

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

Der Einfluss von Neuropilin-2 auf die VEGF- und die VEGFR-Expression beim uvealen Melanom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Michael Simon
aus Gerolstein

promoviert am 10. Dezember 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. phil. L. M. Heindl
2. Gutachterin: Professorin Dr. med. S. Liakopoulos

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. med. Dr. phil. L. M. Heindl
Daria Lehrmann, M. Sc.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Daria Lehrmann, M. Sc. von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 28.06.2024

Michael Simon

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Ludwig M. Heindl, der mich und mein experimentelles Forschungsvorhaben in seiner Arbeitsgruppe *Ophthalmologie* als Arbeitsgruppenleiter und Mentor vom ersten Tag an in jeglicher Hinsicht unterstützt und gefördert hat.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Frau Daria Lehrmann für ihre exzellente und engagierte Hilfe bei der Durchführung meines Projekts. Als erste Ansprechpartnerin hat sie mich geduldig in die Welt der experimentellen Forschung eingeführt und stand mir allzeit zur Seite.

Auch Herrn Dr. med. Alexander Rokohl gilt als Ratgeber und Ansprechpartner mein ausdrücklicher Dank. Seine Begeisterung für ophthalmologische Wissenschaft und Forschung ist ansteckend.

Ich danke meinem Bruder Thomas und Jonas Fleck für die gewissenhafte Korrektur und Beratung.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Frau Antonia und meiner Familie für die permanente Unterstützung. Auf euch kann ich mich immer verlassen.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1 Das uveale Melanom	11
2.1.1. Epidemiologie	11
2.1.2. Risikofaktoren	11
2.1.3. Pathomechanismus	12
2.1.4. Diagnostik und Therapie	14
2.1.5. Metastasierung	15
2.2 Angio- und Lymphangiogenese	16
2.3 Die VEGF-Familie	17
2.3.1. VEGFC	18
2.3.2. VEGFD	19
2.3.3. VEGFR2	21
2.3.4. VEGFR3	21
2.4 Neuropilin-2	22
2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	24
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Material	26
3.1.1. Zelllinien	26
3.1.2. Antikörper	26
3.1.3. Reagenzien und Substanzen	27
3.1.4. Materialien und Hilfsmittel	28
3.1.5. Geräte	29
3.1.6. Software	30
3.2 Methoden	31
3.2.1. Zellkultur	31
3.2.2. Durchflusszytometrie (FACS)	32
3.2.3. Semiquantitative Proteinbestimmung	35

4.	ERGEBNISSE	39
4.1	Durchflusszytometrie (FACS)	39
4.1.1.	VEGFC	39
4.1.2.	VEGFD	40
4.1.3.	VEGFR2	41
4.1.4.	VEGFR3	42
4.2	Semiquantitative Proteinbestimmung	44
4.2.1.	UPMM2	44
4.2.2.	UPMD2	46
5.	DISKUSSION	48
6.	LITERATURVERZEICHNIS	51
7.	ANHANG	66
7.1	Abbildungsverzeichnis	66
7.2	Tabellenverzeichnis	66

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AKT	Proteinkinase B
aNRP2	anti-Neuropilin-2-Antikörper
BAP1	<i>BRCA1-associated protein 1</i>
BRCA	<i>breast cancer</i>
BSE	BAP1, <i>splicing-mutation</i> , EIF1AX
CA	Kanada
CS&T	<i>cytometer setup and tracking</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CUB	<i>complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1</i>
DE	Deutschland
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diaminido-2-phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DK	Dänemark
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> , Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
EIF1AX	<i>eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FIGF	<i>c-fos-induced growth factor</i>
FLK-1	<i>fetal liver kinase</i>
FLT4	<i>fms-like tyrosine kinase 4</i>
FR	Frankreich
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht

g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GB	Großbritannien
GEP	<i>gene expression profiling</i>
GNA	<i>guanine nucleotide-binding protein subunit alpha</i>
HCl	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KDR	<i>kinase-insert domain receptor</i>
MAM	<i>meprin, A5, receptor protein tyrosine phosphatase mu</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
MW	Mittelwert
nd	<i>no significant difference</i>
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> , Nicht-essenzielle Aminosäuren
NRP	Neuropilin
NRP1	Neuropilin-1
NRP2	Neuropilin-2
OCT	<i>optical coherence tomography</i> , Optische Kohärenztomografie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>programmed cell death protein-1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGF	<i>placental growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>

SD	<i>standard deviation, Standardabweichung</i>
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
SF3B1	<i>splicing factor 3B subunit 1</i>
SSC	<i>side scatter, Seitwärtsstreulicht</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with TWEEN® 20</i>
UPMD	<i>uveal primary melanoma with disomy 3</i>
UPMM	<i>uveal primary melanoma with monosomy 3</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHD	<i>VEGF-Homologie-Domäne</i>
YAP	<i>yes-associated protein</i>

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Das uveale Melanom ist der häufigste maligne intraokuläre Tumor im Erwachsenenalter. Es existiert bis dato keine etablierte Therapie zur Behandlung der häufigen Metastasierung. Für den Übergang einer gutartigen Läsion in einen malignen Tumor sind Angio- und Lymphangiogenese von besonderer Bedeutung. Entscheidende Faktoren dabei sind die verschiedenen Liganden und Rezeptoren der VEGF-Familie sowie Neuropilin-2 (NRP2).

Fragestellung: Diese Forschungsarbeit untersucht den Einfluss von NRP2 auf die Expression von VEGFC, VEGFD, VEGFR2 und VEGFR3. Insbesondere soll untersucht werden, ob durch das Blockieren der Bindungsstelle für VEGF an NRP2 die Expression der zuvor genannten Proteine verändert wird, um das komplexe Zusammenspiel dieser Proteine bei der Entstehung respektive Entwicklung uvealer Melanome besser verstehen zu können.

Material und Methoden: In vitro werden zwei Zelllinien eines uvealen Melanoms, eine mit Monosomie 3 und eine mit Disomie 3, für 2 Stunden und für 24 Stunden mit einem die Bindungsstelle für VEGF blockierenden NRP2-Antikörper versetzt. Die Expression von VEGFC, -D, -R2 und -R3 wird anschließend anhand von Durchflusszytometrie und semiquantitativer Proteinbestimmung ermittelt.

Ergebnisse: Die Expression aller vier untersuchten Proteine ist durch die Hinzugabe des NRP2-Antikörpers nach zwei Stunden signifikant erhöht (p-Wert jeweils $\leq 0,05$). Nach 24 Stunden ist diese Erhöhung nicht mehr zu beobachten (p-Wert jeweils $> 0,05$). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Zelllinie mit Monosomie und der mit Disomie.

Schlussfolgerungen: Ob der Einsatz eines inhibierenden NRP2-Antikörpers und damit die Beeinflussung der VEGF-Expression beim uvealen Melanom einen nützlichen therapeutischen Effekt haben könnte, müsste durch ergänzende in-vivo-Experimente geprüft werden. Grundsätzlich sollte insbesondere vor dem Hintergrund verschiedener angiogener Prozesse eine Multi-Target-Therapie in Erwägung gezogen werden.

2. Einleitung

2.1 Das uveale Melanom

2.1.1. Epidemiologie

Das uveale Melanom ist mit einer Inzidenz von etwa 5 Krankheitsfällen auf 1 Million Einwohner pro Jahr der häufigste maligne intraokuläre Tumor im Erwachsenenalter in Deutschland.^{1,2} Während mit 83 % die große Mehrheit aller uvealen Melanome in der Aderhaut entsteht, sind nur etwa 13 % auf ihren Ursprung im Ziliarkörper oder der Iris zurückzuführen.^{1,3,4} Die übrigen 4 % sind bezüglich ihres Ursprungs nicht näher beschrieben.¹ Die Wahrscheinlichkeit, ein uveales Melanom zu entwickeln, steigt mit höherem Lebensalter und erreicht ein Plateau nach 75 Jahren.^{2,5} Das mediane Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 67 Jahren, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen.^{1,2,6} Die Inzidenz uvealer Melanome folgt in Europa einem Nord-Süd-Gefälle: Während in südlichen Ländern Europas weniger als 2 Krankheitsfälle pro 1 Million Einwohner pro Jahr auftreten, können in nördlichen Ländern mehr als 8 Krankheitsfälle pro 1 Million Einwohner pro Jahr registriert werden.^{2,7-9} Obwohl manche Studien eine gleichbleibende Inzidenz über mehrere Jahrzehnte beschreiben^{10,11}, zeigt eine kürzlich erschienene Untersuchung aus Dänemark eine Erhöhung der Inzidenz insbesondere früher Tumorstadien¹². In Deutschland ist dieser Anstieg im Zeitraum von 1996 bis 2015 nicht zu beobachten.¹

2.1.2. Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren, die mit einem häufigeren Auftreten uvealer Melanome assoziiert sind, zählt insbesondere eine helle, eine blaue oder graue, Augenfarbe.^{13,14} Außerdem ist das Risiko eines uvealen Melanoms bei der kongenitalen okulären Melanozytose, beim Vorliegen eines Melanozytoms und beim BAP1-Tumorprädispositionssyndrom erhöht.¹⁵ Während eine helle Hautfarbe und eine Anfälligkeit für Sonnenbrände ebenfalls Risikofaktoren darstellen, lässt sich bei blonden beziehungsweise roten Haaren kein statistisch gesteigertes Auftreten uvealer Melanome feststellen.¹³ Die Wahrscheinlichkeit, ein uveales Melanom zu entwickeln, wird bei Hellhäutigkeit um den Faktor 200 gesteigert.¹⁰ Darüber hinaus gehören häufige dysplastische Nävi, Melanome der Haut und eine familiäre Disposition zu den Risikofaktoren.^{16,17} Zwar ist der Einfluss von UV-Strahlung bei der Entstehung kutaner, maligner Melanome von entscheidender Bedeutung, allerdings wird der Effekt ebenjener vor allem bei den häufigeren posterioren uveal Melanomen aufgrund der Absorption durch weiter anterior gelegene Strukturen wie Cornea, Linse und Glaskörper als gering eingeschätzt.¹⁸⁻²⁰

2.1.3. Pathomechanismus

Bei der Entstehung uvealer Melanome sind bestimmte genetische und epigenetische Veränderungen von Bedeutung.²¹ Zu diesen Veränderungen gehören Mutationen oder Amplifikationen von Protoonkogenen, Mutationen oder Deletionen von Tumorsuppressorgenen sowie zytogenetische beziehungsweise chromosomale Aberrationen^{21,22}, die den Zellzyklus und den programmierten Zelltod in unterschiedlichem Maße beeinflussen und letztlich in einer unkontrollierten, klonalen Proliferation von Tumorzellen münden.²³ Aufgrund wiederkehrender Mutationen wird davon ausgegangen, dass es für den Übergang einer benignen Läsion zu einem malignen uvealen Melanom der Kombination zweier zentraler Veränderungen bedarf.²⁴

(1) Aktivierung des $G\alpha_q$ -Signalweges

Zu den frühen Veränderungen in der Tumorigenese uvealer Melanome gehören insbesondere Mutationen der DNA-Sequenzen der G-Proteine *GNAQ* und *GNA11*, die den $G\alpha_q$ -Signalweg aktivieren.³ Diese Mutationen sind in über 80 % aller uvealen Melanome zu finden.^{25,26} *GNAQ* und *GNA11* kodieren α_q -Untereinheiten der G-Proteine, die normalerweise nur durch Aktivierung ihrerseits eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege bewirken.²⁷ Infolgedessen kommt es durch die Stimulation der Phospholipase- β zu einer übermäßigen Aktivierung des MAP-Kinase- und des PI3K/AKT/mTOR-Signaltransduktionsweges.^{25,28-30} Außerdem sind der Retinoblastom- und der p53-Signalweg in den meisten uvealen Melanomen funktionell inaktiviert, was es den Tumorzellen ermöglicht, neue Zellzyklen einzuleiten.³¹⁻³⁴ Zusätzlich scheint die Aktivierung des *yes-associated protein* (YAP) ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung uvealer Melanome zu sein.³⁵

Zwar gelten Mutationen in *GNAQ* und *GNA11* als initiierender und wesentlicher Faktor bei der Entstehung uvealer Melanome, doch sind diese Veränderungen allein nicht hinreichend, um eine maligne Transformation zu bewirken.³⁶ Außerdem korrelieren Mutationen in *GNAQ* und *GNA11* weder mit der Prognose, der Klinik, dem histopathologischen Typ noch der Anzahl weiterer Mutationen, die mit fortgeschrittenen uvealen Melanomen assoziiert sind.^{23,37}

(2) BSE-Veränderung

Die jährliche Rate der malignen Transformation eines choroidalen Nävus in ein choroidales Melanom liegt – unter der Annahme, dass alle choroidalen Melanome aus zuvor bestehenden

Nävi entstehen – bei 1 zu 8845.³⁸ Aufgrund dieser kleinen Rate und dem Fakt, dass GNAQ- und GNA11-Mutationen auch in uvealen Nävi zu finden sind^{36,39}, bedarf es weiterer Veränderungen, um eine solche maligne Transformation zu bewirken.²⁷

Drei dieser entscheidenden Veränderungen werden durch das Akronym *BSE* zusammengefasst: Inaktivierung von **BAP1** sowie von Mutationen eines **Splicing-Gens** und von **EIF1AX**.^{24,27} Im Gegensatz zu GNAQ und GNA11-Mutationen korrelieren *BSE*-Veränderungen mit der Metastasierungsrate.^{40,41}

Die biallelische Inaktivierung von BAP1, das auf Chromosom 3 lokalisiert ist, tritt in etwa 50 % aller uvealen Melanome auf und geht mit einer erhöhten Metastasierungsrate, einer frühen Metastasierung und dementsprechend mit einer schlechteren Prognose einher.^{40,42-46} Eines der Allele geht häufig durch den kompletten Verlust eines Chromosoms 3 verloren, das andere wird zumeist im Sinne eines *two-hit-models* durch Mutation inaktiviert.⁴⁷ BAP1 beeinflusst als nukleäre, deubiquitinierende Hydrolase viele unterschiedliche Prozesse⁴⁸: Dazu gehören unter anderem die Kontrolle des Zellzyklus und des Zellwachstums, die DNA-Schaden-Reparatur sowie die Regulation der Apoptose und der Genexpression.^{48,49}

Auch eine Mutation von SF3B1, die in etwa 20 % aller uvealer Melanome gefunden werden kann⁵⁰, spielt möglicherweise in der Ätiopathogenese uvealer Melanome eine Rolle.²³ SF3B1 kodiert als Splicing-Gen für einen wichtigen Bestandteil des Spleißosoms.⁵¹ Das fehlerhafte Spleißosom bewirkt die Produktion fehlerhafter mRNA.⁵² Im Gegensatz zu Veränderungen von BAP1 gehen uveale Melanome, die eine Mutation von SF3B1 aufweisen, mit einer späteren Metastasierung und einer besseren Prognose einher.^{40,51,53}

Die dritte Veränderung, die in das Akronym *BSE* einfließt, ist eine Mutation im EIF1AX-Gen. Dieses Gen kodiert ein für die Anbahnung der Translation wesentliches Protein, indem es die Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit an das 5'-Ende der mRNA vermittelt.²⁷ Erst dadurch wird ein Ablesen der mRNA möglich.⁵⁴ Eine Mutation im EIF1AX-Gen geht mit einer niedrigen Metastasierungsrate und einer – insbesondere im Vergleich zu Mutationen in BAP1 – sehr guten Prognose einher.^{55,56}

(3) Chromosomale Aberrationen

Es gibt neben den genetischen Mutationen typische chromosomale Aberrationen, die mit dem Auftreten uvealer Melanome vergesellschaftet sind. Diese Veränderungen können durch unterschiedliche Techniken detektiert werden^{47,57,58}, wobei das *gene expression profiling* (GEP) die aktuell favorisierte Untersuchungsmethode darstellt.²³

Zu den typischen chromosomalen Veränderungen uveal Melanome gehört ein Verlust von 1p, 3, 6q, und 9p sowie ein Zuwachs von 1q, 6p und 8q.^{59,60} Besonders hervorzuheben ist dabei der Wegfall eines der Chromosomen 3. Diese Monosomie 3, die in etwa der Hälfte aller uveal Melanome beobachtet werden kann, korreliert signifikant mit dem Metastasierungsrisiko, der Wiedererkrankungswahrscheinlichkeit nach Therapie und dementsprechend mit der Überlebensprognose.^{41,61-63} Außer der Monosomie 3 gehen ein Zugewinn von Chromosom 8 und ein Verlust von Chromosom 1 mit einer schlechten Prognose einher.^{64,65} Zusätzlich korrelieren eine Monosomie 3 und eine Polysomie 8q mit weiteren tumorspezifischen Eigenschaften, die ihrerseits mit einer Abnahme des progressionsfreien Überlebens signifikant korrelieren: großer Basaldurchmesser des Tumors, Beteiligung des Ziliarkörpers, hohe Mitoseaktivität, ein epitheloider Zelltyp und *closed matrix loops*.⁶⁶ Im Gegensatz dazu ist ein Zugewinn des Chromosoms 6 mit einer guten Prognose verbunden.^{67,68}

Aus den genetischen und chromosomalen Veränderungen lässt sich eine dichotome Einteilung molekularer Subtypen des uveal Melanoms ableiten, mit deren Hilfe das Metastasierungsrisiko des Tumors beurteilt werden und folglich eine Prognoseabschätzung erfolgen kann.^{23,47,69}

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des uveal Melanoms ^{3,27,63,70,71}

mRNA GEP	Schlüssel-Mutation	Chromosom 3	Metastasierungsrisiko
Klasse 1	EIF1AX	Disomie	Niedrig
Klasse 1	SF3B1	Disomie	Intermediär
Klasse 2	BAP1	Monosomie	Hoch

2.1.4. Diagnostik und Therapie

Um die Diagnose eines uveal Melanoms stellen zu können, finden viele verschiedene Untersuchungstechniken Anwendung. Dazu gehören unter anderem die direkte und die indirekte Ophthalmoskopie, die Sonographie mit A- und B-Bild, die optische Kohärenztomographie (OCT), die Fundusautofluoreszenz und die Indocyaningrün-Fluoreszenz-Angiographie.^{3,23} Fortgeschrittene Tumoren können mit den beschriebenen ophthalmologischen Methoden zuverlässig diagnostiziert werden.⁷² In unklaren Fällen kann darüber hinaus eine diagnostische Abklärung durch Tumorbiopsie mit anschließender immunhistologischer und zytogenetischer Aufbereitung erwogen werden.⁷³ Die frühzeitige und korrekte Diagnosestellung ist insbesondere deshalb von herausragender Bedeutung, weil derzeit nur durch diese die Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit begünstigend beeinflusst werden können.³

Zur Behandlung uvealer Melanome stehen unterschiedliche Therapieformen zur Verfügung. In aufsteigender Invasivität werden lasergestützte Therapien, Radiotherapien und chirurgische Therapien unterschieden.⁷⁴ Es konnte gezeigt werden, dass die Brachytherapie als weltweit anerkannte Standardtherapie der besonders invasiven Eucleatio Bulbi bezüglich des Gesamtüberlebens nicht unterlegen ist.^{14,74,75} Zudem scheinen teletherapeutische Methoden im Vergleich zur Brachytherapie im Hinblick auf das Gesamtüberleben ähnliche Ergebnisse zu erzielen^{76,77}, sodass die jeweilige Interventionsauswahl patientenindividuell an den Lokalbefund (beispielsweise Tumorprominenz, Basaldurchmesser, Beteiligung der Makula und Papillennähe), den Allgemeinzustand, die Komorbiditäten und die Patientenpräferenz angepasst werden kann.^{78,79}

Unabhängig von der gewählten Methode erfolgt die Therapie uvealer Melanome primär in einem kurativen Ansatz.³ Dabei definiert die lokale Tumorkontrolle den Therapieerfolg.³ Zwar hat diese lokale Tumorkontrolle einen prognostischen Einfluss^{80,81}, jedoch hat die Entwicklung der Behandlungsoptionen hin zu weniger invasiven Verfahren weiterhin keinen Effekt auf die Gesamtüberlebensrate²³, da von einer Mikrometastasierung ausgegangen wird, die bereits Jahre vor der Behandlung des Primärtumors stattgefunden habe⁸²⁻⁸⁴.

2.1.5. Metastasierung

In einer Studie, in die 8.033 Krankheitsfälle eines uvealen Melanoms eingegangen sind, wurden 10 Jahre nach Diagnosestellung Metastasen bei Beteiligung der Iris in 7 % dieser Fälle, bei Ziliarkörperbeteiligung in 33 % dieser Fälle und bei Aderhautmelanomen in 25 % dieser Fälle beobachtet.⁸⁵ Die Metastasierung wird am häufigsten in der Leber beobachtet^{86,87}; sie kann sich aber auch in der Lunge, den Lymphknoten, den Knochen, der Haut und dem Gehirn manifestieren.⁸⁸ Darüber hinaus können auch lymphatische Metastasen bei sekundärer extraskleraler Tumorausdehnung vorkommen.^{89,90} Das mediane Überleben im Falle einer Metastasierung ist mit Werten zwischen 3,6 und 12,5 Monaten vergleichsweise kurz.⁹¹⁻⁹⁶

Die Wahrscheinlichkeit, Metastasen zu entwickeln, hängt wesentlich von der Größe beziehungsweise dem Basaldurchmesser des Tumors ab.^{85,97} Dabei spielt die biallellische Inaktivierung von BAP1 eine entscheidende Bedeutung⁴²: je größer der Tumor, desto höher die Anzahl an BAP1-mutierten Zellen^{44,98}. Zusätzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass sich das Genom von Primärtumoren und Metastasen weder durch neue Treibermutationen noch durch andere wesentliche Mutationen unterscheidet.⁹⁹ Darüber hinaus konnte keine BAP1-Inaktivierung während der Progression uvealer Melanome mit einem BAP1-Wildtyp festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass BAP1 zwar essenziell für die Tumorigenese, nicht aber für den Fortschritt der Metastasierung ist.⁹⁹

Es gab in der Vergangenheit unterschiedliche Versuche, die Überlebenswahrscheinlichkeit und das progressionsfreie Überleben uveal Melanome hinsichtlich einer Metastasierung positiv zu beeinflussen. Dazu gehören sowohl lokale als auch systemische Ansätze.

Weil sich die Metastasierung uveal Melanome in über 90 % der Fälle in der Leber manifestiert, kann in besonderen Fällen die chirurgische Resektion einzelner exponierter Metastasen angedacht werden.³ Auch andere Ansätze wie die Radiofrequenzablation, die Radioembolisation, die stereotaktische Bestrahlung oder auch die intrahepatische Gabe von Chemotherapeutika können einen positiven Einfluss zumindest auf das krankheitsfreie Überleben bieten.¹⁰⁰⁻¹⁰²

Ein vielversprechender systemischer Ansatz zur Behandlung metastasierter uveal Melanome war der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Ipilimumab (anti-CTLA-4-Antikörper), Nivolumab (anti-PD-1-Antikörper) oder Pembrolizumab (anti-PD-1-Antikörper). Jener revolutionierte die Therapie und die Prognose fortgeschrittener kutaner Melanome geradezu.^{101,103} Beim uveal Melanom konnte ein Nutzen dieser Immuninhibitoren bisher allerdings nicht gezeigt werden.^{104,105} Auch die systemische Anwendung verschiedener Chemotherapeutika, die beim malignen Melanom eingesetzt werden, konnte das Gesamtüberleben beim metastasierten uveal Melanom nicht steigern.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Es werden derzeit einige Studien durchgeführt, deren Ziel eine Verbesserung der Prognose fortgeschrittener beziehungsweise metastasierter uveal Melanome ist und die auf unterschiedliche Weise bestimmte zelluläre Mechanismen adressieren.¹⁰¹ So werden neben weiteren Studien, die andere immuntherapeutische Ansätze verfolgen, auch epigenetische Therapien und DNA-Reparaturverfahren getestet.^{101,109}

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das metastasierte uveale Melanom trotz großer Bemühungen und trotz des Fortschritts hin zu bulbuserhaltenden Therapieoptionen mit einer infausten Prognose einhergeht, da es weiterhin keine etablierte Therapie zur Behandlung fortgeschrittener metastasierter uveal Melanome gibt.^{95,110} Nach derzeitigem Forschungsstand sind Früherkennung und rechtzeitige Therapieeinleitung die einzigen Instrumente, welche die Prognose und damit die Lebenserwartung positiv beeinflussen können.²³

2.2 Angio- und Lymphangiogenese

Die gezielte Beeinflussung von Gefäßen im Zusammenhang mit Tumoren wird seit mehreren Jahrzehnten erforscht. Die fundamentale Überzeugung, dass ein Tumor nicht über die Grenzen der Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen hinaus aus den Blutgefäßen wachsen kann (etwa 1-2 mm), wird seit den Siebzigerjahren vertreten.¹¹¹

Neben genetischen und epigenetischen Veränderungen, welche die maligne Transformation einer benignen Zelle in eine unkontrolliert wachsende Tumorzelle ursächlich bestimmen, sind weitere Schritte zur Ausbildung eines malignen Tumors vonnöten.^{112,113} Insoweit werden sechs Schlüsselmerkmale (*hallmarks of cancer*) unterschieden, welche die Ausbildung und Progression eines Tumors ermöglichen. Dazu gehört unter anderem die anhaltende Angio- und Lymphangiogenese, die eine dauerhafte Proliferation neuer Gefäße aus zuvor bestehenden Gefäßen beschreibt.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Zellen sind grundsätzlich auf eine ausreichende Zufuhr von Blut zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und zum Abtransport von Stoffwechselprodukten angewiesen.¹¹⁷ Sich schnell teilende Tumorzellen sind ebenfalls dergestalt auf diese essenzielle Versorgung angewiesen, dass ein Mangel an adäquater Blutzufuhr das Wachstum und das Potential zur Metastasierung beschränkt.¹¹⁸

Während das Gefäßsystem im Erwachsenenalter physiologisch – mit wenigen Ausnahmen – eine ruhende Einheit darstellt und die Angiogenese als streng kontrollierter Prozess auftritt, ist dieses System beim Auftreten maligner zellulärer Prozesse derart gestört, dass es zur unkontrollierten Ausbildung neuer Gefäße kommt.^{118,119}

Der Beginn der tumoreigenen Angio- und Lymphangiogenese, auch als *angiogenic switch* bezeichnet, kann je nach Tumorart und Tumormikroumgebung in unterschiedlichen Stadien des Tumorwachstumsprozesses auftreten.^{113,120} Die Induktion des *angiogenic switch* hängt davon ab, wie schwer die physiologische Balance zugunsten pro-angiogener Faktoren gegenüber anti-angiogenen Faktoren verlagert wird. Zu den Induktoren gehören Hypoxie, die Aktivierung von Onkogenen und die Mutation von Tumorsuppressorgenen.¹²¹

Das tumoreigene Gefäßsystem unterscheidet sich signifikant von dem physiologischen Gefäßsystem. Zu den Unterschieden gehören eine aberrante Gefäßstruktur, ein abnormaler, teilweise oszillierender Blutfluss, eine erhöhte Permeabilität und eine verzögerte Maturation.^{122,123} Die irregulären Merkmale des tumoreigenen Gefäßsystems sind auf die unverhältnismäßige Expression von pro-angiogenen Faktoren zurückzuführen. Zu den wichtigsten aktivierenden Molekülen gehören der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *fibroblast growth factor* (FGF), der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und der *epidermal growth factor* (EGF).¹²⁴

2.3 Die VEGF-Familie

Die VEGF-Familie ist im Hinblick auf physiologische und pathologische Angio- und Lymphangiogenese eine zentrale Molekülgruppe.¹²⁵ Sie umfasst sechs Unterformen: VEGFA,

VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE und den *placental growth factor* (PGF). Bei diesen handelt es sich um sekretierte, endothelspezifische, homodimere Glykoproteine.¹²⁶ 1983 erstmalig identifiziert, gilt VEGFA, von dem durch differenzielles Spleißen eines einzelnen Gens verschiedene Isoformen generiert werden können, als essenzielles Protein für die Proliferation, das Überleben, die Migration und die Durchlässigkeit von Endothelzellen.^{125,127,128} Es sind drei verschiedene VEGF-Rezeptoren (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR) bekannt, an welche die VEGF-Subtypen an der Zelloberfläche binden: VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3. Diese sind Tyrosinkinase-Rezeptoren, die aus einer extrazellulären Region, einer transmembranen Helix und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase bestehen. Durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Region kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren und folglich zur Aktivierung eines nachgeschalteten Signalwegs.¹²⁹ Während VEGFA und VEGFB hauptsächlich VEGFR1 und VEGFR2 an Blutgefäßendothelzellen binden, binden VEGFC und VEGFD vor allem VEGFR2 an Blutgefäßendothelzellen und VEGFR3 an Lymphendothelzellen.¹³⁰

2.3.1. VEGFC

VEGFC wurde 1996 erstmalig als VEGFR2 und VEGFR3 bindender Ligand identifiziert.¹³¹ VEGFC als Präpropeptid unterscheidet sich von VEGFA und VEGFB dadurch, dass es N- und C-terminale Domänen enthält, die während und nach der Sekretion aus Endothelzellen proteolytisch gespalten werden.¹³² Diese Prozessierung zur reifen Form eines etwa 40 kDa schweren Homodimers, deren Kontrollmechanismus auf molekularer Ebene weiterhin unklar ist, erhöht die Affinität für VEGFR3 um ein Vielfaches.¹³² VEGFR2 kann lediglich die ausgereifte Form von VEGFC binden.¹³³ Grundsätzlich ist die Affinität von VEGFC für VEGFR2 schwächer als für VEGFR3, sodass von einem geringeren Effekt auf die Angiogenese ausgegangen wird.¹³⁴ Die ausgereifte Form von VEGFC induziert Mitose, Migration und Überleben von Endothelzellen.¹³⁵

VEGFC ist als Vermittler der lymphatischen Entwicklung von essenzieller Bedeutung während der Embryogenese. Die Ausschaltung beider VEGFC-Allele in einem Mausexperiment führte zur fehlenden Ausbildung von Lymphgefäßen und aufgrund der Flüssigkeitsansammlung in den Geweben zum pränatalen Tod.¹³⁶ Die Endothelzellen differenzierten sich zwar entlang der lymphatischen Zelllinie, es bildeten sich allerdings keine suffizienten Lymphgefäße. Es sind beide VEGFC-Allele für eine regelrechte Entwicklung des Lymphgefäßsystems vonnöten. So entwickelten Mäuse mit nur einem intakten VEGFC-Allel eine Hypoplasie der Lymphgefäße der Haut und Lymphödeme, was darauf hindeutet, dass auch die Konzentration von VEGFC für die regelrechte Ausbildung des Lymphgefäßsystems entscheidend ist¹³⁶. VEGFC ist jedoch

im Gegensatz zu seinen Rezeptoren VEGFR2 und VEGFR3 für die Entwicklung von Blutgefäßen nicht unerlässlich.¹³⁷

Eine weitere physiologische Bedeutung hat VEGFC als zentraler Mediator des Lymphgefäßsystems bei einer Entzündungsreaktion, indem es die Immunfunktion und die Leukozytenwanderung steuert.¹³⁷ Dabei wird die Transkription von VEGFC, dessen Promoter NF- κ B Bindungsstellen enthält, durch proinflammatorische Zytokine aktiviert.^{138,139}

Hinsichtlich pathologischer Prozesse wird VEGFC nicht nur bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, sondern auch bei malignen Tumoren eine zentrale Rolle zugesprochen.¹⁴⁰ VEGFC kann sowohl durch die Erhöhung der Permeabilität von Lymphgefäßen als auch über neues Lymphgefäßwachstum eine Invasion von Tumorzellen und damit eine intralymphatische Streuung von Tumorzellen ermöglichen.^{133,141}

Es wird eine signifikante Korrelation zwischen der VEGFC Expression und der Dichte von Lymphgefäßen beschrieben.¹⁴² Darüber hinaus ist bekannt, dass die VEGF-Konzentration bei einer Vielzahl von Malignomen, darunter Schilddrüsen-, Prostata-, Magen-, Dickdarm- und Lungenkarzinom, signifikant mit der Lymphknotenmetastasierung korreliert.¹⁴²⁻¹⁴⁷ Es konnte außerdem in einer tierexperimentellen Studie gezeigt werden, dass durch die Neutralisierung von VEGFC mithilfe der systemischen Überexpression von löslichem VEGFR3 die Lymphgefäßbildung und die Lymphknotenmetastasierung gehemmt wird.¹⁴⁸

2.3.2. VEGFD

VEGFD wurde ursprünglich in der Maus als *c-fos-induced growth factor* (FIGF) beschrieben, der die Zelltransformation und maligne Progression von Tumoren stimulieren kann.¹⁴⁹ 1997 wurde dieser durch molekulares Klonen im Menschen identifiziert und aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur VEGF-Familie als VEGFD bezeichnet.¹⁵⁰ Wie auch VEGFC bindet VEGF an VEGFR2 und VEGFR3 und aktiviert diese.

VEGFD wird primär als Präkursorprotein synthetisiert, das neben einer zentralen, rezeptorbindenden VEGF-Homologie-Domäne (VHD) lange N- und C-terminale Propeptide enthält.¹⁵¹ Das Präkursorprotein wird anschließend zu einer bioaktiven, nicht-kovalenten, dimeren Form prozessiert, die eine stark erhöhte Affinität für VEGFR2 und VEGFR3 im Vergleich zum Präkursorprotein hat.¹⁵¹

VEGFD ist strukturell eng mit VEGFC verwandt. Die VHDs von VEGFC und VEGFD, die bei beiden um N- und C-terminale Propeptide erweitert werden, sind in ihren Aminosäuresequenzen zu 61 % identisch.¹⁵² Aus den Ähnlichkeiten im Hinblick auf

Gesamtstruktur und Rezeptorbindung folgt ihre Einordnung als Untergruppe innerhalb der VEGF-Familie.¹³¹

Die physiologische Rolle von VEGFD ist dabei noch nicht abschließend geklärt. VEGFD wird sowohl im vaskulären Endothel als auch im Herz, in der Lunge, den Skelettmuskeln sowie im Dick- und Dünndarm exprimiert.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Einerseits ist VEGFD als potenter angiogenetischer Faktor beschrieben, der die Migration und Proliferation von Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* stimulieren kann.¹⁵⁵ Andererseits konnte gezeigt werden, dass die transgene Überexpression von VEGFD lediglich eine lymphatische Hyperplasie und nicht die Neubildung von Blutgefäßen induziert.¹⁵⁴ Darüber hinaus zeigen VEGFD-defiziente Mäuse im Tiermodell keine pathologischen Veränderungen des Lymphsystems, was darauf hindeutet, dass VEGFD keine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese spielt oder dass VEGFC, mithin auch ein anderer, bisher unbekannter aktivierender VEGFR3-Ligand, VEGFD während der Entwicklung kompensieren kann.¹⁵⁶

Auch die Bedeutung von VEGFD hinsichtlich krankhafter Veränderungen und bei der Tumorigenese ist nicht in Gänze verstanden. Dass VEGFD in der Lage ist, die Bildung von Lymphgefäßen im Tumor zu induzieren, ist bekannt.¹⁵⁷ Darüber hinaus führt die Expression von VEGFD in Tumorzellen zur Ausbreitung des Tumors auf Lymphknoten, die in einer experimentellen Studie durch einen VEGFD spezifischen Antikörper blockiert werden konnte.¹⁵⁷ Die Autoren identifizieren VEGFD aufgrund ihrer Beobachtung als ein Molekül, das den Prozess der metastatischen Ausbreitung maßgeblich bestimmt.¹⁵⁷

In einer anderen Studie, welche die Expression von VEGFD und VEGFR3 in Proben gesunder Darmschleimhaut und kolorektalen Karzinomen untersuchte, konnte eine höhere Expression von VEGFD in den Proben kolorektaler Karzinome nachgewiesen werden.¹⁵⁸ Die Höhe der VEGFD-Expression korreliert mit der Wahrscheinlichkeit, Lymphknotenmetastasen oder Tumorrezidive zu entwickeln.¹⁵⁸ Außerdem konnte VEGFD als unabhängiger prognostischer Faktor sowohl für das krankheitsfreie als auch das Gesamtüberleben bestimmt werden.¹⁵⁸ In der Studie konnte keine Korrelation zwischen der VEGFD-Expression und der Dichte der Mikrogefäße nachgewiesen werden.¹⁵⁸ Daher wird nur eine geringe Rolle von VEGFD für die Angiogenese, dafür aber eine zentrale für die Lymphangiogenese und die lymphatische Metastasierung angenommen.¹⁵⁸

Demgegenüber konnte in anderen Untersuchungen, beispielsweise beim Adenokarzinom der Lunge, beim Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses oder beim Magenkarzinom, eine niedrigere VEGFD-Expression in Proben des Tumorgewebes verglichen zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden.^{147,159,160} Zusätzlich wird eine Korrelation zwischen einer erhöhten VEGFC-Expression, einer reduzierten VEGFD-Expression und dem Auftreten von

Lymphknotenmetastasen beschrieben.^{147,159} Dass durch die Reduktion von VEGFD den potenteren Angiogenesefaktoren VEGFA und VEGFC eine verstärkte Bindung an ihren Rezeptoren ermöglicht wird, ist eine der diskutierten Erklärungen für diesen Zusammenhang.¹⁶⁰

2.3.3. VEGFR2

VEGFR2 besteht, wie auch VEGFR1, aus sieben extrazellulären, homologen Immunglobulin-Domänen, einer einzelnen Transmembranregion und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne, die durch eine eingefügte Kinase-Domäne getrennt wird.¹⁶¹ VEGFR2 wird daher auch als *kinase-insert domain receptor* (KDR) oder *fetal liver kinase* (FLK-1) bezeichnet.¹⁶² VEGFR2 bindet VEGFA, VEGFC und VEGFD. Die Expression von VEGFR2 ist autoreguliert, die Liganden regulieren die Expression von VEGFR2 hoch.¹⁶³ Neben Endothelzellen wird VEGFR2 auf neuronalen Zellen, retinalen Vorläuferzellen, Osteoblasten, Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert.¹⁶⁴

Während der Embryogenese wird VEGFR2 vom primitiven Endoderm, Angioblasten, in den Blutinseln und angiogenen Gefäßen exprimiert.¹⁶⁵ Mäuse, bei denen das VEGFR2-Gen deletiert wurde, versterben aufgrund der fehlenden Ausbildung von Blutinseln, des embryonalen Gefäßsystems und der hämatopoetischen Stammzellen.^{166,167} Während die VEGFR2-Expression in adulten Endothelzellen der Blutgefäße herunterreguliert wird, wird sie im Endothel der angiogenen Blutgefäße wieder hochreguliert.¹⁶⁸ Es wurde in vivo gezeigt, dass die Sequestration von VEGFR2 zu einer Herunterregulierung von VEGFR2 und zur Apoptose einiger Endothelzellen führt.¹⁶⁹ Darüber hinaus ist eine Interaktion von VEGFR2 mit *vascular endothelial cadherin*, einem Zell-Adhäsionsmolekül, und Integrin bei der Integrin-abhängigen Migration von Endothelzellen bekannt.^{170,171}

2.3.4. VEGFR3

VEGFR3, auch als *fms-like tyrosine kinase 4* (FLT4) bekannt, bindet VEGFC und VEGFD.^{131,152} VEGFR3 hat im Gegensatz zu VEGFR2 nur sechs homologe Immunglobulin-Domänen, da die fünfte nach der Biosynthese proteolytisch abgespalten wird.¹⁷² Die resultierenden Polypeptidketten bleiben über eine Disulfidbrücke verbunden. Durch alternatives Spleißen entstehen beim Menschen eine kurze und eine lange Isoform von VEGFR3, die sich in ihren C-Termini und in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden.¹⁷³

Während VEGFR3 in der Entwicklungsphase auf allen Endothelien vorhanden ist, beschränkt sich die Präsenz von VEGFR3 im adulten Organismus auf lymphatische Endothelzellen und

wenige, fenestrierte Blutgefäß-Endothelzellen.^{174,175} Es konnte gezeigt werden, dass VEGFR3 in Endothelzellen, die Kontakt zu glatten Muskelzellen haben, herunterreguliert wird.¹⁷⁶ Dies deutet darauf hin, dass VEGFR3 in sich entwickelnden Gefäßsystemen eine wichtige Rolle einnimmt, aber mit der Reifung der Gefäße überflüssig wird.¹⁷⁶

Tatsächlich konnte die essenzielle Rolle von VEGFR3 in der Entwicklung des embryonalen Herz-Kreislauf-Systems gezeigt werden: So ist die gezielte Inaktivierung des für VEGFR3 kodierenden Gens durch eine fehlerhafte Entwicklung der Blutgefäße im Mausmodell schon im frühembryonalen Stadium letal.¹⁷⁷ Zwar traten Vaskulogenese und Angiogenese auf, aber die großen Gefäße mit defekten Lumen waren abnormal organisiert, was zu Flüssigkeitsansammlungen unter anderem im Herzbeutel und zu kardiovaskulärem Versagen führte.¹⁷⁷ Fehlmutationen in VEGFR3 werden beim Menschen darüber hinaus mit angeborenen hereditären Lymphödemen in Verbindung gebracht.¹⁷⁸ Bei einer Vielzahl von Tumoren, etwa dem Mammakarzinom, dem Melanom und dem Pankreaskarzinom, ist ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von VEGFR3, damit insbesondere der Lymphangiogenese, und einer gesteigerten Migrations- sowie Invasionsrate und damit auch der Tumorprogression beschrieben.¹⁷⁹⁻¹⁸¹

2.4 Neuropilin-2

Neuropilin (NRP) wurde 1987 erstmalig in *Xenopus*-Nervengewebe gefunden.¹⁸² NRP ist ein Typ-I-Transmembranprotein und dient als Rezeptor sowohl für Semaphorin, das an der axonalen Wegfindung beteiligt ist, als auch für VEGF und vermittelt damit die Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßen.^{183,184} Die Rolle von NRP ist die eines Regulators und Modulators.¹²⁶ Neben neuronalem Gewebe (Neuronen und Glia) und vaskulärem Gewebe (Blut- und Lymphendothelzellen) wird NRP unter anderem auch in Herz, Lunge, Leber, Niere, Darm, Skelettmuskel und Knochen in unterschiedlichem Maße exprimiert.¹⁸⁵

Es gibt zwei Unterformen von NRP, Neuropilin-1 (NRP1) und Neuropilin-2 (NRP2), die sich in ihrer zentralen Funktion hinsichtlich der neuronalen und vaskulären Entwicklung und in ihrer chemischen Grundstruktur ähneln.¹⁸⁶ So gliedert sich die Primärstruktur beider Subtypen in vier Domänen: eine a1/a2-Domäne, eine b1/b2-Domäne, eine c-Domäne und eine d-Domäne.¹⁸⁷ Letztere enthält den transmembranen und kurzen zytoplasmatischen Anteil.¹⁸⁷ Während die a1/a2-Domäne über CUB (*complement C1r/C1s*, Uegf, Bmp1) die Interaktion von NRP mit Semaphorin und Plexin vermittelt, interagiert die b1/b2-Domäne über die Koagulationsfaktoren FV/FVIII mit VEGF. Die c-Domäne fördert über MAM (*mephrin*, A5, *receptor protein tyrosine phosphatase mu*) die für die Vermittlung der transmembranen Signaltransduktion notwendige Bildung von Dimeren und Oligomeren.¹⁸⁷ Die selektive

Erfassung und Bindung von Semaphorinen oder VEGF an NRP1 und NRP2 ermöglicht eine unterschiedliche biologische Wirkung auf die Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßendothelzellen.¹⁸⁵

NRP2 wurde erstmalig 1997 entdeckt.¹⁸⁸ Das NRP2-Gen, das auf Chromosom 2q33.3 lokalisiert ist, ist 116 kb lang und besteht aus 17 Exons.¹⁸⁹ Es sind zwei sekundäre Subtypen von NRP2 beschrieben, die zwischen der c-Domäne und dem transmembranen Anteil divergieren.¹⁹⁰ NRP2 wird hauptsächlich auf Lymphendothelzellen exprimiert und bindet VEGFC und VEGFD.

Wie VEGFR3 kann NRP2 VEGFC und VEGFD als Liganden direkt binden.¹⁹¹ Die geradlinigen Epitope von VEGFC und VEGFD, die ein proteolytisch freigesetztes C-terminales Arginin aufweisen, binden selektiv an die b1-Domäne von NRP2.¹⁹² Zwar könnte aufgrund dieser selektiven Bindung von einer unabhängigen Signalfunktion von NRP2 ausgegangen werden, allerdings fehlen NRP2 die klassischen enzymatischen Domänen, die für eine direkte Signaltransduktion erforderlich sind.¹⁹³ Außerdem hat es mit etwa 40 Aminosäuren ein nur kurzes intrazelluläres Segment, welches kein adäquates Kinase-Signal erzeugen kann.¹⁹³

Die Rolle von NRP2 wird als Co-Rezeptor von VEGFR3 verstanden. Dabei ist der genaue Wirkmechanismus der NRP-Funktion bei der VEGF-VEGFR-Signalübertragung noch nicht vollständig geklärt. Die VEGFR- und NRP-Bindungsstellen auf VEGF sind unabhängig voneinander. VEGF kann daher als Vernetzer dienen, um NRP2 in einen Heterokomplex mit VEGFR3 zu rekrutieren.¹⁹⁴ Die Bindung von NRP2 an den Liganden führt zur Internalisierung von NRP2 zusammen mit VEGFR3, was zu einer erhöhten Affinität von Lymphendothelzellen gegenüber dem VEGFC-Gradienten während der lymphatischen Entwicklung führt und die VEGFC-induzierte lymphatische Sprossung zusammen mit VEGFR3 vermittelt.¹⁹⁰

Eine hohe Expression von NRP2 in verschiedenen Entwicklungsstadien von Tumoren, insbesondere bei der Lymphangiogenese und der lymphatischen Metastasierung, ist bekannt.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Veränderungen in der Expression von NRP2 stehen im engen Zusammenhang mit histopathologischen Merkmalen, wie beispielsweise Apoptose, Malignität, Metastasierung und Rezidivierung verschiedener Tumore.^{190,198} Darüber hinaus korreliert eine NRP2-Überexpression mit dem klinischen Stadium, der Metastasierungsrate und damit einer schlechten Prognose bei vielen fortgeschritten Tumoren, wie etwa beim Mammakarzinom, kolorektalem Karzinom, Urothelkarzinom, Nierenzellkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom, Magenkarzinom und Osteosarkom.¹⁹⁷⁻²⁰¹

2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Das uveale Melanom ist der häufigste intraokuläre Tumor im Erwachsenenalter. Die Prognose kann aktuell lediglich durch die frühestmögliche Diagnosestellung und Therapie beeinflusst werden. Eine etablierte Therapie zur Behandlung einer Metastasierung oder gar eine adjuvante Therapie zur Verhinderung einer Metastasierung existieren derzeit nicht.

Angio- und Lymphangiogenese sind von besonderer Bedeutung für die Versorgung einer sich schnell entwickelnden Zellmasse und auch für den Übergang einer gutartigen Läsion in einen bösartigen Tumor.^{113,202} Entscheidende Faktoren dabei sind die VEGF-Familie mit den verschiedenen Liganden und ihren Rezeptoren sowie NRP2.^{203,204}

Die Induktion von VEGF wurde bei einer Vielzahl von bösartigen Tumoren umfassend nachgewiesen.^{205,206} Neben der bekannten Steigerung der VEGF-Expression im Rahmen angiogener Proliferation bei Retinopathien ist eine VEGF-Expression beim uvealen Melanom belegt.²⁰⁷ Auch wenn die Bestimmung der VEGF-Expression im Serum die Prognose und die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit uvealem Melanom nicht vorhersagen kann, so ist dennoch eine Erhöhung des Serumspiegels von VEGF beim metastasierten Aderhautmelanom im Vergleich zum nicht-metastasierten Aderhautmelanom nachgewiesen.²⁰⁸ Darüber hinaus ist das Vorkommen von VEGF im Kammerwasser von Augen mit uvealem Melanom bestätigt und eine Korrelation der VEGF-Expression mit dem größten basalen Tumordurchmesser und der Tumorphöhe belegt.²⁰⁹

Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der die Angiogenese inhibiert, indem er VEGF bindet und die Interaktion mit VEGFR verhindert, wird zur Behandlung von Metastasen einiger Tumore angewandt, beispielsweise dem kolorektalen Karzinom oder Nierenzellkarzinom.^{210,211} Allerdings sind nicht alle Resultate positiv: So wurde beispielsweise beim neuroendokrinen Pankreastumor oder beim Glioblastom eine Adaptierung des Tumors und eine verstärkte Fernmetastasierung dokumentiert.²¹²

Die Off-Label-Anwendung von Bevacizumab ist in der Ophthalmologie als intravitreale operative Medikamenteneingabe bei exsudativer altersbedingter Makuladegeneration, proliferativer diabetischer Retinopathie und Strahlenretinopathie weit verbreitet. Die Datenlage zum Einsatz von Bevacizumab beim uvealen Melanom ist uneinheitlich.²¹³ Einerseits konnte in einem Mausmodell, in dem Melanomzellen subchorioidal eingegeben wurden, gezeigt werden, dass durch eine intraperitoneale Bevacizumab-Injektion das Wachstum des primären okulären Melanoms und die Bildung von Mikrometastasen in der Leber dosisabhängig unterdrückt werden können.²¹¹ Andererseits wurde in einem anderen Mausmodell, in dem Melanomzellen in die vordere Augenkammer eingegeben wurden, eine Beschleunigung des Tumorwachstums durch die Behandlung mit Bevacizumab gegenüber der Kontrollgruppe

beobachtet.^{214,215} Es sind darüber hinaus Patientenfälle bekannt, die aufgrund einer Fehldiagnose Bevacizumab-Injektionen erhalten haben, bei denen retrospektiv kein Nutzen der Injektionen festgestellt werden konnte.²¹⁶ In einer anderen prospektiven Studie, in der die neoadjuvante intravitreale Injektion von Bevacizumab bei uvealem Melanom untersucht wurde, konnte eine Woche nach der Injektion ein paradoxes Tumorwachstum beobachtet werden, woraufhin eine Enukleation durchgeführt wurde.²¹⁷

In einer im Jahr 2008 erschienenen Studie wurde der Einfluss von NRP2 auf die VEGF-Ligand-Rezeptor-Bindung *in vitro* und *in vivo* analysiert.²¹⁸ Dabei wurde sich eines murinen Antikörpers bedient, der spezifisch die b1/b2-Domäne und damit die VEGF-Bindungsstelle bindet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bildung des NRP2/VEGF-Rezeptorkomplexes durch den Einsatz dieses blockierenden Antikörpers gehemmt wurde.²¹⁸ Dies führte nicht nur zur Hemmung der Lymphangiogenese, sondern auch zur Verringerung der Anzahl von Tumorlymphgefäßen und letztendlich zur Hemmung der Metastasierung.²¹⁸ Diese Untersuchung unterstreicht die herausragende Bedeutung von NRP2 und macht es zu einem interessanten Ziel weiterführender Forschung.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von NRP2 auf VEGF und VEGFR im uvealen Melanom, indem die jeweilige Expression nach Hinzugabe eines inhibierenden NRP2-Antikörpers anhand von Durchflusszytometrie und semiquantitativer Proteinbestimmung ermittelt wird. Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, das komplexe Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung dieser Proteine bei der Entstehung beziehungsweise Entwicklung uvealer Melanome besser verstehen zu können, um durch die tiefere Einsicht in komplexe molekularbiologische Prozesse eine effektive Therapie zur Behandlung einer Metastasierung oder gar eine adjuvante Therapie zur Prävention einer Metastasierung zu etablieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

	UPMD2	UPMM2
GNAQ-Mutation ²¹⁹	negativ	Q209L (626 A>T)
GNA11-Mutation ²¹⁹	Q209 (626 A>T)	negativ
Chromosom 3-Status ²²⁰	Disomie	Monosomie
Vorherrschender Zelltyp ²²¹	epitheloid	spindelzellig
Ort der Gewinnung	Primärtumor	Primärtumor

3.1.2. Antikörper

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Methode	Verdünnung
Anti-NRP2, Kaninchen, monoklonal	Abcam, Cambridge, GB	Durchflusszytometrie Western Blot	1:200
Anti-pan Keratin, Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, GB	Durchflusszytometrie	1:20
Anti-VEGFC, Maus, polyklonal	Abcam, Cambridge, GB	Durchflusszytometrie	1:1000
Anti-VEGFC, Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, GB	Western Blot	1:1000
Anti-VEGFD, Kaninchen, monoklonal	Abcam, Cambridge, GB	Durchflusszytometrie Western Blot	1:500 1:1000
Anti-VEGFR2, Maus, monoklonal	Abcam, Cambridge, GB	Durchflusszytometrie	1:400
Anti-VEGFR2, Kaninchen, polyklonal	Zytomed Systems, Berlin, DE	Western Blot	1:200
Anti-VEGFR3, Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, GB	Durchflusszytometrie Western Blot	1:500 1:500
β-Aktin, Kaninchen, monoclonal	Cell Signaling, Danvers, USA	Western Blot	1:1000

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Firma	Methode	Verdünnung
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor Plus 488	Invitrogen, Karlsruhe, DE	Durchflusszytometrie	1:1000
Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP	Abcam, Cambridge, GB	Western Blot	1:2000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe, DE	Durchflusszytometrie	1:1000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP	Abcam, Cambridge, GB	Western Blot	1:2000

3.1.3. Reagenzien und Substanzen

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Substanzen

Reagenz/Substanz	Firma
7-AAD Viability Staining-Solution	BioLegend, San Diego, USA
Acrylamidstammlösung, Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Albumin Standard, 2,0 mg/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bovine Serum Albumin	VWR, Radnor, USA
Coomassie Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CS&T Research Beads	BD Biosciences, San Jose, USA
Dimethylsulfoxid	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
DPBS, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol Rotipuran® (>99,8 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
Fetal Bovine Serum, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycin (>99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
GlutaMAX™, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Laemmli Sample Buffer (4x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
L-Glutamine (200 mM, 100x), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Luminol-Reagenz, Pierce™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM NEAA (100x), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MEM Vitamin Solution (100x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol (1000x), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-Mercaptoethanol (>99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Methanol (>99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Mounting Medium DAPI	Dianova, Hamburg, DE
Natriumazid (>99,5 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat, SDS ultra pure (>99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PBS buffer (10x)	AppliChem, Darmstadt, DE
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PMSF (Protease Inhibitor, 100x)	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
Proteinleiter, ColorPlus™ #26619	New England Biolabs, Ipswich, USA
RIPA Buffer (10x)	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
RPMI Medium 1640, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Salzsäure rauchend (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Sodium Pyruvate (100 mM), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED (>99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris Base	Promega, Walldorf, DE
Tris HCl	Promega, Walldorf, DE
Trypanblau, Trypan Blue Dye (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin, TrypLE™ Express, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TWEEN® 20	Merck, Darmstadt, DE

3.1.4. Materialien und Hilfsmittel

Tabelle 6: Verwendete Materialien und Hilfsmittel

Materialien und Hilfsmittel	Firma
Combitips® advanced, 10 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Einkanalpipette, Reference®, 0,1-2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Einkanalpipette, Research® plus, 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Einkanalpipette, Research® plus, 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Einkanalpipette, Research® plus, 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Einkanalpipette, Research® plus, 0,1-1 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Filterpapier für Western Blot, extra dick	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Gefrierbehälter, CoolCell®	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Gelelektrophorese-System: Mini-Protean® Tetra Cell (Geldicke, 1,0 mm, 10 Wells)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Insulinspritze, U-40, 1ml	B. Braun, Melsungen, DE
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multiwellplatte, 24 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Multiwellplatte, 96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Neubauer Zählkammer (Tiefe, 0,1 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Nitrozellulose-Membran, 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipette, Glas	Brand, Wertheim, DE
Pasteurpipette, Plastik	Labsolute, Renningen, DE
Pinzette, einweg	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Pipettenspitze, 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitze, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitze, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Probenröhre (FACS)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäß 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reagiergefäß, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Schraubröhre, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Schraubröhre, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipette, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipette, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflasche, 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellsieb, 40 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

3.1.5. Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Firma	Spezifizierung
Chemilumineszenz Imager	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	ChemiDoc™ MP
CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Heracell™ 150i
Durchflusszytometer	BD Biosciences, San Jose, USA	LSRFortessa™ Cell Analyzer
Magnetrührer	IKA, Staufen, DE	RET-GS

Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Multiskan™ FC
Mikroskop (invers, Zellkultur)	Motic, Vancouver, CA	AE2000
Mikrozentrifuge	VWR, Radnor, USA	Mikro Star 17R
Minizentrifuge	VWR, Radnor, USA	MiniStar
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, DE	Multipipette® E3x
pH-Messgerät	Dostmann electronic, Wertheim-Reicholzheim, DE	pH 50+
Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	PowerPac™ HC
Rotator	Labnet, Corning, USA	Mini Labroller Rotator
Schüttler	Lauda, Lauda-Königshofen, DE	GFL 3011
Sicherheitswerkbank	LaboGene, Allerød, DK	Mars 1800 LMS runner
Stickstoffbehälter	Cryo Diffusion, Lery, FR	BR-2150
Vibrationsmischer	VWR, Radnor, USA	Mini-Vortex Schüttler
Waage	Kern, Balingen-Frommern, DE	Präzisionswaage, PCB
Waage	VWR, Radnor, USA	Analysewaage, LA 254i
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, DE	GFL 1008
Zentrifuge	VWR, Radnor, USA	Mega Star 1.6R

3.1.6. Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Firma
BD FACSDiva™ Software (Version 8.0)	BD Biosciences, San Jose, USA
GraphPad Prism (Version 10.1.0)	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ (Version 1.54f)	Wayne Rasband, National Health Institute, USA
Microsoft® Excel (Version 16.77)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word (Version 16.79.1)	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.2 Methoden

3.2.1. Zellkultur

Tabelle 9: Zusammensetzung des Tumor-Mediums

Substanz	Menge
RPMI Medium 1640	500 ml
Fetal Bovine Serum (Hitze inaktiviert, 56 °C, 30 min)	50 ml
L-Glutamine (100x)	5 ml
MEM NEAA (100x)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	5 ml
Sodium Pyruvate (100 mM)	5 ml
MEM Vitamin Solution (100x)	2 ml
2-Mercaptoethanol (1000x)	500 µl

Die Zelllinien UPMM2 und UPMD2 wurden in 10 ml des in **Tabelle 9** dargestellten Tumor-Mediums in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator unter sterilen Bedingungen kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage nach zuvor erfolgtem Waschen mit DPBS gewechselt.

Die Subkultivierung der Zellkulturen erfolgte regelmäßig kurz vor dem Erreichen einer Konfluenz. Dafür wurden die adhärennten Zellen mit 7 ml DPBS gewaschen und anschließend mittels 3 ml Trypsins von der Zellkulturflasche gelöst. Weil eine längere Einwirkzeit des Trypsins zu irreversiblen Zellschäden führen würde, wurde der Trypsinisierungsprozess durch Hinzugabe von 3 ml des serumhaltigen Tumor-Mediums gestoppt, sobald ein Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu erkennen war (bei 37 °C nach etwa 5 Minuten). Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 15 ml fassende Schraubröhre überführt und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt worden war, wurden die Zellen in 1 ml des Tumorzell-Mediums resuspendiert. Als Verdünnungsfaktor für die Subkultur wurde zumeist der Faktor 1:8 gewählt.

Auch zur Aussaat der Zellen erfolgte der zuvor beschriebene Trypsinisierungsprozess. Die Zählung der Zellen erfolgte mithilfe einer Neubauer-Kammer. Um dies zu vereinfachen, wurde die Zellsuspension um den Faktor 1:10 verdünnt, sodass der Mittelwert der 4 großen Quadrate der Neubauer-Kammer multipliziert mit dem Faktor 10⁵ die Zellkonzentration pro Milliliter ergab. Die Vitalitätstestung der Zellen erfolgte durch Hinzugabe von Trypanblau, das als saurer Farbstoff die defekte Membran toter Zellen passiert und zytosolische Proteine bindet. Nur lebendige Zellen wurden hinsichtlich der Zellzahlbestimmung berücksichtigt.

Zur Langzeitlagerung wurden 500 µl einer Zellsuspension mit 400 µl FBS und 100 µl DMSO in Kryoröhrchen mittels eines Gefrierbehältnisses, das eine Einfrierrate von -1 °C pro Minute gewährleistet, auf -80 °C heruntergekühlt und dann in einem Stickstoffbehälter gefüllt mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen nur so kurz im Wasserbad erwärmt, dass sich darin noch ein kleiner gefrorener Rest befand. Der Inhalt wurde dann umgehend in 5 ml des Tumor-Mediums in einer Schraubröhre aufgenommen und bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurden die verbliebenen Zellen in Tumor-Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche angezüchtet. Am jeweils darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Zellen für die entsprechenden Experimente erfolgte die Aussaat der Zellen gemäß vorheriger Beschreibung. Hierbei wurden pro Well der 24-Multiwellplatte 200.000 lebensfähige Zellen ausgesät. Nach Kultivierung der Zellen über 24 Stunden wurde das Medium der Wells gewechselt. Dabei wurde der Hälfte der Wells ein inhibierender NRP2-Antikörper im Verhältnis 1:200 zugefügt, während die andere Hälfte als Kontrollgruppe diente. Diese Inkubation mit dem NRP2-Antikörper wurde sowohl für 2 Stunden als auch für 24 Stunden durchgeführt. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie im Folgenden beschrieben.

3.2.2. Durchflusszytometrie (FACS)

(1) Lösungen

Washing-Buffer: 2 % BSA in DPBS

Staining-Solution: 2 % BSA + 0,09 % Natriumazid (>99,5 %) in DPBS

(2) Prinzip

Die Durchflusszytometrie erlaubt als etabliertes optisches Verfahren eine zelluläre Diagnostik, die eine simultane Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Zellen ermöglicht. Zu diesen gehören sowohl die Größe und die Granularität der Zellen als auch deren Fluoreszenzeigenschaften.

Ausgangspunkt eines Durchflusszytometers ist eine monochromatische Lichtquelle, beispielsweise ein Laserstrahl, der die zu untersuchenden Zellen als Suspension am sogenannten Messpunkt, dem gemeinsamen Fokus der Probensuspension und des Lasers, im rechten Winkel trifft. Die Probensuspension wird dabei durch einen Hüllstrom verdünnt und fokussiert, sodass die Zellen den Messpunkt einzeln durchfließen.

Die Analyse der Durchflusszytometrie basiert auf der Detektion der Streuung des Anregungslichtes und der Fluoreszenz am Messpunkt. Die Lichtstreuung kann in Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) differenziert werden, wobei die FSC mit der Zellgröße und die SSC mit der Zellgranularität beziehungsweise der Binnenstruktur korreliert.

Zur Bestimmung einer Fluoreszenz muss eine fluoreszierende Färbung der Zellen, etwa durch Fluorochrome, die an Antikörper konjugiert sind, erfolgen. Diese Antikörper können gegen unterschiedliche zelluläre Antigene gerichtet sein, sodass deren Bindung und damit die indirekte Konjugation der Fluorochrome die Analyse unterschiedlicher Fragestellungen hinsichtlich bestimmter zellulärer Strukturen ermöglicht. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Lage, das von der monochromatischen Lichtquelle ausgesandte energiereiche kurzwellige Licht in ein energiearmes langwelliges Licht umzuwandeln. Diese Emission kann, nachdem sie je nach Farbstoff mittels Farbteilerspiegel und Bandpassfilter optisch getrennt wurde, durch Photomultiplier detektiert und in elektrische Signale konvertiert werden.

(3) Durchführung

Im ersten Schritt mussten die Zellen, die sich in einer 24-Multiwellplatte befanden, zur Ablösung mit jeweils 50 µl Trypsin versetzt werden. Sobald diese Ablösung der Zellen zu erkennen war, wurde der Trypsinisierungsprozess mit 50 µl des serumhaltigen Tumor-Mediums gestoppt und die Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 150 µl des Washing-Buffers. Dafür wurde die Suspension jeweils bei 300 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Zellpellet anschließend mit 150 µl des Washing-Buffers resuspendiert. Zur Maskierung freier Proteinbindungsstellen wurden die Zellen danach mit 200 µl der Staining-Solution für 1 Stunde inkubiert.

Nach einem erneuten Waschen wurden die Proben mit den jeweiligen spezifischen ersten Antikörpern, die zuvor um den entsprechenden Faktor (**Tabelle 3**) verdünnt worden waren, für 1 Stunde versetzt. Um unspezifisch gebundene primäre Antikörper zu entfernen, erfolgte ein weiteres Waschen.

Die Inkubation mit den korrespondierenden zweiten Antikörpern, die ebenfalls zuvor um den jeweiligen Faktor (

Tabelle 4) verdünnt worden waren, erfolgte unter Lichtausschluss für eine halbe Stunde. Nach einem weiteren Waschen wurde das Zellpellet mit 500 µl der Staining-Solution resuspendiert und in die FACS-Probenröhren überführt.

Bevor die Proben analysiert werden konnten, wurde ihnen jeweils 1 ml der 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) Viability Staining-Solution hinzugegeben. 7-AAD besitzt die Fähigkeit zur Interkalation der DNA und kann nur in Zellen eindringen, die eine kompromittierte Zellmembran haben. So eignet es sich als Zellfarbstoff ideal zur Diskriminierung viabler von nicht-viablen Zellen, die zur Ermittlung korrekter Ergebnisse aufgrund veränderter Zelleigenschaften unbedingt ausgeschlossen werden sollten. Nach einer Inkubation von 10 Minuten konnte mit der Analyse fortgefahren werden.

(4) Analyse

Bei jeder zu analysierenden Probe wurden neben der Negativprobe zwei verschiedene Farbstoffe mit unterschiedlichen Fluorochromen und Emissionsspektren verwendet: das zu untersuchende Antigen sowie die Viability Staining-Solution.

Im Histogramm, das lediglich eine Dimension dargestellt, wird die Fluoreszenzintensität entlang der x-Achse und die Anzahl der Zellen auf der y-Achse aufgetragen. So kann mittels der Negativprobe ein Gate festgelegt werden, das den Bereich für die Messung und damit die Anzahl der positiven Zellen diskriminiert. Dieses Gate gewährleistet, dass nur Daten aus der spezifischen Zielgruppe für die Auswertung verwendet werden. Es wurde sowohl für das jeweilige Antigen als auch für die Viability Staining-Solution definiert.

Im Dot Plot werden die Daten zweidimensional als Punktwolke visualisiert, wobei jeder Punkt eine Zelle repräsentiert. Dabei wurde das Antigen mit seinem jeweiligen Gate und die Viability Staining-Solution mit den jeweiligen Gates auf der x-Achse und die Viability auf der y-Achse angeordnet. Dadurch konnten die entsprechenden Zellen, die fluopositiv und lebensfähig sind, gefiltert werden.

Die Anzahl der durchgeführten Versuche für jedes Antigen beträgt jeweils sechs. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die absoluten Werte in Prozent normalisiert, wobei der jeweils höchste Wert als 100 % festgelegt wurde. Um signifikante Unterschiede in der Expression der Antigene zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe zu überprüfen, wurden t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wird dabei als signifikant definiert.

3.2.3. Semiquantitative Proteinbestimmung

(1) Lösungen und Gele

Blockierlösung:	5 % Magermilchpulver in TBST lösen, anschließend durch ein Zellsieb (40 µm) geben
10x Blotting-Buffer:	29,24 Tris Base + 52,75 g Glycin auf 1 l ddH ₂ O
1x Blotting-Buffer:	100 ml 10x Blotting Buffer + 100 ml Methanol + 800 ml ddH ₂ O
Harsh-Stripping-Buffer:	20 ml SDS (10 %) + 12,5 ml Tris HCl, pH 6,8, 0,5 M + 67,5 ml ddH ₂ O + 0,8 ml 2-Mercaptoethanol (>99 %)
Laemmli-Puffer:	90 % Laemmli Sample Buffer (4x) + 10 % 2-Mercaptoethanol
Lysepuffer:	10 % RIPA Buffer (10x) + 1 % PMSF in PBS
SDS (10 %):	1 g Natriumdodecylsulfat in 10 ml ddH ₂ O
10x Running-Buffer:	30,22 g Tris Base + 188 g Glycin + 10 g SDS auf 1 l ddH ₂ O
1x Running-Buffer:	100 ml 10x Running Buffer + 900 ml ddH ₂ O
10x TBS:	24 g Tris Base + 88 g NaCl in 900 ml ddH ₂ O lösen, pH mit HCl auf 7,6 einstellen
1x TBST:	100 ml 10x TBS + 900 ml ddH ₂ O + 1 ml TWEEN® 20
Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8):	6,05 g Tris Base in 40 ml ddH ₂ O lösen, pH mit HCl auf 6,8 einstellen, mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8):	18,2 g Tris Base in 40 ml ddH ₂ O lösen, pH mit HCl auf 8,8 einstellen, mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen

Tabelle 10: Zusammensetzung der Gele der SDS-PAGE

5 % Sammelgel		10 % Trenngel	
2,33 ml	ddH ₂ O	3,25 ml	ddH ₂ O
1 ml	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	2 ml	Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8)
667 µl	Acrylamidstammlösung 30 %	2,67 ml	Acrylamidstammlösung 30 %
40 µl	SDS (10%)	80 µl	SDS (10%)
30 µl	Ammoniumpersulfat (10 %)	60 µl	Ammoniumpersulfat (10 %)

4 µl TEMED

|| 6 µl TEMED

(2) Proteinisolation

Die Lyse der Zellen und die Isolation der Proteine wurde auf Eis durchgeführt. Nachdem die Zellen, die sich in einer auf Eis gelegten 24-Multiwellplatte befunden hatten, mit sehr kaltem PBS gewaschen worden waren, wurden sie mit 50 µl Lysepuffer pro Well versetzt und anschließend in vorgekühlte 1,5 ml fassende Reagiergefäße überführt. In diesen inkubierte die Suspension für insgesamt 30 Minuten, wobei sie zur weiteren Lyse durch Pipettieren immer wieder in Bewegung gebracht wurde. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g und 4 °C für 5 Minuten, woraufhin der Überstand in ein anderes Reagiergefäß überführt und das Pellet verworfen wurde.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde das Verfahren nach Bradford durchgeführt. Dabei erlaubt eine Standardreihe die Bestimmung der unbekanntenen Proteinmenge der Proben. Zur Erzeugung dieser Standardreihe wurde ein Albumin-Standard mit bekannter Konzentration (2000 µg/ml) sechsmal im Verhältnis 1:1 mit ddH₂O verdünnt. Damit nicht zu viel Volumen der Proben für die Analyse verwendet werden musste, wurden 2 µl einer jeden zu untersuchenden Probe zuvor mit 18 µl ddH₂O verdünnt. Anschließend wurden jeweils dreimal 5 µl aller Proben in eine 96-Multiwellplatte pipettiert und mit 250 µl Coomassie Protein Assay Reagent, das sequenzunspezifisch an kationische und unpolare Aminosäurereste bindet, versetzt. Nachdem die Extinktion der einzelnen Proben dann durch ein Mikrotiterplatten-Photometer bei 570 nm biophotometrisch gemessen wurde, erfolgte die Quantifizierung der Proteinkonzentration rechnerisch anhand der Standardkurve.

(3) SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine dient die Gelelektrophorese, in der SDS eingesetzt wird, das als anionisches Tensid die Eigenladung der Proteine konstant überdeckt und die Trennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse ermöglicht.

Die Gelelektrophorese erfolgte mit selbstgegossenen Gelen (**Tabelle 10: Zusammensetzung der Gele der SDS-PAGE**) aus 10-prozentigem Trenn- und 5-prozentigem Sammelgel. Nachdem die Gussformen mit Alkohol gereinigt wurden, wurde das Trenngel bis etwa 3 cm zur Obergrenze zwischen die Glasplatten pipettiert und mit Ethanol bedeckt, um eine luftblasenfreie und gerade Polymerisation zu gewährleisten. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Ethanol entfernt, das Sammel- auf das Trenngel pipettiert und ein

Kamm mit einer Stärke von 1,0 mm und 10 Taschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach weiteren 20 Minuten der Polymerisation konnten die Gele entweder direkt oder – in feuchten Tüchern luftdicht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert – am Folgetag verwendet werden.

Nachdem die vorbereiteten Gele daraufhin in das Gelelektrophorese-System eingesetzt und mit 1x Running-Buffer ausgespült worden waren, wurde das Volumen jeder zu untersuchenden Probe, das 20 µg des jeweiligen Gesamtproteins entsprach, mit dem Laemmli-Puffer im Verhältnis 3:1 in die Taschen pipettiert.²²² Zur Orientierung wurde zusätzlich eine vorgefärbte Proteinleiter aufgetragen, die einen Rückschluss auf die molekulare Masse der zu untersuchenden Proteine im Bereich zwischen 10-250 kDa erlaubte. Die Gelelektrophorese erfolgte für 10 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt und anschließend für weitere 50 Minuten bei einer Spannung von 160 Volt.

(4) Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor in der Trägermatrix aufgetrennten Proteine mithilfe eines elektrischen Feldes, das senkrecht zu dem Gel steht, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Vor dieser Übertragung wurden die auf die Größe der Gele angepassten Nitrozellulose-Membranen, die Schwämme und die extra-dicken Filterpapiere für 10 Minuten in 1x Blotting-Buffer inkubiert. Nachdem die Blotkammer-Kassette entsprechend dem Spannungsgefälle zusammengesetzt worden war, erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran für 20 Stunden über Nacht unter Kühlung und bei einer Stromstärke von 120 mA.

(5) Detektion der Proteinbanden

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Maskierung unspezifischer Proteinbindungen für 1 Stunde in einer 5-prozentigen Magermilchpulver-Blockierlösung inkubiert, die zuvor zur Herausfilterung von Verklumpungen durch ein Zellsieb gegeben wurde. Anschließend wurde die Membran dreimal über 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Inkubation der spezifischen, primären Antikörper, die in TBST um den jeweiligen Faktor (**Tabelle 3**) verdünnt wurden, erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung. Zur Ladekontrolle wurde β-Aktin eingesetzt.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener primärer Antikörper wurde die Membran dreimal über 10 Minuten mit TBST gewaschen. Daran jeweils anschließend wurde sie mit einem gegen die Fc-Region des primären Antikörpers gerichteten, Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper, der in TBST mit einem 0,5-prozentigen Milchpulveranteil gelöst wurde, für 1 Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal über 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Danach wurde die Membran mit einem Luminol-Reagenz unter Lichtausschluss versetzt, wobei die zuvor gebundenen HRP-gekoppelten sekundären Antikörper die Umsetzung des Luminols beziehungsweise seiner Derivate in die oxidierte Form katalysierten. Die dabei entstandene Chemilumineszenz konnte mithilfe eines Chemilumineszenz-Imagers sichtbar gemacht werden.

(6) „Stripping“ der Membranen

Damit die Membranen mit den einzelnen Proben zur Detektion anderer Proteine wiederverwendet werden konnten, musste ein „Membran-Stripping“ erfolgen. Dazu wurden die Membranen 45 Minuten bei 50 °C in einem geschlossenen Behälter mit dem vorgewärmten Harsh-Stripping-Buffer inkubiert. Die Membranen wurden dann für 2 Minuten mit fließendem Wasser gespült und für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Bevor sie anschließend mit anderen primären und sekundären Antikörpern beladen werden konnten, mussten unspezifische Proteinbindungen erneut mit der Blockierlösung maskiert werden.

(7) Quantifizierung

Die Proteinmenge wurde anhand der Stärke der Banden densitometrisch mithilfe des Programms *ImageJ* durchgeführt. Dabei wurde das Ergebnis einer jeden Probe mit der jeweiligen Bandenstärke der Ladekontrolle β -Actin verrechnet. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Erneut wurden t-Tests für unabhängige Stichproben zur Untersuchung eines signifikanten Unterschieds durchgeführt. Ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wird dabei als signifikant definiert.

4. Ergebnisse

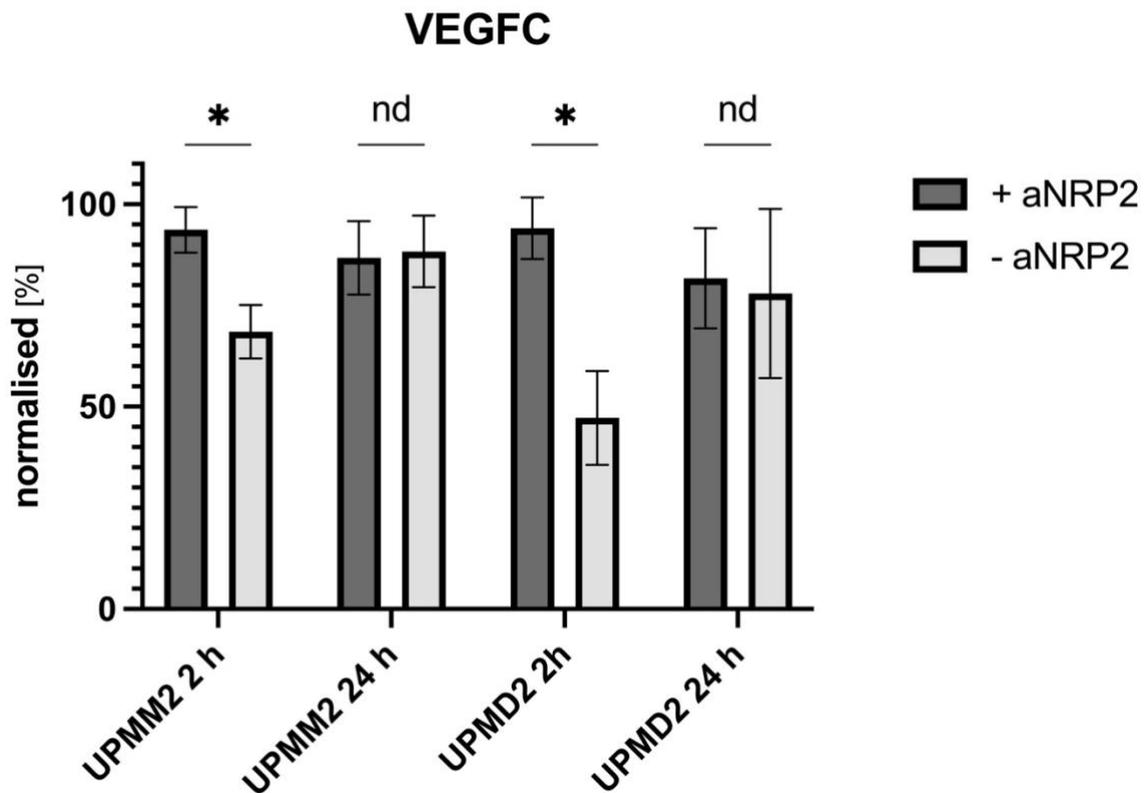
4.1 Durchflusszytometrie (FACS)

4.1.1. VEGFC

Tabelle 11: Relativer Anteil an VEGFC in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie

		+ aNRP2 MW (SD) [%]	- aNRP2 MW (SD) [%]	p-Wert
UPMM2	2 h	93,7 (5,6)	68,5 (6,6)	< 0,0001
	24 h	86,8 (9,1)	88,3 (8,9)	0,7921
UPMD2	2 h	94,1 (7,6)	47,2 (11,6)	< 0,0001
	24 h	81,7 (12,4)	88 (20,9)	0,7392

Abbildung 1: Relativer Anteil an VEGFC in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie



Die zweistündige Behandlung von UPMM2 und UPMD2 mit dem inhibierenden NRP2-Antikörper führt zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von VEGFC. In der Gruppe, die 24 Stunden lang behandelt wurde, ist dieser signifikante Unterschied nicht mehr feststellbar. Die Differenz der Mittelwerte zwischen der behandelten Gruppe und der

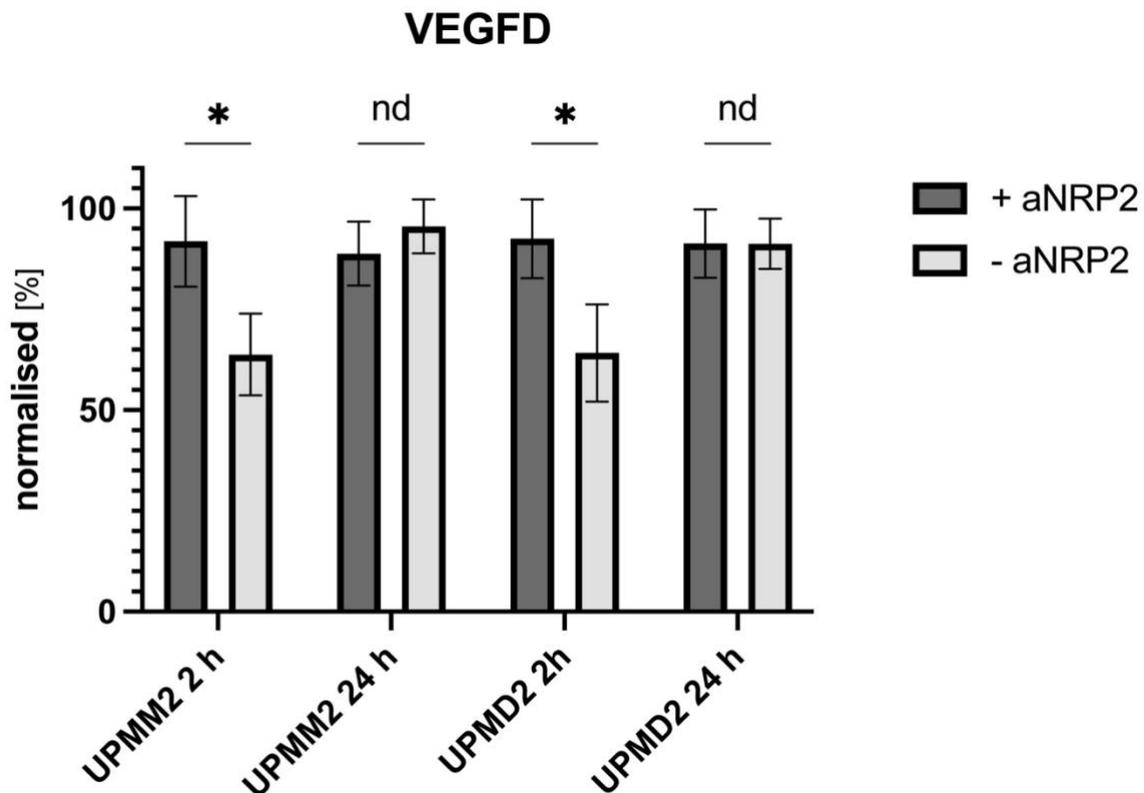
Kontrollgruppe nach einer zweistündigen Behandlung ist für UPMD2 (46,9 %) größer als für UPMM2 (25,2 %). Diese vergleichsweise verstärkte Expression lässt darauf schließen, dass der inhibierende Antikörper eine stärkere Wirkung auf die VEGFC-Expression bei UPMD2 hat.

4.1.2. VEGFD

Tabelle 12: Relativer Anteil an VEGFD in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie

		+ aNRP2 MW (SD) [%]	- aNRP2 MW (SD) [%]	p-Wert
UPMM2	2 h	91,9 (11,2)	63,8 (10,1)	0,0032
	24 h	88,8 (7,9)	95,6 (6,7)	0,1818
UPMD2	2 h	92,5 (9,8)	64,2 (12)	0,0035
	24 h	91,3 (8,5)	91,3 (6,2)	0,9932

Abbildung 2: Relativer Anteil an VEGFD in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie



Die zweistündige Behandlung von UPMM2 und UPMD2 mit dem inhibierenden NRP2-Antikörper führt zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von VEGFD in beiden Zelllinien. Dieser signifikante Unterschied ist in der Gruppe, die 24 Stunden behandelt wurde,

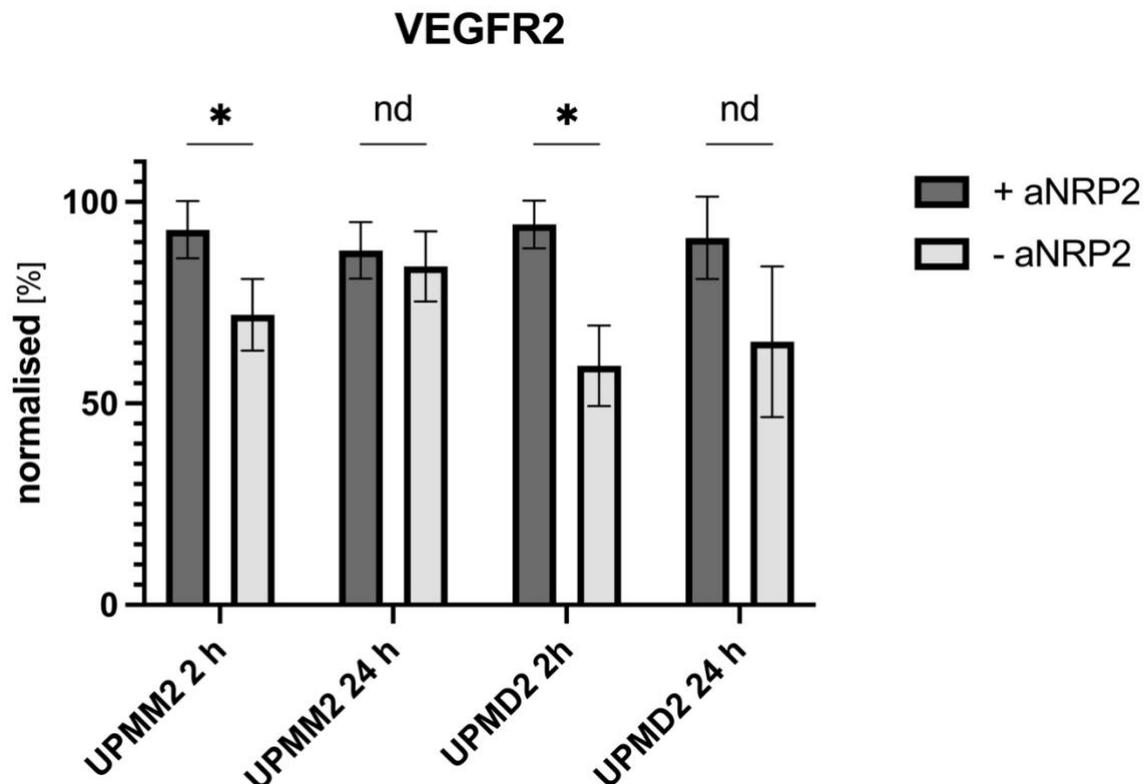
nicht mehr detektierbar. Die Differenz der Mittelwerte zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nach zweistündiger Behandlung unterscheidet sich mit 28,1 % für UPMM2 und 28,3 % für UPMD2 nur marginal.

4.1.3. VEGFR2

Tabelle 13: Relativer Anteil an VEGFR2 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie

		+ aNRP2 MW (SD) [%]	- aNRP2 MW (SD) [%]	p-Wert
UPMM2	2 h	93,1 (7,1)	71,9 (8,9)	0,001
	24 h	88 (7)	84 (8,7)	0,422
UPMD2	2 h	94,4 (6)	59,2 (10)	< 0,0001
	24 h	91,1 (10,2)	65,2 (18,7)	0,0262

Abbildung 3: Relativer Anteil an VEGFR2 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie



Die zweistündige Behandlung von UPMM2 und UPMD2 mit dem inhibierenden NRP2-Antikörper bewirkt eine signifikante Erhöhung der Expression von VEGFR2. Dieser signifikante Unterschied in der Expression von VEGFR2 ist in der Gruppe, die über 24 h beobachtet wurde,

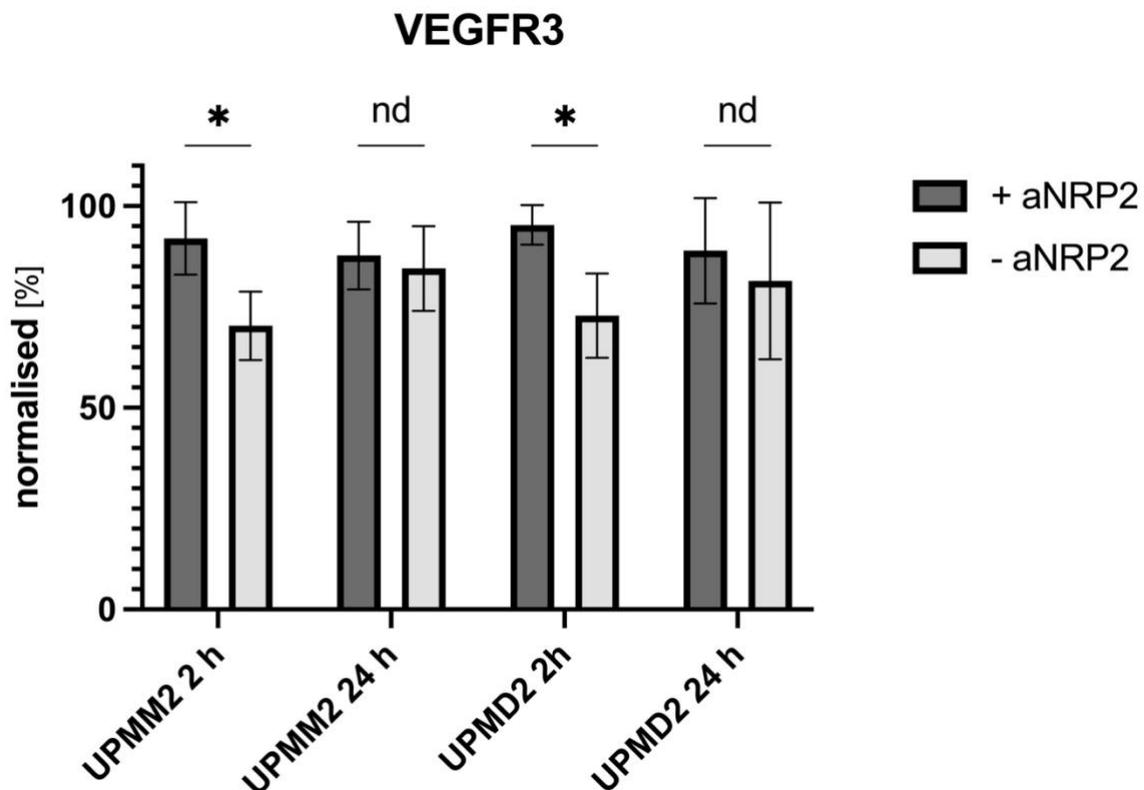
nicht mehr festzustellen. Die Differenz der Mittelwerte der zweistündig behandelten Gruppe im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe beträgt für UPMM2 21,2 % und für UPMD2 35,2 %. Der Unterschied in der jeweiligen Differenz zeigt einen vergleichsweise stärkeren Effekt des inhibierenden Antikörpers auf UPMD2 als auf UPMM2.

4.1.4. VEGFR3

Tabelle 14: Relativer Anteil an VEGFR3 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie

		+ aNRP2 MW (SD) [%]	- aNRP2 MW (SD) [%]	p-Wert
UPMM2	2 h	92 (9)	70,3 (8,5)	0,0016
	24 h	87,7 (8,4)	84,5 (10,5)	0,6078
UPMD2	2 h	95 (4,9)	72,8 (10,5)	0,0024
	24 h	90 (13,1)	81.5 (19,4)	0,4961

Abbildung 4: Relativer Anteil an VEGFR3 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie



Sowohl für UPMM2 als auch für UPMD2 kann eine signifikante Erhöhung der VEGFR3 Expression durch einen inhibierenden NRP2-Rezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe

beobachtet werden. Wie in allen Untersuchungen zuvor, kann auch für VEGFR3 kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe, die 24 Stunden behandelt wurde, und ihrer Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Differenz der Mittelwerte zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nach einer 24-stündigen Behandlung weist mit 21,7 % für UPMM2 und 22,2 % für UPMD2 lediglich eine geringfügige Abweichung auf.

4.2 Semiquantitative Proteinbestimmung

4.2.1. UPMM2

Abbildung 5: Western Blot UPMM2

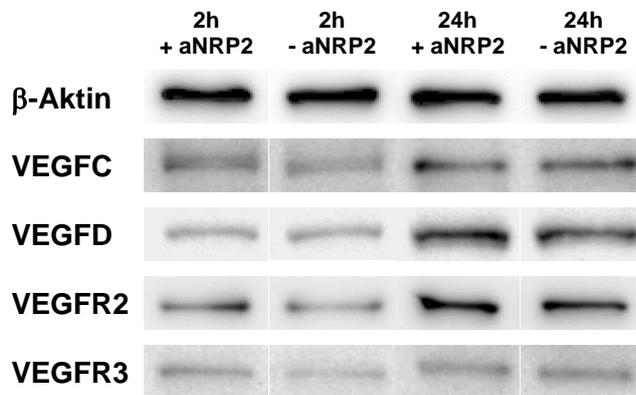
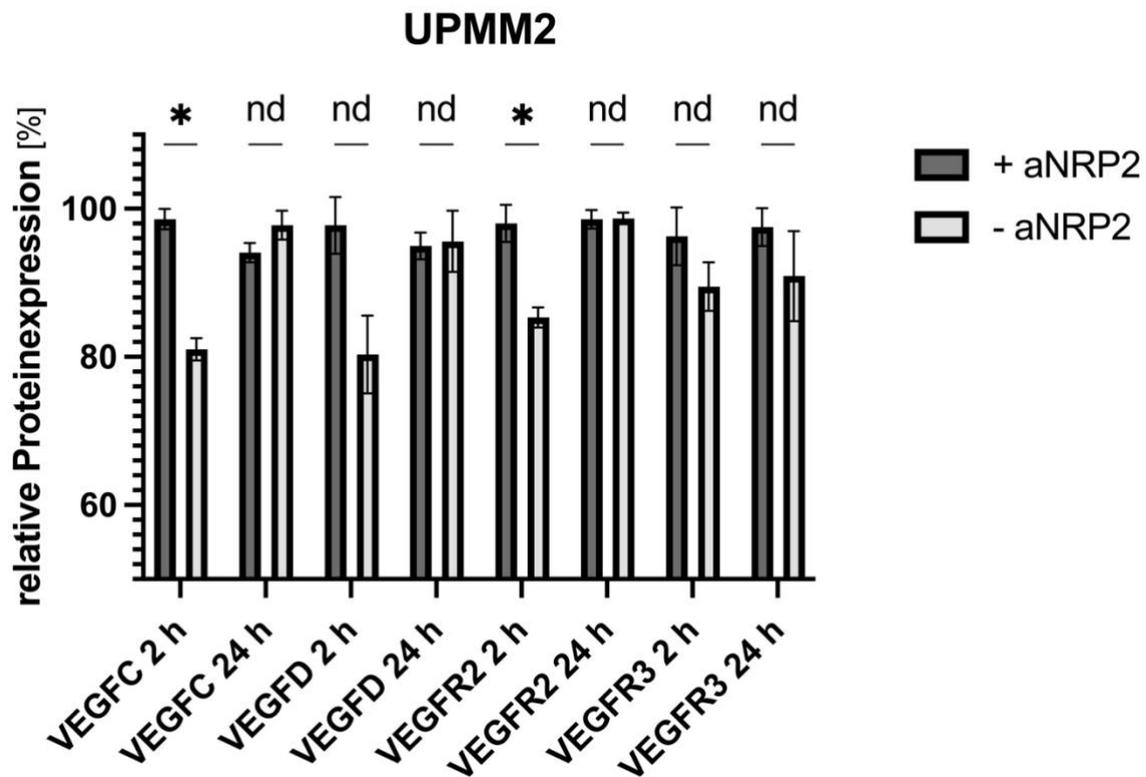


Tabelle 15: Relative Proteinexpression in UPMM2 nach 2 h und 24 h

		+ aNRP2 MW (SD) [%]	- aNRP2 MW (SD) [%]	p-Wert
VEGFC	2 h	98,6 (1,4)	81 (1,5)	0,0001
	24 h	94,1 (1,3)	97,8 (1,9)	0,0507
VEGFD	2 h	97,8 (3,8)	80,3 (5,3)	0,0970
	24 h	95 (1,8)	95,6 (4,1)	0,8225
VEGFR2	2 h	98 (2,5)	85,3 (1,3)	0,0015
	24 h	98,6 (1,2)	98,7 (0,8)	0,8881
VEGFR3	2 h	96,3 (3,9)	89,5 (3,3)	0,0818
	24 h	97,5 (2,6)	90,9 (6,1)	0,1570

Abbildung 6: Relative Proteinexpression in UPMM2 nach 2 h und 24 h



Für UPMM2 kann jeweils für VEGFC nach 2-stündiger Behandlung als auch für VEGFR2 nach 2-stündiger Behandlung ein signifikanter Unterschied in der jeweiligen Expression zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied nach 2-stündiger Behandlung kann weder für VEGFD noch für VEGFR2 beobachtet werden. Es konnte für keines der analysierten Proteine eine signifikante Abweichung nach 24-stündiger Behandlung ermittelt werden.

4.2.2. UPMD2

Abbildung 7: Western Blot UPMD2

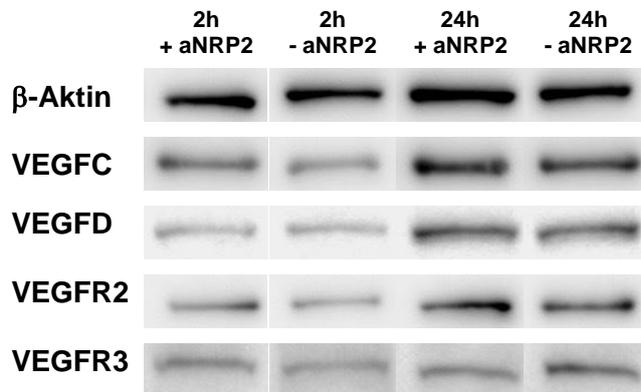
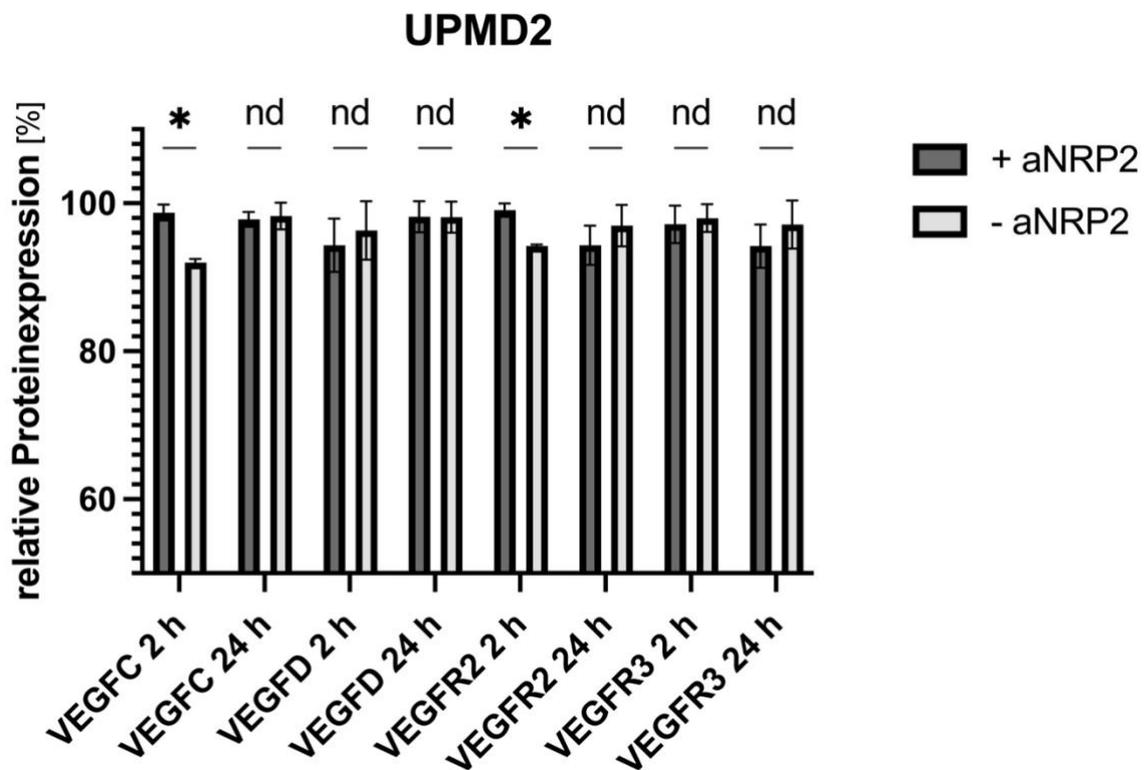


Tabelle 16: Relative Proteinexpression in UPMD2 nach 2 h und 24 h

		+ aNRP2 MW (SD) [%]	- aNRP2 MW (SD) [%]	p-Wert
VEGFC	2 h	98,7 (1,1)	92 (0,5)	0,0006
	24 h	97,8 (1)	98,3 (1,8)	0,7385
VEGFD	2 h	94,3 (3,6)	96,3 (3,9)	0,5514
	24 h	98,2 (2,1)	98,1 (2,1)	0,9730
VEGFR2	2 h	99,1 (0,9)	94,2 (0,2)	0,0008
	24 h	94,3 (2,6)	97 (2,8)	0,3024
VEGFR3	2 h	97,2 (2,5)	98 (1,9)	0,6674
	24 h	94,2 (2,9)	97,1 (3,3)	0,3161

Abbildung 8: Relative Proteinexpression in UPMD2 nach 2 h und 24 h



Wie in der Analyse zuvor zeigt sich sowohl für VEGFC als auch für VEGFR2 ein signifikanter Unterschied in der 2-stündig behandelten Probe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es kann keine weitere signifikante Abweichung ermittelt werden. Insgesamt sind die Differenzen zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe für UPMD2 kleiner als für UPMM2.

5. Diskussion

Aktuell existiert keine wirksame und etablierte Therapie zur Behandlung des metastasierten uvealen Melanoms. Eine frühzeitige Behandlung des Primärtumors stellt deshalb gegenwärtig die einzige Möglichkeit dar, die Überlebenschancen zu verbessern. Insbesondere ist das Vorhandensein einer Monosomie 3, die mit der Inaktivierung von BAP1 verbunden ist, mit einer ungünstigen Überlebensprognose assoziiert. VEGF und dessen Subtypen haben sich als bedeutende therapeutische Ziele für das kutane maligne Melanom etabliert. Allerdings gibt es bisher keinen klaren Nutzen einer anti-VEGF-Therapie beim uvealen Melanom.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Blockade von NRP2 durch einen inhibierenden NRP2-Antikörper die Expression von VEGFC, VEGFD, VEGFR2 und VEGFR3 nach einer zweistündigen Inkubation erhöht. Insbesondere mittels Durchflusszytometrie konnte nach zweistündiger Behandlung mit dem inhibierenden NRP2-Antikörper ein signifikanter Unterschied für alle analysierten Proben festgestellt werden. Die Diskrepanz zwischen der Durchflusszytometrie und der semiquantitativen Proteinbestimmung, bei der weder für VEGFD noch für VEGFR3 in UPMM2 oder UPMD2 ein Unterschied ermittelt werden konnte, könnte sich durch die geringere Sensitivität der semiquantitativen Proteinbestimmung und die geringere Anzahl an Versuchen erklären lassen. In dieser Arbeit lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen UPMM2 und UPMD2 ermitteln.

Der signifikante Unterschied in der Expression der genannten Liganden und Rezeptoren zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nach einer 2-stündigen Inkubation wurde nach einer 24-stündigen Inkubation nicht mehr beobachtet. Der Effekt des inhibierenden Antikörpers scheint also nach 24 Stunden aufgebraucht zu sein. Dies ermöglicht zumindest einen groben Rückschluss auf die Wirkdynamik des Antikörpers.

Inwiefern die gesteigerte Expression einen positiven oder eben auch negativen Effekt auf Metastasen eines uvealen Melanoms oder gar auf die Metastasierungsrate haben könnte, lässt sich aktuell nicht eindeutig bewerten. Zwar ist die Rolle von VEGFC in vielen Tumorentitäten ausführlich erforscht, doch ist die Rolle von VEGFC und insbesondere auch VEGFD für die Angio- und Lymphangiogenese gerade im uvealen Melanom noch nicht ausreichend untersucht. Hinsichtlich der Einflussnahme auf VEGF gibt es teils widersprüchliche Analysen und Erkenntnisse.

In den letzten Jahren wurde postuliert, dass VEGF-Inhibitoren die Tumorigenese und Metastasierung langfristig sogar fördern könnten.^{212,223} In den USA wurde daher beispielsweise der monotherapeutische Einsatz von Bevacizumab, einem etablierten monoklonalen humanisierten VEGF-Antikörper, verboten.²¹⁴ Auch eine Induktion der VEGF-mRNA-Expression in Zellen eines uvealen Melanoms ist beschrieben.²¹⁴ Diese Induktion

erfolgt über den HIF-1 α -Signalweg. VEGF-Inhibitoren scheinen einen ähnlichen Effekt hervorzurufen, wie er zuvor für ischämische Bedingungen beschrieben wurde, welche die VEGF-Expression ebenfalls über den HIF-1 α -Signalweg induzieren. Diese paradox erscheinende Hochregulierung von VEGF nach einer anti-VEGF-Behandlung wird dementsprechend als *Pseudohypoxie* bezeichnet. Diese *Pseudohypoxie* erhöht nachweislich die Tumorigenese bei anderen Arten von Krebszellen, beispielsweise beim Glioblastom oder bei neuroendokrinen Tumoren der Bauchspeicheldrüse, indem die Expression proangiogener Faktoren hochreguliert wird.²²⁴

Als weiterer Faktor dieses paradoxen Phänomens wird die Rekrutierung verschiedener Zellen, wie Monozyten oder reifer Makrophagen, aus dem Knochenmark angesehen.^{225,226} Da uveale Melanome mit schlechter Überlebensrate besonders viele Makrophagen aufweisen, scheint dieser Mechanismus hier besonders relevant zu sein.²²⁷

Darüber hinaus könnte eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber einer antiangiogenen Therapie eine Rolle spielen, indem Mechanismen induziert werden, welche die Abhängigkeit von der Neovaskularisierung verringern. Die *pseudohypoxischen* Bedingungen könnten für eine Selektion bösartigerer Tumorzellen verantwortlich sein, die weniger empfindlich auf eine antiangiogene Therapie reagieren und zusätzliche tumorfördernde Signalwege, wie den MAP-Kinase-Signalweg, aktivieren.²²⁸

Ein weiterer Aspekt, der bei der Analyse und Diskussion der dargelegten Ergebnisse berücksichtigt werden sollte, ist die Möglichkeit, dass der inhibierende NRP2-Antikörper eine Internalisierung von NRP2 auslösen könnte.²¹⁸ Da NRP2 auch ohne Ligandenbindung einen Komplex mit VEGFR2 und VEGFR3 bildet,²⁰⁴ könnte dies zu einer Kointernalisierung von VEGFR3 führen und spezifische VEGF-vermittelte Funktionen beeinträchtigen.

Es ist zudem bekannt, dass die Angiogenese und die VEGF-Expression im uvealen Melanom leicht durch die malignen Zellen selbst moduliert werden können, indem die Tumormikroumgebung angepasst wird.²¹⁴ Eines der beschriebenen Modelle dafür ist das sogenannte *vasculogenic mimicry*, das verschiedene extrazelluläre Gefäßmuster beschreibt, die unabhängig vom lokalen tumoreigenen Gefäßsystem und ohne Endothelauskleidung einen Flüssigkeitsstrom ermöglichen. Daher ist davon auszugehen, dass Zellen eines uvealen Melanoms Mechanismen besitzen, die das Tumorwachstum und die Metastasierung unabhängig von der als klassisch angesehenen (Lymph-)Angiogenese fördern.

Zurzeit lässt sich nicht abschließend beantworten, ob der therapeutische Einsatz eines NRP2-Antikörpers zur Behandlung der Metastasierung uvealer Melanome oder sogar als neoadjuvante Therapie zur Verhinderung einer Metastasierung vorteilhaft ist. Während der Tumorprogression werden verschiedene angiogene Moleküle produziert. Die Blockade eines

einzelnen Moleküls könnte die Fokussierung auf ein anderes Molekül bedeuten. Grundsätzlich sollte daher die Betrachtung einer Multi-Target-Therapie in Erwägung gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Mor JM, Rokohl AC, Dahm S, Kraywinkel K, Heindl LM. Epidemiology of uveal melanomas in Germany. *Acta Ophthalmol* 2021.
2. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, et al. Incidence of uveal melanoma in Europe. *Ophthalmology* 2007; **114**(12): 2309-15.
3. Lipski AC, Lakotka N, Riechartt AI, et al. [Diagnosis of and therapy for choroidal melanoma]. *Klin Monbl Augenheilkd* 2013; **230**(10): 1005-19.
4. Shields CL, Kaliki S, Shah SU, Luo W, Furuta M, Shields JA. Iris melanoma: features and prognosis in 317 children and adults. *J AAPOS* 2012; **16**(1): 10-6.
5. Singh AD, Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003; **110**(5): 956-61.
6. Stang A, Parkin DM, Ferlay J, Jockel KH. International uveal melanoma incidence trends in view of a decreasing proportion of morphological verification. *Int J Cancer* 2005; **114**(1): 114-23.
7. Bergman L, Seregard S, Nilsson B, Ringborg U, Lundell G, Ragnarsson-Olding B. Incidence of uveal melanoma in Sweden from 1960 to 1998. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**(8): 2579-83.
8. Seddon JM, Gragoudas ES, Glynn RJ, Egan KM, Albert DM, Blitzer PH. Host factors, UV radiation, and risk of uveal melanoma. A case-control study. *Arch Ophthalmol* 1990; **108**(9): 1274-80.
9. Hu DN, McCormick SA, Yu GP. Latitude and uveal melanoma. *Ophthalmology* 2008; **115**(4): 757; author reply -9.
10. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011; **118**(9): 1881-5.
11. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, et al. Survival in patients with uveal melanoma in Europe. *Arch Ophthalmol* 2008; **126**(10): 1413-8.
12. Smidt-Nielsen I, Bagger M, Heegaard S, Andersen KK, Kiilgaard JF. Posterior uveal melanoma incidence and survival by AJCC tumour size in a 70-year nationwide cohort. *Acta Ophthalmol* 2021.
13. Weis E, Shah CP, Lajous M, Shields JA, Shields CL. The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. *Arch Ophthalmol* 2006; **124**(1): 54-60.
14. Margo CE. The Collaborative Ocular Melanoma Study: an overview. *Cancer Control* 2004; **11**(5): 304-9.
15. Walpole S, Pritchard AL, Cebulla CM, et al. Comprehensive Study of the Clinical Phenotype of Germline BAP1 Variant-Carrying Families Worldwide. *J Natl Cancer Inst* 2018; **110**(12): 1328-41.
16. van Hees CL, de Boer A, Jager MJ, et al. Are atypical nevi a risk factor for uveal melanoma? A case-control study. *J Invest Dermatol* 1994; **103**(2): 202-5.

17. van Hees CL, Jager MJ, Bleeker JC, Kemme H, Bergman W. Occurrence of cutaneous and uveal melanoma in patients with uveal melanoma and their first degree relatives. *Melanoma Res* 1998; **8**(2): 175-80.
18. Singh AD, Rennie IG, Seregard S, Giblin M, McKenzie J. Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 2004; **49**(4): 419-28.
19. Shah CP, Weis E, Lajous M, Shields JA, Shields CL. Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2005; **112**(9): 1599-607.
20. Sliney DH. How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol* 2002; **21**(6): 501-9.
21. Coupland SE, Lake SL, Zeschnigk M, Damato BE. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)* 2013; **27**(2): 230-42.
22. An J, Wan H, Zhou X, et al. A comparative transcriptomic analysis of uveal melanoma and normal uveal melanocyte. *PLoS One* 2011; **6**(1): e16516.
23. Grisanti S, Ranjbar M, Tura A, Heindl LM, Kakkassery V. [Uveal melanoma : Early detection as the key to successful personalized medicine]. *Ophthalmologe* 2020; **117**(6): 508-20.
24. Field MG, Durante MA, Anbunathan H, et al. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun* 2018; **9**(1): 116.
25. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* 2010; **363**(23): 2191-9.
26. Onken MD, Worley LA, Long MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; **49**(12): 5230-4.
27. Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM, et al. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020; **6**(1): 24.
28. Sisley K, Doherty R, Cross NA. What hope for the future? GNAQ and uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2011; **95**(5): 620-3.
29. Griewank KG, van de Nes J, Schilling B, et al. Genetic and clinico-pathologic analysis of metastatic uveal melanoma. *Mod Pathol* 2014; **27**(2): 175-83.
30. Piperno-Neumann S, Desjardins L. [Advances in uveal melanoma]. *Rev Prat* 2014; **64**(1): 83-4.
31. Landreville S, Agapova OA, Harbour JW. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future Oncol* 2008; **4**(5): 629-36.
32. Brantley MA, Jr., Harbour JW. Deregulation of the Rb and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol* 2000; **157**(6): 1795-801.
33. Brantley MA, Jr., Harbour JW. Inactivation of retinoblastoma protein in uveal melanoma by phosphorylation of sites in the COOH-terminal region. *Cancer Res* 2000; **60**(16): 4320-3.
34. Coupland SE, Anastassiou G, Stang A, et al. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol* 2000; **191**(2): 120-6.

35. Yu FX, Luo J, Mo JS, et al. Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell* 2014; **25**(6): 822-30.
36. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009; **457**(7229): 599-602.
37. Bauer J, Kilic E, Vaarwater J, Bastian BC, Garbe C, de Klein A. Oncogenic GNAQ mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma. *Br J Cancer* 2009; **101**(5): 813-5.
38. Singh AD, Kalyani P, Topham A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology* 2005; **112**(10): 1784-9.
39. Vader MJC, Madigan MC, Versluis M, et al. GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi. *Br J Cancer* 2017; **117**(6): 884-7.
40. Yavuzyigitoglu S, Koopmans AE, Verdijk RM, et al. Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases. *Ophthalmology* 2016; **123**(5): 1118-28.
41. Decatur CL, Ong E, Garg N, et al. Driver Mutations in Uveal Melanoma: Associations With Gene Expression Profile and Patient Outcomes. *JAMA Ophthalmol* 2016; **134**(7): 728-33.
42. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 2010; **330**(6009): 1410-3.
43. Horsman DE, Sroka H, Rootman J, White VA. Monosomy 3 and isochromosome 8q in a uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **45**(2): 249-53.
44. Szalai E, Jiang Y, van Poppelen NM, et al. Association of Uveal Melanoma Metastatic Rate With Stochastic Mutation Rate and Type of Mutation. *JAMA Ophthalmol* 2018; **136**(10): 1115-20.
45. van Essen TH, van Pelt SI, Versluis M, et al. Prognostic parameters in uveal melanoma and their association with BAP1 expression. *Br J Ophthalmol* 2014; **98**(12): 1738-43.
46. Koopmans AE, Verdijk RM, Brouwer RW, et al. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod Pathol* 2014; **27**(10): 1321-30.
47. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004; **64**(20): 7205-9.
48. Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(3): 153-9.
49. Bononi A, Giorgi C, Patergnani S, et al. BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca(2+) flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature* 2017; **546**(7659): 549-53.
50. Alsafadi S, Houy A, Battistella A, et al. Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. *Nat Commun* 2016; **7**: 10615.
51. Furney SJ, Pedersen M, Gentien D, et al. SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov* 2013; **3**(10): 1122-9.

52. Darman RB, Seiler M, Agrawal AA, et al. Cancer-Associated SF3B1 Hotspot Mutations Induce Cryptic 3' Splice Site Selection through Use of a Different Branch Point. *Cell Rep* 2015; **13**(5): 1033-45.
53. Harbour JW, Roberson ED, Anbunathan H, Onken MD, Worley LA, Bowcock AM. Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nat Genet* 2013; **45**(2): 133-5.
54. Weisser M, Voigts-Hoffmann F, Rabl J, Leibundgut M, Ban N. The crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with eIF1 and eIF1A. *Nat Struct Mol Biol* 2013; **20**(8): 1015-7.
55. Ewens KG, Kanetsky PA, Richards-Yutz J, et al. Chromosome 3 status combined with BAP1 and EIF1AX mutation profiles are associated with metastasis in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; **55**(8): 5160-7.
56. Martin M, Masshofer L, Temming P, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet* 2013; **45**(8): 933-6.
57. McNamara M, Felix C, Davison EV, Fenton M, Kennedy SM. Assessment of chromosome 3 copy number in ocular melanoma using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; **98**(1): 4-8.
58. Singh AD, Aronow ME, Sun Y, et al. Chromosome 3 status in uveal melanoma: a comparison of fluorescence in situ hybridization and single-nucleotide polymorphism array. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; **53**(7): 3331-9.
59. Høglund M, Gisselsson D, Hansen GB, et al. Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* 2004; **108**(1): 57-65.
60. Damato B, Dopierala JA, Coupland SE. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res* 2010; **16**(24): 6083-92.
61. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jockel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996; **347**(9010): 1222-5.
62. Prescher G, Bornfeld N, Horsthemke B, Becher R. Chromosomal aberrations defining uveal melanoma of poor prognosis. *Lancet* 1992; **339**(8794): 691-2.
63. Robertson AG, Shih J, Yau C, et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* 2017; **32**(2): 204-20 e15.
64. Sisley K, Rennie IG, Parsons MA, et al. Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **19**(1): 22-8.
65. Kilic E, Naus NC, van Gils W, et al. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**(7): 2253-7.
66. Damato B, Eleuteri A, Taktak AF, Coupland SE. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res* 2011; **30**(5): 285-95.

67. White VA, Chambers JD, Courtright PD, Chang WY, Horsman DE. Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma. *Cancer* 1998; **83**(2): 354-9.
68. Aalto Y, Eriksson L, Seregard S, Larsson O, Knuutila S. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; **42**(2): 313-7.
69. Onken MD, Worley LA, Char DH, et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 2012; **119**(8): 1596-603.
70. Royer-Bertrand B, Torsello M, Rimoldi D, et al. Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing. *Am J Hum Genet* 2016; **99**(5): 1190-8.
71. Jager MJ, Brouwer NJ, Esmaeli B. The Cancer Genome Atlas Project: An Integrated Molecular View of Uveal Melanoma. *Ophthalmology* 2018; **125**(8): 1139-42.
72. Kivela T. Diagnosis of uveal melanoma. *Dev Ophthalmol* 2012; **49**: 1-15.
73. Midena E, Parrozzani R. Biopsies in uveal melanoma. *Dev Ophthalmol* 2012; **49**: 81-95.
74. Collaborative Ocular Melanoma Study G. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. *Arch Ophthalmol* 2006; **124**(12): 1684-93.
75. Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells. *Br J Ophthalmol* 1978; **62**(6): 420-5.
76. Krema H, Heydarian M, Beiki-Ardakani A, et al. A comparison between (1)(2)(5)Iodine brachytherapy and stereotactic radiotherapy in the management of juxtapapillary choroidal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2013; **97**(3): 327-32.
77. Seibel I, Cordini D, Rehak M, et al. Local Recurrence After Primary Proton Beam Therapy in Uveal Melanoma: Risk Factors, Retreatment Approaches, and Outcome. *Am J Ophthalmol* 2015; **160**(4): 628-36.
78. Mor JM, Semrau R, Baus W, et al. [CyberKnife(R): new treatment option for uveal melanoma]. *Ophthalmologie* 2018; **115**(4): 302-8.
79. Groenewald C, Konstantinidis L, Damato B. Effects of radiotherapy on uveal melanomas and adjacent tissues. *Eye (Lond)* 2013; **27**(2): 163-71.
80. Egan KM, Ryan LM, Gragoudas ES. Survival implications of enucleation after definitive radiotherapy for choroidal melanoma: an example of regression on time-dependent covariates. *Arch Ophthalmol* 1998; **116**(3): 366-70.
81. Ophthalmic Oncology Task F. Local Recurrence Significantly Increases the Risk of Metastatic Uveal Melanoma. *Ophthalmology* 2016; **123**(1): 86-91.
82. Eskelin S, Pyrhonen S, Summanen P, Hahka-Kemppinen M, Kivela T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* 2000; **107**(8): 1443-9.

83. Augsburger JJ, Gamel JW, Sardi VF, Greenberg RA, Shields JA, Brady LW. Enucleation vs cobalt plaque radiotherapy for malignant melanomas of the choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1986; **104**(5): 655-61.
84. De Potter P, Shields CL, Shields JA, Cater JR, Tardio DJ. Impact of enucleation versus plaque radiotherapy in the management of juxtapapillary choroidal melanoma on patient survival. *Br J Ophthalmol* 1994; **78**(2): 109-14.
85. Shields CL, Furuta M, Thangappan A, et al. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch Ophthalmol* 2009; **127**(8): 989-98.
86. Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1991; **157**(6): 1279-81.
87. Eskelin S, Pyrhonen S, Hahka-Kemppinen M, Tuomaala S, Kivela T. A prognostic model and staging for metastatic uveal melanoma. *Cancer* 2003; **97**(2): 465-75.
88. Einhorn LH, Burgess MA, Gottlieb JA. Metastatic patterns of choroidal melanoma. *Cancer* 1974; **34**(4): 1001-4.
89. Tojo D, Wenig BL, Resnick KI. Incidence of cervical metastasis from uveal melanoma: implications for treatment. *Head Neck* 1995; **17**(2): 137-9.
90. Dithmar S, Diaz CE, Grossniklaus HE. Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina* 2000; **20**(1): 76-9.
91. Diener-West M, Reynolds SM, Agugliaro DJ, et al. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26. *Arch Ophthalmol* 2005; **123**(12): 1639-43.
92. Bedikian AY, Legha SS, Mavligit G, et al. Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver: a review of the M. D. Anderson Cancer Center experience and prognostic factors. *Cancer* 1995; **76**(9): 1665-70.
93. Kath R, Hayungs J, Bornfeld N, Sauerwein W, Hoffken K, Seeber S. Prognosis and treatment of disseminated uveal melanoma. *Cancer* 1993; **72**(7): 2219-23.
94. Baldo S, Kodjikian L, Belli F, et al. [Liver metastases of choroid melanoma. Retrospective study of 63 cases]. *Tumori* 2003; **89**(4 Suppl): 229-30.
95. Augsburger JJ, Correa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2009; **148**(1): 119-27.
96. Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, Patel A, Abramson DH, Chapman PB. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2005; **23**(31): 8076-80.
97. Kujala E, Tuomaala S, Eskelin S, Kivela T. Mortality after uveal and conjunctival melanoma: which tumour is more deadly? *Acta Ophthalmol* 2009; **87**(2): 149-53.
98. Singh AD, Rennie IG, Kivela T, Seregard S, Grossniklaus H. The Zimmerman-McLean-Foster hypothesis: 25 years later. *Br J Ophthalmol* 2004; **88**(7): 962-7.
99. Shain AH, Bagger MM, Yu R, et al. The genetic evolution of metastatic uveal melanoma. *Nat Genet* 2019; **51**(7): 1123-30.

100. Leyvraz S, Piperno-Neumann S, Suci S, et al. Hepatic intra-arterial versus intravenous fotemustine in patients with liver metastases from uveal melanoma (EORTC 18021): a multicentric randomized trial. *Ann Oncol* 2014; **25**(3): 742-6.
101. Yang J, Manson DK, Marr BP, Carvajal RD. Treatment of uveal melanoma: where are we now? *Ther Adv Med Oncol* 2018; **10**: 1758834018757175.
102. Schuster R, Lindner M, Wacker F, et al. Transarterial chemoembolization of liver metastases from uveal melanoma after failure of systemic therapy: toxicity and outcome. *Melanoma Res* 2010; **20**(3): 191-6.
103. Wolchok JD, Rollin L, Larkin J. Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2017; **377**(25): 2503-4.
104. Zimmer L, Vaubel J, Mohr P, et al. Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naive patients with metastatic uveal melanoma. *PLoS One* 2015; **10**(3): e0118564.
105. Karydis I, Chan PY, Wheeler M, Arriola E, Szlosarek PW, Ottensmeier CH. Clinical activity and safety of Pembrolizumab in Ipilimumab pre-treated patients with uveal melanoma. *Oncoimmunology* 2016; **5**(5): e1143997.
106. Homsy J, Bedikian AY, Papadopoulos NE, et al. Phase 2 open-label study of weekly docosahexaenoic acid-paclitaxel in patients with metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res* 2010; **20**(6): 507-10.
107. Schmittel A, Schmidt-Hieber M, Martus P, et al. A randomized phase II trial of gemcitabine plus treosulfan versus treosulfan alone in patients with metastatic uveal melanoma. *Ann Oncol* 2006; **17**(12): 1826-9.
108. Spagnolo F, Grosso M, Picasso V, Tornari E, Pesce M, Queirolo P. Treatment of metastatic uveal melanoma with intravenous fotemustine. *Melanoma Res* 2013; **23**(3): 196-8.
109. Schuler-Thurner B, Bartz-Schmidt KU, Bornfeld N, et al. [Immunotherapy of uveal melanoma: vaccination against cancer. Multicenter adjuvant phase 3 vaccination study using dendritic cells laden with tumor RNA for large newly diagnosed uveal melanoma]. *Ophthalmologe* 2015; **112**(12): 1017-21.
110. Leyvraz S, Keilholz U. Ocular melanoma: what's new? *Curr Opin Oncol* 2012; **24**(2): 162-9.
111. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; **1**(2): 149-53.
112. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; **347**(20): 1593-603.
113. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**(6): 401-10.
114. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**(8): 573-83.
115. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**(1): 57-70.

116. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 2006; **25**(4): 677-94.
117. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; **29**(6 Suppl 16): 15-8.
118. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; **407**(6801): 249-57.
119. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**(3): 353-64.
120. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**(5): C947-70.
121. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**(6): C1367-74.
122. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; **156**(2): 361-81.
123. McDonald DM, Munn L, Jain RK. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol* 2000; **156**(2): 383-8.
124. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; **6**(4): 389-95.
125. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**(6): 669-76.
126. Djordjevic S, Driscoll PC. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov Today* 2013; **18**(9-10): 447-55.
127. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; **219**(4587): 983-5.
128. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; **266**(18): 11947-54.
129. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; **141**(7): 1117-34.
130. Wang J, Huang Y, Zhang J, et al. Pathway-related molecules of VEGFC/D-VEGFR3/NRP2 axis in tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Clin Chim Acta* 2016; **461**: 165-71.
131. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; **15**(7): 1751.
132. Bui HM, Enis D, Robciuc MR, et al. Proteolytic activation defines distinct lymphangiogenic mechanisms for VEGFC and VEGFD. *J Clin Invest* 2016; **126**(6): 2167-80.

133. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997; **16**(13): 3898-911.
134. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* 2011; **2**(12): 1097-105.
135. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004; **25**(7): 387-95.
136. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004; **5**(1): 74-80.
137. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; **65**(3): 550-63.
138. Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998; **273**(14): 8413-8.
139. Chilov D, Kukk E, Taira S, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 1997; **272**(40): 25176-83.
140. Paavonen K, Mandelin J, Partanen T, et al. Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. *J Rheumatol* 2002; **29**(1): 39-45.
141. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; **61**(5): 1786-90.
142. Ohta Y, Nozawa H, Tanaka Y, Oda M, Watanabe Y. Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-c and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; **119**(4 Pt 1): 804-13.
143. Bunone G, Vigneri P, Mariani L, et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol* 1999; **155**(6): 1967-76.
144. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999; **80**(1-2): 309-13.
145. Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1999; **5**(7): 1823-9.
146. Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000; **83**(7): 887-91.

147. Niki T, Iba S, Tokunou M, Yamada T, Matsuno Y, Hirohashi S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; **6**(6): 2431-9.
148. He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**(11): 819-25.
149. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(21): 11675-80.
150. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 1997; **42**(3): 483-8.
151. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999; **274**(45): 32127-36.
152. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(2): 548-53.
153. Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J. Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **257**(3): 891-4.
154. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2005; **31**(2): 117-21.
155. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, et al. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(17): 9671-6.
156. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(6): 2441-9.
157. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; **7**(2): 186-91.
158. White JD, Hewett PW, Kosuge D, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002; **62**(6): 1669-75.
159. P Oc, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001; **92**(3): 556-68.
160. Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Cancer Lett* 2005; **226**(1): 85-90.
161. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**(20): 9026-30.

162. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991; **6**(9): 1677-83.
163. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett* 1995; **370**(3): 203-8.
164. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001; **2001**(112): re21.
165. Kaipainen A, Korhonen J, Pajusola K, et al. The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J Exp Med* 1993; **178**(6): 2077-88.
166. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997; **89**(6): 981-90.
167. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; **376**(6535): 62-6.
168. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999; **86**(11): 2406-12.
169. Baffert F, Thurston G, Rochon-Duck M, Le T, Brekken R, McDonald DM. Age-related changes in vascular endothelial growth factor dependency and angiopoietin-1-induced plasticity of adult blood vessels. *Circ Res* 2004; **94**(7): 984-92.
170. Hutchings H, Ortega N, Plouet J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J* 2003; **17**(11): 1520-2.
171. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; **98**(2): 147-57.
172. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 1994; **9**(12): 3545-55.
173. Hughes DC. Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J Mol Evol* 2001; **53**(2): 77-9.
174. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(8): 3566-70.
175. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000; **14**(13): 2087-96.
176. Veikkola T, Lohela M, Ikenberg K, et al. Intrinsic versus microenvironmental regulation of lymphatic endothelial cell phenotype and function. *FASEB J* 2003; **17**(14): 2006-13.

177. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; **282**(5390): 946-9.
178. Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am J Hum Genet* 2000; **67**(2): 295-301.
179. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; **7**(2): 192-8.
180. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; **20**(4): 672-82.
181. Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 2007; **67**(2): 593-9.
182. Takagi S, Tsuji T, Amagai T, Takamatsu T, Fujisawa H. Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol* 1987; **122**(1): 90-100.
183. Zachary I. Neuropilins: role in signalling, angiogenesis and disease. *Chem Immunol Allergy* 2014; **99**: 37-70.
184. Sakurai A, Doci CL, Gutkind JS. Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res* 2012; **22**(1): 23-32.
185. Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012; **3**(9): 921-39.
186. Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J* 2008; **411**(2): 211-26.
187. Nakamura F, Goshima Y. Structural and functional relation of neuropilins. *Adv Exp Med Biol* 2002; **515**: 55-69.
188. Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 1997; **19**(3): 547-59.
189. Schellenburg S, Schulz A, Poitz DM, Muders MH. Role of neuropilin-2 in the immune system. *Mol Immunol* 2017; **90**: 239-44.
190. Wang J, Huang Y, Zhang J, et al. NRP-2 in tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Lett* 2018; **418**: 176-84.
191. Xu Y, Yuan L, Mak J, et al. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol* 2010; **188**(1): 115-30.
192. Parker MW, Linkugel AD, Goel HL, Wu T, Mercurio AM, Vander Kooi CW. Structural basis for VEGF-C binding to neuropilin-2 and sequestration by a soluble splice form. *Structure* 2015; **23**(4): 677-87.
193. Migliozi MT, Mucka P, Bielenberg DR. Lymphangiogenesis and metastasis--a closer look at the neuropilin/semaphorin3 axis. *Microvasc Res* 2014; **96**: 68-76.

194. Sawma P, Roth L, Blanchard C, et al. Evidence for new homotypic and heterotypic interactions between transmembrane helices of proteins involved in receptor tyrosine kinase and neuropilin signaling. *J Mol Biol* 2014; **426**(24): 4099-111.
195. Zhang B, Gao Z, Sun M, et al. Prognostic significance of VEGF-C, semaphorin 3F, and neuropilin-2 expression in oral squamous cell carcinomas and their relationship with lymphangiogenesis. *J Surg Oncol* 2015; **111**(4): 382-8.
196. Zhao H, Hou C, Hou A, Zhu D. Concurrent Expression of VEGF-C and Neuropilin-2 Is Correlated with Poor Prognosis in Glioblastoma. *Tohoku J Exp Med* 2016; **238**(2): 85-91.
197. Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, et al. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2002; **95**(10): 2196-201.
198. Nasarre P, Gemmill RM, Potiron VA, et al. Neuropilin-2 Is upregulated in lung cancer cells during TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2013; **73**(23): 7111-21.
199. Staton CA, Koay I, Wu JM, Hoh L, Reed MW, Brown NJ. Neuropilin-1 and neuropilin-2 expression in the adenoma-carcinoma sequence of colorectal cancer. *Histopathology* 2013; **62**(6): 908-15.
200. Ji T, Guo Y, Kim K, et al. Neuropilin-2 expression is inhibited by secreted Wnt antagonists and its down-regulation is associated with reduced tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Mol Cancer* 2015; **14**: 86.
201. Yasuoka H, Kodama R, Tsujimoto M, et al. Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 2009; **9**: 220.
202. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**(8): 457-74.
203. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 2003; **101**(12): 4878-86.
204. Favier B, Alam A, Barron P, et al. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006; **108**(4): 1243-50.
205. Volm M, Koomagi R, Mattern J, Stammers G. Angiogenic growth factors and their receptors in non-small cell lung carcinomas and their relationships to drug response in vitro. *Anticancer Res* 1997; **17**(1A): 99-103.
206. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; **56**(9): 2013-6.
207. Ijland SA, Jager MJ, Heijdra BM, Westphal JR, Peek R. Expression of angiogenic and immunosuppressive factors by uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1999; **9**(5): 445-50.
208. Barak V, Pe'er J, Kalickman I, Frenkel S. VEGF as a biomarker for metastatic uveal melanoma in humans. *Curr Eye Res* 2011; **36**(4): 386-90.

209. Missotten GS, Notting IC, Schlingemann RO, et al. Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2006; **124**(10): 1428-34.
210. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**(1): 60-5.
211. Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(6): 2835-42.
212. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009; **15**(3): 220-31.
213. Ma J, Roelofs KA, Russell L, Weis E, Chen SH. Rapid growth of primary uveal melanoma following intravitreal bevacizumab injection: a case report and review of the literature. *Digit J Ophthalmol* 2021; **26**(3): 27-30.
214. El Filali M, Van der Velden PA, Luyten GPM, Jager MJ. Anti-angiogenic therapy in uveal melanoma. *Dev Ophthalmol* 2012; **49**: 117-36.
215. el Filali M, Ly LV, Luyten GP, et al. Bevacizumab and intraocular tumors: an intriguing paradox. *Mol Vis* 2012; **18**: 2454-67.
216. Lima BR, Schoenfield LR, Singh AD. The impact of intravitreal bevacizumab therapy on choroidal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2011; **151**(2): 323-8 e2.
217. Francis JH, Kim J, Lin A, Folberg R, Iyer S, Abramson DH. Growth of Uveal Melanoma following Intravitreal Bevacizumab. *Ocul Oncol Pathol* 2017; **3**(2): 117-21.
218. Caunt M, Mak J, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008; **13**(4): 331-42.
219. Griewank KG, Yu X, Khalili J, et al. Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012; **25**(2): 182-7.
220. Nareyeck G, Zeschnigk M, Prescher G, Lohmann DR, Anastassiou G. Establishment and characterization of two uveal melanoma cell lines derived from tumors with loss of one chromosome 3. *Exp Eye Res* 2006; **83**(4): 858-64.
221. Nareyeck G, Zeschnigk M, Bornfeld N, Anastassiou G. Novel cell lines derived by long-term culture of primary uveal melanomas. *Ophthalmologica* 2009; **223**(3): 196-201.
222. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680-5.
223. Ebos JM, Lee CR, Bogdanovic E, et al. Vascular endothelial growth factor-mediated decrease in plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 levels as a surrogate biomarker for tumor growth. *Cancer Res* 2008; **68**(2): 521-9.
224. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005; **8**(4): 299-309.

225. Du R, Lu KV, Petritsch C, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008; **13**(3): 206-20.
226. Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA. Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer Res* 2006; **66**(18): 9054-64.
227. Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(2): 643-50.
228. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(14): 6374-8.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Relativer Anteil an VEGFC in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie</i>	39
<i>Abbildung 2: Relativer Anteil an VEGFD in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie</i>	40
<i>Abbildung 3: Relativer Anteil an VEGFR2 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie</i>	41
<i>Abbildung 4: Relativer Anteil an VEGFR3 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie</i>	42
<i>Abbildung 5: Western Blot UPMM2</i>	44
<i>Abbildung 6: Relative Proteinexpression in UPMM2 nach 2 h und 24 h</i>	45
<i>Abbildung 7: Western Blot UPMD2</i>	46
<i>Abbildung 8: Relative Proteinexpression in UPMD2 nach 2 h und 24 h</i>	47

7.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Molekulare Subtypen des uvealen Melanoms</i> ^{3,27,63,70,71}	14
<i>Tabelle 2: Verwendete Zelllinien</i>	26
<i>Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper</i>	26
<i>Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper</i>	27
<i>Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Substanzen</i>	27
<i>Tabelle 6: Verwendete Materialien und Hilfsmittel</i>	28
<i>Tabelle 7: Verwendete Geräte</i>	29
<i>Tabelle 8: Verwendete Software</i>	30
<i>Tabelle 9: Zusammensetzung des Tumor-Mediums</i>	31
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung der Gele der SDS-PAGE</i>	35
<i>Tabelle 11: Relativer Anteil an VEGFC in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie</i>	39

Tabelle 12: Relativer Anteil an VEGFD in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie	40
Tabelle 13: Relativer Anteil an VEGFR2 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie	41
Tabelle 14: Relativer Anteil an VEGFR3 in UPMM2 und UPMD2 mit und ohne aNRP2 nach 2 h und 24 h in der Durchflusszytometrie	42
Tabelle 15: Relative Proteinexpression in UPMM2 nach 2 h und 24 h	44
Tabelle 16: Relative Proteinexpression in UPMD2 nach 2 h und 24 h	46