1 und dem größten Tumordurchmesser ($p = 0,022$), der TNM-Klassifikation ($p = 0,008$) und der Invasion des Sehnervs ($p = 0,048$). Die PI3K wird von allen primären uveal Melanomen dieser Tumorserie exprimiert. Durchschnittlich weisen 87,28 % der uveal Melanomzellen eine PI3K-Expression auf. Eine vermehrte PI3K-Expression war mit einer größeren Tumorphöhe ($p = 0,042$) und einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert ($p = 0,016$). Die Anzahl positiver Zellen für PI3K war signifikant mit der objektiven Expressionsrate von Caveolin assoziiert ($p = 0,034$). Für die PI3K- und Caveolin-1-Expression wurde eine nicht signifikante Assoziation mit dem *vasculogenic mimicry* nachgewiesen ($p = 0,064$ bzw. $p = 0,072$). Keine Korrelation von der PI3K oder Caveolin-1 mit der Angiogenese oder muren Gefäßen war detektierbar ($p > 0,05$).

Demnach ist die Caveolin-1-Expression insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien des uveal Melanoms nachweisbar und mit der PI3K-Expression beziehungsweise mit dem VM signifikant assoziiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Caveolin-1 eine Ausbildung des VMs mittels der PI3K-Signalkaskade induziert.

Anhang A.

Anhang

A.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
100ter	100-facher-Vergrößerung
200ter	200-facher-Vergrößerung
400ter	400-facher-Vergrößerung
5-JÜ	5 Jahres-Überlebensrate
AH	Aderhaut
AMF	autocrine motility factor
BF	bright field
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	bovines Serum-Albumin
C ₆ H ₈ O ₇	Zitronensäuremonohydrat
Cav-1	Caveolin-1
CD31	cluster of differentiation
CEMM	cholesterol-enriched membrane microdomains
Cil	Ziliarkörper
cm	Zentimeter
Co	Cobalt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
GTD	größter Tumordurchmesser
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HCL	Chlorwasserstoff
He ²⁺	Helium
HH	Hornhaut
IgG	Immunglobulin G
Ir	Iridiumplaque
J	Jod
JL	Julia Lüke
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHz	Mega Hertz
min	Minuten
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MMP2	Matrixmetalloproteinase-2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Miriam Stenzel
MT-MMP2	membrane type-1 matrix metalloproteinase
m-TOR	mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH	Netzhaut
PAS	Perjod Schiff Acid
PBS	phosphat-gepufferte Salzsäure
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
Ph-Cav-1	Phospho-Caveolin-1
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKB	Proteinkinase-B

PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
Ru	Ruthenium
Sr	Strontium
StA	Standardabweichung
TBS	tris-gepufferte Salzsäure
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TIFF	Tagged Image File Format
TMN	Tumor, Nodes, Metastases
TTT	Transpupiläre Thermotheapie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor in der Isoform A
VM	vasculogenic mimicry
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

A.2. Abbildungsverzeichnis

1.1. Bänderdiagramm Caveolin-1 (beta-Isoform)	8
1.2. Bänderdiagramm der PI3K	9
1.3. Hypothetischer Signaltransduktionsweg der PI3K im Rahmen des VM . . .	10
2.1. Boxplot Diagramm: Follow-up in Jahren für metastasierte und nicht metasta- sierte Tumore	19
2.2. Fluoreszenz-Aufnahme der HH in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild . .	28
2.3. Fluoreszenz-Aufnahme der Iris in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild . .	28
2.4. Fluoreszenz-Aufnahme des Ziliarkörpers in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild: Ziliarkörper eines präparierten Auges mit metastasiertem Tumor und Ziliarkörper- Invasion	29
2.5. Fluoreszenz-Aufnahme der NH in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild: Prä- parat eines Tumors, der im Verlauf metastasierte	29
2.6. Fluoreszenz-Aufnahme der AH in 200-facher Vergrößerung; 3-Kanalbild . .	30
2.7. Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung; 3 Kanalbild	30
2.8. Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter L5 . .	30
2.9. Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter Y3	31

2.10. Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter für DAPI	31
2.11. Lichtmikroskopische Aufnahme eines CD31+PAS gefärbten Präparates in 200ter Vergrößerung	35
3.1. Boxplot Diagramm: Cav-1-Expression für metastasierte und nicht metasta- sierte Tumore	39
3.2. Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter L5 . .	39
3.3. Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter L5 . .	39
3.4. Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter Y3 . .	43
3.5. Fluoreszenz-Aufnahme in 400-facher Vergrößerung mit Lampenfilter Y3 . .	43
3.6. Boxplot Diagramm: PI3K-Expression für metastasierte und nicht metastasierte uveale Melanome	44
3.7. Boxplot Diagramm: Cav-1 Expressionsrate für VM positive und VM negative Tumore	47
3.8. Boxplot Diagramm: PI3K-Expressionsrate für VM positive und VM negative Tumore	47

A.3. Tabellenverzeichnis

2.1. Klinische Daten und Tumorcharakteristika der untersuchten Tumore	18
2.2. Bleichzeiten der Präparate für die Färbung mit CD31 und PAS	32
3.1. Caveolin-1-Expressionsraten für metastasierte und nicht metastasierte Tumore	38
3.2. Korrelationen der Caveolin-1-Expression mit bisher bekannten Tumorprogno- sefaktoren	40
3.3. PI3K-Expressionsraten metastasierter und nicht metastasierter Tumore . .	42
3.4. Korrelation der PI3K-Expression mit bisher bekannten Prognosefaktoren . .	45
3.5. Korrelation des VM mit bisher bekannten Tumorprognosefaktoren	46
3.6. Korrelation der Expression von PI3K und Caveolin-1 mit VM	47

Anhang B.

Danksagung

Ich danke dem Direktor der Klinik für Augenheilkunde der Universität zu Lübeck Herrn Prof. Dr. Grisanti, dass ich die Arbeit zu diesem spannenden Thema übernehmen durfte.

Ein sehr herzliches Dankeschön möchte ich an meine Doktormutter Frau PD Dr. Julia Lücke richten. Sie hat mich betreut und meine ersten Schritte in der Wissenschaft fürsorglich aber fordernd begleitet. In der Zeit unserer Zusammenarbeit ist sie für mich zu einem Vorbild geworden, nicht nur als Ärztin und Wissenschaftlerin.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Christine Örün und Frau Dr. Aysegül Tura bedanken, die mir oft im Labor unter die Arme gegriffen haben und mir mit praktischen Ratschlägen zur Seite standen. Die Türen ihrer Labore standen mir jederzeit ebenso offen wie ihre Ohren.

Einen sehr herzlichen Dank möchte ich auch an Herrn Dr. Khaled Nassar richten. Seine geduldige Art bei der Erklärung von Laborgeräten und deren Software hat mir sehr geholfen. Außerdem hat er mich sehr bei der statistischen Aufarbeitung meiner Daten unterstützt. Auch hierbei war ihm keine meiner vielen Nachfragen zu lästig.

Ein weiterer Dank gilt dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck, welches uns Präparate und Positivkontrollen zur Verfügung gestellt haben.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Anselm von Gladiß. Er hat mich mit vielen technischen Ratschlägen und manch ermutigendem Wort bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Arbeit sehr unterstützt.

Zum Ende möchte ich mich noch bei meiner langjährigen Freundin Vivian Allouche für die sprachliche Korrektur meiner Arbeit bedanken. Sie hat den langen und an manchen Stellen etwas trockenen Text akribisch gelesen.

Abschließend bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern Adelgunde und Detlef Stenzel. Sie haben mich stets ermutigt, meinen Weg zu gehen und mir den Rücken gestärkt.

Anhang C.

Curriculum Vitae



Ausbildung

- 2006** Abitur am Erzbischöflichen St. Anna Gymnasium Wuppertal
- 2006 - 2009** Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 2009** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2009 - 2013** Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
- 2013** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

- seit 2013** Assistenzärztin der Neurochirurgie am Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

Militärische Laufbahn

- 2006** Eintritt in die Bundeswehr
Sanitätsoffizieranwärter der Marine in der Crew VII / 06
- 2010** Beförderung zum Leutnant zur See
- 2013** Beförderung zum Stabsarzt

Wissenschaftliche Karriere

- seit 2010** Doktorandin an der Klinik für Augenheilkunde, Universität zu Lübeck
- 2012** Präsentation auf der Norddeutschen Augenärzte Tagung
„Expression von Caveolin-1 und der Phosphoinositol-3-Kinase in primären uvealen Melanomen“
- 2014** Poster-Präsentation auf der Jahrestagung der Neuroonkologischen Arbeitsgemeinschaft
„Metastatic angiosarcoma of the brain disguised as hemorrhage from a cavernous angioma“

Auslandsaufenthalte

- 2003 - 2004** Long Creek High School in Oregon, USA
- 2011** Famulatur am Agogo Presbyterian Hospital in Agogo, Ghana

Soziales Engagement

- seit 2004** Leo-Club
Leo-Club Wuppertal, Leo-Club „Lübeck Sieben Türme“ (Gründungsmitglied, Präsidentin 2010/2011), Distriktsprecherin des Leo-Distrikts 111-N 2011/2012, „Fellowship of Melvin Jones“ Award des Lions Club International 2012
- seit 2011** Botschafterin der Deutschen Teddy Stiftung e.V.

Literatur

- [1] T. W. SADLER und J. LANGMAN. *Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*. Thieme, 2003.
- [2] R. LÜLLMANN-RAUCH. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. Thieme, 2006.
- [3] K. M. EGAN, J. M. SEDDON, R. J. GLYNN, E. S. GRAGOUDES und D. M. ALBERT. *Epidemiologic aspects of uveal melanoma*. *Survey of ophthalmology*, 32(4):239–251, 1988.
- [4] L. A. YANNUZZI, D. R. GUYER und W. R. GREEN. *The retina atlas*. Mosby, 1995.
- [5] W. E. LIEB und J. M. ROHRBACH. *Tumoren des Auges und seiner Adnexe: Textbuch und Atlas unter besonderer Berücksichtigung des klinischen und morphologischen Bildes; mit 12 Tabellen*. Schattauer, 1998.
- [6] N. VICENTE, M. A. SAORNIL, C. GARCIA-ALVAREZ, A. ALMARAZ, P. ALONSO MARTINEZ, J. M. FRUTOS-BARAJA und F. LOPEZ-LARA. *Uveal melanoma: clinical characteristics, treatment and survival in a series of 500 patients*. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 88(11):433–8, 2013.
- [7] A. STANG, D. M. PARKIN, J. FERLAY und K.-H. JÖCKEL. *International uveal melanoma incidence trends in view of a decreasing proportion of morphological verification*. *Int J Cancer*, 114(1):114–23, 2005.
- [8] G. VIRGILI, G. GATTA, L. CICCOLALLO, R. CAPOCACCIA, A. BIGGERI, E. CROCETTI, J.-M. LUTZ und E. PACI. *Incidence of uveal melanoma in Europe*. *Ophthalmology*, 114(12):2309–2315, 2007.
- [9] S. MALLONE, E. d. VRIES, M. GUZZO, E. MIDENA, J. VERNE, J. W. COEBERGH, R. MARCOS-GRAGERA, E. ARDANAZ, R. MARTINEZ, M. D. CHIRLAQUE, C. NAVARRO und G. VIRGILI. *Descriptive epidemiology of malignant mucosal and uveal melanomas and adnexal skin carcinomas in Europe*. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(8):1167–1175, 2012.
- [10] D.-N. HU, G.-P. YU, S. A. MCCORMICK, S. SCHNEIDER und P. T. FINGER. *Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups*. *American journal of ophthalmology*, 140(4):612–617, 2005.
- [11] H. HAMMER, E. TÓTH-MOLNÁR, J. OLÁH und A. DOBOZY. *Az uvealis melanoma és a dysplasticus naevus-syndroma kapcsolata*. *Magyar onkologia*, 49(1):15–18, 2005.
- [12] J. ROOTMANN. *Diseases of the Orbit. A multidisciplinary approach*. Lippincott, 1988.

- [13] I. W. MCLEAN, W. D. FOSTER, L. E. ZIMMERMAN und J. W. GAMEL. *Modifications of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed Forces Institute of Pathology. American journal of ophthalmology*, 96(4):502–509, 1983.
- [14] M. YANOFF und B. S. FINE. *Ocular pathology: A color atlas*. Lippincott Gower Medical Pub., 1988.
- [15] D. M. ALBERT, M. DIENER-WEST, N. L. ROBINSON, H. E. GROSSNIKLAUS und W. R. GREEN. *Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. American journal of ophthalmology*, 125(6):745–766, 1998.
- [16] D. J. COLEMAN, R. H. SILVERMAN, M. J. RONDEAU, J. A. COLEMAN, D. ROSBERGER, R. M. ELLSWORTH und F. L. LIZZI. *Ultrasonic tissue characterization of uveal melanoma and prediction of patient survival after enucleation and brachytherapy. American journal of ophthalmology*, 112(6):682–688, 1991.
- [17] A. J. MUELLER, W. R. FREEMAN, R. FOLBERG, D. U. BARTSCH, A. SCHEIDER, U. SCHALLER und A. KAMPIK. *Evaluation of microvascularization pattern visibility in human choroidal melanomas: comparison of confocal fluorescein with indocyanine green angiography. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 237(6):448–456, 1999.
- [18] R. H. SILVERMAN, F. L. LIZZI, B. G. URSEA, M. J. RONDEAU, N. B. ELDEEN, A. KALISCZ, H. O. LLOYD und D. J. COLEMAN. *High-resolution ultrasonic imaging and characterization of the ciliary body. Investigative ophthalmology & visual science*, 42(5):885–894, 2001.
- [19] N. HOSTEN, A. LEMKE, B. SANDER, H. REQUARDT, R. WASSMUTH, J. MÄURER, N. ANDERS und R. FELIX. *MRT des Auges: Normalanatomie und Nachweis kleinster Läsionen mit einer hochauflösenden Oberflächenspule. RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*, 164(2):126–131, 1996.
- [20] J. J. AUGSBURGER, L. KHOURI, A. ROUMELIOTIS, R. C. KERSTEN, D. R. KULWIN und S. SCHNEIDER. *Enucleation versus preservation of blind eyes following plaque radiotherapy for choroidal melanoma. Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 39(4):372–379, 2004.
- [21] I. W. MCLEAN, V. S. SARAIVA und J. BURNIER M. N. *Pathological and prognostic features of uveal melanomas. Can J Ophthalmol*, 39(4):343–50, 2004.
- [22] L. DESJARDINS, C. LEVY-GABRIEL, L. LUMBROSO-LEROUIC, X. SASTRE, R. DENDALE, J. COUTURIER, S. PIPERNO-NEUMANN, T. DORVAL, P. MARIANI, R. SALMON, C. PLANCHER und B. ASSELAÏN. *Prognostic factors for malignant uveal melanoma. Retrospective study on 2,241 patients and recent contribution of monosomy-3 research. J Fr Ophtalmol*, 29(7):741–9, 2006.

- [23] G. NAREYECK, M. ZESCHNIGK, G. PRESCHER, D. R. LOHMANN und G. ANASTASSIOU. *Establishment and characterization of two uveal melanoma cell lines derived from tumors with loss of one chromosome 3. Experimental eye research*, 83(4):858–864, 2006.
- [24] J. GAMBRELLE, S. LABIALLE, G. DAYAN, L. GAYET, S. BARAKAT, J.-D. GRANGE und L. G. BAGGETTO. *Données cytogénétiques actuelles: vers la monosomie du chromosome 3 comme principal facteur pronostique du mélanome uvéal. Journal français d'ophtalmologie*, 27(9 Pt 1):1061–1067, 2004.
- [25] R. FOLBERG, M. MEHAFFEY, L. M. GARDNER, M. MEYER, V. RUMMELT und J. PE'ER. *The microcirculation of choroidal and ciliary body melanomas. Eye (London, England)*, 11 (Pt 2):227–238, 1997.
- [26] R. FOLBERG, M. J. HENDRIX und A. J. MANIOTIS. *Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. The American journal of pathology*, 156(2):361–381, 2000.
- [27] S. M. ALBELDA, W. A. MULLER, C. A. BUCK und P. J. NEWMAN. *Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. The Journal of cell biology*, 114(5):1059–1068, 1991.
- [28] J. FOLKMAN. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature medicine*, 1(1):27–31, 1995.
- [29] H. F. DVORAK. *Angiogenesis: update 2005. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 3(8):1835–1842, 2005.
- [30] S. L. SELLERS, A. E. TRANE und P. N. BERNATCHEZ. *Caveolin as a potential drug target for cardiovascular protection. Frontiers in physiology*, 3:280, 2012.
- [31] Y. N. KIM, G. J. WIEPZ, A. G. GUADARRAMA und P. J. BERTICS. *Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. Enhanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status. The Journal of biological chemistry*, 275(11):7481–7491, 2000.
- [32] P. LIU, M. RUDICK und R. G. W. ANDERSON. *Multiple functions of caveolin-1. The Journal of biological chemistry*, 277(44):41295–41298, 2002.
- [33] U. L. S. INC. *USCN Life Science*. URL: <http://www.uscnk.com> (besucht am 09. 12. 2012).
- [34] K. G. ROTHBERG, J. E. HEUSER, W. C. DONZELL, Y. S. YING, J. R. GLENNEY und R. G. ANDERSON. *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell*, 68(4):673–682, 1992.
- [35] X. M. WANG, Y. ZHANG, H. P. KIM, Z. ZHOU, C. A. FEGHALI-BOSTWICK, F. LIU, E. IFEDIGBO, X. XU, T. D. OURY, N. KAMINSKI und A. M. CHOI. *Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. J Exp Med*, 203(13):2895–906, 2006.

- [36] P. G. CORN und T. C. THOMPSON. *Identification of a novel prostate cancer biomarker, caveolin-1: Implications and potential clinical benefit. Cancer management and research*, 2:111–122, 2010.
- [37] I. MERCIER und M. P. LISANTI. *Caveolin-1 and breast cancer: a new clinical perspective. Advances in experimental medicine and biology*, 729:83–94, 2012.
- [38] A. LLORENTE, M. C. de MARCO und M. A. ALONSO. *Caveolin-1 and MAL are located on prostasomes secreted by the prostate cancer PC-3 cell line. J Cell Sci*, 117(Pt 22):5343–51, 2004.
- [39] Z. A. SHERIF und A. S. SULTAN. *Divergent control of Cav-1 expression in non-cancerous Li-Fraumeni syndrome and human cancer cell lines. Cancer Biol Ther*, 14(1), 2012.
- [40] K. H. NAM, B. L. LEE, J. H. PARK, J. KIM, N. HAN, H. E. LEE, M. A. KIM, H. S. LEE und W. H. KIM. *Caveolin 1 expression correlates with poor prognosis and focal adhesion kinase expression in gastric cancer. Pathobiology*, 80(2):87–94, 2013.
- [41] U. N. L. o. M. National Center for BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PIK3CA phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha [Homo sapie]*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5290> (besucht am 12. 12. 2012).
- [42] P. R. SHEPHERD, D. J. WITHERS und K. SIDDLE. *Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. Biochem J*, 333 (Pt 3):471–90, 1998.
- [43] J. A. ENGELMAN, J. LUO und L. C. CANTLEY. *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nature reviews. Genetics*, 7(8):606–619, 2006.
- [44] I. YAJIMA, M. Y. KUMASAKA, N. D. THANG, Y. GOTO, K. TAKEDA, O. YAMANOSHITA, M. IIDA, N. OHGAMI, H. TAMURA, Y. KAWAMOTO und M. KATO. *RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. Dermatol Res Pract*, 2012:354191, 2012.
- [45] K. H. PARAISO, Y. XIANG, V. W. REBECCA, E. V. ABEL, Y. A. CHEN, A. C. MUNKO, E. WOOD, I. V. FEDORENKO, V. K. SONDAK, A. R. ANDERSON, A. RIBAS, M. D. PALMA, K. L. NATHANSON, J. M. KOOMEN, J. L. MESSINA und K. S. SMALLEY. *PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. Cancer Res*. 71(7):2750–2760, 2011.
- [46] M. A. DAVIES, K. STEMKE-HALE, E. LIN, C. TELLEZ, W. DENG, Y. N. GOPAL, S. E. WOODMAN, T. C. CALDERONE, Z. JU, A. J. LAZAR, V. G. PRIETO, K. ALDAPE, G. B. MILLS und J. E. GERSHENWALD. *Integrated Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. Clin. Cancer Res*. 15(24):7538–7546, 2009.

- [47] H. TSAO, V. GOEL, H. WU, G. YANG und F. G. HALUSKA. *Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. J. Invest. Dermatol.* 122(2):337–341, 2004.
- [48] H. TSAO, X. ZHANG, K. FOWLKES und F. G. HALUSKA. *Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. Cancer Res.* 60(7):1800–1804, 2000.
- [49] A. R. HESS, E. A. SEFTOR, R. E. B. SEFTOR und M. J. C. HENDRIX. *Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. Cancer research,* 63(16):4757–4762, 2003.
- [50] N. P. BARBARA, J. L. WRANA und M. LETARTE. *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. J. Biol. Chem.* 274(2):584–594, 1999.
- [51] C. BERNABEU, J. M. LOPEZ-NOVOA und M. QUINTANILLA. *The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. Biochim. Biophys. Acta,* 1792(10):954–973, 2009.
- [52] O. D. ENERSEN. URL: <http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/2690.html> (besucht am 15.06.2016).
- [53] M. STOCKSCHLAEDER, R. SCHNEPPENHEIM und U. BUDDE. *Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. Blood Coagul. Fibrinolysis,* 25(3):206–216, 2014.
- [54] Z. M. RUGGERI. *The role of von Willebrand factor in thrombus formation. Thromb. Res.* 120 Suppl 1:5–9, 2007.
- [55] C. L. SHIELDS und J. A. SHIELDS. *Recent developments in the management of choroidal melanoma. Curr Opin Ophthalmol,* 15(3):244–51, 2004.
- [56] ANONYM. *Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 1. Arch Ophthalmol,* 108(9):1268–73, 1990.
- [57] P. R. PEREIRA, A. N. ODASHIRO, L. A. LIM, C. MIYAMOTO, P. L. BLANCO, M. ODASHIRO, S. MALONEY, D. F. DE SOUZA und J. BURNIER M. N. *Current and emerging treatment options for uveal melanoma. Clin Ophthalmol,* 7:1669–1682, 2013.
- [58] K. GUNDUZ und N. E. BECHRAKIS. *Exoresection and endoresection for uveal melanoma. Middle East Afr J Ophthalmol,* 17(3):210–6, 2010.
- [59] B. E. DAMATO. *Local resection of uveal melanoma. Bull Soc Belge Ophtalmol,* 248:11–7, 1993.
- [60] H. B. STALLARD. *Radiotherapy for malignant melanoma of the choroid. The British journal of ophthalmology,* 50(3):147–155, 1966.

- [61] F. SCHWICKERATH. URL: <http://www.meyer-schwickerath.net> (besucht am 04.03.2014).
- [62] A. NAVARRO, B. ANAND-APTE und M. O. PARAT. *A role for caveolae in cell migration. FASEB J*, 18(15):1801–11, 2004.
- [63] J. A. OOSTERHUIS, H. G. Journée-de KORVER und J. E. KEUNEN. *Transpupillary thermotherapy: results in 50 patients with choroidal melanoma. Archives of ophthalmology*, 116(2):157–162, 1998.
- [64] Z. SVETLOSÁKOVÁ, V. KRÁSNÍK, H. GERGISÁKOVÁ, P. BABÁL und P. KUSENDA. *Vybrané prognostické faktory maligneho melanómu uvey. Česká a slovenská oftalmologie : casopis České oftalmologické společnosti a Slovenské oftalmologické společnosti*, 68(1):38–42, 2012.
- [65] B. ROMEIS, M. MULISCH und U. WELSCH. *Romeis Mikroskopische Technik*. Springer, 2010.
- [66] N. I. for HEALTH USA. *ImageJ Information and Documentation Portal*. URL: <http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php> (besucht am 12.12.2012).
- [67] A. J. MANIOTIS, R. FOLBERG, A. HESS, E. A. SEFTOR, L. M. GARDNER, J. PE'ER, J. M. TRENT, P. S. MELTZER und M. J. HENDRIX. *Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am J Pathol*, 155(3):739–52, 1999.
- [68] I. C. NOTTING, G. S. MISSOTTEN, B. SIJMONS, Z. F. BOONMAN, J. E. KEUNEN und G. van der PLUIJM. *Angiogenic profile of uveal melanoma. Curr Eye Res*, 31(9):775–85, 2006.
- [69] M. J. C. H. a. ROBERT FOLBERG. *Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis*. American Society for Investigative Pathology,
- [70] H. E. GROSSNIKLAUS. *Tumor vascularity and hematogenous metastasis in experimental murine intraocular melanoma. Trans Am Ophthalmol Soc*, 96:721–52, 1998.
- [71] R. FOLBERG und A. J. MANIOTIS. *Vasculogenic mimicry. APMIS*, 112(7-8):508–25, 2004.
- [72] N. Y. FRANK, T. SCHATTON, S. KIM, Q. ZHAN, B. J. WILSON, J. MA, K. R. SAAB, V. OSHEROV, H. R. WIDLUND, M. GASSER, A. M. WAAGA-GASSER, T. S. KUPPER, G. F. MURPHY und M. H. FRANK. *VEGFR-1 expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor growth. Cancer Res*, 71(4):1474–85, 2011.
- [73] Q. SUN, X. ZOU, T. ZHANG, J. SHEN, Y. YIN und J. XIANG. *The role of miR-200a in vasculogenic mimicry and its clinical significance in ovarian cancer. Gynecol Oncol*, 2014.
- [74] M. CLEMENTE, M. D. PEREZ-ALENZA, J. C. ILLERA und L. PENA. *Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. Vet Pathol*, 47(2):265–74, 2010.

- [75] S. KAESSMEYER, K. BHOOLA, S. BALTIC, P. THOMPSON und J. PLENDL. *Lung cancer neovascularisation: Cellular and molecular interaction between endothelial and lung cancer cells. Immunobiology*, 2013.
- [76] Y. L. FAN, M. ZHENG, Y. L. TANG und X. H. LIANG. *A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (Review). Oncol Lett*, 6(5):1174–1180, 2013.
- [77] R. FOLBERG, V. RUMMELT, R. PARYS-VAN GINDERDEUREN, T. HWANG, R. F. WOOLSON, J. PE'ER und L. M. GRUMAN. *The prognostic value of tumor blood vessel morphology in primary uveal melanoma. Ophthalmology*, 100(9):1389–1398, 1993.
- [78] S. R. BOYD, D. TAN, C. BUNCE, A. GITTOS, M. H. NEALE, J. L. HUNGERFORD, S. CHARNOCK-JONES und I. A. CREE. *Vascular endothelial growth factor is elevated in ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. Br J Ophthalmol*, 86(4):448–52, 2002.
- [79] S. A. IJLAND, M. J. JAGER, B. M. HEIJDRRA, J. R. WESTPHAL und R. PEEK. *Expression of angiogenic and immunosuppressive factors by uveal melanoma cell lines. Melanoma Res*, 9(5):445–50, 1999.
- [80] M. B. CROSBY, H. YANG, W. GAO, L. ZHANG und H. E. GROSSNIKLAUS. *Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels correlate with number and location of micrometastases in a murine model of uveal melanoma. Br J Ophthalmol*, 95(1):112–7, 2011.
- [81] S. R. BOYD, D. S. TAN, L. de SOUZA, M. H. NEALE, N. E. MYATT, R. A. ALEXANDER, M. ROBB, J. L. HUNGERFORD und I. A. CREE. *Uveal melanomas express vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor and support endothelial cell growth. Br J Ophthalmol*, 86(4):440–7, 2002.
- [82] T. G. SHEIDOW, P. L. HOOPER, C. CRUKLEY, J. YOUNG und J. G. HEATHCOTE. *Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. Br J Ophthalmol*, 84(7):750–6, 2000.
- [83] J. LIU, B. RAZANI, S. TANG, B. I. TERMAN, J. A. WARE und M. P. LISANTI. *Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. J Biol Chem*, 274(22):15781–5, 1999.
- [84] A. B. VOJTEK und C. J. DER. *Increasing complexity of the Ras signaling pathway. J Biol Chem*, 273(32):19925–8, 1998.
- [85] A. R. HESS, E. A. SEFTOR, R. E. SEFTOR und M. J. HENDRIX. *Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. Cancer Res*. 63(16):4757–4762, 2003.

- [86] M. GRAUPERA und M. POTENTE. *Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. Exp. Cell Res.* 319(9):1348–1355, 2013.
- [87] T. M. WILLIAMS und M. P. LISANTI. *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. Am J Physiol Cell Physiol*, 288(3):C494–506, 2005.
- [88] G. FIUCCI, D. RAVID, R. REICH und M. LISCOVITCH. *Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. Oncogene*, 21(15):2365–75, 2002.
- [89] V. A. TORRES, J. C. TAPIA, D. A. RODRIGUEZ, A. LLADSER, C. ARREDONDO, L. LEYTON und A. F. QUEST. *E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. Mol Cell Biol*, 27(21):7703–17, 2007.
- [90] J. A. KARAM, Y. LOTAN, C. G. ROEHRBORN, R. ASHFAQ, P. I. KARAKIEWICZ und S. F. SHARIAT. *Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. The Prostate*, 67(6):614–22, 2007.
- [91] M. SHATZ und M. LISCOVITCH. *Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. Int J Radiat Biol.* 84(3):177–189, 2008.
- [92] R. SENETTA, G. STELLA, E. POZZI, N. STURLI, D. MASSI und P. CASSONI. *Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why. J Cell Mol Med*, 17(3):325–36, 2013.
- [93] T. M. WILLIAMS, F. MEDINA, I. BADANO, R. B. HAZAN, J. HUTCHINSON, W. J. MULLER, N. G. CHOPRA, P. E. SCHERER, R. G. PESTELL und M. P. LISANTI. *Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. J Biol Chem*, 279(49):51630–51646, 2004.
- [94] Z. D. NASSAR, M. M. HILL, R. G. PARTON und M. O. PARAT. *Caveola-forming proteins caveolin-1 and PTRF in prostate cancer. Nat Rev Urol*, 10(9):529–36, 2013.
- [95] B. JOSHI, S. S. STRUGNELL, J. G. GOETZ, L. D. KOJIC, M. E. COX, O. L. GRIFFITH, S. K. CHAN, S. J. JONES, S.-P. LEUNG, H. MASOUDI, S. LEUNG, S. M. WISEMAN und I. R. NABI. *Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. Cancer research*, 68(20):8210–8220, 2008.
- [96] F. FELICETTI, I. PAROLINI, L. BOTTERO, K. FECCHI, M. C. ERRICO, C. RAGGI, M. BIFFONI, F. SPADARO, M. P. LISANTI, M. SARGIACOMO und A. CARÈ. *Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. Int J Cancer*, 125(7):1514–1522, 2009.

- [97] A. FONG, E. GARCIA, L. GWYNN, M. P. LISANTI, M. J. FAZZARI und M. LI. *Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. Am J Clin Pathol*, 120(1):93–100, 2003.
- [98] Y. C. HU, K. Y. LAM, S. LAW, J. WONG und G. SRIVASTAVA. *Profiling of differentially expressed cancer-related genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) using human cancer cDNA arrays: overexpression of oncogene MET correlates with tumor differentiation in ESCC. Clin Cancer Res*, 7(11):3519–25, 2001.
- [99] L. LI, G. YANG, S. EBARA, T. SATOH, Y. NASU, T. L. TIMME, C. REN, J. WANG, S. A. TAHIR und T. C. THOMPSON. *Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. Cancer Res*, 61(11):4386–92, 2001.
- [100] B. RAZANI, Y. ALTSCHULER, L. ZHU, R. G. PESTELL, K. E. MOSTOV und M. P. LISANTI. *Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. Biochemistry*, 39(45):13916–24, 2000.
- [101] K. WIECHEN, L. DIATCHENKO, A. AGOULNIK, K. M. SCHARFF, H. SCHOBER, K. ARLT, B. ZHUMABAYEVA, P. D. SIEBERT, M. DIETEL, R. SCHAFER und C. SERS. *Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. Am J Pathol*, 159(5):1635–43, 2001.
- [102] J. GLENNEY J. R. *Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. J Biol Chem*, 264(34):20163–6, 1989.
- [103] I. J. SALANUEVA, A. CEREZO, M. C. GUADAMILLAS und M. A. del POZO. *Integrin regulation of caveolin function. J Cell Mol Med*, 11(5):969–80, 2007.
- [104] M. A. del POZO, N. BALASUBRAMANIAN, N. B. ALDERSON, W. B. KIOSSES, A. GRANDE-GARCIA, R. G. ANDERSON und M. A. SCHWARTZ. *Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. Nat Cell Biol*, 7(9):901–8, 2005.
- [105] W. ZHANG, B. RAZANI, Y. ALTSCHULER, B. BOUZAHZAH, K. E. MOSTOV, R. G. PESTELL und M. P. LISANTI. *Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. J Biol Chem*, 275(27):20717–25, 2000.
- [106] E. K. SLOAN, D. R. CIOCCA, N. POULIOT, A. NATOLI, C. RESTALL, M. A. HENDERSON, M. A. FANELLI, F. D. CUELLO-CARRION, F. E. GAGO und R. L. ANDERSON. *Stromal cell expression of caveolin-1 predicts outcome in breast cancer. Am J Pathol*, 174(6):2035–43, 2009.

- [107] A. SEKULIC, J. HALUSKA P., A. J. MILLER, J. GENEVRIERA DE LAMO, S. EJADI, J. S. PULIDO, D. R. SALOMAO, E. C. THORLAND, R. G. VILE, D. L. SWANSON, B. A. POCKAJ, S. D. LAMAN, M. R. PITTELKOW, S. N. MARKOVIC und C. Melanoma Study Group of MAYO CLINIC CANCER. *Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. Mayo Clin Proc*, 83(7):825–46, 2008.
- [108] J. R. TESTA und A. BELLACOSA. *AKT plays a central role in tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):10983–5, 2001.
- [109] S. A. AZIZ, M. DAVIES, E. PICK, C. ZITO, L. JILAVEANU, R. L. CAMP, D. L. RIMM, Y. KLUGER und H. M. KLUGER. *Phosphatidylinositol-3-kinase as a therapeutic target in melanoma. Clin Cancer Res*, 15(9):3029–36, 2009.
- [110] J. BROGNARD, A. S. CLARK, Y. NI und P. A. DENNIS. *Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. Cancer Res*, 61(10):3986–97, 2001.
- [111] S. A. AZIZ, L. B. JILAVEANU, C. ZITO, R. L. CAMP, D. L. RIMM, P. CONRAD und H. M. KLUGER. *Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma. Clin Cancer Res*, 16(24):6029–39, 2010.
- [112] R. HARFOUCHE, S. BASU, S. SONI, D. M. HENTSCHEL, R. A. MASHELKAR und S. SENGUPTA. *Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis. Angiogenesis*, 12(4):325–38, 2009.
- [113] S. GAUDI und J. L. MESSINA. *Molecular bases of cutaneous and uveal melanomas. Patholog Res Int*, 2011:159421, 2011.
- [114] V. K. GOEL, A. J. LAZAR, C. L. WARNEKE, M. S. REDSTON und F. G. HALUSKA. *Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. J Invest Dermatol*, 126(1):154–60, 2006.
- [115] E. S. KANDEL und N. HAY. *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. Exp Cell Res*, 253(1):210–29, 1999.
- [116] B. D. MANNING und L. C. CANTLEY. *United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. Biochem Soc Trans*, 31(Pt 3):573–8, 2003.
- [117] J. WERZOWA, S. KOEHRER, S. STROMMER, D. CEJKA, T. FUEREDER, E. ZEBEDIN und V. WACHECK. *Vertical inhibition of the mTORC1/mTORC2/PI3K pathway shows synergistic effects against melanoma in vitro and in vivo. J Invest Dermatol*, 131(2):495–503, 2011.
- [118] S. TACHIIRI, K. SASAI, N. OYA und M. HIRAOKA. *Enhanced cell killing by overexpression of dominant-negative phosphatidylinositol 3-kinase subunit, Deltap85, following genotoxic stresses. Jpn J Cancer Res*, 91(12):1314–8, 2000.

- [119] M. TANDON, Z. CHEN und J. PRATAP. *Runx2 activates PI3K/Akt signaling via mTORC2 regulation in invasive breast cancer cells. Breast Cancer Res*, 16(1):R16, 2014.
- [120] Y. SUKAWA, H. YAMAMOTO, K. NOSHO, M. ITO, H. IGARASHI, T. NAITO, K. MITSUHASHI, Y. MATSUNAGA, T. TAKAHASHI, M. MIKAMI, Y. ADACHI, H. SUZUKI und Y. SHINOMURA. *HER2 Expression and PI3K-Akt Pathway Alterations in Gastric Cancer. Digestion*, 89(1):12–7, 2014.
- [121] J. SUN, D. ZHANG, D. H. BAE, S. SAHNI, P. JANSSON, Y. ZHENG, Q. ZHAO, F. YUE, M. ZHENG, Z. KOVACEVIC und D. R. RICHARDSON. *Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors. Carcinogenesis*, 34(9):1943–54, 2013.
- [122] K. M. NICHOLSON und N. G. ANDERSON. *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cell Signal*, 14(5):381–95, 2002.
- [123] T. KUBIATOWSKI, T. JANG, M. B. LACHYANKAR, R. SALMONSEN, R. R. NABI, P. J. QUESENBERRY, N. S. LITOFISKY, A. H. ROSS und L. D. RECHT. *Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. J Neurosurg*, 95(3):480–8, 2001.
- [124] N. BABCHIA, A. CALIPEL, F. MOURIAUX, A. M. FAUSSAT und F. MASCARELLI. *The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: interaction with B-Raf/ERK. Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(1):421–9, 2010.
- [125] V. S. SARAIVA, A. L. CAISSIE, L. SEGAL, C. EDELSTEIN und J. BURNIER M. N. *Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. Melanoma Res*, 15(4):245–50, 2005.
- [126] R. FOLBERG, J. PE'ER, L. M. GRUMAN, R. F. WOOLSON, G. JENG, P. R. MONTAGUE, T. O. MONINGER, H. YI und K. C. MOORE. *The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study. Hum Pathol*, 23(11):1298–305, 1992.
- [127] S. LUANPITPONG, S. J. TALBOTT, Y. ROJANASAKUL, U. NIMMANNIT, V. PONGRAKHANANON, L. WANG und P. CHANVORACHOTE. *Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. J. Biol. Chem.* 285(50):38832–38840, 2010.
- [128] P. CHANVORACHOTE, P. CHUNHACHA und V. PONGRAKHANANON. *Caveolin-1 induces lamellipodia formation via an Akt-dependent pathway. Cancer Cell Int.* 14:52, 2014.
- [129] H. YAMAGUCHI, J. WYCKOFF und J. CONDEELIS. *Cell migration in tumors. Curr. Opin. Cell Biol.* 17(5):559–564, 2005.

- [130] R. E. SEFTOR, E. A. SEFTOR, N. KOSHIKAWA, P. S. MELTZER, L. M. GARDNER, M. BILBAN, W. G. STETLER-STEVENSON, V. QUARANTA und M. J. HENDRIX. *Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. Cancer Res*, 61(17):6322–7, 2001.
- [131] D. ZHANG und P. BRODT. *Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. Oncogene*, 22(7):974–82, 2003.
- [132] A. M. RANDI, M. A. LAFFAN und R. D. STARKE. *Von Willebrand Factor, Angiodysplasia and Angiogenesis. Mediterr J Hematol Infect Dis*, 5(1):e2013060, 2013.
- [133] H. YANG, C. AKOR, S. DITHMAR und H. E. GROSSNIKLAUS. *Low dose adjuvant angiostatin decreases hepatic micrometastasis in murine ocular melanoma model. Mol Vis*, 10:987–95, 2004.
- [134] H. YANG, M. J. JAGER und H. E. GROSSNIKLAUS. *Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(6):2835–42, 2010.
- [135] S. CHEIFETZ, T. BELLON, C. CALES, S. VERA, C. BERNABEU, J. MASSAGUE und M. LETARTE. *Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. J Biol Chem*, 267(27):19027–30, 1992.
- [136] H. J. JOO, D. K. OH, Y. S. KIM, K. B. LEE und S. J. KIM. *Increased expression of caveolin-1 and microvessel density correlates with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. BJU Int*, 93(3):291–6, 2004.
- [137] S. A. TAHIR, S. PARK und T. C. THOMPSON. *Caveolin-1 regulates VEGF-stimulated angiogenic activities in prostate cancer and endothelial cells. Cancer Biol. Ther.* 8(23):2286–2296, 2009.
- [138] Y. PAN, Q. WU, L. QIN, J. CAI und B. DU. *Gold Nanoparticles Inhibit VEGF165-Induced Migration and Tube Formation of Endothelial Cells via the Akt Pathway. Biomed Res Int*, 2014:418624, 2014.
- [139] T. L. PHUNG, K. ZIV, D. DABYDEEN, G. EYIAH-MENSAH, M. RIVEROS, C. PERRUZZI, J. SUN, R. A. MONAHAN-EARLEY, I. SHIOJIMA, J. A. NAGY, M. I. LIN, K. WALSH, A. M. DVORAK, D. M. BRISCOE, M. NEEMAN, W. C. SESSA, H. F. DVORAK und L. E. BENJAMIN. *Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. Cancer Cell*, 10(2):159–70, 2006.
- [140] J. S. KHALILI, X. YU, J. WANG, B. C. HAYES, M. A. DAVIES, G. LIZEE, B. ESMAELI und S. E. WOODMAN. *Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner. Clin Cancer Res*, 18(16):4345–55, 2012.

- [141] F. CASAGRANDE, D. BACQUEVILLE, M. J. PILLAI, F. MALECAZE, S. MANENTI, M. BRETON-DOUILLON und J. M. DARBON. *G1 phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27Kip1 and inhibition of G1 CDKs in choroidal melanoma cells. FEBS Lett*, 422(3):385–90, 1998.
- [142] S. D. KNIGHT, N. D. ADAMS, J. L. BURGESS, A. M. CHAUDHARI, M. G. DARCY, C. A. DONATELLI, J. I. LUENGO, K. A. NEWLANDER, C. A. PARRISH, L. H. RIDGERS, M. A. SARPONG, S. J. SCHMIDT, G. S. VAN ALLER, J. D. CARSON, M. A. DIAMOND, P. A. ELKINS, C. M. GARDINER, E. GARVER, S. A. GILBERT, R. R. GONTAREK, J. R. JACKSON, K. L. KERSHNER, L. LUO, K. RAHA, C. S. SHERK, C.-M. SUNG, D. SUTTON, P. J. TUMMINO, R. J. WEGRZYN, K. R. AUGER und D. DHANAK. *Discovery of GSK2126458, a Highly Potent Inhibitor of PI3K and the Mammalian Target of Rapamycin. ACS Med. Chem. Lett.* 2010, 1 (1):pp 39–43, 2010.
- [143] S. R. KUO, S. A. TAHIR, S. PARK, T. C. THOMPSON, S. COFFIELD, A. E. FRANKEL und J. S. LIU. *Anti-caveolin-1 antibodies as anti-prostate cancer therapeutics. Hybridoma (Larchmt)*, 31(2):77–86, 2012.