

**Untersuchung zur Bedeutung des Transkriptionsfaktors pSTAT3 beim
humanen Melanom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von Sarah Gerdsen
aus Aachen

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Tüting
2. Gutachter: Prof. Dr. H. P. Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 22. März 2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. T. Bieber

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnis der Abkürzungen	6
2	Einleitung	8
2.1	Das humane Melanom.....	8
2.2	Signaltransduktion durch den JAK/STAT3-Weg.....	16
2.3	STAT3 im malignen Melanom	21
2.4	Hypothesen und Ziele der Arbeit.....	23
3	Patienten und Methoden	24
3.1	Patienten	24
3.2	Verwendete Substanzen und Materialien	26
3.3	Immunhistochemie	26
3.4	Immunhistochemische Färbung	27
3.5	Färbeprotokoll STAT3.....	28
3.6	H.E.-Färbung	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Untersuchung der STAT3-Aktivität in Melanomzellen	30
4.2	Korrelation der STAT3-Expression mit der vertikalen Tumordicke.....	32
4.3	STAT3-Expression und metastatische Progression	33
4.4	STAT3-Expression und Regression	35
4.5	STAT3-Aktivität im Infiltrat.....	36
5	Diskussion	40
5.1	STAT3 in Melanomzellen und anderen Tumoren.....	40
5.2	STAT3 und Invasivität	42
5.3	STAT3-Aktivität und Metastasierung beim malignen Melanom	43
5.4	STAT3 in primären Melanomen mit und ohne Regressionszeichen	44
5.5	Mögliche Zusammenhänge zwischen STAT3 und Immunsuppression	45
5.6	Ausblick	47
6	Zusammenfassung.....	48
7	Literaturverzeichnis	49

1 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABL	intrazelluläre Tyrosinkinase
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AK	Antikörper
ALM	akrolentiginöses Melanom
C	Celsius
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
HE	Hämatoxylin/ Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
LMM	Lentigo-maligna Melanom
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Min	Minute
MW	Mittelwert
NM	noduläres Melanom
P	phosphoryliert
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIAS	Protein Inhibitors of Activated STAT
pT	Primärtumor
PTP	Protein-Tyrosinphosphatase
S	Sekunde
SH	Src-Homology (Domäne)
SOCS	Suppressors of Cytokine Signalling
Src	intrazelluläre Tyrosinkinase
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle

TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TK	Tyrosinkinase
TGF	Tumor Growth Factor
TNM	T- Primärtumor N- regionale Metastasen der Noduli lymphatici M- Fernmetastasen
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
uM	unklassifizierbares Melanom
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

2 Einleitung

2.1 Das humane Melanom

2.1.1 Epidemiologie und Demographie

Das maligne Melanom („schwarzer Hautkrebs“) ist eine bösartige Tumorerkrankung, die von den pigmentbildenden Melanozyten der Haut ausgeht und sich überwiegend in der Haut, selten aber auch im Auge (Uvea und Retina), den Hirnhäuten und den Schleimhäuten manifestiert. Das Melanom ist meist stark pigmentiert. Es treten aber auch amelanotische Formen auf. Charakteristisch für das maligne Melanom ist seine Fähigkeit zur Metastasierung in unterschiedliche Organe wie Lunge, Leber, Haut und Gehirn, was letztendlich zum Tod führt. Es ist für ca. 90% aller Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich. Das Melanom verursacht in Deutschland 2% aller bösartigen Neubildungen und 1% aller Todesfälle an Krebs.

Die Inzidenz des malignen Melanoms nimmt bei der weißen Bevölkerung weltweit zu, insbesondere bei einer starken Sonnenexposition und einem hellen Hauttyp (Armstrong und Kricger, 1994; Garbe und Blum, 2001). In ethnischen Gruppen mit stärkerer Pigmentierung (Afrikanern, Asiaten) ist das Melanom selten und fast ausschließlich im Bereich der Schleimhäute oder palmoplantar lokalisiert (Garbe, 1997). Bei weißen Menschen hingegen hängt die Inzidenz des Melanoms der Haut von der UV-Belastung der geographischen Region ab. In mittleren Breiten beträgt sie etwa 12 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr. Die höchste Inzidenz findet sich mit mehr als 40 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr in Australien. Der jährliche Zuwachs beträgt unter der weißen Bevölkerung zwischen 4 und 8%, was eine Verdopplung ca. alle 10-15 Jahre bedeutet und zu einer enormen Erhöhung des Lebenszeitrisikos führt (Fritsch, 2004). Dies wird einerseits auf die sich verändernden Lebens- bzw. Freizeitgewohnheiten der Menschen zurückgeführt, wie beispielsweise häufige Urlaube in südlichen Regionen und intensives Sonnenbaden. Andererseits spielen auch Umweltfaktoren eine Rolle (Garbe, 2000), insbesondere der erhöhte UV-Anteil des Sonnenlichts durch Abnahme der stratosphärischen Ozonkonzentration („Ozonloch“).

2.1.2 Ätiologie

Maligne Melanome können sich spontan auf vorher klinisch unauffälliger Haut oder auf dem Boden eines vorbestehenden Nävuszellnävus entwickeln. Als wichtigster auslösender Faktor gilt die UV- Exposition, wobei Stärke und Dauer der Strahlung sowie das Alter des Patienten eine wichtige Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms spielen. Prognostisch besonders relevant sind schwere Sonnenbrände in Kindesalter und Pubertät (Bauer et al., 2003, 2004; Wiecker et al., 2003). Personen mit einem hellen Pigmentierungstyp haben ein erhöhtes Risiko an einem Melanom zu erkranken. Menschen mit hoher Nävuszahl und Träger von Melanomvorläufern (sog. dysplastische Nävi, kongenitale Nävi) sind ebenfalls besonders gefährdet (Garbe et al., 1994; MacKie et al., 1989). Neben den exogenen Faktoren ist die erbliche Prädisposition für das maligne Melanom zu nennen (Czajkowski et al., 2004). Patienten mit einem Melanom in der Familienanamnese oder in der eigenen Vorgeschichte sind stärker gefährdet, ein Melanom zu entwickeln. Familiäre Melanome gehen oft mit dem sogenannten dysplastischen Nävussyndrom einher. Charakteristisch hierfür ist eine Vielzahl von dysplastischen Nävi am gesamten Körper, die ein hohes Potential haben, maligne zu entarten. Eine genetische Prädisposition besteht bei ca. 5-10% der Melanome (Greene et al., 1985).

Beobachtungen von Spontanremissionen und aggressiven Verläufen bei immunsupprimierten Patienten weisen auf die Bedeutung immunologischer Faktoren in der Tumorgenese und Progression dieser Neoplasie hin (Kaufmann et al., 1989; Tilgen und Kaufmann, 1995).

2.1.3 Pathologische Einteilung und Klassifikation

Melanome sind zum Teil sehr unterschiedlich intensiv pigmentiert. In der Regel sind die Tumore tiefbraun bis blauschwarz gefärbt. Durch verschiedene vertikale und horizontale Wachstumsmuster und durch sekundäre Veränderungen wie Ulzerationen, Blutungen, Verkrustungen und in einigen Fällen auch partielle Regression kann es zu einem verschiedenartigen Erscheinungsbild kommen. Die meisten Melanome sind im Bereich des Rückens, der Brust und der Extremitäten lokalisiert. Eine Ausnahme stellt das Lentigo-maligna-Melanom dar, das sich zusätzlich häufig im Hals- und Gesichtsbereich manifestiert. Zur ersten klinischen Beurteilung eines Melanoms ist die ABCD-Regel

hilfreich: **A**symmetrie, unscharfe **B**egrenzung, unregelmäßiges **C**olorit und **D**urchmesser über 6 mm dienen als Kriterien zur Diagnostik der Melanome.

Die histopathologische Diagnose des malignen Melanoms erfolgt anhand des Wachstumsmusters und der Zellmorphologie. Man unterscheidet folgende Melanomtypen, die in Abbildung 1 dargestellt sind:

- Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)

Das SSM ist mit ca. 65% die häufigste Variante des Melanoms. Es zeigt zunächst eine intraepidermale horizontale Ausbreitungsphase und geht dann sekundär in ein vertikales Wachstum über. Es weist ein heterogenes Bild mit unregelmäßiger Pigmentierung von rosa bis schwarzblau, hellen Regressionszonen und teilweise knotigen Anteilen auf.

- Noduläres Melanom (NM)

Etwa 15% aller Melanome in der weißen Bevölkerung sind noduläre Melanome. Die Melanomzellen bilden einen rasch wachsenden dermalen Knoten. Dieser überwiegend schwarz-braune, häufig erosiv-blutende Tumor ist gekennzeichnet durch ein sofortiges vertikales Wachstum ohne eine vorangehende horizontale Wachstumsphase. Daher hat das NM von allen Melanomformen die schlechteste Prognose.

- Lentigo-maligna-Melanom (LMM)

Das LMM macht ca. 5% der Melanome aus. Es entsteht oft erst nach vielen Jahren aus einer Lentigo maligna (Melanom in situ). Diese stellt eine Anhäufung atypischer Melanozyten oberhalb der epidermalen Basalmembran dar, die jahre- bis jahrzentelang in der horizontalen Wachstumsphase bleibt. Die Mehrzahl der Patienten mit einem LMM ist älter als 60 Jahre und meist befindet es sich an sonnenexponierten Stellen wie dem Gesicht, an Unterarmen oder Handrücken.

- Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Zum ALM zählen etwa 5% der Melanome. Der Tumor ist an Handinnenflächen, Fußsohlen und auch an Schleimhäuten oder im Bereich der Übergangsschleimhäute lokalisiert. Die intraepidermale frühe Wachstumsphase ist durch eine unregelmäßige, dunkelbraun bis schwarz gescheckte Pigmentierung gekennzeichnet. Während der späteren invasiven Wachstumsphase weist der Tumor knotige Anteile auf. Durch seine ungünstige

Lage ist das ALM oft schlecht durch die nötige, radikale chirurgische Therapie zu entfernen.



Abb. 1:
Die verschiedenen Melanomtypen: Superfiziell spreitendes Melanom (SSM); Noduläres Melanom (NM); Lentigo-maligna Melanom (LMM); Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Weitere 10% stellen nicht klassifizierbare Melanome, Mischformen oder andere Sonderformen dar. Klinische Sonderformen sind zum Beispiel amelanotische Melanome, Schleimhaut- oder andere extrakutane Melanome.

Für das maligne Melanom wurde vom American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2001 eine neue TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung vorgeschlagen (Balch et al., 2001). Diese Einteilung gilt nun für das primäre Melanom. Sie ist nachfolgend in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tabelle 1: Tumorstadien nach der AJCCKlassifikation, 2001
(American Joint Committee on Cancer)

<i>T(tumor)-Klassifikation des Primärtumors</i>		
T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis		Melanoma in situ, keine Tumordinvasion
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar*
T1	< = 1,0 mm	a: ohne Ulzeration, Level II-III b: mit Ulzeration oder Level IV oder V
T2	1,01-2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01-4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	> 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

* Fehlen einer Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor

<i>N(node)-Klassifikation der regionären Lymphknoten</i>		
N Klassifikation	Zahl metastatisch befallenen Lymphknoten (LK)	Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung
N1	1 LK	a: Mikrometastasierung b: Makrometastasierung
N2	2-3 LK	a: Mikrometastasierung b: Makrometastasierung c: Satelliten oder in-transit Metastasen ohne LK-Met.
N3	> 4 LK, Satelliten oder in-transit Metastasen mit LK-Metastasierung	

<i>M(metastatic)-Klassifikation der Fernmetastasen</i>		
M Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
M1a	Haut, Subkutan oder Lymphknoten	Normal
M1b	Lunge	Normal
M1c	Alle anderen Organmetastasen Jede Art von Fernmetastasierung	Normal Erhöht

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach der AJCC-Klassifikation, 2001

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	In situ Tumoren	Keine	Keine
IA	≤ 1,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IB	≤ 1,0 mm mit Ulzeration oder Clark Level IV oder V	Keine	Keine
	1,01–2,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIA	1,01–2,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	2,01–4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIB	2,01–4,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	> 4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIC	> 4,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikrometastasen	Keine
IIIB	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikrometastasen	Keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Bis zu drei Makrometastasen	Keine
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	Keine aber Satelliten- und/ oder in-transit Metastasen	Keine
IIIC	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Bis zu drei Makrometastasen	Keine
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	Vier oder mehr Makrometastasen oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall oder Satelliten und/oder in-transit Metastasen mit Lymphknotenbefall	Keine
IV			Fernmetastasen

2.1.4 Regressionsphänomene

Die spontane Rückbildung eines Tumors (Regression) wurde schon früh beobachtet und als Immunphänomen gedeutet. Sowohl Regression eines gesamten Tumors, als auch das Vorkommen partieller Regression wurden festgestellt (Everson, 1964, 1967). Beim malignen Melanom wurden Regressionszeichen erstmals von Gromet et al. (1978) beschrieben. Klinisch äussern sich regressive Zonen beim malignen Melanom durch eine verminderte Pigmentierung innerhalb oder am Rand des Tumors. Diese Bereiche können eine weiße, gräuliche oder auch rotbraune Farbe annehmen. Abbildung 2 zeigt einige Beispiele von Regression beim malignen Melanom. Die Frage nach der Bedeutung von Regressionsphänomenen hinsichtlich der Prognose der Patienten wird kontrovers diskutiert. Einige Studien legen dar, dass sich Regression beim primären Melanom als ein ungünstiger prognostischer Faktor auswirkt (Blessing et al., 1992; Clark et al., 1989; Gromet et al., 1978; Paladugu und Yonemoto, 1983; Ronan et al., 1987;

Slingluff et al., 1988;). Andere jedoch konnten keinen Zusammenhang zwischen Regression und der Prognose feststellen (Briggs et al., 1984; Cooper et al., 1985; Kelly et al., 1985; McGovern et al., 1979, 1983; Shaw et al., 1987; Trau et al., 1983). Auch gibt es Hinweise, dass sich Regression in Melanomen günstig auswirkt in Bezug auf die Metastasierung (Liszky et al., 2005).

Regressive Areale in primären Melanomen sind histologisch häufig mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten assoziiert. Meist handelt es sich um zytotoxische T-Zellen. Clemente et al. (1996) befassten sich mit der prognostischen Relevanz von T-Zell-Infiltraten in primären Melanomen und stellten fest, dass die Intensität des Infiltrats mit dem Überleben der Patienten korreliert.

Trotz dieser Immunreaktionen kommt es dennoch in der Regel zu keiner Zerstörung des Melanoms. Der Grund dafür sind verschiedene Escape-Mechanismen, die der Tumor im Laufe seiner Progression entwickelt.



Abb.2: Beispiele von Regression beim primären Melanom

2.1.5 Prognose

Die Prognose einer Erkrankung am malignen Melanom ist abhängig vom Tumorstadium. Ca. 90% aller malignen Melanome werden derzeit als Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung diagnostiziert. Die 10-Jahres-Überlebensrate im Gesamtkollektiv liegt bei ca. 75-80%. Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären malignen Melanom sind (1) die vertikale Tumordicke nach Breslow am histologischen Präparat; (2) das Invasionslevel nach Clark; (3) der klinisch-histologische Typ (ungünstig: primär

noduläre Melanome und akrolentiginöse Melanome); (4) das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration und (5) der Nachweis einer Mikrometastasierung in den regionären Lymphknoten durch eine Sentinellymphknoten-Biopsie (SLNB) (Balch et al., 1992; Barnhill, 1993; Garbe et al., 1995).

Bei histologisch unklaren Tumoren, amelanotischen Tumoren oder bei vermuteter Metastasierung eines Melanoms kann eine immunphänotypische Charakterisierung zum Beispiel durch das S-100- Protein, HMB-45 Antigen oder MIB-1 als Proliferationsmarker hilfreich sein.

Das maligne Melanom kann sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen metastasieren. Etwa 2/3 aller Erstmetastasierungen sind zunächst auf das regionäre Lymphabflussgebiet beschränkt. Beobachtet werden Satelliten-Metastasen (bis 2 cm um den Primärtumor), In-transit-Metastasen (in der Haut bis zur ersten Lymphknotenstation) und regionale Lymphknotenmetastasen. Die 10-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei Patienten mit Satelliten- und In-transit-Metastasen etwa 30-50% und bei Patienten mit klinisch manifesten regionären Lymphknotenmetastasen ca. 20-40%. Bei einer Fernmetastasierung ist die Prognose in der Regel ungünstig, die mittlere Überlebenszeit ohne Behandlung beträgt nur ca. 6-9 Monate, welche jedoch in Abhängigkeit des befallenen Organs stark variieren kann (Garbe, 2003).

2.1.6 Therapie

Das therapeutische Vorgehen beim malignen Melanom umfasst in erster Linie die chirurgische Exzision des betroffenen Hautareals. Eine frühzeitige, vollständige operative Entfernung des Tumors mit einem entsprechenden Sicherheitsabstand stellt die wichtigste Behandlungsmaßnahme dar. Nach den Empfehlungen der Kommission „Malignes Melanom“ der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) sollten dünne Melanome mit einer Tumordicke bis zu 2 mm mit einem Sicherheitsabstand von 1,0 cm exzidiert werden. Bei Melanomen $\geq 2,0$ mm empfiehlt die Kommission, einen Sicherheitsabstand von mindestens 2,0 cm einzuhalten. Besonders bei Melanomen, die noch vor Eintritt in die vertikale Wachstumsphase exzidiert werden, ist eine kurative Therapie möglich. Zusätzlich wird ab einer Tumordicke von 1,0 mm eine Biopsie des Sentinellymphknotens („Wächterlymphknoten“) durchgeführt. Bei Nachweis von

Melanomzellen in dem entnommenen Lymphknoten ist die Entfernung aller Lymphknoten aus dem entsprechenden Gebiet indiziert (radikale Lymphadenektomie). Die weitere Tumornachsorge ist vom Tumorstadium (AJCC-Klassifikation) abhängig. Patienten, die ein erhöhtes Metastasierungsrisiko besitzen (vertikale TD > 1,5 mm, oder lokale Lymphknotenmetastasen), wird eine adjuvante Therapie mit Interferon-alpha empfohlen, um die Prognose zu verbessern. Für den Einsatz von Interferon-alpha wurde in verschiedenen Studien eine Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit bestätigt. Auch die Behandlung mit Interleukin-2 (IL-2) konnte bei metastasierten Melanomen deutliche Remissionsraten erzielen. In den letzten Jahrzehnten wurde außerdem versucht, durch systemische adjuvante Chemotherapie das Gesamtüberleben zu verlängern. Die am häufigsten eingesetzte Substanz ist das Dacarbazin (DTIC). Es handelt sich hierbei um ein Prodrug, dessen wirksame Verbindungen eine Alkylierung der DNA bewirken. Eine Rückbildung der Tumormassen um mehr als 50 % wird in ca. 10-20 % der Patienten nach einer Monotherapie mit DTIC beobachtet. In 5 % werden komplette Remissionen erreicht, die jedoch meist nur von kurzer Dauer (3-6 Monate) sind. Außerdem ist bei aggressiven Chemotherapien die Toxizität stark erhöht und die Lebensqualität eingeschränkt. Eine weitere Behandlungsalternative stellt Temozolomid dar, welches denselben Wirkmechanismus wie DTIC besitzt. Es ist auch oral applizierbar und im Gegensatz zu DTIC liquorgängig.

Die primäre Radiotherapie ist mit Ausnahme der Lentigo maligna nur in Einzelfällen indiziert. Indikationen sind in erster Linie inoperable Primärmelanome und Lymphknoten- oder ausgedehnte Hautmetastasen. Weitere, interessante Ansatzpunkte für die Therapie des malignen Melanoms stellen neue, immunologische Therapieverfahren, sowie die gezielte Blockade molekularer Zielstrukturen, die für Apoptosehemmung oder metastatische Progression verantwortlich sind, dar. Derartige Moleküle könnten zukünftig in Kombination mit chemotherapeutischen Verfahren in der Melanombehandlung Anwendung finden.

2.2 Signaltransduktion durch den JAK/STAT3-Weg

2.2.1 Zelluläre Kommunikation durch Signaltransduktion

Unter Signaltransduktion versteht man die Weiterleitung extrazellulärer Signale in das Zellinnere. Durch Rezeptorbindung empfangen Zellen Signale, die intrazellulär durch

eine kaskadenartige Aktivierung von Mediatoren fortgeleitet werden. Um auf die Transkription Einfluss zu nehmen, muss ein Signal in den Zellkern weitergeleitet werden. Hierzu existieren verschiedene Signalwege, die über unterschiedliche biochemische Mechanismen verfügen und sich gegenseitig beeinflussen können. Der regelrechte Ablauf dieser Signalkaskaden wird unter physiologischen Bedingungen über diverse Kontrollmechanismen streng reguliert. Durch eine fehlerhaft regulierte Aktivität verschiedener signalvermittelnder Proteine können malignitätsfördernde Zelleigenschaften wie Hemmung von Apoptose, unkontrollierte Proliferation, infiltrierendes Wachstum und Metastasierung begünstigt werden.

2.2.2 *Der JAK / STAT3-Weg*

Die signal transducer and activator of transcription (STAT) Proteine sind eine Gruppe von zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren. Sie spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren.

Die Aktivierung des STAT3-Signalweges kann über die extrazelluläre Bindung verschiedener Liganden an ihren spezifischen Rezeptor erfolgen. Durch die Interaktion von bestimmten Zytokinen als auch Wachstumsfaktoren mit ihrem Rezeptor werden intrinsische Rezeptortyrosinkinasen oder auch rezeptorassoziierte Kinasen, sogenannte Januskinasen (JAK) aktiviert. Bis heute sind vier verschiedene Januskinasen (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2) bekannt. Die Januskinasen phosphorylieren sich selbst und mehrere intrazelluläre Domänen des Rezeptors, vor allem an der STAT3-Bindungsstelle (Gadina et al., 2001). Dadurch wird die Bindung von STAT-Molekülen an den Rezeptor ermöglicht (Shuai et al., 1994). Die Januskinasen aktivieren die STAT-Moleküle durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes. Aktivierte STATs dissoziieren vom Rezeptor. Alternativ kann es auch zu einer rezeptorunabhängigen Aktivierung von STAT3 durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen kommen. Zu diesen „Non receptor tyrosine kinases“ zählen die Onkoproteine SRC (Sarcoma tyrosine kinase) und ABL (Abelson leukaemia protein), die ebenfalls STAT-Moleküle phosphorylieren (Bowman et al., 2000, Danial und Rothman, 2000; Yu et al., 1995). In der phosphorylierten, aktivierten Form können die STAT-Proteine über das Phosphotyrosin und die SH2-Domäne Dimere bilden. Als dimerisierte STAT-Moleküle sind sie in der Lage, in den Zellkern zu translozieren, wo sie an spezifische Promotorregion binden und so auf die Transkription bestimmter

Zielgene wirken (Darnell, 1996; Ihle, 2001; Schindler und Darnell, 1995). Verschiedene Zielgene können durch den STAT3-Signalweg aktiviert werden, z.B. MYC, Cyclin D1/D2, Survivin, IL-10, IL-6 und VEGF (Bromberg, 2001). Unter physiologischen Bedingungen wird STAT3 nur kurz aktiviert. Eine Reihe von Proteinen sind für die negative Regulation verantwortlich, unter anderem suppressor of cytokine signalling (SOCS), protein inhibitor of activated STATs (PIAS) und protein tyrosine phosphatases (PTP). Diese wirken über unterschiedliche Mechanismen, wie Blockierung der Phosphorylierung von Zytokinrezeptoren, Inhibition der Januskinasen oder Dephosphorylierung durch Phosphatasen einer übermäßigen STAT3-Aktivierung entgegen (Alexander et al., 1999; Irie-Sasaki et al., 2001; Shuai und Liu, 2005). In Abbildung 3 ist der STAT3-Signalweg schematisch dargestellt.

Error! Objects cannot be created from editing field codes.

Abb.3:

Der STAT3 Signalweg

STAT3 = signal transducer and activator of transcription; JAK = Januskinase;

SOCS = suppressor of cytokine signalling; PIAS = protein inhibitor of activated STATs;

PTPase = protein tyrosine phosphatase; Src = sarcoma tyrosine kinase; Abl = abelson leukaemia protein; P = Phosphorylierung; TK = Tyrosinkinase

2.2.3 Struktur der STAT-Proteine

Heute sind sieben Formen von STAT bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT 6, die jeweils aus 780-800 Aminosäuren bestehen. Die verschiedenen STAT-Proteine unterscheiden sich in der Sequenz ihrer C-terminalen Region, an deren Stelle sich ein Tyrosinrest und eine SH2-Domäne befinden. STAT3 besteht aus 770 Aminosäuren und ist in sieben Domänen unterteilt (siehe Abb. 4). Die Phosphorylierung des Tyrosins 705 ermöglicht die Interaktion mit der SH2-Domäne eines anderen STAT-Moleküls und fördert dadurch die Dimerisierung (Hoey und Schindler, 1998). Die Bindung an den phosphorylierten Zytokinrezeptor erfolgt ebenfalls über die SH2-Domäne (Heim et al., 1995). Über die NH₂-terminale Region kann eine Protein-Protein-Interaktion stattfinden, die dazu dient, dass Dimere untereinander interagieren können, um so auch tetramere Strukturen zu bilden. Durch diese

Tetramerbildung wird eine Stabilisierung der DNA-Bindungsaktivität an schwachen Promotoren erreicht (Vinkemeier et al., 1996; John et al. 1999). Der coiled-coil (CC) Domäne werden wichtige Funktionen unter anderem bei der nukleären Translokation von STAT-3 zugeschrieben (Ma et al., 2003).

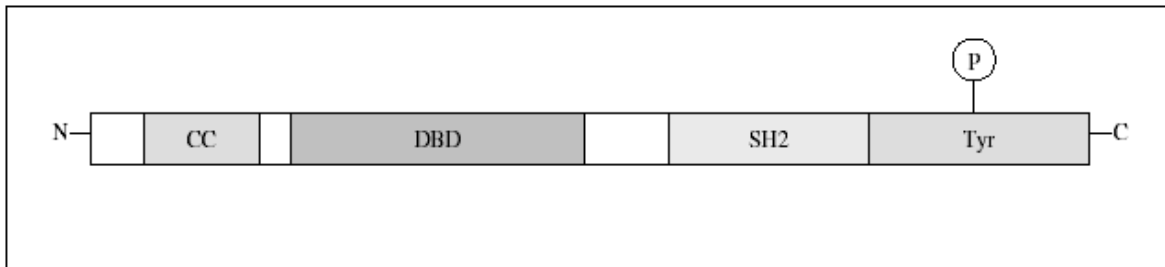


Abb.4:

Struktur der STAT3-Moleküle

CC: Coiled-coil Domäne; DBD: DNA-bindende Domäne; SH2: SRC-homologe Domäne; Tyr: Tyrosin;
P: Phosphorylierung

2.2.4 STAT3-Funktionen

Die STAT-Proteine werden in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Die physiologischen Aufgaben der STAT-Proteine sind sehr vielseitig. Sie haben einen Einfluss auf verschiedene Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Regeneration, Proliferation und Apoptose (Bowman et al., 2000). 1994 wurde STAT3 als wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Induktion der Akuten-Phase-Reaktion in Leberzellen entdeckt (Akira et al., 1994; Zhong et al., 1994). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen menschlichen Tumoren eine konstitutive STAT3-Phosphorylierung und Aktivierung vorhanden ist (Bowman et al., 2000; Buettner et al., 2002; Yu und Jove, 2004). STAT3 spielt außerdem in der frühen Embryonalentwicklung eine fundamentale Rolle (Akira, 1999). Takeda et al. (1997) fanden heraus, dass STAT3-Knockout-Mäuse nicht lebensfähig sind und wenige Tage nach ihrer Zeugung sterben. Anhand von Tumorzelllinien, die eine konstitutive STAT3-Aktivität aufwiesen, konnte hingegen gezeigt werden, dass das Einbringen einer dominant-negativen STAT3-Variante zur Apoptose führt (Bromberg, 2002). STAT3 wird nicht nur mit einer antiapoptotischen Wirkung in Zusammenhang gebracht (Levy und Lee, 2002). In mehreren Studien wurde ebenfalls ein Einfluss von STAT3 auf die Immunantwort festgestellt (Burdelya et al., 2005; Kortylewski et al., 2005; Wang et al., 2004).

Bislang wurden mehr als 40 verschiedene Polypeptide identifiziert, die den STAT-Signalweg aktivieren können (Bromberg und Darnell, Jr. 2000). Dazu gehören beispielsweise Zytokine, wie die Interleukine (IL-2-7, IL-9, IL-11-13, IL-15) und Interferone, sowie verschiedene Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF). Auch Hormone wie zum Beispiel Prolaktin können eine STAT3-Aktivierung bewirken (Calo et al., 2003). Ebenfalls viele onkogen wirkende Tyrosinkinase wie v-Src, v-Fps oder v-Eyk sind in der Lage, STAT-Proteine zu aktivieren und führen dadurch zu einer STAT3-Hyperaktivität, wodurch Tumorentstehung und Tumorprogression induziert werden kann (Garcia et al., 1997; Garcia und Jove, 1998; Bromberg und Darnell, Jr 2000).

Nur in der phosphorylierten Form sind die STAT3-Moleküle in der Lage, aktive Dimere zu bilden. Diese Dimere akkumulieren im Nukleus, binden spezifische DNA-Elemente und aktivieren die Transkription verschiedener Gene. Eine Übersicht der Gene, die durch STAT3 reguliert werden, ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3:

Funktionen von STAT3 (verändert nach Yu et al., 2007)

Funktion	STAT3-Zielgen	Referenz
Proliferation und Überleben	↑ MYC	Bowman et al., 2001; Ning et al., 2001; Odajima et al., 2000
	↑ CyclinD1/D2	Sinibaldi et al., 2000
	↑ BCL-XL	Catlett-Falcone et al., 1999; Karni et al., 1999
	↑ MCL1	Epling-Burnette et al., 2001; Niu et al., 2002
	↑ Survivin	Aoki et al., 2003; Gritsko et al., 2006
	↓ p53	Niu et al., 2005
Angiogenese	↑ VEGF	Niu et al., 2002; Wei et al., 2003
	↑ bFGF	Xie et al., 2006
	↑ HIF1 α	Jung et al., 2005; Xu et al., 2005
	↑ MMP2	Xie et al., 2004
	↑ MMP9	Dechow et al., 2004
Immunsuppression	↑ IL-10	Herbeuval et al., 2004; Kinjyo et al., 2006
	↑ TGF- β	Kasprzycka et al., 2006; Kinjyo et al., 2006
	↓ IFN- γ	Kortylewski et al., 2005
	↓ IL-12	Hoentjen et al., 2005; Wang et al., 2004
	↓ TNF	Sumimoto et al., 2006; Wang et al., 2004

2.3 STAT3 im malignen Melanom

2.3.1 STAT3 in den Tumorzellen

Eine erhöhte STAT3-Aktivität konnte bereits in einer Vielzahl maligner Tumoren nachgewiesen werden. Auch beim Melanom wurde eine konstitutive Aktivität beobachtet (Bowman et al., 2000; Buettner et al., 2002; Niu et al., 2002). Die Feststellung, dass phosphoryliertes STAT3 in verschiedenen menschlichen Tumoren akkumuliert, führte zu der Hypothese, aktiviertes STAT3 fungiere als Onkogen (Bromberg et al., 1999).

Niu et al. (2002) zeigten, dass eine dauerhafte STAT3-Aktivität sowohl in der Mehrheit der getesteten menschlichen Melanomzelllinien als auch in den Zellen der primären Melanome vorzufinden war. Bei der Aktivierung von STAT3 im Melanom spielt mitunter Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle. Man fand heraus, dass im Gegensatz zu Zellen

des multiplen Myeloms und Prostatakarzinomzellen, bei denen die IL-6 vermittelte STAT3-Aktivierung die Malignität fördert, in normalen Melanozyten und bei Melanomzellen im frühen Stadium durch IL-6 die Proliferation in vitro gehemmt werden kann (Catlett-Falcone et al., 1999; Kortylewski et al., 1999; Lu et al., 1992; Swope et al., 1991). Allerdings zeigte sich bei bereits weiter fortgeschrittenen Melanomstadien ein Zusammenhang zwischen IL-6 und einem vermehrten Melanomwachstum in vivo (Lu et al., 1996). Demnach spielt STAT3 sowohl eine Rolle bei der IL-6 induzierten Wachstumshemmung von normalen Melanozyten und Melanomzellen im frühen Stadium der Tumorprogression, als auch bei der Wachstumssteigerung von Melanomen in einem späteren Stadium. Bei Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von STAT3 auf Proliferation und Zellüberleben beim malignen Melanom stellten Niu et al. (2002) fest, dass u.a. die anti-apoptotischen Gene BCL-XL als auch MCL-1 durch STAT3 reguliert werden. Bereits in früheren Studien wurde ein Anstieg von BCL-XL und MCL-1 Proteinen in humanen Melanomen im Vergleich zu gutartigen Naevi festgestellt (Tang et al., 1998; Leiter et al., 2000).

2.3.2 STAT3 und Immunsuppression

Verschiedene Studien befassten sich in letzter Zeit mit der Rolle von STAT3 bei der Immunreaktion und lieferten Hinweise dafür, dass STAT3 an einem immunsuppressiven Netzwerk im Tumor beteiligt ist. Untersuchungen zeigten, dass STAT3 in verschiedenen Immunzellen in der Umgebung des Tumors aktiviert ist. Am Mausmodell wurde beobachtet, dass die STAT3-Aktivität mit Tumorwachstum und einer Verminderung des T-Zellinfiltrats assoziiert ist (Burdelya et al., 2005). Kortylweski et al. (2005) fanden heraus, dass es durch eine STAT3-Aktivierung in den Tumorzellen zu einer vermehrten Produktion immunsuppressiver Faktoren (IL-10, IL-6 und VEGF) kommt. Auch in humanen Melanomzellen wurde dies beobachtet (Sumimoto et al., 2006). Weiterhin konnte im Experiment mit Mäusen gezeigt werden, dass eine konstitutive STAT3-Aktivierung in Tumorzellen die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine hemmt. Eine Blockierung der STAT3-Aktivität in Tumorzellen, u.a. in Maus B16 Melanomen, führte zu einer verstärkten Expression proinflammatorischer Mediatoren, welche eine Aktivierung des Immunsystems und dendritischer Zellen bewirkten (Wang et al., 2004). Die von Tumorzellen produzierten Faktoren (VEGF, IL-10

und TGF- β) sind in der Lage, die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen (DCs) zu hemmen und können zu einer T-Zell-Toleranz führen (Gabrilovich et al., 1996; Yang und Lattirne, 2003).

2.4 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Der JAK / STAT3-Weg wurde bereits von der Plasmamembran bis zum Nukleus ausführlich analysiert und ist daher gut verstanden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass phosphorylierte, aktivierte STAT3-Dimere in den Nukleus translozieren, an die DNA binden und die Transkription verschiedener Zielgene induzieren. Durch die Beobachtung einer erhöhten Aktivität von STAT1, STAT3 und STAT5 in verschiedenen malignen Tumoren wurde die Untersuchung der JAK / STAT-vermittelten Signaltransduktion zum Forschungsschwerpunkt weltweit. STAT3 konnte bisher unter anderem mit einer verstärkten Immunsuppression in Zusammenhang gebracht werden. Weitere Untersuchungen lieferten Hinweise, dass die STAT3-Aktivität mit der Metastasierung korreliert. Im Mausmelanom-Modell konnte durch Einsatz einer dominant-negativen STAT3 Variante eine verminderte Inzidenz an Hirnmetastasen festgestellt werden (Xie et al., 2004, 2006).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu überprüfen, ob die Beobachtungen, dass STAT3 mit einer verringerten Immunantwort und einer gesteigerten metastatischen Progression einhergeht, auch anhand unseres Patientenkollektivs für das humane Melanom nachzuvollziehen sind. Dazu wurden die Gewebeproben von insgesamt 70 Melanompatienten untersucht. Dabei galt es, folgenden Fragen nachzugehen:

- Ist im Gewebe der primären Melanome phosphoryliertes STAT3 vorhanden?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der STAT3-Expression und der Tumordicke als Zeichen der Invasivität?
- Kann die STAT3-Aktivität mit einer vermehrten Metastasierung des humanen Melanoms assoziiert werden?
- Lässt sich ein Zusammenhang zwischen der STAT3-Expression und der Regression erkennen?
- Geht die STAT3-Aktivität mit einer Verminderung des Immunzellinfiltrates im Sinne einer immunsuppressiven Wirkung einher?

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten

In den Jahren 2000 - 2005 stellten sich in der dermatologischen Ambulanz der Uniklinik Bonn insgesamt 878 Patienten mit primärem Melanom vor. Bei 227 Patienten wurde die Primärtherapie an der Uniklinik Bonn durchgeführt. Als Patientenkollektiv dieser Arbeit dienten 70 Patienten mit primärem Melanom, bei denen sowohl eine chirurgische Entfernung des Melanoms, als auch eine Exzision des Sentinellymphknotens in unserer Klinik erfolgten. Diese Gruppe unterteilte sich in 28 weibliche und 42 männliche Patienten. Das Alter der weiblichen Patienten variierte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 20 und 76 Jahren (MW 55,3 Jahre). Das Manifestationsalter bei den männlichen Patienten lag zwischen dem 27. und 71. Lebensjahr (MW 58,5 Jahre). Die Tumordicke der primären Melanome wies eine Bandbreite zwischen 0,7 und 9,0 mm auf. Anhand der vertikalen Tumordicke (Breslow-Index) ließen sich die Melanome dieser 70 Patienten und Patientinnen folgenden Risikogruppen zuteilen: Den Stadien T1 und T2 ($\leq 2,0$ mm) entsprachen 46 (66 %) der Tumore, 16 (23 %) befanden sich im Stadium T3 (2,01- 4,0 mm) und 8 (11 %) der Melanome im Stadium T4 ($\geq 4,0$ mm). Es handelte sich insgesamt um 32 superfiziell spreitende Melanome (SSM), 19 noduläre Melanome (NMM), 1 Lentigo-maligna Melanom, 5 akrolentiginöse Melanome (ALM) und 13 unklassifizierbare Melanome (uM). Bei 43 der 70 Melanome konnten Zeichen von Regression festgestellt werden, wovon sich 25 in der Gruppe der männlichen Patienten und 18 in der weiblichen Patientengruppe befanden. Unter den 43 regressiven Melanomen fanden sich 25 superfiziell spreitende, 8 noduläre, 3 akrolentiginöse und 7 unklassifizierbare Melanome. Bei 14 (20 %) der insgesamt 70 Patienten stellte sich bei der Analyse des Sentinellymphknotens ein positiver Befund heraus. Dabei handelte es sich um 10 männliche und 4 weibliche Probanden. Das mittlere Alter innerhalb dieser Untergruppe betrug 58,2 Jahre und die Tumordicke lag im Durchschnitt bei 3,5 mm. Eine Übersicht des Patientenkollektivs ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Übersicht des Patientenkollektivs

Primäres Melanom Typ	Anzahl	Mittelwert (Jahre)	Geschlecht		Tumorstadium (Breslow-Index)			Regression		SLND- Biopsie	
			m	w	T1+T2	T3	T4	ja	nein	pos	neg
SSM	32 (46%)	58,8	20 (48%)	12 (43%)	27 (59%)	4 (25%)	1 (12%)	25 (58%)	7 (26%)	4 (29%)	28 (50%)
NMM	19 (27%)	57,9	12 (28%)	7 (25%)	6 (13%)	10 (63%)	3 (38%)	8 (19%)	11 (41%)	5 (36%)	14 (25%)
LMM	1 (1%)	(55,0)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	1 (7%)	0 (0%)
ALM	5 (7%)	65,8	2 (5%)	3 (11%)	2 (4%)	1 (6%)	2 (25%)	3 (7%)	2 (7%)	3 (21%)	2 (4%)
uM	13 (19%)	49,0	7 (17%)	6 (21%)	10 (22%)	1 (6%)	2 (25%)	7 (16%)	6 (22%)	1 (7%)	12 (21%)
Gesamt	70	57,2	42	28	46	16	8	43	27	14	56

3.2 Verwendete Substanzen und Materialien

Herstellernachweis

AEC-Reagenz (3- Amino-9-ethylcarbazol)	Dako, USA
ChemMate Antibody Diluent	Dako, Dänemark
Citratpuffer (pH 6)	Dako, USA
EnVision Detection Kit	Dako, Dänemark
Essigsäure 1%	Merck, Deutschland
Ethanol 100%, 96%, 70%	Merck, Deutschland
Formalin zur Fixierung, 4 - 10 %	Merck, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) 10 % in PBS	Sigma, Deutschland
H ₂ O ₂ 3%	Merck, Deutschland
KOH 0,5%	Sigma, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma, Deutschland
Phosphotyrosin-705-STAT3- Antikörper	Cell Signaling, USA
TRIS Buffered Saline	Dako, USA
Tween 20	Dako, USA
Xylol	Merck, Deutschland
beschichtete Objektträger	Marienfeld, Deutschland
Eindeckgläschen	Engelbrecht, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine, Eindeckmedium	Merck, Deutschland
Kamera	JVC, Japan
Küvetten, Kochtopf	
Lichtmikroskop	Leica, Deutschland

3.3 Immunhistochemie

Die entnommenen Gewebeproben wurden über Nacht in Formalin fixiert und im Automaten mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Am nächsten Tag erfolgte die Orientierung des Gewebes in Paraffin. Es wurden 4 µm dicke Schnitte aus den Gewebelöcken angefertigt und diese auf beschichtete Objektträger transferiert. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C. Vor der Färbung

wurden die Gewebeschnitte zur Entparaffinisierung zunächst in Xylol inkubiert und nachfolgend in einer Ethanolreihe abnehmender Konzentration rehydriert und in H₂O überführt.

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen :

2 x 2 min Xylol

2 x 45 s 100% Alkohol

30 s 96% Alkohol

30 s 70% Alkohol

30 s Aqua dest.

3.4 Immunhistochemische Färbung

Die Methode der immunhistochemischen Färbeverfahren beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem jeweiligen Antigen und dem daran spezifisch bindenden Antikörper. Durch verschiedene Markersysteme erfolgt eine Kopplung der Antikörper, so dass die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht werden können. Man unterscheidet direkte und indirekte Nachweisverfahren. Bei der „direkten Methode“ findet eine Reaktion zwischen dem enzymmarkierten Primärantikörper mit dem Antigen statt. Bei der „indirekten Methode“ wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt, der gegen einen unkonjugierten Primärantikörper gerichtet ist. Das angewendete Verfahren gehört in die Gruppe der indirekten Nachweisverfahren. Es handelt sich hierbei um eine Polymerkonjugat-Methode (EnVision Detektion Kid), bei der ein sowohl enzym-, als auch antikörpermarkiertes Dextranpolymer an den Primärantikörper bindet. Durch dieses Polymer, das durchschnittlich 10 Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle enthält, ist diese Methode besonders sensitiv. Abbildung 5 veranschaulicht das angewendete Verfahren.

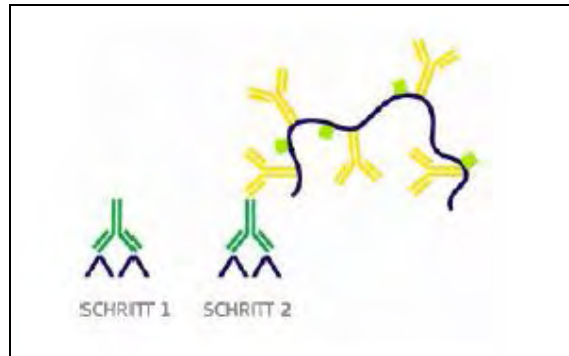


Abb.5:
 Polymerkonjugat-Methode
 Schritt 1: Bindung des Primärantikörpers
 Schritt 2: Bindung eines Dextranpolymers, welches
 Sekundärantikörpermoleküle und Enzymmoleküle enthält

3.5 Färbeprotokoll STAT3

Zunächst wurden die Gewebeschnitte demelanisiert. Dazu wurden diese für 10-15 Min. bei 37°C in 3% H₂O₂ + KOH (0,5%) inkubiert, anschließend für 20 Sekunden mit 1%iger Essigsäure behandelt und danach in TRIS-Waschpuffer überführt. Zur Demaskierung des Antigens wurden die Schnitte 10 Min. in Citratpuffer (pH 6,0) gekocht. Nach dem Auskühlen wurden die Objektträger 2 x 3 Min. in Aqua dest. gewaschen und für 5 Min. in PBS (phosphate buffered saline) überführt. Vor dem Einsatz des Primärantikörpers wurde eine Blockung mit 200µl 10% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für 30 Min. vorgenommen, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wurden die Schnitte mit 150-200µl des Primärantikörpers Phosphotyrosin-705-STAT3 in einer 1:50 Verdünnung über 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Als nächstes wurde der Primärantikörper durch 3 x 5 Min. Spülen in PBS entfernt. Zur Detektion diente ein enzym- als auch antikörpermarkiertes Dextranpolymer (EnVision Detection Kit). Nach einer Inkubationszeit des Sekundärantikörpers von 30 Min. wurden die Schnitte wieder für 3 x 5 Min. in PBS gewaschen und anschließend für die Farbreaktion mit 150-200µl AEC-Reagenz (3-Amino-9-ethylcarbazol) für 30 Min. bedeckt. Danach wurden die Objektträger erneut 3 x 5 Min. in PBS gewaschen und in Aqua dest. überführt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 10 Sek. in Mayers Hämatoxylin getaucht und in Aqua dest. gewaschen. Die gefärbten Präparate wurden anschließend mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

Zur Positivkontrolle wurde ein Psoriasispräparat zum immunhistologischen Nachweis von Phospho-STAT3 mitgeführt. Präparate, bei denen eine Inkubation mit dem Primärantikörper unterlassen wurde, dienten als Negativkontrolle, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers ausschließen zu können.

3.6 H.E.-Färbung

Die Schnitte wurden aus Aqua dest. für 2 Min. 30 Sek. in Mayers Hämalaunlösung gebracht.

Als nächstes wurden die Präparate für 3 – 5 Min. in Leitungswasser gebläut.

Nach 5 Min. in 1%iger Eosinlösung wurden sie mit Aqua dest. abgespült.

Es folgte die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 2 x 100%, Xylol).

Anschließend wurden die Präparate wässrig mit Corbitt-Balsam eingedeckelt.

Die mikroskopische Beurteilung der H.E. und STAT3-gefärbten Präparate erfolgte mit einem Leica-Mikroskop (Leica DMLB). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden ebenfalls an diesem Mikroskop mit einer digitalen Kamera (JVC Digital Kamera KY-F75U) angefertigt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der STAT3-Aktivität in Melanomzellen

Zur Bestimmung der STAT3-Aktivität im primären Melanom wurden Gewebeproben von insgesamt 70 Patienten untersucht. Die 4 µm dicken Gewebeschnitte wurden anhand einer H.E. und einer STAT3-Färbung beurteilt. Für die Analyse der STAT3-Expression wurden die Schnitte mit dem Phosphotyrosin-705-STAT3-Antikörper inkubiert, der spezifisch phosphoryliertes STAT3 erkennt. Es handelt sich bei STAT3 um ein intrazelluläres Signalwegprotein, das sowohl nukleär, als auch zytoplasmatisch exprimiert ist. Bei der mikroskopischen Beurteilung wurde eine rote Farbentwicklung innerhalb des Zytoplasmas und des Zellkerns als ein positives Ergebnis gewertet.

In der Mehrzahl der Präparate konnte phosphoryliertes STAT3 in den Melanomzellen nachgewiesen werden. Die Melanome wurden nach Intensität der Färbung klassifiziert. Dabei wurde zwischen vier Ausprägungsgraden unterschieden: „0“ steht für keine nachweisbare, „+“ für eine schwache, „++“ für eine mittelgradige und „+++“ für eine starke STAT3-Expression. Die Einteilung der Anfärbbarkeit ist anhand von Beispielen in Abbildung 6 zusammengestellt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war, die genaue Lokalisation der STAT3-Aktivität innerhalb des Tumors zu bestimmen. Das Gewebe der Tumoren und deren Umgebung zeigt zum Teil ein heterogenes Bild, das neben den Tumorzellen zusätzlich auch Bindegewebe und Infiltrate mit Entzündungszellen enthält. Aus diesem Grund war es erforderlich eine genauere Differenzierung zwischen der STAT3- Aktivität in den Tumorzellen und in den Zellen des Infiltrates vorzunehmen. Um eine selektive Beurteilung der Melanomzellen zu ermöglichen, wurde die zu beobachtende Region des Melanoms vorher mittels einer Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung untersucht. Durch diese Nebeneinanderstellung von H.E.-Färbung und Immunhistochemie konnte eine differenziertere Betrachtung der verschiedenen Zellen erfolgen. Insgesamt wurde bei 62 von 70 Melanomen eine zytoplasmatische STAT3-Anfärbung in den Tumorzellen festgestellt. Hiervon zeigten 25 Melanome eine schwache, 21 eine mittelgradige und 16 eine starke STAT3-Expression. In den restlichen 8 Melanomen ließ sich keine Aktivität in den Tumorzellen nachweisen. Die Verteilung ist in Abbildung 7 dargestellt. Durch weitere Analysen wurden diese Gruppen unterschiedlicher STAT3-Expression nun

hinsichtlich weiterer Eigenschaften (Tumordicke, Zeichen von Regression, Metastasierung) charakterisiert.

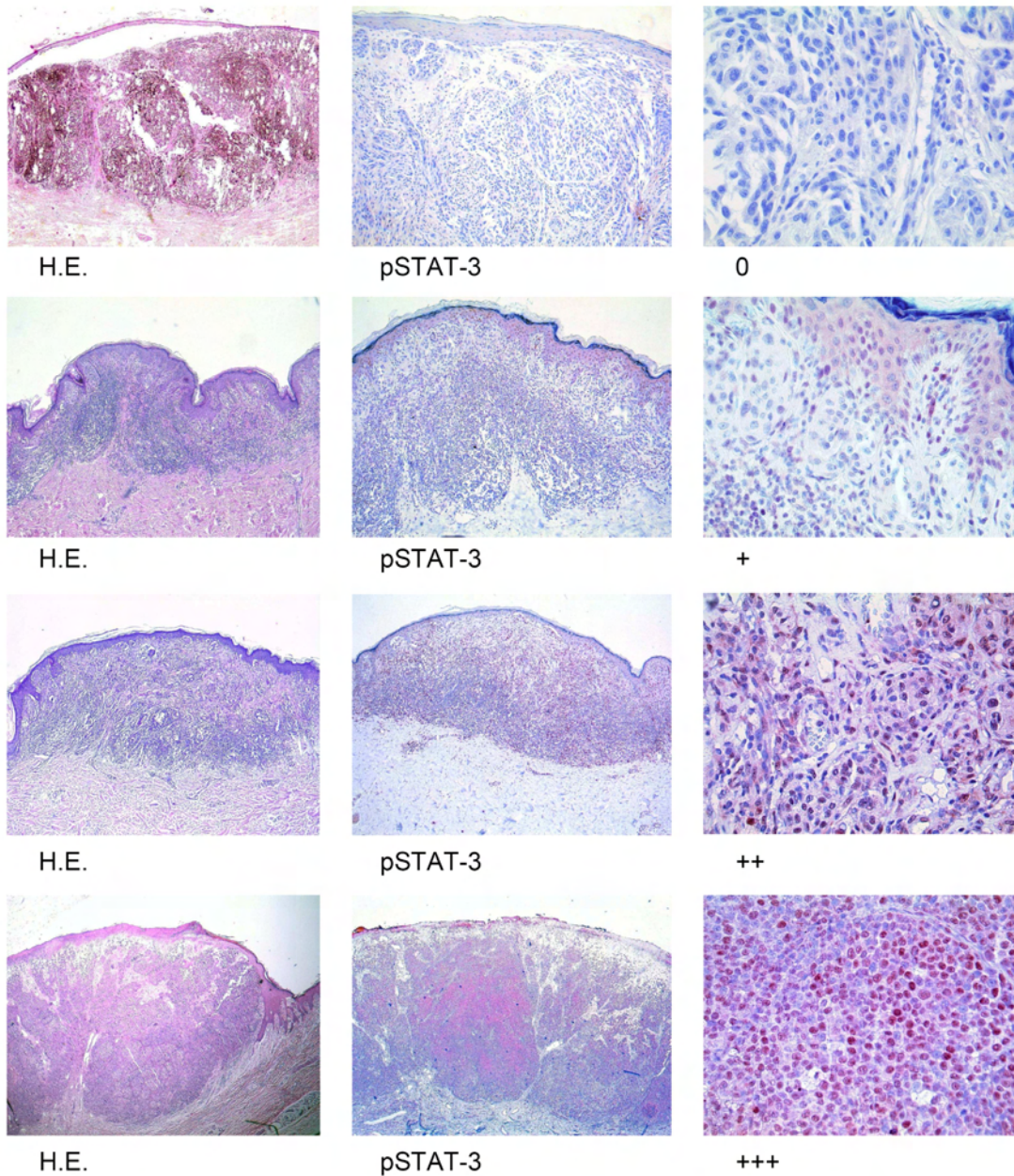


Abb.6:

H.E. und pSTAT3-Färbung der Melanomzellen

0 = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke STAT3-Expression

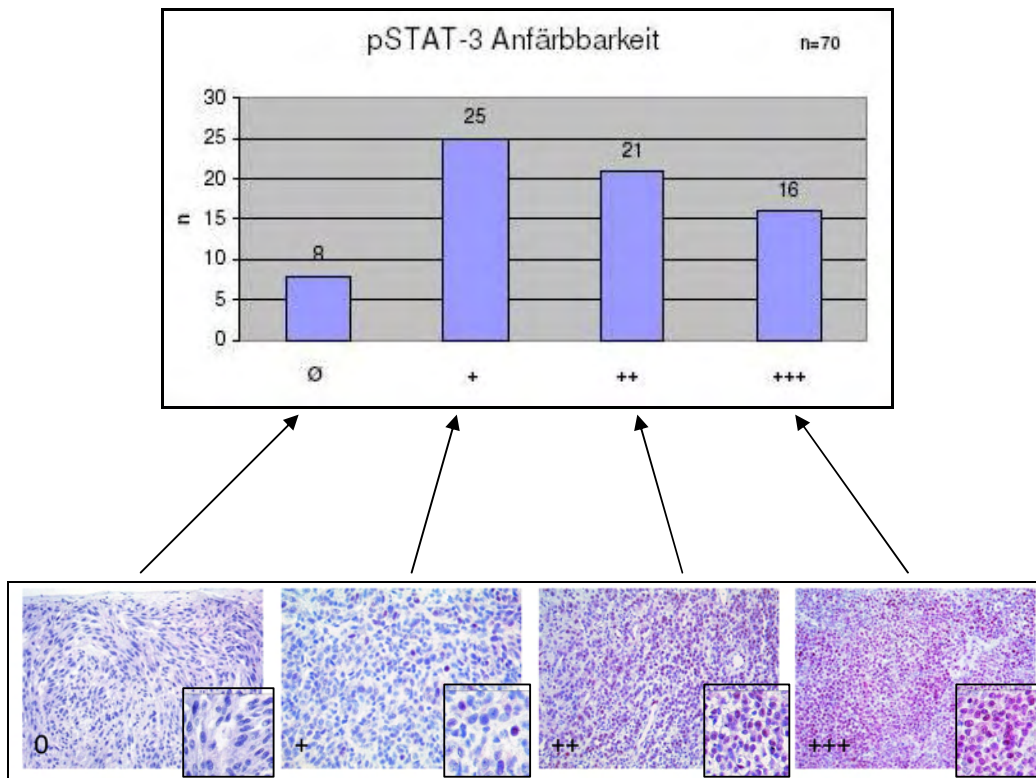


Abb.7:

Ergebnisverteilung der Intensität der pSTAT3-Färbung: 0 = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke pSTAT3-Expression in den Melanomzellen

4.2 Korrelation der STAT3-Expression mit der vertikalen Tumordicke

In dem hier untersuchten Patientenkollektiv variierte die Tumordicke in einem Bereich zwischen 0,7 und 9,0 mm. Die Messung der Dicke des primären Tumors (pT) erfolgte am histologischen Präparat und ist definiert durch den Abstand zwischen dem Stratum granulosum der Epidermis und der am tiefsten in das Gewebe infiltrierenden Melanomzelle (Breslow-Index). Es wurde bei insgesamt 46 (66 %) der Melanome eine vertikale Tumordicke von $\leq 2,0$ mm gemessen. Dies entspricht den Stadien pT1 und pT2 in der Risikogruppenzuordnung. Dem Stadium pT3 (2,01-4,0 mm) konnten 16 (23 %) der Melanome und dem Stadium pT4 ($> 4,0$ mm) 8 (11 %) der Melanome zugeordnet werden. In der genaueren Betrachtung der STAT3-Expression in Bezug auf die Melanomdicke zeigte sich, dass in den Gruppen mit mittelgradiger und starker STAT3-Aktivität der Tumorzellen zu einem höheren Prozentsatz (76 %) Melanome der Stadien

pT1 und pT2 (≤ 2,0 mm) zu finden waren. Im Gegensatz dazu waren bei den Melanomen mit schwacher STAT3-Expressivität nur zu 56 % und bei denen mit fehlender STAT3-Expressivität nur noch zu 50 % Melanome der Stadien pT1 und pT2 vorhanden (vgl. Abbildung 8). Umgekehrt verhielt es sich mit den Melanomen, die eine Dicke von mehr als 2 mm (Stadien pT3 und pT4) aufwiesen. Diese fanden sich gehäuft in den Gruppen mit schwacher oder fehlender STAT3-Expression. Die Graphik in Abbildung 8 gibt die STAT3-Expression im Vergleich mit der Tumordicke wider.

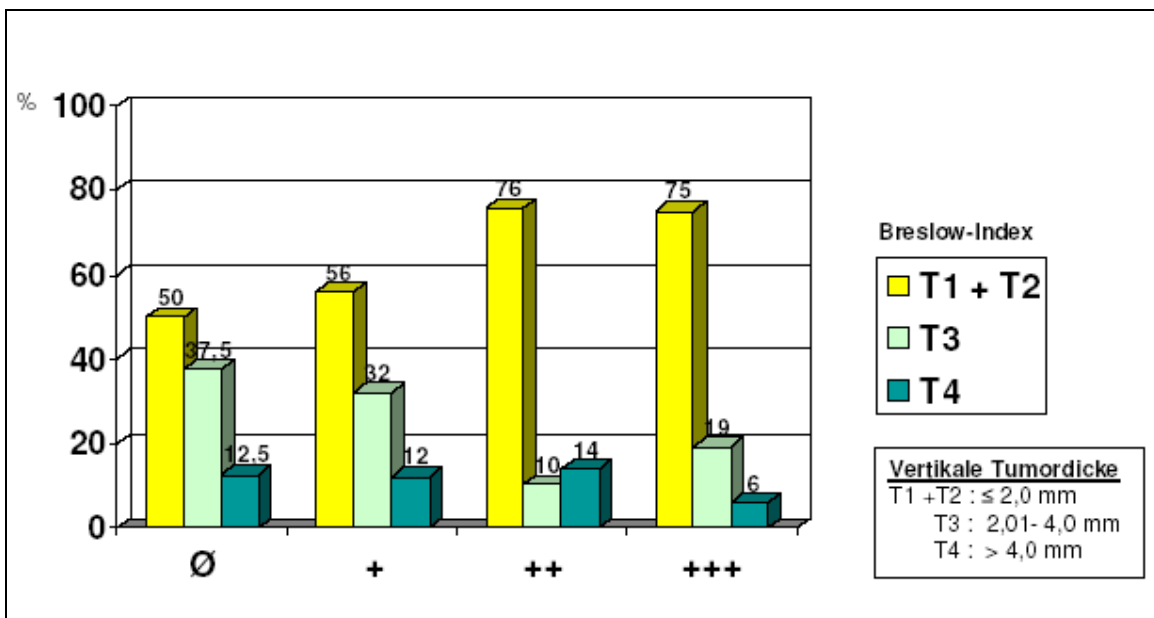


Abb.8:

Korrelation von pSTAT3 mit der vertikalen Tumordicke (Breslow-Index)

Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige +++ = starke STAT3-Expression in den Melanomzellen

4.3 STAT3-Expression und metastatische Progression

Bei allen Personen des Gesamtkollektivs wurde eine Sentinellymphknoten-Dissektion durchgeführt. Von den insgesamt 70 Patienten stellte sich bei 14 Personen ein positives Ergebnis bei der histologischen Analyse des Sentinellymphknotens heraus. Um der Frage nachzugehen, ob die STAT3-Aktivität mit der Metastasierungshäufigkeit korreliert, wurden die Melanome der Patienten mit positiver Lymphknotenbiopsie denen mit einem

negativen Biopsieergebnis gegenübergestellt und die STAT3-Expression in den Tumorzellen miteinander verglichen (siehe Abb.9).

Es zeigte sich, dass zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied in der STAT3-Aktivität vorzufinden war. Es lag eine ähnliche Verteilung von Sentinel-positiven Biopsien sowohl in der Gruppe der Melanome, die eine schwache STAT3-Expression aufwiesen, als auch in der Gruppe mit einer starken Expression vor. Die Ergebnisse ließen daher keinen Zusammenhang zwischen der STAT3-Expression und einer vermehrten Metastasierung erkennen. Interessant jedoch war die Beobachtung, dass die Melanome mit histologisch nachweisbarer Regression zu 88% einen negativen Sentinellymphknotenstatus aufwiesen. Im Vergleich dazu machte der Anteil negativer Lymphknotenbiopsien unter den Melanomen ohne Regressionszeichen nur 66 % aus. Diese Beobachtungen legten nahe, dass Regression in unserem Patientenkollektiv als prognostisch günstiges Zeichen gewertet werden.

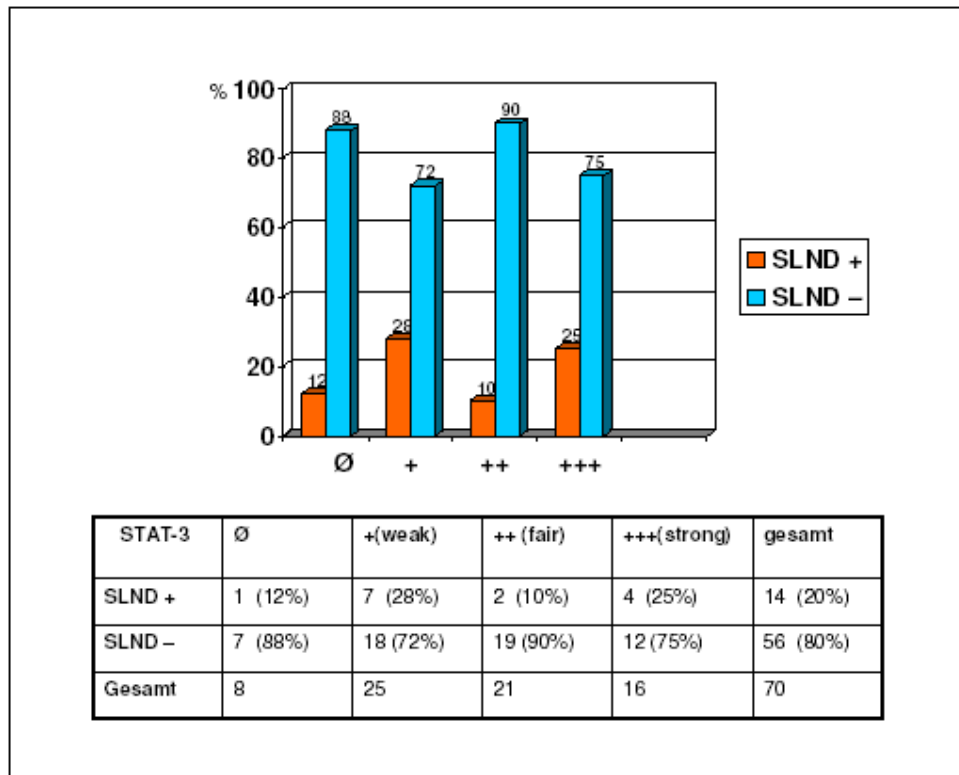


Abb.9:

Vergleich der pSTAT3-Expression mit der metastatischen Progression

SLND + = positive Sentinellymphknotenbiopsie; SLND - = negative Sentinellymphknotenbiopsie

Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke STAT3-Expression der Melanomzellen

4.4 STAT3-Expression und Regression

Das Patientenkollektiv wurde aufgeteilt in Melanome, die als regressiv eingestuft wurden und solche, die keine regressiven Veränderungen erkennen ließen. Dabei wurden sowohl makroskopische Zeichen der Regression, als auch histologische Regressionsphänomene beobachtet. Bei der makroskopischen Betrachtung der Melanome deuteten Areale, die eine Hypopigmentierung oder Depigmentierung zeigten, auf Regressionsprozesse hin. Solche Areale waren bei 17 der 70 Melanome innerhalb des Tumors oder direkt an seinen Rändern zu erkennen. Mikroskopisch wurden die Tumore anhand einer H.E. Färbung hinsichtlich histologischer Regression überprüft. Hierbei war es hilfreich, nach einer Einteilung von Kang et al. (1990) vorzugehen, wonach histologische Regression in die Stadien „early“, „intermediate“ und „late regression“ unterteilt wird:

- „early regression“: Dies sind Melanome, bei denen ein dichtes lymphozytäres Infiltrat zu sehen ist, welches die Melanomzellnester durchbricht.
- „intermediate regression“: Das Tumorgewebe wird durch lymphozytäres Infiltrat ersetzt, so dass es zu einer Reduktion der Tumormasse kommt. Auch finden sich hier Zonen mit fibrotischem Gewebe.
- „late regression“: Dieses Stadium ist charakterisiert durch ausgedehnte Fibrosebereiche und nur noch vereinzelt vorkommende oder fehlende Lymphozyten.

Diese Einteilung erleichterte die Zuordnung der Melanome zu den Gruppen „regressiv“ bzw. „nicht regressiv“. Letztendlich wurden jedoch alle Merkmale histologischer und makroskopischer Regression zu einer Gruppe zusammengefasst. Es stellte sich heraus, dass insgesamt 43 (61%) der 70 Melanome Zeichen von Regression aufwiesen. Bei der Fragestellung nach einem möglichen Zusammenhang der STAT3-Expression und Regressionsphänomenen zeigte sich, dass sowohl bei den Melanomen, die eine schwache STAT3-Aktivität aufwiesen, als auch bei solchen, bei denen eine starke Aktivität zu beobachten war, Regression in einer ähnlichen Häufigkeit zu finden war (vgl. Abb.10). Es fanden sich demnach keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der STAT3-Expression und der Regression.

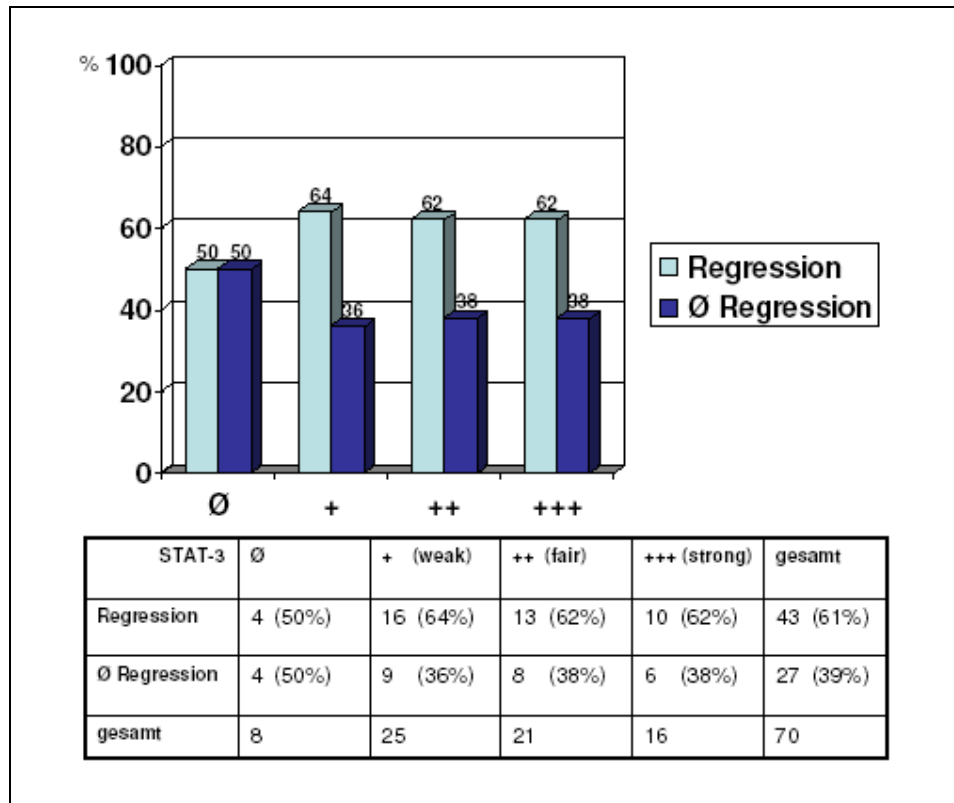


Abb.10:

Vergleich der pSTAT3-Expression mit der Regression

Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige +++ = starke STAT3-Expression der Melanomzellen

4.5 STAT3-Aktivität im Infiltrat

Auch die STAT3-Aktivität in den Zellen des Infiltrates wurde selektiv durch die H.E.-Färbung und die immunhistochemische STAT3-Färbung betrachtet (siehe Abb.11). Bei 47 von 70 Melanomen zeigten die Zellen des Infiltrates eine STAT3-Aktivität. Dabei wurde die STAT3-Expression in 18 Fällen als schwach, in 25 als mittelgradig und in 4 Fällen als stark eingestuft. In den restlichen 13 Melanomen war keine STAT3-Aktivität im Infiltrat nachzuweisen und bei weiteren 10 konnte kein Infiltrat im Bereich des Tumors festgestellt werden, bzw. es konnte keine Beurteilung stattfinden. Allgemein stellte sich heraus, dass die STAT3-Aktivität in den Tumorzellen und im Infiltrat weitestgehend korreliert: die Melanompatienten, bei denen sich eine schwache STAT3-Expression in den Tumorzellen zeigte, wiesen auch in den Zellen des Infiltrates eine schwache Anfärbung auf, wohingegen bei den Patienten mit einer starken Anfärbung im

Tumorgewebe auch in den Zellen des Infiltrates eine stärkere Expression zu erkennen war (siehe Abb.12). Zusätzlich wurde eine detailliertere Analyse der Melanome vorgenommen, die als „early regressive“ eingestuft worden waren und somit deutliche Immunzellinfiltrate aufwiesen. Die STAT3-Expression dieser Gruppe von Melanomen wurde verglichen mit der Expression der übrigen Präparate. Hierbei wurden die Melanome auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der STAT3-Expression in den Tumorzellen und dem Infiltrataufkommen hin geprüft. Es stellte sich heraus, dass innerhalb der Gruppe von Melanomen mit deutlichen Immunzellinfiltraten („early regressive“ Melanome) in 36 % der Fälle eine starke STAT3-Expression zu verzeichnen war. 29 % dieser als „early regressive“ klassifizierten Melanome, zeigten eine mittelgradige, 21 % eine schwache und 14 % keine STAT3-Aktivität. Der Vergleich dieser Melanome mit denen der Gruppen „intermediate“ und „late/no“ regression machte deutlich, dass die „early regressive“ Melanome nicht mit einer verminderten STAT3-Expressivität vergesellschaftet sind. Abbildung 13 veranschaulicht die STAT3-Expressivität in den verschiedenen Regressionsstadien. Die Melanomgruppe mit einer starken Expression von STAT3 beinhaltete zu 31,25 % Melanome mit hohem Infiltrataufkommen („early regressive“ Melanome). Im Gegensatz dazu machte der Anteil dieser Melanome in den Gruppen mit keiner, schwacher und mittelgradiger STAT3-Expression nur zwischen 12 und 25 % aus. Diese Ergebnisse lassen somit keinen Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivität und einer Verminderung des Immunzellinfiltrates erkennen (vgl. Abbildung 14).

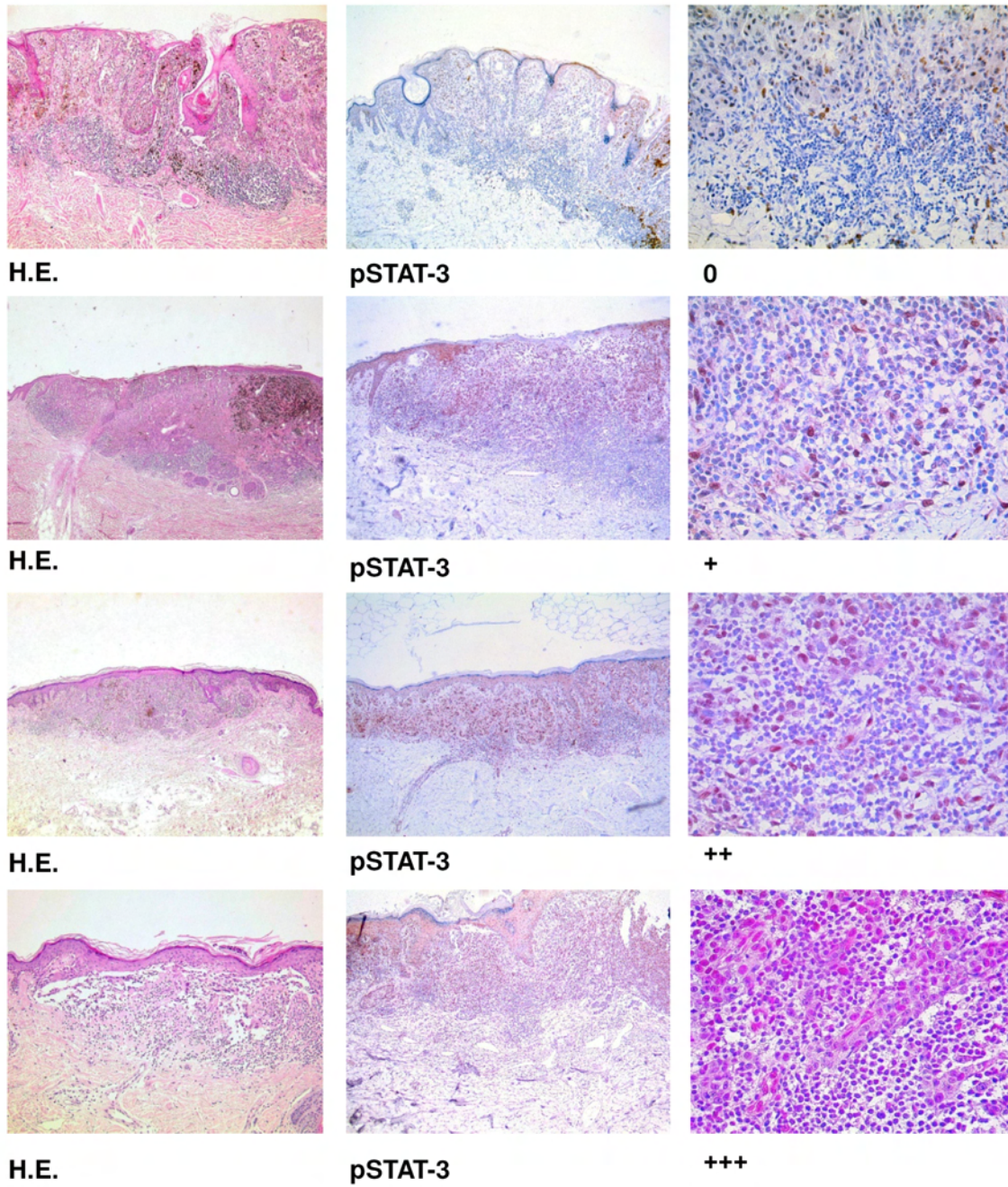


Abb.11:

H.E. und pSTAT3-Färbung der Zellen des Infiltrates

Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke STAT3-Expression

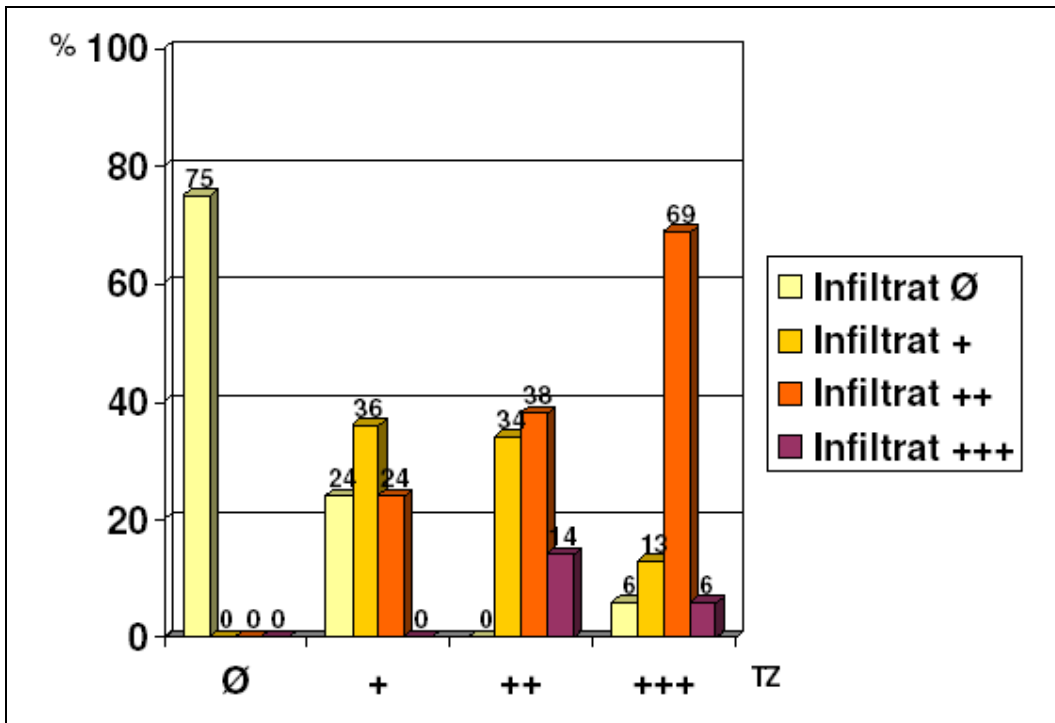


Abb.12:
Vergleich der pSTAT3-Expression in den Tumorzellen (TZ) und im Infiltrat
Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke STAT3-Expression

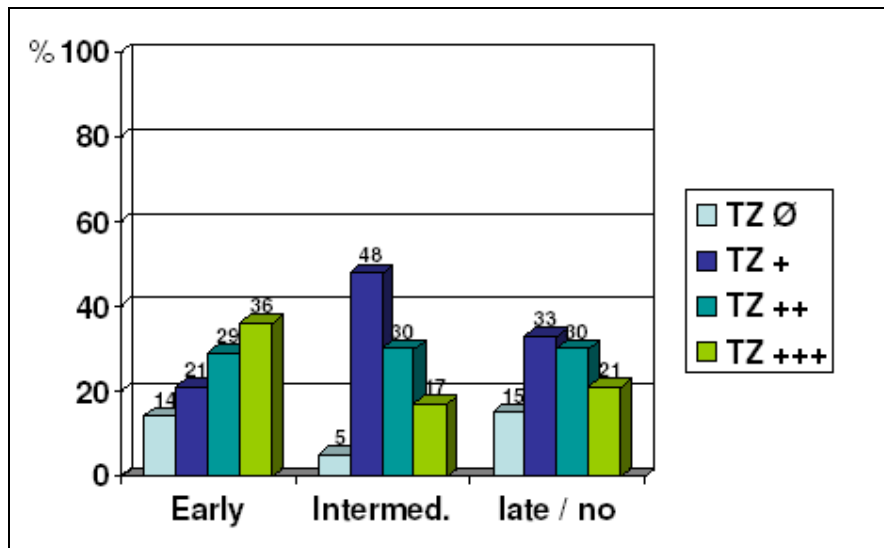


Abb.13:
Darstellung der STAT3-Expression der Tumorzellen (TZ) in den verschiedenen Stadien der Regression: early = early regression; intermed. = intermediate regression; late / no = late regression / keine Regression (siehe Stadieneinteilung unter Abschnitt 3.4)
Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke STAT3-Expression

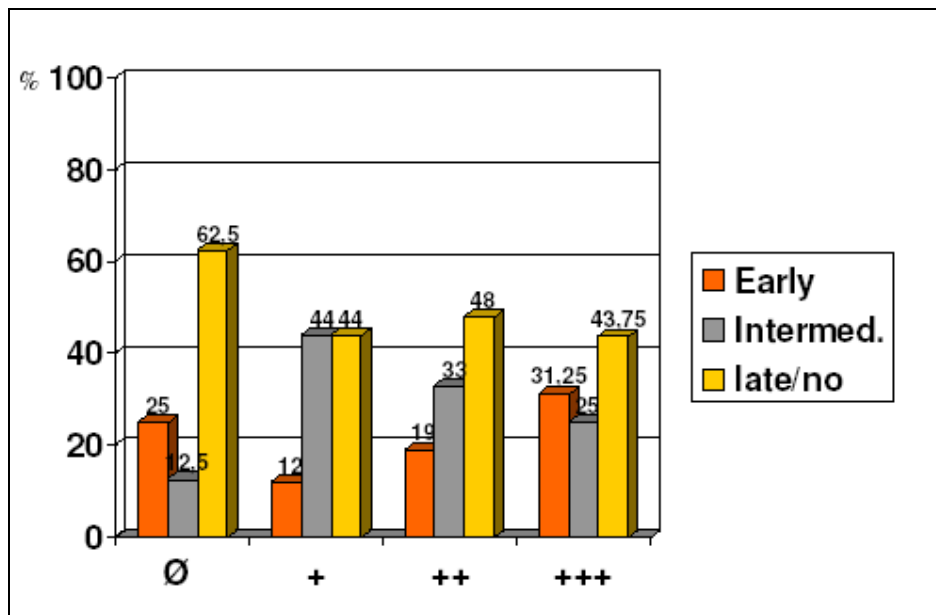


Abb.14:
 Vergleich der Regressionsstadien „early“, „intermediate“ und „late/no“ in Bezug auf die STAT3-Expression in den Tumorzellen
 Ø = keine; + = schwache; ++ = mittelgradige; +++ = starke STAT3-Expression der Tumorzellen

5 Diskussion

5.1 STAT3 in Melanomzellen und anderen Tumoren

Durch eine fehlerhaft regulierte Aktivität bestimmter Signalwege kann die Entstehung maligner Tumoren begünstigt werden. Von besonderem Interesse ist hier der STAT3-Signalweg. Unter physiologischen Bedingungen wird die STAT3-Aktivierung durch unterschiedliche Mechanismen strengstens kontrolliert, wohingegen in Tumorzellen eine dauerhafte Aktivität festgestellt werden konnte (Yu und Jove, 2004).

In verschiedenen Publikationen konnte STAT3 bisher als wichtiger Faktor bei der Entstehung und der Progression von Tumoren identifiziert werden. Unter anderem wurde bei malignen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom, Leukämien, Lymphomen als auch bei Brustkrebs, Lungenkrebs, Prostata- und Ovarialkarzinomen und bei malignen Melanomen eine erhöhte STAT3-Aktivität nachgewiesen (Bowman et al. 2000, Buettner et al. 2002). Untersuchungen von humanen Melanomzelllinien und primären Melanomen zeigten eine konstitutive STAT3-Aktivität (Niu et al., 2002). Die Ergebnisse

dieser Arbeit stimmen mit den bislang publizierten Erkenntnissen überein, dass in Melanomzellen eine deutliche STAT3-Aktivität vorhanden ist. Insgesamt konnte bei 62 der 70 Melanome eine Aktivierung von STAT3 in den Tumorzellen nachgewiesen werden. Es stellte sich die Frage, welche Bedeutung die STAT3-Aktivität für das humane Melanom hat. Mehrere Studien haben gezeigt, dass STAT3 ein sehr vielseitiges Protein ist und in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps unterschiedliche Funktionen hat. Einen direkten Nachweis, dass STAT3 die maligne Transformation von Zellen fördert, lieferten Bromberg und Darnell (1999): Fibroblasten mit konstitutiv aktivem STAT3 führten zu einer direkten Tumorbildung in Nacktmäusen.

Mora et al. (2002) haben Zelllinien menschlicher Prostatatumoren und primäre Prostatakarzinome hinsichtlich ihrer STAT3-Aktivität untersucht. Dabei wurde bei 37 von 45 Karzinomen eine erhöhte STAT3-Expression beobachtet und eine Korrelation der STAT3-Expression mit der Malignität (bestimmt nach dem Gleason score) festgestellt. Durch eine Hemmung von STAT3 zeigte sich eine Wachstumshemmung und Apoptose der Prostatakarzinomzellen. Den ersten direkten Hinweis, dass die Hemmung des STAT3-Signalweges in menschlichen Tumorzellen die Apoptose begünstigt, lieferten Catlett-Falcone et al. (1999). Durch eine Blockierung der STAT3-Aktivität konnte in Zellen des multiplen Myeloms eine Hemmung der Expression des anti-apoptotischen Gens BCL-XL festgestellt werden. MCL1 ist ein weiteres Gen der BCL-2-Familie, welches der Apoptose entgegenwirkt. Durch eine Hemmung des STAT3-Signalweges konnte eine verminderte Expression von MCL1 und dieses dadurch als Zielgen von STAT3 identifiziert werden. Auch beim malignen Melanom fand man heraus, dass die anti-apoptotischen Gene BCL-XL und MCL-1 durch STAT3 reguliert werden (Epling-Burnette et al., 2001, Niu et al., 2002). Aktiviertes STAT3 induziert zusätzlich die Expression von Survivin, das ein Mitglied der „Inhibitor of Apoptosis (IAP)“ Familie ist und ebenfalls anti-apoptotisch wirkt (Aoki et al., 2003). Zusätzlich gibt es Beobachtungen, dass STAT3 außer der onkogenen und antiapoptotischen Wirkweise gewebeabhängig auch eine proapoptotische Wirkung haben kann. Im Brustdrüsengewebe ist STAT3 beispielsweise zu Beginn der physiologischen Mammainvolution überexprimiert und an der Aktivierung der Apoptose beteiligt (Chapman et al., 2000; Groner und Hennighausen, 2000).

5.2 STAT3 und Invasivität

Zu den prognostisch wichtigsten Kriterien beim malignen Melanom zählt die Tumordicke des primären Melanoms (pT). Diese wird am histologischen Präparat gemessen (Breslow-Index). Die Beobachtungen, dass die STAT3-Aktivität bei verschiedenen Tumorarten mit der Malignität korreliert und zur Tumorprogression beiträgt, lässt einen Zusammenhang auch zwischen der STAT3-Expression und der Invasivität beim malignen Melanom vermuten. Zhuang et al. (2007) untersuchten verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter auch pSTAT3 hinsichtlich ihres Einflusses auf die Progression von Melanomen. Dazu wurden 100 Paraffinschnitte von benignen Naevi, primären Melanomen und metastasierten Melanomen immunhistochemisch analysiert. Die Beobachtungen zeigten keine STAT3-Aktivität bei den Naevi und Melanomen unter 1,0 mm Dicke. Die Melanome mit einer Tumordicke von über 1,0 mm und subkutane Metastasen wiesen eine wechselnde STAT3-Expression auf. Suiqing et al. (2005) analysierten die STAT3-Aktivität verschiedener menschlicher Hauttumore, wie dem Basaliom, dem Plattenepithel-Karzinom und der seborrhoische Keratose. Dabei stellten sie fest, dass die STAT3-Expression beim Plattenepithel-Karzinom mit der Tiefe des invasiven Wachstums korreliert. Um zu prüfen, ob diese Beobachtungen auch für das maligne Melanom in unserem Patientenkollektiv zutreffen, wurde die vertikale Tumordicke nach Breslow als wichtiges Merkmal für invasives Wachstum herangezogen und auf einen Zusammenhang mit der STAT3-Expression hin geprüft. Von den insgesamt 70 primären Melanomen wurde bei 46 eine Tumordicke von $\leq 2,0$ mm gemessen. 16 der Melanome wiesen eine Tumordicke zwischen 2,01 und 4,0 mm auf und 8 Melanome eine Dicke $> 4,0$ mm. Hinsichtlich der STAT3-Expression ließ sich bei diesen Gruppen kein Unterschied erkennen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten allerdings, dass die Melanome $\leq 2,0$ mm eine Tendenz zu verstärkter STAT3-Expression aufwiesen im Gegensatz zu den Melanomen mit größerer Tumordicke. Diese Beobachtungen widersprachen der Annahme, dass STAT3 mit der Invasionstiefe korreliert. Eine Studie zum Mundhöhlenkarzinom lieferte bereits ähnliche Ergebnisse. Es wurde beschrieben, dass T1- und T2-klassifizierte Karzinome eine stärkere STAT3-Aktivität erkennen ließen, als T3- und T4-klassifizierte Karzinome. Sie vermuteten, dass die STAT3-Aktivierung eine Rolle insbesondere bei der frühen Entwicklung von Mundhöhlenkarzinomen spielen könnte (Nagpal et al., 2002). Auch unsere Ergebnisse

könnten darauf hinweisen, dass besonders frühe Entwicklungsstadien des Melanoms aktives STAT3 benötigen, bzw. die STAT3-Aktivität im Verlauf der Tumorprogression verloren geht.

5.3 STAT3-Aktivität und Metastasierung beim malignen Melanom

Das maligne Melanom ist bekannt für sein hohes Potential zum grenzüberschreitenden Wachstum und zur Metastasierung, u.a. in das Gehirn (Denkins et al., 2004). Die Induktion der Angiogenese, d.h. die Bildung neuer Blutkapillaren, ist ein entscheidender Schritt bei der Tumorprogression und dem Metastasierungsprozess, welche dazu dient, den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Im Primärmelanom wird die Angiogenese hauptsächlich über „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) vermittelt. Niu et al. (2002) zeigten im Mausmodell, dass STAT3 zu einer gesteigerten Expression von VEGF und verstärkter Angiogenese führt. Ebenfalls konnte den Matrix Metalloproteinasen (MMPs), besonders MMP-2 und MMP-9, eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und Metastasierung zugeschrieben werden (Curran und Murray, 1999). Xie et al. (2004) demonstrierten anhand eines Mausmelanom-Modells die STAT3-vermittelte Expression von MMP-2 und Metastasierung. Ihre Untersuchungen ergaben, dass es durch eine Blockade des STAT3-Signalweges in Melanomzellen von Mäusen zu einer Hemmung des Tumorwachstums und einer Verhinderung der Metastasierung kommt. Mittels eines Mausmodells und anhand menschlicher Melanomzelllinien analysierten sie die STAT3-Aktivität in metastasierten Melanomen und in Melanommetastasen des Gehirns. Dabei fanden sie heraus, dass die STAT3-Expression in Hirnmetastasen signifikant erhöht war im Vergleich zu der Expression in den primären Melanomen. Außerdem stellten sie fest, dass es durch eine Hemmung von STAT3 durch Einsatz einer dominant-negativen STAT3-Variante zu einer verminderten Inzidenz an Hirnmetastasen im Tiermodell kommt. Bei einer gesteigerten STAT3-Aktivität durch STAT3C (Mutation von STAT3, die spontan dimerisiert, an die DNA bindet und als Transkriptionsfaktor wirkt) wurde eine verstärkte Metastasierung ins Gehirn beobachtet (Xie et al., 2006). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gingen der Frage nach, ob es bei den primären Melanomen des genannten Patientenkollektivs ebenfalls Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivität und einer vermehrten Metastasierung gibt. Zur Beurteilung diene die

histologische Analyse der jeweiligen Sentinellymphknoten. Bei 14 der insgesamt 70 Patienten ergab die Lymphknotenuntersuchung ein positives Ergebnis. Die Überprüfung der STAT3-Expression der primären Melanome dieser Patienten im Vergleich zu denen mit einem negativen Lymphknotenstatus ließ jedoch keinen Unterschied erkennen. Unsere Ergebnisse konnten daher die Beobachtungen anderer Studien, STAT3 gehe einher mit metastatischer Progression, für das humane Melanom nicht bestätigen. Um umfassendere Ergebnisse über die prognostische Aussagekraft von STAT3 zu erhalten, sind zusätzliche Langzeitstudien nötig, da die vorliegende Studie als Anhaltspunkt für eine Metastasierung allein den Sentinellymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Exzision erfasst.

5.4 STAT3 in primären Melanomen mit und ohne Regressionszeichen

Regressionsphänomene sind beim malignen Melanom schon seit längerer Zeit bekannt. Die Bedeutung in Hinblick auf die Prognose der Patienten ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Es gibt sowohl Studien, in denen Regression als prognostisch ungünstiger Faktor angesehen wird (Blessing et al., 1992; Clark et al., 1989; Gromet et al., 1978; Slingluff et al., 1988), als auch Untersuchungen, die die Vermutung nahelegen, dass sich Regression günstig bezüglich des Lymphknotenstatus beim malignen Melanom auswirkt (Liszky et al., 2005). Ebenfalls gibt es Forschungsergebnisse, bei denen kein Zusammenhang zwischen Regression und Prognose festzustellen ist (Briggs et al., 1984; Cooper et al., 1985; Fontaine et al., 2003; Kelly et al., 1985; McGovern et al., 1979; Shaw et al., 1987; Trau et al., 1983). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu analysieren, ob eine Verbindung zwischen der STAT3-Expression und der Regression besteht. Bei 43 (61%) der insgesamt 70 Patienten unseres Kollektivs ließen sich Zeichen von Regression feststellen. Hinsichtlich der STAT3-Expression jedoch konnte bei dieser Gruppe kein Unterschied beobachtet werden im Vergleich zu der STAT3-Expression der nicht-regressiven Melanome. Die Ergebnisse lieferten somit keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivität und Regression. Es gibt jedoch Untersuchungen, bei denen durch Gentherapie mit einer dominant-negativen STAT3 Variante (STAT-3 β) im Mausmodell an B16 Tumoren eine Hemmung des Tumorwachstums und Tumorregression beobachtet werden konnte (Niu et al., 1999).

5.5 Mögliche Zusammenhänge zwischen STAT3 und Immunsuppression

Das Vorhandensein von T-Zellinfiltraten innerhalb eines Tumors konnte bereits in verschiedenen Studien als ein prognostisch günstiges Zeichen bewertet werden. Meist handelt es sich bei den Zellen des Infiltrates um zytotoxische T-Zellen. Auch beim Melanom wurden häufig tumorinfiltrierende Lymphozyten beobachtet. Die Intensität des Infiltrates (brisk, nonbrisk, absent) korrelierte dabei mit dem Langzeitüberleben der Patienten (Clemente et al., 1996). Die Studie von Mraz-Gernhard et al. (1998) zu prognostischen Faktoren beim humanen Melanom konnte hingegen keinen individuellen Vorhersagewert treffen für die Abwesenheit von Lymphozyteninfiltraten in Bezug auf eine Lymphknotenbeteiligung.

Bei 60 der 70 primären Melanome unseres Patientenkollektivs fanden sich Immuzellinfiltrate im Bereich der Tumoren. 47 dieser Melanome zeigten eine deutliche STAT3-Aktivität im Infiltrat, wobei die STAT3-Expression in den Zellen des Infiltrates und den Tumorzellen korrelierte. Kortylewski et al. (2005) beobachteten ebenfalls, dass STAT3 in verschiedenen Immunzellen in der nahen Umgebung des Tumors aktiviert ist. Sie stellten fest, dass STAT3 die Produktion der Tumorzellen an immunsuppressiven Faktoren (IL-10, IL-6 und VEGF) fördert, welche wiederum zu einer vermehrten Aktivität von STAT3 in Immunzellen führen. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Immunsuppression (u.a. Verhinderung der Reifung von dendritischen Zellen und Akkumulation von regulatorischen T-Zellen in der Tumorumgebung). Auch Burdelya et al. (2005) erforschten in ihrer Arbeit Zusammenhänge zwischen der STAT3-Aktivität und dem Immuzellinfiltrat. Im Mausexperiment fanden sie Hinweise, dass die STAT3-Aktivität assoziiert ist mit Tumorstadium und einer Verminderung des T-Zell-Infiltrats. Auch zeigte sich in ihren Experimenten, dass es durch eine Blockierung des STAT3-Signalweges zu einer vermehrten Migration von Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, Neutrophilen und Makrophagen kommt.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass regulatorische T-Zellen durch ihre hemmende Wirkung auf CD8⁺-T-Zellen wesentlich zur Immunsuppression in der Tumorumgebung beitragen (Zou et al., 2005). Bei Tumorpatienten konnte eine gesteigerte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Tumor und in den Lymphknoten nachgewiesen werden (Liyanage et al., 2002).

Wang et al. (2004) zeigten anhand eines Mausmodells, dass es bei einer dauerhaften Aktivierung des STAT3-Signalweges in Tumorzellen zu einer Hemmung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen kommt. Eine Blockierung der STAT3-Aktivität in Tumorzellen, u.a. in Maus B16 Melanomen, resultierte in einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, was zu einer Aktivierung des Immunsystems und dendritischer Zellen führte. Auch die Studien von Nefedova et al. (2004) weisen darauf hin, dass STAT3 in die abnorme Differenzierung von dendritischen Zellen in Tumoren involviert ist. Tumorzellen produzieren verschiedene Faktoren, wie VEGF, IL-10 und TGF- β , die in der Lage sind, die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen (DCs) zu hemmen und so zu einer T-Zell-Toleranz führen (Gabrilovich et al., 1996, Yang und Lattirne, 2003). Diese Studien legten nahe, dass durch die mögliche immunsuppressive Wirkung von aktiviertem STAT3 eine Verminderung des Immunzellinfiltrates auch im hier untersuchten Patientenkollektiv nachzuvollziehen sein müsste. Die Überprüfung eines etwaigen Zusammenhanges ergab hingegen keine Hinweise für eine inverse Korrelation zwischen der STAT3-Expression und dem Infiltrat. Wider Erwarten fanden sich Immunzellinfiltrate („early regressive“ Melanome) häufig (31,25 %) innerhalb der Gruppe von Melanomen mit starker STAT3-Expression. In den Melanomgruppen mit schwacher oder keiner STAT3-Expression fand sich hingegen ein geringerer Anteil (12 bzw. 25 %) an „early regressive“ Melanomen. Das Infiltrat wurde jedoch lediglich in seiner Quantität bestimmt. Für eine detailliertere Beurteilung sind weitere Studien nötig, die eine genaue Charakterisierung des Infiltrates beinhalten. Interessant wäre zum Beispiel herauszufinden, welche Zelltypen im Infiltrat vorliegen und ob es sich um funktionstüchtige Zellen handelt.

Im Experiment mit Mäusen wurde beobachtet, dass Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die sich durch ein Fehlen von STAT3 auszeichneten, eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Mediatoren und eine vermehrte Th1 Aktivität bewirkten. Auch entwickelten diese Mäuse mit der Zeit chronisch entzündliche Darmerkrankungen, was STAT3 eine Rolle zukommen lässt bei der physiologischen Unterdrückung überschießender Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Takeda et al., 1999).

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass in den primären Melanomen eine deutliche STAT3-Aktivität vorhanden ist. Bei der Analyse von Regressionsphänomenen fanden sich Hinweise, dass Zeichen partieller Regression beim malignen Melanom als prognostisch günstig anzusehen sind. Ein Zusammenhang zwischen STAT3 und einer vermehrten Invasivität, Metastasierung oder immunsuppressiven Wirkung ließ sich anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigen. Zumindest ist für die primären Melanome unseres Kollektivs davon auszugehen, dass STAT3 als prognostischer Marker bei der histopathologischen Untersuchung eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch scheint STAT3 bei einer Vielzahl von Tumoren mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein (Masuda et al., 2002; Xie et al., 2006; Yu and Jove, 2004). Verschiedene Studien haben bisher die Hoffnung geweckt, dass sich STAT-3 als Zielmolekül bei der Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten in der Tumorthherapie eignen könnte. Niu et al. (2001) fanden im Experiment mit Maus B16 Melanomen heraus, dass es durch die Expression einer dominant-negativen Form des STAT3-Proteins (STAT-3 β) zu einer massiven Apoptose der Tumorzellen kam. Außerdem stellten sie einen sogenannten „Bystander Effect“ fest, bei dem sich zeigte, dass auch benachbarte Tumorzellen, die keiner Genterapie ausgesetzt waren, durch Apoptose zugrunde gingen. Auch frühere in vitro Experimente zeigten, dass die Hemmung des STAT3-Signalweges die Apoptose in Tumorzellen des Myeloms induziert (Catlett-Falcone et al., 1999). Eine Vielzahl von Signaltransduktionstherapeutika befindet sich bereits in der Entwicklung: z.B. Antikörper gegen Zytokine, Tyrosinkinase-Inhibitoren, Rezeptorantagonisten, interagierende Moleküle der STAT-DNA-Bindung und genterapeutische Ansätze (Bromberg et al., 2002). Ob diese auch für die Therapie des primären Melanoms von Bedeutung sein werden, bleibt abzuwarten. Da die STAT3-aktivierenden Mechanismen sehr komplex sind und von gewebeabhängigen Unterschieden ausgegangen werden muss, ist anzunehmen, dass die STAT3-Aktivität zwischen verschiedenen Tumoren variiert. Langzeitstudien mit wesentlich größeren Patientenzahlen werden erforderlich sein, um die prognostische Relevanz von STAT3 beim humanen Melanom genauer zu prüfen.

6 Zusammenfassung

Signal transducer and activator of transcription (STAT) Proteine sind an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. In verschiedenen Publikationen wurde der aktive Transkriptionsfaktor STAT3 u.a. mit invasivem Wachstum, vermehrter Metastasierung und einer immunsuppressiven Wirkung in Zusammenhang gebracht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die STAT3-Expression in Bezug auf invasives Wachstum und Metastasierung beim humanen Melanom zu analysieren. Dazu wurde die STAT3-Expression von 70 primären Melanomen mit einem spezifischen Phosphotyrosin-705-STAT3-Antikörpers immunhistochemisch dargestellt und bezüglich der Tumordicke, Lymphknotenstatus und Überleben der Patienten analysiert.

Entgegen den Erwartungen ergab sich keine Korrelation der STAT3-Aktivität mit der Tumordicke, als Zeichen der Invasivität. Es zeigte sich eher eine verminderte STAT3-Expression mit zunehmender Invasionstiefe. Eine Korrelation zwischen positiven und negativen Lymphknotenstatus und der STAT3-Expression in den primären Melanomen konnte ebenfalls nicht festgestellt werden, so dass wir die Hypothese, STAT3 fördere die metastatische Progression, anhand unseres Patientenkollektivs nicht verifizieren konnten. 61% der primären Melanome unseres Kollektivs wiesen Regressionszeichen auf. Hinsichtlich der STAT3-Expression konnte bei dieser Gruppe keine Differenz zu den nicht-regressiven Melanomen festgestellt werden. Das Ausmaß der STAT3-Expression korrelierte nicht mit der Menge der Immunzellinfiltrate. Melanome mit histologisch nachweisbarer Regression wiesen allerdings zu einem höheren Anteil einen negativen Lymphknotenstatus auf, so dass Regression in dem untersuchten Patientenkollektiv als prognostisch günstiges Zeichen gedeutet werden kann.

Zusammenfassend deutet die Analyse der primären Melanome unseres Kollektivs darauf hin, dass STAT3 als prognostischer Marker bei der histopathologischen Untersuchung eine untergeordnete Rolle spielt. Weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven werden nötig sein, um den Zusammenhang zwischen STAT3 und der Metastasierung beim humanen Melanom näher zu charakterisieren.

7 Literaturverzeichnis

Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 1999; 17:138-146

Alexander WS, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanty AG, Brysha M, Kile BT, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, Hilton DJ. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 1999; 66:588-592

Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 2003; 101:1535-1542

Armstrong BK, Krickler A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1994; 20:219-240

Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol* 1992; 8:400-414

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:3635-3648

Barnhill RL. Pathology and prognostic factors. *Curr Opin Oncol* 1993; 5:364-376

Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res* 2003; 16:297-306

Bauer J, Garbe C. Risk estimation for malignant transformation of melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 2004; 140:127

- Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 1992; 20:315-322
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman T, Courtneidge SA, Jove R. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7319-7324
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-2488
- Briggs JC, Ibrahim NB, Hastings AG, Griffiths RW. Experience of thin cutaneous melanomas (less than 0.76 mm and less than 0.85 mm thick) in a large plastic surgery unit: a 5 to 17 year follow-up. *Br J Plast Surg* 1984; 37:501-506
- Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109:1139-1142
- Bromberg J, Darnell JE, Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000; 19:2468-2473
- Bromberg JF. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays* 2001; 23:161-169
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98:295-303
- Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002; 8:945-954
- Burdelya L, Kujawski M, Niu G, Zhong B, Wang T, Zhang S, Kortylewski M, Shain K, Kay H, Djeu J, Dalton W, Pardoll D, Wei S, Yu H. Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol* 2005; 174:3925-3931

- Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003; 197:157-168
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999; 10:105-115
- Chapman RS, Lourenco P, Tonner E, Flint D, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480:129-38
- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-1904
- Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77:1303-1310
- Cooper PH, Wanebo HJ, Hagar RW. Regression in thin malignant melanoma. Microscopic diagnosis and prognostic importance. *Arch Dermatol* 1985; 121:1127-1131
- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189:300-308
- Czajkowski R, Placek W, Drewa G, Czajkowska A, Uchanska G. FAMMM syndrome: pathogenesis and management. *Dermatol Surg* 2004; 30:291-296
- Danial NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 2000; 19:2523-2531
- Darnell JE, Jr. Reflections on STAT3, STAT5, and STAT6 as fat STATs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6221-6224

- Dechow TN, Pedranzini L, Leitch A, Leslie K, Gerald WL, Linkov I, Bromberg JF. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:10602-10607
- Denkins Y, Reiland J, Roy M, Sinnappah-Kang ND, Galjour J, Murry BP, Blust J, Aucoin R, Marchetti D. Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins. *Neuro-oncol* 2004; 6:154-165
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP, Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 2001; 107:351-362
- Everson TC. Spontaneous regression of cancer. *Prog Clin Cancer* 1967; 3:79-95
- Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? *Am J Dermatopathol* 2003; 25:371-376
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2:1096-1103
- Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:363-373
- Garbe C. Increasing incidence of malignant melanoma. *Hautarzt* 2000; 51:518
- Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 1995; 75:2484-2491

- Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102:695-699
- Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14:280-290
- Garcia R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci* 1998; 5:79-85
- Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997; 8:1267-1276
- Greene MH, Clark WH, Jr., Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 1985; 102:458-465
- Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12:11-19
- Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer* 1978; 42:2282-2292
- Groner B, Hennighausen L. Linear and cooperative signaling: roles for Stat proteins in the regulation of cell survival and apoptosis in the mammary epithelium. *Breast Cancer Res* 2000; 2:149-153

- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE, Jr. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 1995; 267:1347-1349
- Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol* 2004; 172:4630-4636
- Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 2005; 105:689-696
- Hoey T, Schindler U. STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:582-587
- Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:211-217
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 2001; 409:349-354
- John S, Vinkemeier U, Soldaini E, Darnell JE, Jr., Leonard WJ. The significance of tetramerization in promoter recruitment by Stat5. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1910-1918
- Jung JE, Lee HG, Cho IH, Chung DH, Yoon SH, Yang YM, Lee JW, Choi S, Park JW, Ye SK, Chung MH. STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J* 2005; 19:1296-1298
- Kang S, Barnhill RL, Mihm MC, Jr., Sober AJ. Histologic regression in malignant melanoma: an interobserver concordance study. *J Cutan Pathol* 1993; 20:126-129
- Karni R, Jove R, Levitzki A. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene* 1999; 18:4654-4662

- Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:9964-9969
- Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* 1985; 56:2287-2291
- Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, Koga K, Takaki H, Himeno K, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* 2006; 203:1021-1031
- Kortylewski M, Heinrich PC, Mackiewicz A, Schniertshauer U, Klingmuller U, Nakajima K, Hirano T, Horn F, Behrmann I. Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1. *Oncogene* 1999; 18:3742-3753
- Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24:315-327
- Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 2000; 292:225-232
- Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; 109:1143-1148
- Liszkay G, Orosz Z, Peley G, Csuka O, Plotar V, Sinkovics I, Banfalvi T, Fejos Z, Gilde K, Kasler M. Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma. *Melanoma Res* 2005; 15:509-513
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169:2756-2761

- Lu C, Sheehan C, Rak JW, Chambers CA, Hozumi N, Kerbel RS. Endogenous interleukin 6 can function as an in vivo growth- stimulatory factor for advanced-stage human melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1417-1425
- Lu C, Vickers MF, Kerbel RS. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:9215-9219
- MacKie RM, Aitchison TC, Freudenberger T. Risk factors for melanoma. *Lancet* 1989; 2:928
- Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:3351-3355
- McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology* 1983; 7:673-680
- McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW, Farago GA. Prognostic significance of the histological features of malignant melanoma. *Histopathology* 1979; 3:385-393
- Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, Bowman T, Falcone R, Fairclough R, Cantor A, Muro-Cacho C, Livingston S, Karras J, Pow-Sang J, Jove R. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62:6659-6666
- Mraz-Gernhard S, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M, Miller JR, III, Leong SP. Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1998; 134:983-987

- Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, Jove R, Gabrilovich D. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol* 2004; 172:464-474
- Ning ZQ, Li J, McGuinness M, Arceci RJ. STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. *Oncogene* 2001; 20:4528-4536
- Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 1999; 59:5059-5063
- Niu G, Shain KH, Huang M, Ravi R, Bedi A, Dalton WS, Jove R, Yu H. Overexpression of a dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res* 2001; 61:3276-3280
- Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21:2000-2008
- Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, Irby R, Briggs J, Karras J, Cress WD, Pardoll D, Jove R, Chen J, Yu H. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 2005; 25:7432-7440
- Odajima J, Matsumura I, Sonoyama J, Daino H, Kawasaki A, Tanaka H, Inohara N, Kitamura T, Downward J, Nakajima K, Hirano T, Kanakura Y. Full oncogenic activities of v-Src are mediated by multiple signaling pathways. Ras as an essential mediator for cell survival. *J Biol Chem* 2000; 275:24096-24105
- Paladugu RR, Yonemoto RH. Biologic behavior of thin malignant melanomas with regressive changes. *Arch Surg* 1983; 118:41-44
- Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol* 1987; 123:1326-1330

- Schindler C, Darnell JE, Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:621-651
- Shaw HM, McCarthy WH, McCarthy SW, Milton GW. Thin malignant melanomas and recurrence potential. *Arch Surg* 1987; 122:1147-1150
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE, Jr. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 1994; 76:821-828
- Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:593-605
- Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ, Jove R. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 2000; 19:5419-5427
- Slingluff CL, Jr., Vollmer RT, Reintgen DS, Seigler HF. Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk. *Ann Surg* 1988; 208:150-161
- Suiqing C, Min Z, Lirong C. Overexpression of phosphorylated-STAT3 correlated with the invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol* 2005; 32:354-360
- Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 2006; 203:1651-1656
- Swope VB, bdel-Malek Z, Kassem LM, Nordlund JJ. Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J Invest Dermatol* 1991; 96:180-185
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10:39-49

- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3801-3804
- Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1865-1871
- Trau H, Kopf AW, Rigel DS, Levine J, Rogers G, Levenstein M, Bart RS, Mintzis MM, Friedman RJ. Regression in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:363-368
- Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE, Jr. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 1996; 15:5616-5626
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004; 10:48-54
- Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003; 22:319-329
- Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 2003; 97:628-638
- Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, Xie K, Sawaya R, Huang S. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res* 2006; 66:3188-3196

- Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, li-Osman F, Sawaya R, Huang S. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 2004; 23:3550-3560
- Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 2005; 24:5552-5560
- Yang AS, Lattime EC. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res* 2003; 63:2150-2157
- Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995; 269:81-83
- Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:97-105
- Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:41-51
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994; 264:95-98
- Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF, Hersey P. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod Pathol* 2007; 20:416-426
- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:263-274