

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19737> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Maat, Willem

**Title:** Genetic prognostic factors in uveal melanoma

**Date:** 2012-09-04

**Summary and general discussion**

**Nederlandse samenvatting (Summary in Dutch)**

**Nawoord (Acknowledgements)**

**Biography**

**List of publications**





## Introductie

Met behulp van moleculair onderzoek is het mogelijk om met een grote mate van nauwkeurigheid de prognose van patiënten met een oogmelanoom te bepalen. Ondanks deze vooruitgang is het beloop van de ziekte of de duur van de overleving van de patiënt nauwelijks verbeterd, omdat een effectieve therapie tegen uitzaaiingen of de mogelijkheid om uitzaaiingen te voorkomen, ontbreekt. Om dit te kunnen veranderen is kennis vereist over de manier waarop deze tumoren groeien en hoe ze kunnen uitzaaien ofwel metastaseren. Het doel van dit onderzoek was daarom om de mechanismen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van een oogmelanoom beter te begrijpen.

### Moleculaire markers

Monosomie 3, ofwel het verlies van één kopie van chromosoom 3 was de eerste moleculaire voorspeller van metastasering (Sisley et al., 1990; Horsthemke et al., 1992; Prescher et al., 1995; White et al., 1998). De mogelijkheid om patiënten die een hoog risico lopen om uitzaaiingen te ontwikkelen te selecteren voor frequente controle, maakt vroegdetectie van metastasen en eerdere behandeling mogelijk. Voor vroegopsporing is echter wel tumormateriaal nodig voor analyse. Voor patiënten die behandelend worden door middel van verwijdering van de oogbol is dit geen probleem, maar voor de patiënten die behandeld worden met oog-sparende therapie zoals lokale bestraling, is tumormateriaal niet voorhanden. Een alternatieve manier om toch tumorweefsel in handen te krijgen en een uitspraak over risico of prognose te kunnen doen, is door middel van het nemen van een biopt met een dunne naald (FNAB; Fine Needle Aspiration Biopsy).

Deze aanpak berust op de aanname dat oogmelanomen een genetisch homogene eenheid vormen. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben we deze aanname onderzocht en aangetoond dat oogmelanomen ook heterogeen kunnen zijn wat betreft de verdeling van chromosoom 3: In het ene gebied kan een kopie verloren zijn gegaan, terwijl dat in het ander gebied of gedeelte van de tumor niet het geval is. Sinds deze bevinding zijn er meerdere studies geweest die deze heterogeniteit bevestigd hebben en een follow-up studie heeft laten zien dat de aanwezigheid van cellen met maar één kopie van chromosoom 3, hoe beperkt dat aantal ook kan zijn, toch geassocieerd wordt met een slechte prognose (Bronkhorst et al., 2011). Dit betekent dat je deze cellen kunt missen en dat een negatieve testuitslag van een biopt de aanwezigheid van deze cellen in de tumor, niet uitsluit. Voordat deze zogenaamde prognostische biopten in de praktijk kunnen worden aangeboden zullen er eerst goede manieren moeten worden gevonden om fouten te minimaliseren (Kivelä et al., 2009).

### Methylatie onderzoek

De correlatie tussen monosomie 3 en de beperkte overleving door uitzaaiingen, kan betekenen dat er zich op chromosoom 3 een tumor-suppressor gen bevindt (Prescher et al., 1996; Kilic et al., 2005). Twee gebieden werden hiervoor aangewezen, maar er werden geen tumor-suppressor genen geïdentificeerd

(Tschentscher et al., 2001; Parella et al., 2003). Net naast één van deze gebieden werd recent het Bap1 (3p21.1) gen ontdekt (Harbour et al., 2010). In ongeveer dezelfde regio identificeerden wij het *RASSF1* gen (Ras association domain family 1), dat uitgeschakeld wordt door middel van methylatie (Maat et al., 2007). Hypermethylatie van CpG eilanden in de promotorregio van tumor suppressor genen en onderdrukking van expressie heeft zich ontwikkeld tot een belangrijk epigenetisch mechanisme in de ontwikkeling van kanker dat ook in oogmelanomen is beschreven (van der Velden et al., 2001; Jones and Baylin, 2002; van der Velden et al., 2003; van Dinten et al., 2005).

Hypermethylatie van CpG eilanden in de promotor regio van een belangrijk alternatief transcript van dit gen, *RASSF1a*, wordt in verschillende carcinomen gevonden (Spugnardi et al., 2003; Kang et al., 2004; Yeo et al., 2005; Fukasawa et al., 2006). In **hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat een gemethyleerd *RASSF1a* in 50% van de primaire tumoren voorkomt en dat dit correleert met de ontwikkeling van uitzaaiingen. Een deel van de primaire monsters en een uitgezaaide laesie vertonen tumor heterogeniteit en presenteren zowel ongemethyleerd, als gemethyleerd DNA in hetzelfde monster. Er zijn aanwijzingen dat het *RASSF1a* eiwit de celcyclus controleert en dat verlies dientengevolge de celdeling kan bevorderen (Shivakumar et al., 2002; Hamilton et al., 2005; Pfeifer and Dammann, 2005; Choi et al., 2006; Calipel et al., 2011).

### **Epigenetische regulatie van *RASEF***

Een alternatief voor de analyse van somatische veranderingen in tumoren, is de analyse van het erfelijk materiaal in gezinnen die een predispositie voor oogmelanomen hebben. Terwijl in huidmelanomen het familiair voorkomen een bekend fenomeen is, is het familiair voorkomen van oogmelanomen vrij zeldzaam. Er bestaan echter families waar zowel huid- en oogmelanomen voorkomen, die niet in verband staan met het familiair melanoom locus op 9p21. Linkage-analyse in deze oog- en huid-melanoom families wijzen de 9q21 regio aan als een locus voor een mogelijke tumor suppressor gen dat betrokken is bij de ontwikkeling van het erfelijke melanoom. Daarnaast identificeert heterozygotie (LOH) analyse in twee oogmelanomen, de 9q21 regio als mogelijke omgeving voor een tumor suppressor gen (Jönsson et al., 2005).

Deze regio herbergt het *RASEF*-gen, dat mogelijk betrokken is in de *RAS*-pathway, die prominent aanwezig is in de ontwikkeling van melanomen (Padua et al., 1984; Rimoldi et al., 2003). In **hoofdstuk 4** hebben we het *RASEF* gen onderzocht voor mutaties en in overeenstemming met de bevindingen van Jönsson et al., konden wij geen mutaties detecteren in het gen, anders dan een bekend polymorfisme (Jönsson et al., 2005; Sweetser et al., 2005). Epigenetische regulatie was echter aanwezig en cellijnen zonder *RASEF* expressie bleken een gemethyleerd gen te bevatten.

Onze resultaten met tumorweefsel gaven aan dat tumoren vaak heterogeen zijn met betrekking tot methylatie van het *RASEF* gen. Integratie van genetische en epigenetische analyse toonde aan dat de combinatie van een homozygoot genotype en een gemethyleerd *RASEF* gen, geassocieerd

was met overlijden als gevolg van uitzaaingen. Wij hypothetiseren dat in oogmelanomen verlies van een allel, in combinatie met methylering, het mechanisme is dat *RASEF* kan uitschakelen. Allelische imbalance op dit locus ondersteunt een tumor-suppressor rol voor *RASEF*, maar verdere analyse van *RASEF* in zowel proliferatie, overleving en metastasering is nodig om dit te bevestigen.

### Mitogen-activated protein kinase (MAPK) route

Een ander kandidaat melanoom-gen op 9q21 is het *GNAQ* gen, dat in bijna de helft van de oogmelanomen gemuteerd is (Van Raamsdonk et al., 2009). *GNAQ* is onderdeel van een complex eiwit dat mede zorg draagt voor intracellulaire signalering. Recent bleek dat ook de homoloog van *GNAQ*, *GNA11* genaamd, een mutatie bevat in de oogmelanomen die geen *GNAQ* mutatie bezitten (van Raamsdonk et al., 2010). *GNAQ* en *GNA11* signaleren via Protein-kinase C (PKC) en dit zou kunnen resulteren in activatie van de MAPK (mitogen-activated protein kinase) route (Patel et al., 2011). De MAPK route speelt een belangrijke rol in de ontwikkeling van vele vormen van kanker en dit geldt ook voor de tumoren die afstammen van melanocyten (Davies et al., 2002; Cohen et al., 2003).

In melanocyten van de huid vindt activatie van de MAPK route plaats door een verscheidenheid van mechanismen, waaronder stimulatie door groeifactoren en mutatie van de *N-RAS* en *B-RAF* genen. Mutaties in *B-RAF* die kenmerkend zijn voor huidmelanomen worden slechts zelden aangetroffen in oogmelanomen (Calipel et al., 2003; Kiliç et al., 2004; Zuidervaart et al., 2005; Calipel et al., 2006). Een mogelijke verklaring voor het schijnbare gebrek aan *B-RAF* mutaties is dat oogmelanomen genetisch heterogeen zijn en de mutaties waarschijnlijk niet in elke cel aanwezig zijn. Dit is vergelijkbaar met onze bevindingen in eerdere onderzoeken naar de heterogene verdeling van monosomie van chromosoom 3 en methylatie status van het *RASSF1a* gen (hoofdstuk 2 en hoofdstuk 3). Om te onderzoeken of *B-RAF* mutaties, eventueel in een achtergrond van normaal DNA, inderdaad aanwezig zijn in oogmelanomen en om de heterogeniteit van de tumor te onderzoeken, gebruikten we een zeer gevoelige mutatie specifieke PCR (pyrophosphorolysis-geactiveerde polymerisatie; PAP). In **hoofdstuk 5** concluderen we dat *B-RAF* mutaties, frequenter dan aangenomen, voorkomen in oogmelanomen. Hoewel de klinische relevantie van deze *B-RAF* mutaties in een klein percentage van de tumorcellen nog nader moet worden bepaald, lijkt de relatieve schaarste van *B-RAF* mutatie bevattende cellen, een belangrijke rol voor deze mutatie in oogmelanomen uit te sluiten.

### Tyrosine kinase-activiteit

In vergelijking met het huidmelanoom is er vrij weinig bekend over de moleculaire pathogenese van oogmelanomen. Ook met de detectie van *GNAQ* en *GNA11* mutaties, blijft het de vraag hoe deze mutaties de proliferatie precies stimuleren. Activatie van de klassieke MAPK route is te zien in vele soorten van kanker en activatie van deze route is vermoedelijk van essentieel belang bij de stimulatie van de celdeling in het oogmelanoom (Rimoldi et al., 2003; Weber et al., 2003; Zuidervaart et al., 2005). Remming van de MAPK route met farmacologische en genetische middelen resulteerde in een

verminderde proliferatie van oogmelanoom-cellijnen (Levefre et al., 2004; Calipel et al., 2006). Dit geeft aan dat, hoewel mutaties in deze route afwezig zijn, MAPK signalering essentieel is voor groei van het oogmelanoom en suggereert tevens dat een in de route hoger gelegen factor betrokken is bij de proliferatie van deze tumoren.

In **hoofdstuk 6** analyseerden we het mechanisme dat betrokken is bij MAPK-activering in oogmelanoom cellijnen. We vergeleken een oogmelanoom-celijn verkregen uit een primair oogmelanoom met twee cellijnen afkomstig van twee uitzaaiingen van dezelfde patiënt. In vergelijking met de primaire oogmelanoom-celijn, vertoonden de twee gemetastaseerde cellijnen een verminderde MAPK activiteit. We waren in staat om Src te identificeren als een cruciale hoger gelegen tyrosine kinase betrokken bij MAPK activatie in het primaire oogmelanoom. Om de bevindingen te valideren, pasten we genetische remming (siRNA) en farmaceutische remming van Src toe. Een sterke vermindering van MAPK activatie en celgroei werden waargenomen en bevestigden daarmee de rol van Src in oogmelanomen.

Verminderde MAPK activatie in gemetastaseerde cellijnen en in verse levermetastasen duidt op een verlies van MAPK activatie bij de progressie van het oogmelanoom. Dit laatste is onverwacht, omdat MAPK activatie over het algemeen geassocieerd is met het maligne karakter van tumorcellen. Echter, in sommige tumoren zoals endometrium- en borstkanker, wordt MAPK activatie ook in verband gebracht met een goede prognose (Milde-Langosch et al., 2005; Mizumoto et al., 2007). Een mogelijke verklaring wordt geleverd door de observatie dat de MAPK route betrokken is bij oncogen en stress-geïnduceerde cel-inactivatie (senescence) (Serrano et al., 1997; Stott et al., 1998). De gedachte is, dat dit mechanisme een belangrijk verdedigingsmechanisme is voor cellen die risico lopen om te ontaarden, dat omzeild moet worden door de tumorcellen om te kunnen vermenigvuldigen. Verlies van een geactiveerde MAPK route in metastasecellen zoals in dit proefschrift beschreven, kan daardoor ook voordelen voor de tumorcel opleveren en uiteindelijk metastasering bevorderen.

## Toekomst

De identificatie van de moleculaire pathways die betrokken zijn bij de ontwikkeling van het oogmelanoom, kunnen in de toekomst leiden tot effectieve therapieën voor het gemetastaseerde oogmelanoom. De identificatie van mutaties, zoals *GNAQ* en *GNA11*, die invloed hebben op de groei van de tumor en het ontrafelen van de moleculaire basis van het verband tussen het verlies van chromosoom 3 en metastasering, kan helpen bij de zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen. Zoals weergegeven in dit proefschrift, zijn tumoren vaak heterogeen en zullen niet alle cellen van de tumor op dezelfde manier reageren. Zo kunnen cellen in metastasen een subkloon zijn van de primaire tumor en daarom verschillende karakteristieken hebben. Onderzoek met behulp van materiaal van de primaire tumor van patiënt en diens metastasen zal essentieel zijn om nieuwe therapieën te ontwikkelen, hetgeen kan leiden tot individueel gerichte therapie om lange-termijn overleving mogelijk te verbeteren.

## References

- Bronkhorst IH, Maat W, Jordanova ES, Kroes WG, Schalijs-Delfos NE, Luyten GP, Jager MJ. Effect of heterogeneous distribution of monosomy 3 on prognosis in uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2011 Aug;135(8):1042-7.
- Calipel A, Lefevre G, Poupponnot C, Mouriaux F, Eychène A, Mascarelli F. Mutation of B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation through the MEK/ERK pathway. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):42409-18.
- Calipel A, Mouriaux F, Glotin AL, Maleceze F, Faussat AM, Mascarelli F. Extracellular signal-regulated kinase-dependent proliferation is mediated through the protein kinase A/B-Raf pathway in human uveal melanoma cells. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9238-50.
- Calipel A, Abonnet V, Nicole O, Mascarelli F, Coupland SE, Damato B, Mouriaux F. Status of RASSF1A in Uveal Melanocytes and Melanoma Cells. *Mol Cancer Res.* 2011 Sep;9(9):1187-98.
- Choi YL, Kang SY, Shin YK, Choi JS, Kim SH, Lee SJ, Bae DS, Ahn G. Aberrant hypermethylation of RASSF1A promoter in ovarian borderline tumors and carcinomas. *Virchows Arch.* 2006 Mar;448(3):331-6.
- Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, Chowers I, Merbs SL, Pe'er J, Sidransky D. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jul;44(7):2876-8.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
- Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Matsubara K, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Sasaki H, Hatada I. Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *J Hum Genet.* 2006;51(4):368-74.
- Hamilton DW, Lusher ME, Lindsey JC, Ellison DW, Clifford SC. Epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in ependymoma. *Cancer Lett.* 2005 Sep 8;227(1):75-81.
- Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matattal KA, Helms C, Bowcock AM. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010 Dec 3;330(6009):1410-3.
- Horsthemke B, Prescher G, Bornfeld N, Becher R. Loss of chromosome 3 alleles and multiplication of chromosome 8 alleles in uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992 Apr;4(3):217-21.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6):415-28. Review.
- Jönsson G, Bendahl PO, Sandberg T, Kurbasic A, Staaf J, Sunde L, Crüger DG, Ingvar C, Olsson H, Borg A. Mapping of a novel ocular and cutaneous malignant melanoma susceptibility locus to chromosome 9q21.32. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Sep 21;97(18):1377-82.
- Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol.* 2004 Feb;202(2):233-40.
- Kiliç E, Brüggewirth HT, Verbiest MM, Zwarthoff EC, Mooy NM, Luyten GP, de Klein A. The RAS-BRAF kinase pathway is not involved in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2004 Jun;14(3):203-5.
- Kiliç E, Naus NC, van Gils W, Klaver CC, van Til ME, Verbiest MM, Stijnen T, Mooy CM, Paridaens D, Beverloo HB, Luyten GP, de Klein A. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Jul;46(7):2253-7.
- Kivelä T. Hot issues in the current management of eye cancer. *Future Oncol.* 2009 Dec;5(10):1541-4.
- Lefevre G, Glotin AL, Calipel A, Mouriaux F, Tran T, Kherrouche Z, Maurage CA, Auclair C, Mascarelli F. Roles of stem cell factor/c-Kit and effects of Glivec/STI571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2004 Jul 23;279(30):31769-79.
- Maat W, van der Velden PA, Out-Luiting C, Plug M, Dirks-Mulder A, Jager MJ, Gruis NA. Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Feb;48(2):486-90.
- Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Grund D, Hemminger G, Müller V, Löning T. Expression and prognostic relevance of activated extracellular-regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. *Br J Cancer.* 2005 Jun 20;92(12):2206-15.
- Mizumoto Y, Kyo S, Mori N, Sakaguchi J, Ohno S, Maida Y, Hashimoto M, Takakura M, Inoue M. Activation of ERK1/2 occurs independently of KRAS or BRAF status in endometrial cancer and is associated with favorable prognosis. *Cancer Sci.* 2007 May;98(5):652-8.



- Padua RA, Barrass N, Currie GA. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature*. 1984 Oct 18-24;311(5987):671-3.
- Parrella P, Fazio VM, Gallo AP, Sidransky D, Merbs SL. Fine mapping of chromosome 3 in uveal melanoma: identification of a minimal region of deletion on chromosomal arm 3p25.1-p25.2. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8507-10.
- Patel M, Smyth E, Chapman PB, Wolchok JD, Schwartz GK, Abramson DH, Carvajal RD. Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17(8):2087-100.
- Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 May;70(5):576-83. Review.
- Prescher G, Bornfeld N, Friedrichs W, Seeber S, Becher R. Cytogenetics of twelve cases of uveal melanoma and patterns of nonrandom anomalies and isochromosome formation. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995 Mar;80(1):40-6.
- Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jöckel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet*. 1996 May 4;347(9010):1222-5.
- Rimoldi D, Salvi S, Liénard D, Lejeune FJ, Speiser D, Zografos L, Cerottini JC. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5712-5.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):593-602.
- Sisley K, Rennie IG, Cottam DW, Potter AM, Potter CW, Rees RC. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3, 6, and 8. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990 Sep;2(3):205-9.
- Spugnardi M, Tommasi S, Dammann R, Pfeifer GP, Hoon DS. Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1639-43.
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*. 1998 Sep 1;17(17):5001-14.
- Sweetser DA, Peniket AJ, Haaland C, Blomberg AA, Zhang Y, Zaidi ST, Dayyani F, Zhao Z, Heerema NA, Boultonwood J, Dewald GW, Paietta E, Slovak ML, Willman CL, Wainscoat JS, Bernstein ID, Daly SB. Delineation of the minimal commonly deleted segment and identification of candidate tumor-suppressor genes in del(9q) acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 Nov;44(3):279-91.
- Tschentscher F, Prescher G, Horsman DE, White VA, Rieder H, Anastassiou G, Schilling H, Bornfeld N, Bartz-Schmidt KU, Horsthemke B, Lohmann DR, Zeschnick M. Partial deletions of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor suppressor genes in uveal melanoma. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3439-42.
- Van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, Monique H, Hurks H, Frants RR, Gruis NA, Jager MJ. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):5303-6.
- Van der Velden PA, Zuidervaart W, Hurks MH, Pavey S, Ksander BR, Krijgsman E, Frants RR, Tensen CP, Willemze R, Jager MJ, Gruis NA. Expression profiling reveals that methylation of TIMP3 is involved in uveal melanoma development. *Int J Cancer*. 2003 Sep 10;106(4):472-9. Erratum in: *Int J Cancer*. 2004 Oct 10;111(6):982.
- Van Dinten LC, Pul N, van Nieuwpoort AF, Out CJ, Jager MJ, van den Elsen PJ. Uveal and cutaneous melanoma: shared expression characteristics of melanoma-associated antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Jan;46(1):24-30.
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Dec 2;363(23):2191-9.
- Weber A, Hengge UR, Urbanik D, Markwart A, Mirmohammadsaegh A, Reichel MB, Wittekind C, Wiedemann P, Tannapfel A. Absence of mutations of the BRAF gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea. *Lab Invest*. 2003 Dec;83(12):1771-6.
- White VA, McNeil BK, Horsman DE. Acquired homozygosity (isodisomy) of chromosome 3 in uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Apr 1;102(1):40-5.
- Yeo W, Wong WL, Wong N, Law BK, Tse GM, Zhong S. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non-tumorous tissue of breast cancer. *Pathology*. 2005 Apr;37(2):125-30.
- Zuidervaart W, van Nieuwpoort F, Stark M, Dijkman R, Packer L, Borgstein AM, Pavey S, van der Velden P, Out C, Jager MJ, Hayward NK, Gruis NA. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. *Br J Cancer*. 2005 Jun 6;92(11):2032-8.