

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin
Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie

Direktor Prof. Dr. med. Udo Schumacher

„Expression von epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) regulierenden Transkriptionsfaktoren in Kopf-Hals-Karzinomen“

Publikationsdissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Juliane Göppel
aus Köthen

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.02.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Adrian Münscher

INHALTSVERZEICHNIS

1. Veröffentlichte Publikation	1
2. Einleitung	7
3. Material und Methoden	9
4. Ergebnisse	11
5. Diskussion	13
6. Zusammenfassung	16
7. Literaturverzeichnis	17
8. Erklärung des Eigenanteils	20
9. Danksagung	21
10. Eidesstattliche Erklärung	22

1. Veröffentlichte Publikation

ANTICANCER RESEARCH 37: 5435-5440 (2017)
doi:10.21873/anticancer.11971

Expression of Epithelial–Mesenchymal Transition Regulating Transcription Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas

JULIANE GÖPPEL¹, NIKOLAUS MÖCKELMANN², ADRIAN MÜNSCHER²,
GUIDO SAUTER³ and UDO SCHUMACHER¹

*Departments of ¹Anatomy and Experimental Morphology,
²Ear, Nose and Throat Surgery and*

³Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Abstract. *Background/Aim: The transcription factors Twist, Snail, Slug, ZEB1 and ZEB2 regulate epithelial-mesenchymal transition (EMT) and their expression has been associated with a poor prognosis in several cancer entities. The aim of this analysis was to investigate in parallel the expression of all of these transcription factors in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) in order to gain insight into their possible co-expression. Materials and Methods: Tumor tissue samples were immunohistochemically stained using antibodies against these transcription factors. The staining intensity and cellular distribution of the immunoreactivity was recorded. Results: In general, transcription factor immunoreactivity was noted in the nucleus of both cancer and stromal cells. The highest immunoreactivity was observed for Twist. Snail, Slug, ZEB1 and ZEB2 showed a much lesser immunoreactivity in cancer cells and they were expressed independently from each other. Conclusion: Twist is the major transcription factor active in HNSCC; the other transcription factors of EMT seem to be of less importance in this tumor entity.*

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is one of the most common malignancies worldwide and patients, who suffer from HNSCCs have a high mortality risk (1). HNSCC is in comparison to other cancers a mainly loco-regional

Correspondence to: Juliane Göppel, Institute for Anatomy and Experimental Morphology, University Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. Tel: +49 40741052586, Fax: +49 40741055427, e-mail: juliane.goepfel@googlemail.com

Key Words: Epithelial-mesenchymal transition, transcription factors, head and neck cancer, Slug, Snail, Twist, ZEB 1, ZEB 2.

disease and thus the formation of distant metastasis in HNSCCs is comparatively low. However, if it occurs it is still the determining prognostic factor for survival (2, 3).

Metastasis formation is a very complex process and follows a series of sequential steps, the so-called metastatic cascade. Initially, the future metastatic cell has to loosen its contact to neighboring tumor cells and the basement membrane as well. Thereafter it has to degrade the surrounding extracellular matrix and has to invade tumor blood vessels. After survival in the circulation, the cell has to adhere to the endothelium at the site of the target organ and has to transmigrate it. Once this tumor cell has lodged into the connective tissue stroma of the host organ, it has to start to divide again in order to form a clinically detectable metastasis (4).

A key process during this metastatic cascade is the epithelial–mesenchymal transition (EMT), a multi-step morphogenetic process that enables the cancer cell to break loose from the primary tumor and enables it to migrate to distant organs. During this process the epithelial properties of the cells will be down-regulated and the mesenchymal properties which facilitate migration will be in turn up-regulated (5). Thus, during EMT the non-motile epithelial cells become motile mesenchymal ones by loosening their epithelial cell junction proteins. These transitioned cells are able to invade different tissues outside of the primary tumor, such as lymphatic tissue or blood vessels and finally ensure the metastatic lesions (6, 7). As EMT is a regulatory process it is governed by different transcription factors amongst which Twist, Snail and Slug and ZEB1 and ZEB2 are the best characterized ones (8, 9).

Twist was first identified in *Drosophila* and is a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, which has a conserved domain consisting of two α -helices and an interhelical loop. Twist expression down-regulates one key protein of the epithelial state namely E-cadherin and up-

Table I. Antibody dilutions, pre-treatment and visualization of antibody binding sites used in this study.

Antigen	Antibody in DAKO Antibody Diluent Solution	Pre-treatment	Visualization
Twist	1:100, abcam ab 50581	Steamer retrieval solution, DAKO S1699, 121°, 10 min pH=6.1	New Fuchsin
Snail	1:8,000, abcam ab 85931	85° water bath 16h, overnight 4°, DAKO S1699 pH=6.1	DAB Chromogen
Slug	1:100, abcam ab 38551	steamer 100°, 20 min citrate buffer pH=6.0	Permanent Red
ZEB1	1:200, Atlas Antibodies HPA027524	Steamer 121°, 10 min citrate buffer pH=6.0	Permanent Red
ZEB2	1:400, Atlas Antibodies HPA0003456	Steamer 121°, 10 min. citrate buffer pH=6.0	Azo-dye method

regulates a key marker of the mesenchymal phenotype namely N-cadherin. Twist expression has been analyzed in a wide range of human malignancies, including breast cancer, uterine cervical cancer, melanoma, nasopharyngeal carcinoma, prostate cancer, pancreatic cancer and gastric cancer. In most of these cancers entities a high Twist expression was related with a poor prognosis (10, 11).

The Snail family of transcription factors to which Snail and Slug belong bind to the E-boxes of the specific regions of the target genes with C-terminal zinc finger domains. They both repress the epithelial specific E-cadherin, claudin 1 and cytokeratin 18 genes, while they up-regulate the expression of the pro-invasive and mesenchymal genes vimentin and fibronectin and thus the up-regulation of Snail expression correlates with a higher metastatic potential in patients with head and neck carcinomas (9, 12).

ZEB1 and ZEB2 are members of the zinc-finger E-box-binding homeobox factor (ZEB) family and are also known to induce the EMT by repressing the E-cadherin expression. Several studies highlight the significance of their expression during malignant progression in several cancer entities including such as bladder, breast and pancreatic cancer (13), however, the role of ZEB1 and ZEB2 expression in regulating the EMT in HNSCC is still unclear.

The aim of this study was to evaluate the expression of these five different transcription factors which are all involved in EMT in HNSCCs in HNSCC in parallel. Because all of them regulate the EMT it is of interest to analyze whether they are expressed in the same way or whether they might substitute for each other.

Materials and Methods

Immunohistochemistry. A series of 30 HNSCC samples from patients from the ENT Department of the University Medical Center Hamburg Eppendorf were analyzed. The routinely formalin-fixed and paraffin-embedded material was cut in 4 µm sections. The antibodies used are listed in Table I.

For Twist immunohistochemistry, de-paraffinized tissue sections were pre-treated with DAKO S1699 antigen retrieval solution (Dako North America, Inc., Carpinteria, California, USA) in 121°C pressure cooker for 10 minutes. Prior to the next incubation step the sections

were rinsed 2x5 min in Tris buffered saline (TBS, pH 7.6) with 0,1% Tween added (TBS-T) and once in normal TBS with for 5 min. To block non-specific binding sites, the sections were incubated with 10% normal swine serum (DAKO) for 30 min. diluted in TBS before incubation with the 1:100 diluted anti-Twist antibody (abcam, Cambridge, UK #50581). After over night incubation with anti-Twist antibody and proper rinsing, the secondary antibody (swine-anti-rabbit, DAKO), also diluted with TBS (1:200), was applied to the sections. The monoclonal Twist-antibody was detected using the Avidin-Biotin-Complex (ABC) Alkaline Phosphatase method. Visualization of the Alkaline Phosphatase was developed using the simultaneous Azo-dye method with naphtol AS-TR phosphate as the substrate and New Fuch-sin as the Tetrazolium salt (14).

The tissue sections for polyclonal anti-Snail (abcam, ab85931,1:8,000) immunohistochemistry were detected with the Catalyzed Signal Amplification System (CSA System by DAKO). After sections were de-paraffinized, they were incubated with the Peroxidase Block, to inhibit endogenous peroxidase activity, followed by incubating the sections with Avidin-Block and Biotin-Block. In between the steps the sections were rinsed twice with TBS-T and then once with TBS buffer. The sections were then incubated for 15 min with the protein block and tipped-off. After over night incubation with the anti-Snail antibody (abcam ab85931) with a dilution of 1:8,000 and rinsing with TBS, the secondary swine-anti-rabbit (DAKO 1:200) antibody was applied for 20 min. Afterwards the sections were incubated with streptavidin-biotin complex, amplification reagent and streptavidin-HRP respectively for 15 min and rinsed in between the incubation steps. Visualization was achieved using 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB-Chromogen). The regular CSA system is intended for primary mouse antibodies and as our anti-snail antibody is a rabbit polyclonal one we used the system for CSA rabbit link (DAKO K 1498) and our secondary antibody was as described swine-anti-rabbit.

For the detection of Slug immunoreactivity the same procedure as for anti-Twist was followed. The sections were incubated with anti-Slug antibodies (1:100, abcam ab38551) and swine-anti-rabbit secondary antibodies (1:200). Binding sites were visualized using ABC-AP and permanent red.

The primary antibody against ZEB1 (Atlas Antibodies, Bromma, Sweden, HPA027524) was diluted 1:100 in Dako antibody diluent and the secondary antibody swine-anti-rabbit (DAKO) 1:200 in TBS. To detect the antibody APC AP and Permanent Red was used.

The detection system for anti-ZEB2 antibody (Atlas Antibodies, HPA003456) used was the CSA-Kit (abcam). Visualization of the antibody binding site was achieved as described above for the anti-Twist antibody.

Table II. Transcription factor expression in HNSCC cancer cells in our study. Note that Twist is the most commonly expressed transcription factor in HNSCC cells, while ZEB1 and 2 are rarely expressed.

	Twist	Snail	Slug	ZEB1	ZEB2
1	++	++	-	-	+
2	++	+	-	-	+
3	++	++	-	+	-
4	++	+	-	+	-
5	++	+	+	++	-
6	+++	++	+	-	-
7	++	+	-	-	-
8	++	-	-	-	+
9	+	-	-	-	+
10	++	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-
12	-	+	-	-	-
13	++	+	+	-	-
14	+	-	+	-	-
15	-	-	+	-	-
16	+	-	-	-	-
17	++	-	+	-	-
18	+++	-	++	-	-
19	++	-	-	-	-
20	++	-	-	-	-
21	++	+	+	+	-
22	+	-	-	-	+
23	+	-	-	-	-
24	+	+	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	++	-	-	+	-
27	-	-	-	-	-
28	+	+	-	-	-
29	++	++	-	-	+
30	++	+	-	-	-

Table III. Transcription factor expression in the stromal cells of HNSCC in our study. ZEB 1 and 2 were the most expressed transcription factors, that is in contrast to the cancer cells themselves, see Table II.

	Twist	Snail	Slug	ZEB1	ZEB2
1	-	-	-	++	+++
2	+	-	-	+++	+++
3	+	+	-	++	+++
4	+	+	-	++	++
5	++	-	-	+++	+++
6	+	-	-	++	+++
7	-	-	-	+	+++
8	+	+	-	++	+++
9	+	-	-	++	+++
10	+	-	-	+++	+++
11	-	+	-	+++	+++
12	-	-	-	++	+
13	++	+	-	+++	+++
14	-	-	-	+++	-
15	+	+	-	+	-
16	-	-	-	++	+
17	++	++	+	+++	-
18	-	+	-	+++	-
19	++	+	-	+++	-
20	++	+	-	++	-
21	+	++	-	++	+
22	+	-	-	+++	++
23	+	-	-	++	+
24	-	-	-	++	-
25	-	-	-	++	-
26	+	+	-	++	-
27	+	+	-	++	+
28	+	++	-	+++	-
29	-	+	-	+++	+
30	-	-	+	+	-

Primary antibodies were replaced by PBS as a negative control and the rest of the procedures were carried out as described. After the enzymatic color development reaction tissue sections were rinsed in tab water; hemalum was used as a counter-stain followed by further rinse in tab water and a last rinse with distilled water. Finally the sections were dehydrated and cover slipped with Eukitt. Photographs were taken on a Zeiss Axiophot (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) photomicroscope equipped with a Zeiss MRc2 camera.

The immunoreactivity of the different antibodies was semi-quantitatively scored into five different staining intensity levels: negative -, only a few cells or only very weak staining, weak +, moderate ++ and intense +++ immunoreactivity. In some cases, several tissue blocks of different parts of the tumor were available so that the average value of the staining results was scored.

Results

The results of the immunohistochemical staining are shown in Tables II and III. Significant Twist expression was

detected in the nuclei and cytoplasm of the squamous carcinoma cells in 26 of our 30 patients (Figure 1a). Moderate to intense staining was shown in 60% of the cases, weak staining in 27%. The Twist immunoreactivity was unevenly distributed amongst the tumor tissue: the periphery of the tumor showed in 18 out of the 30 patients an increased Twist expression and the centre showed less intensive nuclear staining. The stromal fibroblasts and some smooth muscle cells also showed a positive, but mostly weak Twist expression (47%), whereas a moderate positivity was only presented in 5 cases. No significant difference in Twist expression between the periphery and central area of the stromal compartment was observed.

Snail showed nuclear and cytoplasmic expression (Figure 1b). Fifty percent of the patients showed expression in the nuclei of the cancer cells and also 50% in the nuclei of stromal fibroblasts although in average the expression was mostly weak. Out of all patients with tumor expression only

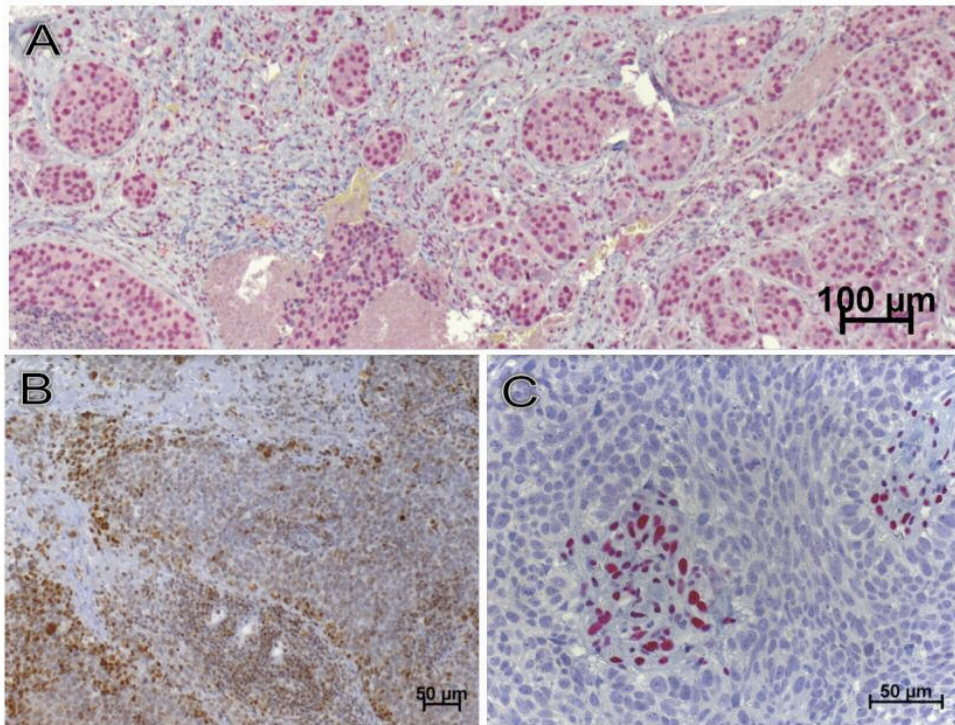


Figure 1. Expression of transcription factors in HNSCCs. A: An intensive Twist expression was observed in the nuclei of the cancer cells and a weaker intensity was noted in their cytoplasm. In addition, nuclei of stromal fibroblasts were also Twist-positive. B: A similar expression pattern was observed in Snail. Note that the center of the tumor is less intensively stained for Twist compared to the margin of the tumor to the tumor stroma. C: In contrast to Twist and Snail, ZEB1 is only expressed in the stromal cells.

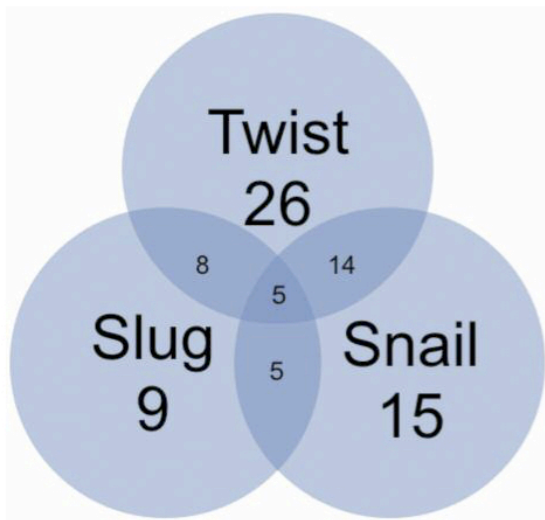


Figure 2. Correlation of Twist, Snail and Slug expression in HNSCC cancer cells. Twist is the most commonly expressed transcription factor and its expression is often correlated with Snail and Slug expression.

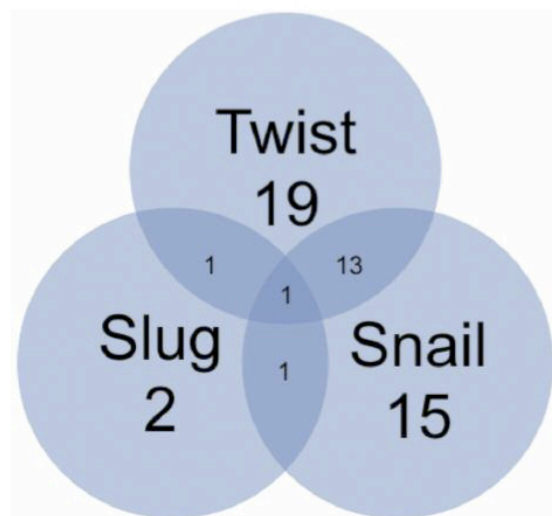


Figure 3. Correlation of Twist, Snail and Slug expression in the stromal cells of HNSCCs.

four cases showed a moderate intensity, the rest only weak or no Snail expression; in the group with stromal expression only three cases showed moderate expression. In six out of the 30 patients we found a higher Snail expression in the periphery of the tumor than in its central areas. In the remaining patients no different expression pattern between the periphery and the center of the tumor could be observed.

The nuclei of cancer cells showed only in 6 cases a partial Slug immunoreactivity of scattered cancer cells. In 30% of the patients a generally weak expression was detected in the cytoplasm of the cancer cells. In 70% of the patients no Slug expression in the tumor cells was shown at all. Less than 1% expression was detected in the stromal fibroblasts. Slug expression showed a great heterogeneity in its expression even in the same patient.

ZEB1 was expressed in the stromal fibroblasts in all cases (Figure 1c). In 17% of the cases the nuclei of individual and scattered tumor cells showed a weak positive ZEB1 immunoreactivity. In contrast, the majority of the nuclei of stromal fibroblasts were moderately to intensively immunoreactive for ZEB1 in 90% of the cases. No differences in the intensity of ZEB1 immunoreactivity in the nuclei of stromal fibroblasts was seen between the center and the periphery of the tumor. A very intense ZEB1 immunoreactivity was seen in the nuclei of endothelial cell and lymphocytes surrounding the blood vessels in 33% of the cases.

ZEB2 was also mostly expressed in the nuclei of stromal cells in 63% of the cases. The variation of the expression of ZEB2 was considerable; in some cases no ZEB2 expression in the stroma was seen at all and in some cases a very strong stromal expression with a high intensity was observed. In 30% of the cases a very strong ZEB2 immunoreactivity was noted in the nuclei of tumor blood vessels. In 20% of the cases individual cancer cell nuclei showed a weak ZEB2 expression. These single cancer cell nuclei were mostly located in the nuclei of cancer cells in the periphery of the tumor. In 58% of the patients the stromal cells expressed ZEB2 with an intensity varying from weak to intense.

Discussion

EMT is key process of metastasis formation and is regulated by a number of transcription factors including Twist, Snail, Slug, ZEB1 and ZEB2. This study was initiated to investigate if their expression is correlated in HNSCCs. Previous reports have demonstrated that the overexpression of some of these transcription factors is associated with tumor metastasis in breast cancer (12, 15), pancreatic cancer (16, 17) and gastric cancer (18).

In HNSCC Twist, Snail and Slug are reported to be the most significant factors for EMT (19). In accordance with this report, Twist was highly and most abundantly expressed in 26/30 cases in the cancer cells, followed by Snail, which was expressed only

in half of our cases and Slug which was expressed in only about one third of the cases (9/30). Therefore, our samples are representative with the previously published results (19). ZEB1 (6/30) and ZEB2 (6/30) were only expressed in a minority of cases in the cancer cells, while ZEB1 was expressed in the stromal fibroblasts in all cases and ZEB2 in half of the cases in the stromal fibroblasts showing an internal validation of the immunohistochemical staining (Tables II and III).

Concerning the co-expression of these transcription factors, a correlation of the EMT related transcription factors Twist, Snail and Slug were noted in the cancer cells (Figure 2): 14 out of the 15 Snail-positive patients showed also Twist expression in the cancer cells and 8 out of the 9 Slug-positive cancers showed Twist expression as well. Out of the 15 Snail-positive cancers, only 5 were also Slug-positive and all those were also Twist-positive. So Twist and Slug as well as Twist and Snail are highly associated in their expression, while Slug and Snail co-expression (5 cases only) was more rarely observed. ZEB1 and ZEB2 expression in cancer cells is mutually exclusive as the 6 positive ZEB1 case are all ZEB 2 negative (6 cases as well). This co-expression of the three main transcription factors Twist, Snail and Slug is not only of theoretical interest as inhibitors for all these transcription factors have been developed (20-22). It is therefore attractive to hypothesize that in those cases in which two or three of these transcription factors are expressed in the cancer cells a combination of these inhibitors might be therapeutically more successful than their single use.

Transcription factor expression was not restricted to the cancer cells themselves but was also noted in the stromal compartment (Figure 3). Concerning the stromal compartment a co-expression of Twist and Snail, which were also the most expressed transcription factors in the cancer cell compartment, was also noted in fibroblasts in 13 cases, while Slug expression is rare with only two positive cases and one each with Twist and Snail co-expression, respectively.

Further 17 Twist and 7 Snail cases showed positivity in cancer as well as in the stromal cell compartment. In 5 of the 30 cases both transcription factors were expressed in both mentioned cell compartments.

Numerous studies over the past years have confirmed that cells which undergo the EMT are more likely to disseminate, however, new studies showed, that the expression of these transcription factors alone is not sufficient for a straight forward influence on tumor progression, invasion or metastasis (23, 24). Our findings corroborate the latter hypothesis because in case of an expression of any investigated transcription factor the vast majority of the cancer cells in our series expressed the transcription factor while only a very minor portion of disseminated cancer cells are able to form metastases (4).

According to a recent study, tumor cells in the primary tumor or in the metastatic lesions can either reveal an epithelial

or mesenchymal phenotype (23). For this transition to occur in general, the pleiotropically active transcription factors ZEB1 and ZEB2 have been made responsible (4), however, as they are both rarely expressed in our HNSCC series they are unlikely to play a major role in this tumor entity. In contrast, many tumor cells in our cases showed Twist expression both in the cancer cells and in the fibroblasts of the tumor stroma, which probably indicates that cancer cells in these tumors have the potency to transit into a mesenchymal phenotype.

This mesenchymal phenotype may be of greater clinical importance in the context of chemotherapy resistance. Recent studies in breast and pancreatic cancer demonstrated the chemoresistance of EMT modified cancer cells. Conventional chemotherapy is affected negatively by the chemoresistance of these mesenchymally differentiated tumor cells (23, 26) as tumor cells with a mesenchymal phenotype may have an increased apoptotic tolerance (23). Therefore EMT associated transcription factors may be of greater clinical importance for prediction chemotherapy resistance than for predicting metastatic spread.

References

- 1 Dohadwala M, Wang G, Heinrich E, Luo J, Lau O, Shih H, Munaim Q, Lee G, Hong L, Lai C, Abemayor E, Fishbein MC, Elashoff DA, Dubinett SM and St John MA: The role of ZEB1 in the Inflammation-induced promotion of EMT in HNSCC. *Otolaryngol Head Neck Surg* 142(5): 753-759, 2010.
- 2 Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz Jr. M, Woolgar JA, Triantafyllou A, Mondin V, Paccagnella D, de Bree R, Ashok R, Shaha AR, Dana M, Hartl DM and Ferlito A: Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part 1. Basic aspects. *Oral Oncol* 48(9): 775-779, 2012.
- 3 Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT and Ribeiro DA: Metastasis from oral cancer: An overview. *Cancer Genomics Proteomics* 9: 329-336, 2012.
- 4 Valastyan S and Weinberg RA: Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell Press* 147(2): 275-292, 2011.
- 5 Jung HJ: Chemical proteomic approaches targeting cancer stem cells: A review of current literature. *Cancer Genomics Proteomics* 14: 315-327, 2017.
- 6 Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transition in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454, 2002.
- 7 Kalluri R and Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6): 1420-8, 2009.
- 8 Samatov TR, Tonevitsky AG and Schumacher U: Epithelial-mesenchymal Transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol Cancer* 12: 107, 2013.
- 9 Scully OJ, Bay BH, Yip G and Yu Y: Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 9(5): 311-320, 2012.
- 10 Je EC, Lca BS, and Ga GA: The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells. *J Genet Syndr Gene Ther* 4: 1, 2013.
- 11 Lee KW, Kim JH, Han S, Sung CO, Do IG, Ko YH, Um SH and Kim SH: Twist1 is an independent prognostic factor of esophageal squamous cell carcinoma and associated with its epithelial-mesenchymal transition. *Ann Surg Oncol* 19(1): 326-335, 2012.
- 12 Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, Virtanen I, Kataja V, Auvinen P, Mannermaa A and Kosma VM: Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 11: 73, 2011.
- 13 Chu PY, Hu FW, Yu CC, Tsai LL, Yu CH, Wu BC, Chen YW, Huang PI and Lo WL: Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck can-cer. *Oral Oncol* 49: 34-41, 2013.
- 14 Barka T and Anderson PJ: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J Histochem Cytochem* 10: 741-753, 1962.
- 15 Martin TA, Goyal A, Watkins G and Jiang WG: Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 12(6): 488-496, 2005.
- 16 Ebine K, Chow CR, DeCant BT, Hattaway HZ, Grippo PJ, Kumar K & Munshi HG: Slug inhibits pancreatic cancer initiation by blocking Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Sci Rep* 6: 29133, 2016.
- 17 Elaskalani O, Razak NB, Falasca M, and Metharom P: Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer: *World J Gastrointest Oncol* 9(1): 37-42, 2017.
- 18 Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, Höfler H and Becker KF: Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators Snail, SIP1, and Twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 151(5): 1881-1891, 2002.
- 19 Smith A, Teknos TN and Pan Q: Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49(4): 287-292, 2013.
- 20 Khan MA, Chen HC, Zhang D and Fu J: Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol* 34(5): 2497-2506, 2013.
- 21 Azmi AS, Bollig-Fischer A, Bao B, Park BJ, Lee SH, Yong-Song G, Dyson G, Reddy CK, Sarkar FH and Mohammad RM: Systems analysis reveals a transcriptional reversal of the mesenchymal phenotype induced by SNAIL-inhibitor GN-25. *BMC Syst Biol* 7: 85, 2013.
- 22 Harney AS, Lee J, Manus LM, Wang P, Ballweg DM, LaBonne C and Meade TJ: Targeted inhibition of Snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-Co(III) Schiff base conjugate. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(33): 13667-13672, 2009.
- 23 Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Seongho Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V and Gao D: Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527: 472-476, 2015.
- 24 Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS and Kalluri R: Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527: 525-530, 2015.
- 25 Lambert AW, Pattabiraman DR and Weinberg RA: Emerging biological principles of metastasis. *Cell Press* 168(4): 670-691, 2017.
- 26 Bharti R, Dey G and Mandal M: Cancer development, chemoresistance, epithelial to mesenchymal transition and stem cells: A snapshot of IL-6 mediated involvement. *Cancer Lett* 375(1): 51-62, 2016.

Received August 1, 2017
 Revised September 7, 2017
 Accepted September 11, 2017

2. Einleitung

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich gehören weltweit zu den am häufigsten auftretenden Krebsarten (Dohadwala et al. 2010, Masui et al. 2014). Meist sind die Kopf-Hals-Karzinome lokal begrenzt und nur in seltenen Fällen kommt es zu einer entfernten Streuung des Tumors, der sogenannten Metastasierung (Takes et al. 2012). Sobald sich jedoch Metastasen gebildet haben, ist die Prognose schlecht und es ist mit einer geringen Überlebensrate zu rechnen (Noguti et al. 2012, Masui et al. 2014).

Valastyan und Weinberg beschrieben 2011 die Metastasierung als einen hochkomplexen Prozess. Die metastasierende Zelle muss vorerst den Kontakt zu den benachbarten Zellen verlieren, um in die extrazelluläre Matrix und anschließend in die Blutgefäße einzudringen. Sobald die Zelle den Weg überstanden hat und im Gewebe des Zielorgans eingedrungen ist, wird durch Zellteilung eine Metastase gebildet (Valastyan und Weinberg 2011).

Ein entscheidender Vorgang bei der Metastasierung ist die epithelial-mesenchymale Transition. Dieser morphogenetische Prozess erlaubt der Krebszelle sich vom Primärtumor zu lösen und in umliegende Organe zu wandern. Während des Vorgangs werden die epithelialen Eigenschaften der Zelle herunterreguliert und die mesenchymalen Eigenschaften hochreguliert (Thiery 2002, Kalluri und Weinberg 2009). Dieser Prozess wird durch die Transkriptionsfaktoren gesteuert. Twist, Snail, Slug, ZEB1 und ZEB1 gehören zu den am Besten untersuchten Transkriptionsfaktoren, die den Prozess der epithelial-mesenchymalen-Transition regulieren (Scully et al. 2012, Samatov et al. 2013).

Der basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor Twist reguliert das wichtige epitheliale Protein E-Cadherin herunter und den Marker für den mesenchymalen Phänotypen, das N-Cadherin, hoch (Lee et al. 2012, Je et al. 2013).

Snail und Slug gehören zu der Snail Familie der Transkriptionsfaktoren. Diese binden an E-Boxen der speziellen Areale der Zielgene mit C-terminalen Zink Finger Domänen. Beide unterdrücken die Synthese von E-Cadherin, Claudin 1 und Zytokeratin 18, während die Synthese der proinvasiven und mesenchymalen Gene Vimentin und Fibronectin hochreguliert wird (Soini et al. 2011).

ZEB1 und ZEB2 gehören zur ZEB Familie und veranlassen die EMT auch durch Unterbindung der E-Cadherin Expression (Chu et al. 2013).

Ziel dieser Studie war es die Exprimierung dieser Transkriptionsfaktoren in Kopf-Hals-Tumoren zu untersuchen und zu prüfen, ob diese in der Expression miteinander korrelieren.

3. Material und Methoden

Für diese Untersuchungen wurden 30 Gewebeproben von Kopf-Hals-Karzinomen von Patienten des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf verwendet. Um die Transkriptionsfaktoren in den Präparaten nachzuweisen, wurden diese mit jeweiligen Antikörpern durch immunhistochemische Färbungen markiert.

Die mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden vorab in 4 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom geschnitten.

Der Antikörper gegen Twist wurde, nachdem die Gewebeproben deparaffiniert wurden, mit DAKO 1699 Antigen Retrieval Solution für 10 Minuten in einem 121°C heißen Drucktropf vorbehandelt. Anschließend wurden die Schnitte zwei mal jeweils für 5 Minuten mit TBS-T (Tris-buffer Saline und 0,1% Tween) und einmal für 5 Minuten mit normalen TBS Puffer gespült. Um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, wurden die Proben für 30 Minuten mit 10% normalem Schweineserum inkubiert. Der anti-Twist Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und wirkte über Nacht ein. Am nächsten Tag und erneutem Spülen wurde der sekundäre Antikörper (Schwein-Anti-Kaninchen) mit einer Verdünnung von 1:200 in TBS aufgetragen. Der monoklonale Antikörper wurde mit dem Avidin-Biotin-Komplex und der alkalischen Phosphatase markiert und anschließend die Bindungsstelle mit Neufuchsin sichtbar gemacht.

Snail wurde mit dem Catalyzed Signal Amplification System (CSA System, DAKO) nachgewiesen. Um eine unspezifische Peroxidasereaktion zu vermeiden, wurden die endparaffinierten Schnitte zur Hemmung der endogenen Peroxidase vorerst mit dem Peroxidase Block behandelt. Anschließend wurde der Avidin- und Biotin Block aufgetragen. Zwischen den einzelnen Schritten wurde wie vorher beschrieben jeweils mit TBS-T und TBS gespült. Nach 15 minütiger Einwirkung des Proteinblocks wurde der anti-Snail Antikörper mit einer Verdünnung von 1:8000 aufgetragen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde erst für 20 Minuten der sekundäre Antikörper (Swine-Anti-Kaninchen) und anschließend der Streptavidin-Biotin-Complex, Amplification Reagenz und Streptavidin-HRP für 15 Minuten auf die Präparate gebracht. Der letzte Schritt zur Visualisierung erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB-Chromogen).

Die Antikörperfärbung von Slug erfolgte auf gleiche Weise wie bei anti-Twist. Der primäre Antikörper wurde 1:100 und der sekundäre Antikörper (Schwein-Anti-Kaninchen) wurde 1:200 mit TBS verdünnt. Sichtbar gemacht wurde Slug mittels ABC-AP und dem Substrat Permanent Red.

Der Antikörper gegen ZEB1 wurde 1:100 und der Antikörper gegen ZEB2 1:400 mit TBS verdünnt. Zur Visualisierung wurde bei ZEB1 ebenso ABC-AP und Permanent Red verwendet. Als Detektionssystem für ZEB 2 wurde ebenfalls das CSA-Kit verwendet und als Farbstoff wurde eine Entwicklungslösung mit einem Azofarbstoff verwendet.

Bei den Negativkontrollen wurde der primäre Antikörper jeweils durch PBS (Phosphate Buffer Solution) ersetzt. Für die Gegenfärbung wurde durchgehend Hämalaun verwendet.

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden abschließend entwässert und mit Eukitt eingedeckelt. Es wurden Fotos mit einem Zeiss Axiophot Fotomikroskop und dazugehöriger Zeiss MRc2 Kamera erstellt.

Bei der Analyse der Proben wurde die Immunreaktivität in verschiedene Stärkegrade unterteilt: negativ -, sehr schwache Färbung oder nur Anfärbung einzelner Zellen +, moderat + und starke Färbung +++.

In einigen Fällen waren mehrere Schnitte eines Patienten vorhanden, dort wurde der Durchschnittswert notiert.

4. Ergebnisse

Twist wurde in den Tumoren bei Karzinomzellen in 26 von 30 Patienten im Zellkern und im Zytoplasma der Epithelzellen exprimiert. In 60% der Fälle gab es eine moderate bis intensive Färbung der Zellen und in 27% eine schwache Färbung.

Die Exprimierung von Twist variierte im Bereich des Tumors. 18 von 30 Patienten wiesen eine erhöhte Twist Expression in den Tumorzellen in der Peripherie im Vergleich zu dem Zentrum des Tumors auf. Weiter zeigten auch vereinzelt Fibroblasten und glatte Muskelzellen eine leicht positive Immunreaktivität (47%). Im Stroma unterschieden sich allerdings die peripheren nicht von den zentralen Bereichen.

Snail wurde sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert. Die Färbung mit Snail war überwiegend schwach. 50% der Fälle zeigten positiv angefärbte Zellkerne in den Tumorzellen und zusätzlich in den Fibroblasten des Stromas. Eine moderate Färbung konnte bei nur vier Fällen festgestellt werden. Eine erhöhte Snail Immunreaktivität in der Peripherie des Tumors zeigten sechs Patienten.

Slug wurde in nur 6 Fällen vereinzelt in Zellkernen der Tumorzellen beobachtet. 30% der Patienten wiesen eine vorwiegend schwache Immunreaktivität im Zytoplasma der Tumorzellen auf. In 70% der Fälle war allerdings keine Immunreaktivität in den Tumorzellen zu erkennen.

Sowohl ZEB1, also auch ZEB2, wurde fast ausschließlich in den Zellen des Stromas exprimiert. Der Transkriptionsfaktor ZEB1 wurde bei jedem der Patienten in den Fibroblasten des Stromas nachgewiesen. Nur 17% zeigten eine leichte positive ZEB1 Färbung in den Zellkernen von einzelnen, verstreuten Tumorzellen. In 33% der Patienten wurden die Zellkerne des Endothels und Lymphozyten um die Blutgefäße mit sehr intensiver Immunreaktivität beobachtet.

ZEB2 Immunreaktivität wurde in 63% der Fälle auch in den Stromazellen beobachtet, jedoch variierte das Ausmaß der Intensität der Färbung beträchtlich. Einige Fälle zeigten auch keinerlei Expression in den Zellen des Stromas und andere wiederum eine sehr starke Immunreaktivität. In 30% der Patientenfälle wurden stark positive Kerne der Blutgefäße registriert. In nur 20% der Fälle wurde eine leichte ZEB2 Färbung der Tumor Zellkerne beobachtet, diese befanden sich vorwiegend in der

Peripherie. In 58% der Patienten schwankte die Intensität der ZEB1 positiv gefärbten Fibroblasten von schwach bis intensiv.

5. Diskussion

Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren regulieren die epithelial-mesenchymal-Transition während des komplexen Vorgangs der Metastasierung von bösartigen Tumoren.

Insbesondere Twist, Snail, Slug, sowie ZEB1 und ZEB2 treten in diversen Studien als Haupttranskriptionsfaktoren bei der Regulation von EMT auf (Chu et al. 2013, Samatov et al. 2013, Smith et al. 2013). Allerdings wurde die Expression dieser fünf Transkriptionsfaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen noch nicht parallel untersucht und miteinander verglichen, folglich war das Ziel dieser Arbeit zu analysieren, ob die Expression dieser Faktoren miteinander korreliert.

In unserer Versuchsreihe zeigte Twist die stärkste und häufigste Expression. In 26 von unseren 30 Patientenproben wurde Twist in den Krebszellen nachgewiesen. Snail wurde nur in der Hälfte der Fälle und Slug sogar nur in einem Drittel exprimiert. Diese Ergebnisse stimmen mit vorigen Studien überein (Smith et al. 2013). ZEB1 und ZEB2 wurden vorwiegend im Stroma exprimiert und nur in seltenen Fällen auch in den Krebszellen selbst nachgewiesen. Die Fibroblasten des Stromas waren bei allen Patienten ZEB1-positiv und bei der Hälfte der Patienten ZEB2-positiv, was in unserer Studie nur eine interne Überprüfung der immunhistochemischen Färbung darstellte.

Der Vergleich der Expression von Twist, Snail und Slug in den Tumorzellen deutet auf einen Zusammenhang. 15 Patienten zeigte eine positive Snail-Immunreaktivität und 14 dieser Patienten wiesen auch eine positive Twist-Immunreaktivität auf. Ebenso wurde in 8 der 9 Slug-positiven Fälle auch Twist exprimiert. Des Weiteren zeigten von den 15 Snail-positiven Patienten nur 5 Fälle eine positive Slug Färbung. Allerdings waren diese 5 Slug-positiv gefärbten Kopf-Hals-Tumore auch zeitgleich Twist-positiv. Folglich korreliert die Expression von Twist und Slug, sowie Twist und Snail deutlich miteinander. Wiederum besteht bei der Exprimierung von Slug und Snail (Koexpression in 5 Fällen) ein nur geringfügiger, also wenig aussagekräftiger, Zusammenhang.

Die Ergebnisse von ZEB1 und ZEB2 sind zu vernachlässigen, da die nur 6 ZEB1-positiven Fälle keine Immunreaktivität bei der ZEB2 Färbung aufwiesen.

Der Zusammenhang der koexprimierten Transkriptionsfaktoren Twist, Snail und Slug könnte klinisch von Nutzen sein, da es bereits einige Hemmstoffe gegen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren auf dem Markt gibt (Harney et al. 2009, Khan et al. 2013, Azmi et al. 2013). Möglicherweise wäre es klinisch von Vorteil, wenn bei einem Patienten mehrere der jeweiligen Transkriptionsfaktoren in den Tumorzellen exprimiert sind, diese mit einem Medikament zu hemmen, welches die einzelnen Inhibitoren kombiniert. Somit könnte auch die Wechselwirkung der einzelnen Transkriptionsfaktoren verhindert werden.

In diversen Studien wurde die epithelial-mesenchymale- Transition als ein entscheidender Prozess bei der Tumormetastasierung beschrieben. Die Epithelzellen, die durch die EMT einen mesenchymalen Phänotyp erhalten, metastasieren eher in das umliegende Gewebe. Doch neuere Studien widerlegen teilweise diese These, da festgestellt wurde, dass diese EMT induzierenden Transkriptionfaktoren nicht allein maßgebend für das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung sind (Fischer et al. 2015, Zheng et al. 2015). Auch Zellen mit epitheliale Phänotyp lösen sich von ihrem Zellverband und können metastasieren.

Auch unsere Ergebnisse stützen die These, dass die Transkriptionfaktoren und die EMT für die Metastasierung nicht allein notwendig ist. Ein großer Teil unserer Patienten exprimiert nämlich diese Transkriptionfaktoren, doch klinisch ist nur ein geringer Anteil der sich verbreiteten Krebszellen letztendlich fähig Metastasen zu bilden (Valastyan und Weinberg 2011). Somit werden noch weitere entscheidende Prozesse vermutet, die in dem komplexen Vorgang der Bildung von Metastasen beteiligt sind und diese gilt es zu erforschen.

Nach der Studie von Fischer et al. (2015) können Krebszellen, egal ob Primärtumor oder als Metastase, einen mesenchymalen oder epithelialen Phänotypen aufweisen. ZEB1 und ZEB2 sollen an diesem pleiotropen Effekt maßgeblich beteiligt sein (Valastyan und Weinberg 2011). Da die Transkriptionsfaktoren allerdings eine kaum positive Immunreaktivität in den Tumorzellen aufwiesen, ist die Bedeutung dieser für Kopf-Hals-Tumoren vermutlich eher gering.

Der mesenchymale Phänotyp scheint darüber hinaus im Rahmen der Chemotherapie eine signifikante Rolle zu spielen. Die Studien von Fischer et al. (2015) und Bharti et al. (2015) untersuchten die Chemoresistenz der Krebszellen, die die epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen haben. Der programmierte Zelltod, die

Apoptose, die durch herkömmliche Chemotherapie bei den Krebszellen hervorgerufen werden soll, tritt bei diesen modifizierten Zellen mit mesenchymalen Phänotypen nämlich nicht zwangsläufig ein. Diese Zellen scheinen eine erhöhte Resistenz gegenüber den während der Chemotherapie verabreichten Zytostatika zu haben.

Die Blockade von EMT Transkriptionsfaktoren führt zwar nicht zwangsläufig zu einem geringeren Metastasierungspotenzial, allerdings hat das Überleben der EMT Krebszellen während der Chemotherapie womöglich indirekten Einfluss auf das Metastasierungspotenzial. Je mehr EMT Krebszellen dem programmierten Zelltod entkommen, desto mehr Krebszellen haben die Möglichkeit weiter zu metastasieren.

Daher ist zu überlegen, insbesondere während der Chemotherapie, die EMT Transkriptionsfaktoren direkt anzugreifen, damit mehr Zellen durch Apoptose zugrunde gehen. Diesbezüglich sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

6. Zusammenfassung

Die Transkriptionsfaktoren Twist, Snail, Slug, ZEB1 und ZEB2 sind an der Steuerung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) im Rahmen der Metastasierung von bösartigen Tumoren maßgeblich beteiligt. Bisher wurde die Expression dieser Transkriptionsfaktoren nur einzeln betrachtet. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression aller dieser fünf Transkriptionsfaktoren in einem Kollektiv von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches zu untersuchen. Im Rahmen unserer Untersuchungen an Kopf-Hals-Tumoren wurde Twist in den Tumorzellen am stärksten exprimiert. Snail und Slug hingegen zeigten nur geringe Immunreaktivität in den Plattenepithelkarzinomzellen. Die Expression von ZEB1 und ZEB2 in den Tumorzellen selbst ist zu vernachlässigen, diese wurden fast ausschließlich im Stroma exprimiert. Twist scheint damit der bedeutendste Transkriptionsfaktor, welcher die EMT reguliert, in dieser Tumorentität zu sein. Trotzdem besteht ein Zusammenhang dieser drei Transkriptionsfaktoren, da sowohl die Expression von Twist und Snail, als auch von Twist und Slug, miteinander korreliert waren.

Summary

The epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is a key process during the metastatic cascade in malignant tumors, is operated by the transcription factors Twist, Snail, Slug, ZEB1 and ZEB2. So far the expression of these transcription factors has been only been studied individually. The aim of this study was to investigate and compare the expression of all five transcription factors collectively in a patient cohort of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Twist was expressed in the cancer cells in a major proportion of our patients with HNSCC. The immunoreactivity of Snail and Slug in squamous cell carcinoma cells was much less. The expression of ZEB1 and ZEB2 is negligible as they were generally expressed in the stromal cells only and not in the cancer cells themselves. Twist seems to be the most significant transcription factor regulating the EMT in HNSCC. Nonetheless the expression of Twist and Snail as well as Twist and Slug is highly associated and consequently there is a connection between these three transcription factors.

7. Literaturverzeichnis

Azmi AS, Bollig-Fischer A, Bao B, Park BJ, Lee SH, Yong-Song G, Dyson G, Reddy CK, Sarkar FH and Mohammad RM: Systems analysis reveals a transcriptional reversal of the mesenchymal phenotype induced by SNAIL-inhibitor GN-25. *BMC Syst Biol* 7:85, 2013.

Bharti R, Dey G and Mandal M: Cancer development, chemoresistance, epithelial to mesenchymal transition and stem cells: A snapshot of IL-6 mediated involvement. *Cancer Lett* 375(1): 51-62, 2016.

Chu PY, Hu FW, Yu CC, Tsai LL, Yu CH, Wu BC, Chen YW, Huang PI and Lo WL: Epithelial–mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer. *Oral Oncol* 49: 34-41, 2013.

Dohadwala M, Wang G, Heinrich E, Luo J, Lau O, Shih H, Munaim Q, Lee G, Hong L, Lai C, Abemayor E, Fishbein MC, Elashoff DA, Dubinett SM and St John MA: The role of ZEB1 in the Inflammation-induced promotion of EMT in HNSCC. *Otolaryngol Head Neck Surg* 142(5): 753-759, 2010.

Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Seongho Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V and Gao D: Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527: 472-476, 2015.

Harney AS, Lee J, Manus LM, Wang P, Ballweg DM, LaBonne C and Meade TJ: Targeted inhibition of Snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-Co(III) Schiff base conjugate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(33): 13667-13672, 2009.

Je EC, Lca BS, and Ga GA: The Role of transcription factor TWIST in cancer cells. *J Genet Syndr Gene Ther* 4:1, 2013.

Kalluri R and Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119(6): 1420-8, 2009.

Khan MA, Chen HC, Zhang D and Fu J: Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biol* 34(5):2497-2506, 2013.

Lambert AW, Pattabiraman DR and Weinberg RA: Emerging biological principles of metastasis. *Cell Press* 168(4): 670-691, 2017.

Lee KW, Kim JH, Han S, Sung CO, Do IG, Ko YH, Um SH and Kim SH: Twist1 is an independent prognostic factor of esophageal squamous cell carcinoma and associated with its epithelia-mesenchymal transition. *Ann Surg Oncol* 19(1): 326-335, 2012.

Masui T, Ota I, Yook JI, Mikami S, Yane K, Yamanaka T and Hosoi H. Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 44(3): 693-9, 2014.

Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT and Ribeiro DA: Metastasis from oral cancer: An overview. *Cancer Genomics Proteomics* 9: 329-336, 2012.

Samatov TR, Tonevitsky AG and Schumacher U: Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol Cancer* 12:107,2013.

Scully OJ, Bay BH, Yip G and Yu Y: Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 9(5): 311-320, 2012.

Smith A, Teknos TN and Pan Q: Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49(4): 287-292, 2013.

Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, Virtanen I, Kataja V, Auvinen P, Mannermaa A and Kosma VM: Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 11:73, 2011.

Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz Jr. M, Woolgar JA, Triantafyllou A, Mondin V, Paccagnella D, de Bree R, Ashok R, Shaha AR, Dana M, Hartl DM and Ferlito A: Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part 1. Basic aspects. *Oral Oncol* 48(9): 775-779, 2012.

Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transition in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454, 2002.

Valastyan S and Weinberg RA: Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell Press* 147(2): 275-292, 2011.

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS and Kalluri R: Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527: 525-530, 2015.

8. Erklärung des Eigenanteils

Die Idee dieser experimentellen Studie kam von meinem Doktorvater und Institutsleiter Herr Prof. Dr. Udo Schumacher.

Die hierfür benötigten Präparate stellten uns Herr Dr. Adrian Münscher und Herr Dr. Nikolaus Möckelmann aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde zu Verfügung. Herr Prof. Dr. Guido Sauter und seinem Team aus dem Institut für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie präparierten die Gewebeproben.

Die Vorbereitung der Gewebeschnitte erfolgte von mir im Labor des Instituts für Anatomie und experimentelle Morphologie. Nach Einarbeitung durch die MTAs des Instituts führte ich die immunhistochemischen Färbungen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren eigenständig durch.

Bei der mikroskopischen Diagnostik der einzelnen Färbungen unterstützte mich Herr Prof. Dr. Schumacher. Das Manuskript wurde selbstständig von mir geschrieben und regelmäßig von Herrn Prof. Schumacher überprüft und ergänzt.

Die Tabellen und Grafiken der Publikation wurden eigenhändig von mir erstellt.

9. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mit unermüdlicher Hilfsbereitschaft und Motivation zum guten Gelingen beitrug.

Danken möchte ich außerdem Herrn Dr. Adrian Münscher und Herrn Dr. Nikolaus Möckelmann für die Versorgung mit den Gewebeproben.

Bei Herrn Prof. Dr. Guido Sauter und seinem Team möchte ich mich recht herzlich für die Fixierung der Gewebeproben bedanken.

Ebenso gebührt mein Dank den MTAs, die mich in die Methodik einarbeiteten.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern und meiner Großmutter für den emotionalen Rückhalt und die immerwährende Unterstützung und Motivation.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: