



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Genetic prognostication in uveal melanoma

Dogruso, M.

Citation

Dogruso, M. (2018, April 17). *Genetic prognostication in uveal melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/61625>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/61625>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/61625> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Doğrusöz, M.

Title: Genetic prognostication in uveal melanoma

Issue Date: 2018-04-17

Appendices

Nederlandse samenvatting

List of publications

Acknowledgements

Curriculum vitae

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het uveamelanoom (UM) is een relatief zeldzame maligniteit die in tot 50% van de patiënten een fatale afloop kent.¹ Ondanks verbeteringen in de behandeling van de primaire tumor in de afgelopen decennia zijn de overlevingskansen van UM patiënten niet gestegen.² Effectieve behandeling van de primaire tumor voorkomt mogelijkweliswaar enkel uitzaaiingen van kleine tumoren, terwijl patiënten met grote tumoren al ten tijde van de diagnose van de primaire tumor micro-uitzaaiingen hebben (**Hoofdstuk 1**). Het feit dat de prognose van UM patiënten niet is verbeterd ondanks goede behandeling van de primaire tumor impliceert dat de overlevingskansen vooral kunnen stijgen door effectieve behandeling van uitzaaiingen. De continue ontrafeling van de biologie van UM, met name door een toegenomen begrip van de genetica en moleculaire mechanismen van UM, heeft bijgedragen aan de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten voor behandeling (“therapeutische targets”) en in de afgelopen jaren zijn verschillende nieuwe klinische studies gestart. Het betrouwbaar kunnen bepalen van de prognose van een patiënt is daarom nog belangrijker geworden, omdat aan de meeste klinische studies enkel hoog-risico patiënten mogen deelnemen. Accurate stratificatie van patiënten op basis van hun risico op metastasen draagt bij aan een betere evaluatie van nieuwe behandelingen.

Betrouwbare prognosticering is, naast het belang ervan voor klinische studies, ook van belang voor het geruuststellen van laag-risico patiënten en het bieden van de mogelijkheid tot levensplanning aan patiënten met een hoog risico op metastasen. Daarnaast maakt prognosticering het voor klinici mogelijk om de ‘follow-up’ en de nazorg aan te passen aan het risico op uitzaaiingen: surveillance om uitzaaiingen vroegtijdig te detecteren kan aangeboden worden aan hoog-risico patiënten, terwijl kostbare en invasieve onderzoeken laag-risico patiënten bespaard kunnen blijven. Verscheidene demografische, anatomische, histologische en genetische parameters hebben bewezen prognostische waarde in UM. Vooral bepaalde karakteristieke afwijkingen aan de chromosomen 1, 3, 6 en 8 zijn waardevolle prognostische markers (**Hoofdstuk 2**). Verlies van chromosoom 1p, monosomie 3 en de aanwezigheid van extra kopieën van chromosoom 8q zijn geassocieerd met een ongunstige prognose, terwijl een extra chromosoom 6p is gecorreleerd aan een gunstige klinische uitkomst.³⁻⁶ Het gelijktijdig voorkomen van monosomie 3 en een extra chromosoom 8q is gerelateerd aan een nog hoger risico op metastasen

dan wanneer deze afwijkingen apart voorkomen.⁷

Het uveamelanoom kan op basis van gen expressie profiling (GEP) ingedeeld worden in twee prognostische klassen: klasse 1 UM met een laag-risico op uitzaaiingen en klasse 2 met een hoog-risico hierop.⁸ GEP klassen corresponderen sterk met de chromosoom 3 status.⁹ De ontdekking van afwijkingen in de *BAP1*, *SF3B1*, en *EIF1AX* genen heeft een nieuwe dimensie toegevoegd aan genetische prognosticering in UM.¹⁰⁻¹² Inactiverende mutaties in het *BAP1* gen, gelokaliseerd op chromosoom 3p, zijn geassocieerd met metastasering en komen zelden voor in een UM dat niet uitzaait.¹⁰ Het combineren van chromosoom aberraties en GEP met genmutaties verfijnt de genetische prognosticering: disomie 3 tumoren met een wild-type *BAP1* gen hebben een 10-voudig lager risico op het ontwikkelen van metastasen in geval van een gemuteerde *EIF1AX* gen, terwijl *SF3B1*-mutante disomie 3 tumoren zijn gerelateerd aan een toegenomen risico op metastasen op de lange termijn.^{12, 13}

Kiembaanmutaties in *BAP1* zijn beschreven in circa 20% van de familiale gevallen van UM en zijn geassocieerd met grote tumoren en tumoren die gelokaliseerd zijn in het corpus ciliaire, welke kenmerken zijn geassocieerd met een slechte prognose.^{14, 15} Bovendien hebben patiënten met een kiembaanmutatie in *BAP1* een hoger risico op andere maligniteiten zoals long adenocarcinoom, niercelcarcinoom, meningeoom en maligne mesothelioom.¹⁶

Hoewel 80% van de patiënten die uiteindelijk metastasen ontwikkelen dat doet binnen 10 jaar na behandeling van de primaire tumor, is er een substantiële groep UM patiënten die vele jaren na behandeling van de primaire tumor alsnog metastasen ontwikkelt.¹ Het moment waarop patiënten gediagnosticeerd worden met klinische metastasen kan beïnvloed worden door de effectiviteit van het immuunsysteem in de controle van tumorgroei en verschillen in de agressiviteit van metastaserende tumorcellen. In **Hoofdstuk 3** bespreken we verschillen in demografische karakteristieken en tumorkenmerken tussen patiënten die vroeg (<drie jaar na enucleatie) overlijden ten gevolge van metastasen en patiënten die in een later stadium (drie tot vijf jaar en meer dan 5 jaar na enucleatie) komen te overlijden door gemetastaseerd UM. Daarnaast hebben we 'competing risk regression' analyses uitgevoerd om te evalueren welke factoren van invloed zijn op het risico op overlijden ten gevolge van UM metastasen in patiënten die meer dan 5 jaar na behandeling van de primaire tumor nog in leven zijn. We bevestigen dat patiënten die in een later stadium na enucleatie komen te overlijden vaker van het vrouwelijk geslacht zijn en jonger ten tijde van de enucleatie dan

patiënten die in het eerste drie jaar overlijden. Daarnaast hebben deze patiënten vaker kleine tumoren, met een AJCC stage I klassificering en een spoelcel morfologie. Monosomie 3 en extra chromosoom 8q werden respectievelijk in 57% en 67% van de patiënten die later dan 5 jaar na behandeling overlijden door UM metastasen gedetecteerd. In patiënten die binnen 3 tot 5 jaar na enucleatie overleden waren deze getallen respectievelijk 68% en 71%, en in patiënten die in de eerste 3 jaar na behandeling overleden respectievelijk 90% en 80%. Vrouwelijk geslacht en extra chromosoom 8q waren de enige factoren die in patiënten die langer dan 5 jaar overleven onafhankelijk waren geassocieerd met dood door gemetastaseerd UM. Dit gegeven is met name relevant voor de counseling van patiënten met indolente UM, zoals de GEP klasse 1 tumoren. Daarnaast is het betrouwbaar identificeren van patiënten die laat overlijden van belang voor het doelgericht aanbieden van adjuvante therapie, omdat vooral patiënten met langzaam groeiende metastasen baat kunnen hebben bij deze therapie, in tegenstelling tot patiënten die vroeg komen te overlijden ten gevolge van agressieve metastasen. Toekomstige studies die de prognostische waarde van de combinatie van chromosoom status of GEP en specifieke mutaties in genen zoals *SF3B1* en *EIF1AX* evalueren, kunnen bijdragen aan een verbeterde identificatie van patiënten die een risico hebben om laat metastasen te ontwikkelen. Zoals hierboven genoemd stratificeren deze mutaties het risico op metastasen in patiënten met indolente UM.

Overlevingskansen worden echter niet alleen beïnvloed door genetische factoren: het combineren van verschillende typen parameters zou prognosticering in UM kunnen verbeteren. Damato en co-auteurs hebben een multifactorieel algoritme ontwikkeld dat gebaseerd op patiëntleeftijd, geslacht, tumorgrootte, histologische kenmerken en chromosoom 3 status de prognose voor iedere patiënt afzonderlijk bepaalt.^{17, 18} Hoewel veel progressie is gemaakt in de genetische typering van UM en vele genetische kenmerken met prognostische waarde zijn geïdentificeerd, moet de waarde van traditionele prognostische parameters zoals tumorgrootte voor prognosticering niet genegeerd worden. Twee recente studies hebben beschreven dat de tumor diameter prognostische informatie biedt die onafhankelijk is van de GEP klassen.^{19, 20} In verschillende artikelen is voorgesteld dat de combinatie van het American Joint Committee on Cancer (AJCC) stageringssysteem, welke gebruik maakt van de Tumor-Node-Metastasis (TNM) klassificering, en genetische kenmerken van UM kan resulteren in een betere risicovoorspelling.^{17, 18, 21} In 2014 hebben Bagger en co-auteurs in een cohort van

153 Deense UM patiënten aangetoond dat AJCC stage III en chromosoom 3 en 8 aberraties onafhankelijke prognostische factoren zijn.²² In **Hoofdstuk 4**, hebben we in een cohort van 522 UM patiënten (275 LUMC patiënten en 247 Deense patiënten) het effect van de combinatie van de AJCC stagering en informatie over de chromosoom 3 en 8q status op prognosticering onderzocht. We laten zien dat de combinatie van deze gegevens een betere risicostratificatie biedt dan wanneer deze gegevens afzonderlijk in beschouwing worden genomen. De prognostische waarde van de AJCC stagering, dat een internationaal erkende en gevalideerde methode voor prognosticering is, neemt toe wanneer informatie over de chromosoom 3 en 8q status wordt toegevoegd aan het stageringssysteem. Omgekeerd stratificeert de AJCC stagering het risico op overlijden in patiënten met monosomie 3 en/of extra chromosoom 8q. Onze bevindingen kunnen gebruikt worden om het AJCC stageringssysteem, dat in de afgelopen jaren steeds verfijnder is geworden maar nog geen genetische informatie in ogenschouw neemt, verder te verbeteren. Daarnaast bevestigt onze studie dat prognosticering gebaseerd op genetica verbeterd kan worden door niet-genetische prognostische markers te includeren, zoals voorgesteld in eerdere studies.¹⁷⁻²² Ook de combinatie van AJCC stagering en GEP zou, zoals Kivelä en Kujala eerder voorstelden, kunnen resulteren in een verfijndere prognosticering.²¹ Hoewel wordt geclaimd dat GEP qua prognostische waarde superieur is aan chromosoomafwijkingen,^{23, 24} corresponderen de GEP klassen sterk met de chromosoom aberraties en is aangetoond het combineren van informatie over meerdere chromosoom alteraties resulteert in een accurate prognosticering.^{5, 7, 9, 25-27} Dit komt deels voort uit de hoge kosten van mRNA expressie analyses; hierom gebruiken veel oculair-oncologische centra chromosoom analyses voor prognosticering in UM.

Aangezien de meeste UM heden ten dage worden bestraald, vroegen wij ons af wat het effect van bestraling (radiotherapie) op chromosoom analyses in UM zou zijn. In **Hoofdstuk 5**, hebben we het effect van eerdere bestraling op de slagingskans van karyotypering en fluorescence in situ hybridization (FISH) geanalyseerd en geëvalueerd of bestraling vooraf aan de enucleatie leidt tot specifieke chromosoomafwijkingen. We laten zien dat karyotypering en FISH vaker mislukken in tumoren die eerder bestraald zijn. Karyotypering kon succesvol uitgevoerd worden in 79% van de niet-bestraalde tumoren (primaire enucleaties) terwijl het slagingspercentage slechts 25% was in eerder bestraalde tumoren (secundaire enucleaties). FISH kon succesvol worden uitgevoerd in 83% van de

primaire enucleaties en 49% van de eerder bestraalde enucleaties. De reden voor secundaire enucleatie na eerdere bestraling leek van invloed te zijn op de slagingskansen van karyotypering en FISH. Beide testen konden vaker succesvol uitgevoerd worden in enucleaties vanwege een tumorrecidief dan in secundaire enucleaties door het uitblijven van een therapeutisch effect van de bestraling of als gevolg van aan de bestraling gerelateerde complicaties. De verschillen waren echter niet significant, hoogstwaarschijnlijk door de te kleine groep patiënten die we in deze specifieke analyse konden evalueren. We veronderstellen dat het hoge slagingspercentage in secundaire enucleaties vanwege een tumorrecidief gerelateerd is aan het feit dat het tumorrecidief niet is aangedaan door de biologische effecten van de bestralingstherapie die kan resulteren in necrose en fibrose.^{28, 29} Onze bevinding dat chromosoomonderzoek moeilijker is bij bestraalde tumoren ondersteunt het beleid om biopsieën voor genetisch onderzoek af te nemen voordat tumoren bestraald worden. In overeenstemming met onze resultaten hebben Horsman en collegae beschreven dat het slagingspercentage van karyotypering slechts 58% was in bestraalde tumoren.³⁰ Zoals aangetoond door verschillende studiegroepen zijn andere genetische testen zoals CGH, MLPA, MSA en GEP wellicht succesvoller dan karyotypering en FISH in bestraalde tumoren.³¹⁻³³ De andere studies zijn echter uitgevoerd in kleine patiëntenpopulaties. Een andere intrigerende bevinding van onze studie was dat in eerder bestraalde enucleaties een hogere frequentie van chromosoomafwijkingen werd gezien en de karyotypes complexer waren. Dit deed ons afvragen of resultaten van genetische testen verkregen na radiotherapie wel representatief zijn voor de genetische status van de tumor vooraf aan de bestraling. Overtuigend bewijs voor de betrouwbaarheid van genetische testen in bestraalde tumoren ontbreekt en overeenkomstig met die constatering wordt het gebruik van de DecisionDx-UM GEP test in bestraalde tumoren afgeraden door de fabrikant van deze veelgebruikte GEP test.³⁴ Toekomstige studies die resultaten van genetische testen voor en na radiotherapie evalueren in grote patiëntenpopulaties met lange follow-up zijn nodig om de effecten van bestraling op de betrouwbaarheid van genetische testen te kunnen bepalen. Hoewel radiotherapie een effectieve oogsparende behandeling voor primair UM is, is het in een deel van de patiënten niet succesvol. Dit kan komen doordat een primair UM niet reageert op radiotherapie of er een tumorrecidief ontstaat na initieel een goede reactie op de bestraling. Hoewel het bewijs niet eenduidig is, is in verschillende studies gerapporteerd over een mogelijke associatie tussen

chromosoom 3 status en GEP klassen en de mate van tumorregressie na radiotherapie.³⁵⁻³⁸ Omdat radiotherapie zijn therapeutische werking heeft door het veroorzaken van DNA schade, waardoor tumorcellen stoppen te delen en in apoptose gaan, veronderstellen wij dat DNA herstelmechanismen van invloed zijn op de gevoeligheid van UM voor radiotherapie. DNA herstel is echter een onderbelicht onderwerp binnen UM onderzoek en de rol van DNA herstelmechanismen in de etiologie en progressie van UM is nog onbekend. Naast een rol in de gevoeligheid van tumoren voor bestralingstherapie, kunnen afwijkingen in DNA herstel eiwitten ook van invloed zijn op de ontwikkeling van tumoren en een mogelijke 'target' voor therapie zijn.^{39, 40} Het gebrek aan kennis en inzicht over de rol van DNA herstelmechanismen in UM hindert de ontwikkeling van dergelijke doelgerichte therapieën. In **Hoofdstuk 6**, beschrijven we de resultaten van onze studie naar de expressie van genen betrokken bij DNA herstel in UM. We veronderstellen dat deze genen significant verschillend tot expressie komen tussen UM met een goede prognose en UM met een ongunstige prognose. Om deze hypothese te testen hebben we op basis van de literatuur 121 genen die betrokken zijn bij DNA herstelmechanismen geïdentificeerd. De expressie van een groep van 44 genen, die in de Illumina gen expressie analyses van 64 UM een acceptabele variatie toonden (standaard deviatie > 0.3), werd vergeleken tussen disomie 3 en monosomie 3 tumoren. Na validatie in 110 tumoren uit Genua en Parijs en in 80 tumoren van het 'The Cancer Genome Atlas' (TCGA) project, identificeerden we 4 genen die herhaaldelijk een significant verschillende expressie toonden tussen UM met een goede en slechte prognose. Een lage expressie van *WDR48*, *XPC* en *BAP1* was geassocieerd met een ongunstige klinische uitkomst, terwijl dit het geval was voor een hoge expressie van *PRKDC*. Aangezien de *WDR48*, *XPC* en *BAP1* genen gelokaliseerd zijn op chromosoom 3p, welke vaak verloren gaat in UM met een slechte prognose, vinden wij het aannemelijk dat ontoereikend DNA herstel een van de gevolgen zou kunnen zijn van het verlies van een kopie van chromosoom 3. Inadequate DNA herstelmechanismen zouden mogelijk kunnen bijdragen aan de opstapeling van genmutaties en chromosoomafwijkingen die tumorgroei en maligne ontaarding stimuleren. Het *PRKDC* gen ligt op chromosoom 8q, wat frequent geamplificeerd is in UM met een ongunstige prognose. Het is intrigerend dat het DNA-PKcs eiwit, waar het *PRKDC* gen voor codeert, de migratie en metastasering van tumorcellen in prostaatkanker lijkt te stimuleren en hoog tot expressie komt in hepatocellulair carcinoom met een slechte prognose.^{41, 42} Kotula en collegae

hebben aangetoond dat DNA-PKcs de invasie en migratie van tumorcellen bevordert.⁴³ In onze studie resulteerde inhibitie van DNA-PKcs in een remming van de groei in UM cellijnen. Daarnaast laten wij zien dat DNA-PKcs inhibitie de expressie van *SNAIL1*, dat betrokken is bij invasie van UM cellen, remt.⁴⁴ Gezien de metastaserings-stimulerende functies van DNA-PKcs en de lokalisering op chromosoom 8q, is het aannemelijk dat dit eiwit een rol speelt in de metastasering van UM en het zou daarom onderzocht moeten worden als een mogelijke target voor therapie.

Epigenetica is een ander vakgebied dat recent uitgebreid onder de aandacht is komen te staan in kankeronderzoek, maar waarover weinig bekend is in UM. Epigenetica is de studie van erfelijke veranderingen die zijn ontstaan zonder wijzigingen aan de nucleotide volgorde.⁴⁵ Epigenetische modificaties, meestal door DNA methylatie en histon modificatie, resulteren in een verandering van de expressie van genen. Er wordt steeds meer bewijs geleverd voor de relevantie van epigenetica in de pathogenese van UM. Verschillende genen, zoals het *RASSF1a* tumorsuppressorgen op chromosoom 3p en het *pINK4a* gen dat een rol speelt in celcyclus regulatie, zijn door promotor DNA methylatie uitgeschakeld in UM.^{46, 47} Recent is hypomethylatie van *PRAME* gerapporteerd.⁴⁸ Het TCGA project heeft aangetoond dat het methylatie patroon in UM is geassocieerd met de chromosoom 3/BAP1 status.⁴⁹ Naast promotor methylatie speelt histon modificatie een rol in UM ontwikkeling en progressie. Het *BAP1* gen, waarvan het verlies in UM is geassocieerd met metastasering, codeert voor een deubiquitinasen dat histonen modificeert.¹⁰ Verlies van BAP1 is gerelateerd aan hyperubiquitinatie van histon 2A.⁵⁰ Aangezien epigenetische regulatoren van belang blijken te zijn voor de ontwikkeling en progressie van UM, vroegen wij ons af welke epigenetische regulatoren een rol spelen in UM. In **Hoofdstuk 7** hebben we de expressie van 59 epigenetische regulatoren vergeleken tussen disomie 3 en monosomie 3 tumoren. We vonden een algehele downregulatie van epigenetische regulatoren in monosomie 3/GEP klasse 2 tumoren. Na analyses in een validatie set vonden we een significant lagere expressie van de epigenetische regulatorgenen *KAT2B*, *HDAC11*, *KMT1C*, *KDM4B*, *KDM6B* en *BMI-1* in monosomie 3/GEP klasse 2 tumoren. In deze studie vonden we een lage expressie van epigenetische regulatoren in UM met een ongunstige prognose en bevestigden we de associatie van epigenetische dysregulatie met UM ontwikkeling en progressie.

CONCLUSIES EN TOEKOMSPERSPECTIEVEN

De afgelopen decennia is veel vooruitgang geboekt in de prognosticering in UM. Dit werd met name aangedreven door de ontdekking van genetische afwijkingen met prognostische waarde. Eerst werden prognostisch relevante chromosoomafwijkingen zoals monosomie 3, extra chromosoom 6p en extra chromosoom 8q geïdentificeerd. Dit werd gevolgd door de bevinding dat UM op basis van het genexpressie profiel verdeeld kan worden in twee prognostische klassen. Recent zijn mutaties in specifieke genen (*BAP1*, *SF3B1*, *EIF1AX*) ontdekt die additionele stratificatie van de overlevingskansen mogelijk maken. Deze ontdekkingen leiden niet alleen tot een betere prognosticering, maar resulteren ook in een toegenomen begrip van de pathogenese van UM en hebben bijgedragen aan de identificatie van nieuwe targets voor doelgerichte therapie. In dit proefschrift hebben we onderzocht hoe we de genetische prognosticering in UM kunnen verbeteren, geëvalueerd wat het effect van voorafgaande radiotherapie is op chromosoom testen en bekeken wat de relatie is van DNA herstelgenen en epigenetische regulatoren en de prognose in UM. We tonen aan dat monosomie 3, extra chromosoom 8q en histologische kenmerken die karakteristiek zijn voor een hoge maligniteitsgraad minder vaak voorkomen in tumoren van patiënten die meer dan 5 jaar na enucleatie overlijden ten gevolge van UM metastasen en wij laten zien dat geslacht en chromosoom 8q status de enige factoren zijn die meer dan 5 jaar na enucleatie onafhankelijk van invloed zijn op de overlevingskansen. Deze bevinding is van belang voor de counseling van patiënten met indolente UM, zoals bijvoorbeeld patiënten met een GEP klasse 1 tumor die vele jaren na de diagnose metastasen ontwikkelen. We bewijzen dat het combineren van de AJCC staging en informatie over de chromosoom 3 en 8q status de prognostische waarde van beide prognostische systemen verhoogt. De recent gepubliceerde 8^{ste} editie van de AJCC staging neemt genetische informatie nog niet in beschouwing en zou, zoals aangetoond door onze studie, verbeterd kunnen worden door in de volgende editie de anatomische staging en genetische informatie te combineren. Verder toont ons onderzoek aan dat, ondanks toegenomen begrip van de genetica van UM, de conventionele manieren van staging additionele stratificatie mogelijk maken en samen met de genetica in ogenschouw genomen moeten worden voor accuratere prognosticering in UM. We leveren bewijs voor het nemen van biopsieën vooraf aan radiotherapie, omdat chromosoom testen mogelijk vaker mislukken in bestraalde tumoren of niet representatief zijn voor de primaire genetische status van de tumor. Studies

die pre- en post-radiotherapie genetische testen evalueren in grote groepen patiënten met lange follow-up zijn nodig om het gebruik van genetische testen in bestraalde tumor samples te valideren.

Onze onderzoeken laten zien dat de expressie van bepaalde DNA herstelgenen en epigenetische regulatoren is geassocieerd met prognose. Nieuwe studies dienen uitgevoerd te worden om de rol van deze DNA herstelgenen en epigenetische regulatoren in de pathogenese van UM te begrijpen en hun rol als mogelijke target voor doelgerichte therapie te evalueren.

REFERENTIES

1. Kujala E, Makitie T, Kivela T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4651-4659.
2. Singh AD, Topham A. Survival rates with uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003;110:962-965.
3. Kilic E, van Gils W, Lodder E, et al. Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3703-3707.
4. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jockel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-1225.
5. 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;19:22-28.
6. Damato B, Dopierala J, Klaasen A, van Dijk M, Sibbring J, Coupland SE. Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma: correlation with metastatic death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3048-3055.
7. Damato B, Duke C, Coupland SE, et al. Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience. *Ophthalmology* 2007;114:1925-1931.
8. 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;64:7205-7209.
9. 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;98:1738-1743.
10. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 2010;330:1410-1413.
11. 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;45:933-936.
12. Yavuzigitoglu S, Koopmans AE, Verdijk RM, et al. Uveal Melanomas with SF3B1 Mutations: A Distinct Subclass Associated with Late-Onset Metastases. *Ophthalmology* 2016;123:1118-1128.
13. 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;55:5160-5167.
14. Rai K, Pilarski R, Boru G, et al. Germline BAP1 alterations in familial uveal melanoma. 2017;56:168-174.
15. Gupta MP, Lane AM, DeAngelis MM, et al. Clinical Characteristics of Uveal Melanoma in Patients With Germline BAP1 Mutations. *JAMA Ophthalmol* 2015;133:881-887.

16. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J Med Genet* 2011;48:856-859.
17. Eleuteri A, Damato B, Coupland SE, Taktak AFG. Enhancing survival prognostication in patients with choroidal melanoma by integrating pathologic, clinical and genetic predictors of metastasis. *International Journal of Biomedical Engineering and Technology* 2012;8:18-35.
18. Damato B, Eleuteri A, Taktak AF, Coupland SE. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:285-295.
19. Correa ZM, Augsburger JJ. Independent Prognostic Significance of Gene Expression Profile Class and Largest Basal Diameter of Posterior Uveal Melanomas. *Am J Ophthalmol* 2016;162:20-27.e21.
20. Walter SD, Chao DL, Feuer W, Schiffman J, Char DH, Harbour JW. Prognostic Implications of Tumor Diameter in Association With Gene Expression Profile for Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol* 2016;134:734-740.
21. Kivela T, Kujala E. Prognostication in eye cancer: the latest tumor, node, metastasis classification and beyond. *Eye (Lond)* 2013;27:243-252.
22. Bagger M, Andersen MT, Andersen KK, Heegaard S, Andersen MK, Kiilgaard JF. The prognostic effect of American Joint Committee on Cancer staging and genetic status in patients with choroidal and ciliary body melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;56:438-444.
23. Worley LA, Onken MD, Person E, et al. Transcriptomic versus chromosomal prognostic markers and clinical outcome in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:1466-1471.
24. 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;119:1596-1603.
25. Trolet J, Hupe P, Huon I, et al. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2572-2580.
26. Damato B, Dopierala JA, Coupland SE. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res* 2010;16:6083-6092.
27. Cassoux N, Rodrigues MJ, Plancher C, et al. Genome-wide profiling is a clinically relevant and affordable prognostic test in posterior uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2014;98:769-774.
28. Saornil MA, Egan KM, Gragoudas ES, Seddon JM, Walsh SM, Albert DM. Histopathology of proton beam-irradiated vs enucleated uveal melanomas. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1112-1118.

29. Saornil MA, Fisher MR, Campbell RJ, et al. Histopathologic study of eyes after iodine I 125 episcleral plaque irradiation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1395-1400.
30. Horsman DE, White VA. Cytogenetic analysis of uveal melanoma. Consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q. *Cancer* 1993;71:811-819.
31. Wackernagel W, Tarmann L, Mayer C, Langmann G, Wedrich A. Genetic analysis of uveal melanoma by array comparative genomic hybridization before and after radiotherapy. *Spektrum der Augenheilkunde* 2013;27:286-291.
32. Coupland SE, Kalirai H, Ho V, Thornton S, Damato BE, Heimann H. Concordant chromosome 3 results in paired choroidal melanoma biopsies and subsequent tumour resection specimens. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1444-1450.
33. Gold AS, Murray TG, Markoe AM, et al. Uveal melanoma gene expression status post radiotherapy. *Optom Vis Sci* 2014;91:e14-17.
34. Plasseraud KM, Cook RW. Clinical Performance and Management Outcomes with the DecisionDx-UM Gene Expression Profile Test in a Prospective Multicenter Study. 2016;2016:5325762.
35. Shields CL, Bianciotto C, Rudich D, Materin MA, Ganguly A, Shields JA. Regression of uveal melanoma after plaque radiotherapy and thermotherapy based on chromosome 3 status. *Retina* 2008;28:1289-1295.
36. Salvi SM, Aziz HA, Dar S, Singh N, Hayden-Loreck B, Singh AD. Uveal Melanoma Regression after Brachytherapy: Relationship with Chromosome 3 Monosomy Status. *Ocul Oncol Pathol* 2017;3:87-94.
37. Naseripour M, Jaber R, Sedaghat A, et al. Ruthenium-106 brachytherapy for thick uveal melanoma: reappraisal of apex and base dose radiation and dose rate. *J Contemp Brachytherapy* 2016;8:66-73.
38. Gupta K, McCannel CA, Kamrava M, Lamb J, Almanzor RD, McCannel TA. Tumor-height regression rate after brachytherapy between choroidal melanoma gene expression profile classes: effect of controlling for tumor height. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016;254:1371-1378.
39. Kelley MR, Fishel ML. DNA repair proteins as molecular targets for cancer therapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8:417-425.
40. Belzile JP, Choudhury SA, Cournoyer D, Chow TY. Targeting DNA repair proteins: a promising avenue for cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2006;6:111-123.
41. Goodwin JF, Kothari V, Drake JM, et al. DNA-PKcs-Mediated Transcriptional Regulation Drives Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Cell* 2015;28:97-113.
42. Evert M, Frau M, Tomasi ML, et al. Deregulation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit contributes to human hepatocarcinogenesis development and has a putative prognostic value. *Br J Cancer* 2013;109:2654-2664.

43. Kotula E, Berthault N, Agrario C, et al. DNA-PKcs plays role in cancer metastasis through regulation of secreted proteins involved in migration and invasion. *Cell Cycle* 2015;14:1961-1972.
44. Asnaghi L, Gezgin G, Tripathy A, et al. EMT-associated factors promote invasive properties of uveal melanoma cells. *Molecular Vision* 2015;21:919-929.
45. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:245-254.
46. Maat W, van der Velden PA, Out-Luiting C, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:486-490.
47. van der Velden PA, Metzelaar-Blok JA, Bergman W, et al. Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res* 2001;61:5303-5306.
48. Field MG, Durante MA, Decatur CL, et al. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas. *Oncotarget* 2016;7:59209-59219.
49. Robertson AG, Shih J, Yau C, et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* 2017;32:204-220.e215.
50. Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Nishikawa H, Ohta T. Functional Link between BRCA1 and BAP1 through Histone H2A, Heterochromatin and DNA Damage Response. *Curr Cancer Drug Targets* 2016;16:101-109.