

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Operative Medizin  
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c.  
Jakob R. Izbicki

## **Auswirkung einer Tn-Antigen-Expression auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Maya Charline Reinecke  
aus Hamburg

Hamburg 2022

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:**

06.01.2023

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

PD Dr. Marianne Sinn

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**

Prof. Dr. Maximilian Bockhorn

# Inhalt

Inhalt.....	3
Arbeitshypothese und Fragestellung .....	6
1. Einleitung.....	7
1.1 Das Pankreaskarzinom .....	7
1.1.1 Anatomie des Pankreas.....	7
1.1.2 Das Pankreaskarzinom .....	8
1.1.3 Epidemiologie.....	9
1.1.4 Ätiologie und Risikofaktoren .....	9
1.1.5 Pathogenese.....	10
1.1.6 Pathologie .....	12
1.1.7 Therapieoptionen.....	12
1.1.8 Prognose.....	13
1.1.9 Bedeutung einer Kras-Mutation.....	14
1.2 Glykosylierung .....	15
1.2.1 Glykane.....	15
1.2.2 O-GalNAc Glykosylierung .....	16
1.2.3 Pathologisch veränderte Glykansynthese .....	17
1.2.4 Das Tn-Antigen .....	18
1.2.5 Das molekulare Chaperon Cosmc .....	19
1.2.6 Bedeutung des Tn-Antigens für neue Therapien .....	19
1.3 Signalwege.....	21
1.3.1 Der Map-Kinase-Signalweg .....	21
1.3.2 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	23
1.3.3 Der PI3K/Akt-Signalweg .....	25
1.3.4 Der Apoptose-Signalweg .....	27
1.3.5 Der Shh/ Patched-Signalweg.....	28
1.4 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT).....	30
2. Material und Methoden .....	32
2.1 Material .....	32
2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.2 Onlinedatenbanken und Werkzeuge .....	33
2.1.3 Mausmodelle.....	33
2.1.4 Primär Antikörper.....	34

2.1.5 Sekundär Antikörper .....	37
2.1.6 Lektine .....	37
2.1.7 Molekulargewichtstandards.....	38
2.1.8 Häufig verwendete Lösungen und Puffer .....	39
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Herstellung eines Lysates .....	41
2.2.2 Sialyl-Verdau.....	41
2.2.3. Gewebefraktionierung .....	42
2.2.4 Immunblot-Analyse (Western Blot) .....	43
2.2.4.1 BCA-Test (Proteinbestimmung).....	43
2.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	43
2.2.4.3. Elektrophoretischer Membranentransfer .....	44
2.2.4.4. Immunreaktion .....	45
2.2.4.5. ECL Detektion .....	45
2.2.4.6 Entfernung der Antikörper des Western Blots .....	46
2.2.5 Immunhistochemie .....	47
2.2.5.1 Entparaffinierung.....	47
2.2.5.2. Antikörperfärbung.....	48
2.2.5.3. Fluoreszenzfärbung .....	49
2.2.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	50
2.2.7. Masson-Goldner-Trichom-Färbung.....	51
3. Ergebnisse .....	53
3.1 Grundlagen.....	53
3.2 Makroskopische Analyse der Pankreata .....	53
3.3 Analyse der Organgewichte .....	54
3.4 Histologische Analyse der Pankreata .....	55
3.5 Histopathologische Charakterisierung .....	56
3.6 Proliferation .....	57
3.7 Differentielle O-Glykosylierung.....	58
3.8 Sialyl-Verdau.....	67
3.9 Lysatfraktionierungen .....	68
3.10 Fibrosierung .....	71
3.11 Veränderung der Signalkaskaden.....	74
3.11.1 Map-Kinase Signalweg .....	74
3.11.2 NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	75
3.11.3 PI3K/Akt-Signalweg .....	76

3.11.4 Caspase/ Apoptose-Signalweg .....	78
3.11.5 Shh/patched Signalweg .....	79
3.12 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) .....	80
4. Diskussion.....	84
5. Zusammenfassung.....	98
6. Summary .....	99
7. Abkürzungsverzeichnis.....	100
8. Tabellenverzeichnis .....	104
9. Abbildungsverzeichnis.....	104
10. Literaturverzeichnis.....	108
11. Danksagung .....	117
12. Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.....	119
13. Eidesstattliche Versicherung .....	120

## Arbeitshypothese und Fragestellung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt die heutige Medizin trotz diverser neuer Therapieoptionen unverändert vor eine große Herausforderung. So geht ein Pankreaskarzinom nach wie vor mit einer schlechten Prognose einher. Im Rahmen multipler Studien konnte in vielen Pankreaskarzinomen eine veränderte O-Glykosylierung mit einer daraus resultierenden Expression des sogenannten Tn-Antigens nachgewiesen werden. Während die Auswirkung einer aberranten O-Glykosylierung beispielsweise im Kolonkarzinom weitestgehend erforscht ist, liegen bezüglich des Pankreaskarzinoms nur wenige Studien vor. Da allerdings bei etwa 90% der Pankreaskarzinome eine aberrante O-Glykosylierung nachzuweisen ist, bedarf dieser Umstand bezüglich der Auswirkungen einer Tn-Expression auf das Pankreaskarzinom weiterer mechanistischer Studien.

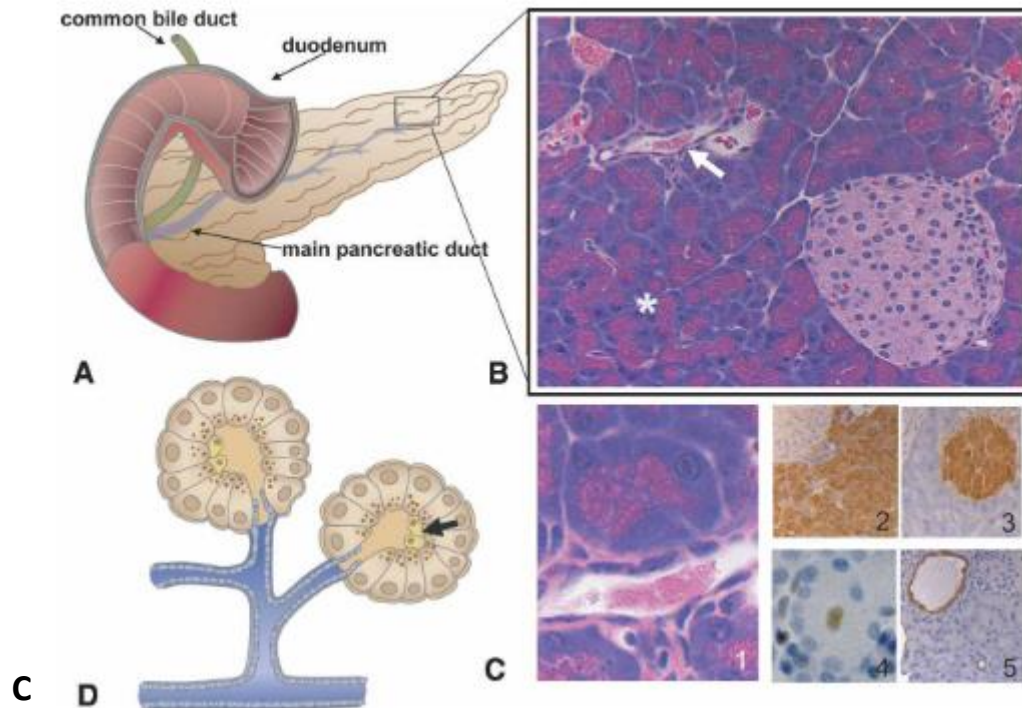
Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer differentiellen O-Glykosylierung auf die Karzinogenese des Pankreas in einem konditional-transgenen Mausmodell untersucht werden. Hierfür wurde das murine Pankreaskarzinom-Mausmodell  $Ptf1a^{cre/+};Kras^{G12D/+}$  gezüchtet und eine konditionale *Cosmc* knockout Maus eingekreuzt. Somit standen dem Projekt distinkte Mauslinien zur tiefgehenden Phänotypisierung zur Verfügung. Das Hauptaugenmerk lag dabei insbesondere auf den beiden tumorassoziierten Genotypen  $Ptf1a^{cre/+};Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Ptf1a^{cre/+};Kras^{G12D/+}$ . Die Hypothese war, dass ein Verlust des Gens *Cosmc* mit resultierender Tn-Antigen-Expression zu einem aggressiveren Tumorphänotypen führen würde. Es wurde vermutet, dass die Tn-Expression zu einer schnelleren Progression und Proliferation, hyperaktivierten pro-onkogenen Signalwegen, sowie zu einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit führen würde. Diesen Fragestellungen wurde durch Western-Blot-Analysen, immunhistochemischen Verfahren, sowie histopathologischen Auswertungen nachgegangen.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Anatomie des Pankreas

Das Pankreas ist ein sekundär retroperitoneal gelegenes Organ des Gastrointestinaltrakts. Man unterscheidet den Pankreaskopf, den Corpus sowie den Schwanz des Pankreas (Suda, Nobukawa, Takase, & Hayashi, 2006). Dabei ist das Pankreas sowohl an der Verdauung von Proteinen und Fetten als auch an der Glukose-Homöostase beteiligt. Entsprechend besteht das Organ aus exokrinen Anteilen, welche die Verdauungssäfte produzieren und den endokrinen Anteilen, welche als Langerhansinseln bezeichnet werden. Die sogenannten Azini sezernieren als exokriner Anteil des Pankreas ihr Sekret in die Ductuli, welche wiederum im Ductus pancreaticus konfluieren. Im Pankreaskopf münden sowohl der Ductus pancreaticus als auch der Galle führende Ductus hepaticus communis gemeinsam in die Papilla vateri, welche die beiden Sekrete in das Duodenum entlässt. Dort führen die im Sekret enthaltene Zymogene und Trypsine zur Spaltung von Fettsäuren und Proteinen. Die endokrinen Langerhansinseln unterliegen einer feinen Regulation und führen bei Hyperglykämie zur Insulinfreisetzung. (Hezel et al., 2006).



**Abbildung 1:** Anatomie des Pankreas

A) Das Pankreas gliedert sich in den Pankreaskopf, den Corpus und den Schwanz. Der Ductus pancreaticus (*main pancreatic duct*) mündet gemeinsam mit dem Gallengang (*common bile duct*) in die Papilla Vateri. Beide Sekrete werden dort dem Speisebrei im Duodenum zugeführt. B) Mikroskopische Anatomie des Pankreas. Man unterscheidet die lila-blau (Stern) imponierenden Azini als exokrinen Anteil des Organs von den heller erscheinenden, endokrinen Langerhansinseln. Der Pfeil zeigt auf einen Ductus, in welchem das Sekret transportiert wird. C) Darstellung der Azinus-Ductus-Einheit. Das in den Azini produzierte Sekret mündet über kleine Ductuli in größere Ductus, um im Ductus pancreaticus mit zusammenzulaufen.

Modifiziert nach Hezel et al. (Hezel et al., 2006)

### 1.1.2 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein Malignom, welches aus den exokrinen Anteilen des Pankreas hervorgeht und gegen Tumore des endokrinen Pankreas abzugrenzen ist. In 90% der Fälle handelt es sich um duktales Adenokarzinome des Pankreas (PDAC), welche von den zentroazinären Zellen des exokrinen Pankreas ausgehen (Puckett & Garfield, 2018; Shi, Daniels, & Hruban, 2008). Aufgrund der steigenden Inzidenz bei etwa deckungsgleicher Mortalität stellt es unter allen Tumorentitäten neben dem



Mesotheliom das Karzinom mit der geringsten Überlebenschance dar (Ilic & Ilic, 2016; Robert-Koch-Institut, 2021).

### **1.1.3 Epidemiologie**

Das Pankreaskarzinom stellt als dritt häufigstes Malignom des Gastrointestinaltraktes die Tumorentität mit der schlechtesten Prognose dar. Die aktuelle Krebsstatistik von Siegel et al zeigen, dass in den USA im Jahre 2021 rund 60430 Neuerkrankungen und etwa 48220 Sterbefälle durch das Pankreaskarzinom verzeichnet wurden (Siegel, Miller, Fuchs, & Jemal, 2021). Im Vergleich mit der Statistik des Vorjahres ist es dabei zu einer Zunahme um etwa 2800 Fälle von Neuerkrankungen gekommen (Siegel, Miller, & Jemal, 2020). Die Inzidenz steigt jährlich um 1-2% (Park, Chawla, & O'Reilly, 2021). Dieser Umstand zeigt deutlich, dass die Inzidenz des Pankreaskarzinoms im Gegensatz zur Gesamtrate an Krebserkrankungen deutlich steigt. Zudem ist die Inzidenz mit der Sterberate nahezu deckungsgleich. Bei Frauen stellt das Pankreaskarzinom den acht häufigsten Tumor dar. Bei Männern hingegen ist es die zehnte häufigste Tumorentität. Das Pankreaskarzinom ist sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit rund 8% aller Krebstodesfälle die viert häufigste zum Tode führende Tumorentität (Siegel et al., 2021).

Im Vergleich dazu erkrankten in Deutschland im Jahr 2018 9860 Männer und 9160 Frauen an einem Pankreaskarzinom, woraus sich eine Inzidenz von rund 19000 ergibt. Somit zählt das Pankreaskarzinom zu den 10 häufigsten Tumorentitäten in Deutschland. Das Pankreaskarzinom ist ein Tumor des höheren Lebensalters. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 76 Jahren für Frauen und 72 Jahren für Männer. Bei einer etwa gleichbleibenden schlechten Prognose kommt es aufgrund des demografischen Wandels daher zu einer erhöhten Neuerkrankungsrate (Robert-Koch-Institut, 2021).

### **1.1.4 Ätiologie und Risikofaktoren**

Wie bei den meisten Tumoren, liegt auch dem Pankreaskarzinom eine multifaktorielle Genese zu Grunde. Neben nicht beeinflussbaren Faktoren wie ein hohes Lebensalter,

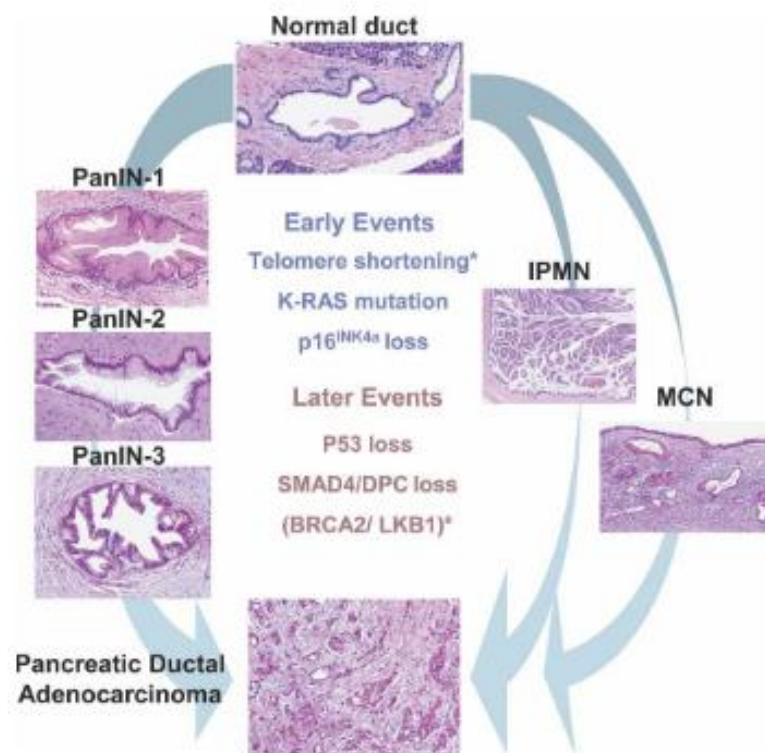
Geschlecht und Blutgruppe (Antwi et al., 2018), sind insbesondere Lifestylefaktoren wie Alkoholkonsum, der Genuss von Fleischprodukten, Adipositas, Diabetes mellitus 2 und insbesondere das Rauchen als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms beschrieben. Passend dazu liegt in westlichen Ländern eine höhere Erkrankungsrate als vor als in Entwicklungsländern (Hu et al., 2021). Rezidivierende, chronische Pankreatitiden stellen dabei einen der größten Risikofaktoren für ein Pankreaskarzinom dar. Des Weiteren konnte eine familiäre Disposition festgestellt werden. In etwa 5-10% der Fälle liegt eine familiäre Disposition vor (McWilliams, Rabe, Olswold, De Andrade, & Petersen, 2005). Verwandte ersten Grades haben dabei ein doppelt so hohes Risiko an einem PDAC zu erkranken. Darüber hinaus ist das Risiko durch bestimmte Mutationen und entsprechend bei Tumorsyndromen wie der FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) und dem HNPCC (hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom) ebenfalls massiv erhöht (Hu et al., 2021; Klimstra & Longnecker, 1994).

In wie weit Schadstoffbelastungen oder Umweltfaktoren wie Pestizide, Fungizide, Chromverbindungen oder Kraftstoffe das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms erhöhen ist noch nicht vollends geklärt (Lowenfels et al., 1993; Robert-Koch-Institut, 2021).

### **1.1.5 Pathogenese**

Es existieren drei Vorläuferläsionen des Pankreas, welche im Verlauf fast ausschließlich in ein Pankreaskarzinom münden: Die Pankreatische intraepitheliale Neoplasie 1-3 (PanIN), die intraductale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) sowie die muzinöse zystische Neoplasie (MCN). Dabei machen die PanINs mit Abstand den größten Anteil dieser aus (Hidalgo et al., 2015). Neben den bereits genannten Umwelt,- und Lifestylefaktoren können auch intrinsische Faktoren wie Mutationen bestimmter Gene zur Entwicklung einer Vorläuferläsion führen. Im Falle des PDACs sind die am häufigsten mutierten Gene: Kras, INK4, BRCA2, Tp53 und SMAD4 (Hruban et al., 2006; Wilentz et al., 1998). Wie in den meisten Tumoren können also sowohl Tumorsuppressorgene wie INK4 und BRCA2, als auch Protoonkogene wie Kras zu einer Tumorentstehung führen. Jedoch wirken sich diese Mutationen nicht im

gleichen Maße aus. Während die INK4 Mutation vor allem in frühen Vorgängerläsionen und nicht im Karzinom an sich zu finden ist, scheint eine Kras-Mutation sowohl bei der Induktion der Läsionen, als auch bei der Progression dieser zu einem Karzinom eine entscheidende Rolle zu spielen (Hezel et al., 2006; Klimstra & Longnecker, 1994; Wilentz et al., 1998).



**Abbildung 2:** Darstellung des Zusammenhanges zwischen Genmutationen und Vorgängerläsionen des PDACs.

Es gibt drei Vorgängerläsionen des PDAC: Die Pankreatische intraepitheliale Neoplasie 1-3 (PanIN), die intraductale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinöse zystische Neoplasie (MCN). Während Kras-Mutationen bereits in frühen Stadien der Vorgängerläsionen nachzuweisen sind, scheint ein Verlust von p53 eher an der Progression der Läsionen zum Karzinom beteiligt zu sein.

BRCA: *Breast Cancer early-onset*; INK4: *Inhibitors of CDK4*; IPMN: intraductale papilläre muzinöse Neoplasie; MCN: muzinöse zystische Neoplasie; PanIn: Pankreatische intraepitheliale Neoplasie (Hezel, Kimmelman, Stanger, Bardeesy, & Depinho, 2006)

### **1.1.6 Pathologie**

Das PDAC ist zu 70% im Pankreaskopf und zu 30% im Körper oder Schwanz des Pankreas lokalisiert. Histologisch lassen sich die duktaalen Adenokarzinome von den Azinären-Zellkarzinomen, den Serösen Zyst-Adenokarzinomen und den neuroendokrinen Tumoren abgrenzen (Hezel et al., 2006). Die PDACs imponieren durch ein massives Vorkommen an hyperplasierten ductalen Strukturen mit einem mehrschichtigem Epithel und machen etwa 85% der Pankreastumore aus (Puckett & Garfield, 2018; Warshaw & Fernandez-del Castillo, 1992). Die Tumorumgebung präsentiert sich äußerst heterogen; sie besteht aus proliferierenden Fibroblasten und Myofibroblasten, Typ 1 Kollagen, Hyaluronsäure, pankreatischen Sternzellen, ECM, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten sowie Plasmazellen (Feig et al., 2012; Ryan, Hong, & Bardeesy, 2014). Des Weiteren gilt das Pankreaskarzinom als eines der Stroma-reichsten Karzinome. Der durch die vorherrschende Fibrose hypovaskularisierte und hypoxische Tumor neigt zu stärkerer Tumorprogression und Chemoresistenz. Das Ausmaß der Tumorstromaproliferation korreliert mit der Invasivität, Metastasierung und Chemoresistenz. (Feig et al., 2012). Dabei infiltriert es primär umliegende Strukturen wie Lymphknoten, Milz, oder das Peritoneum. Fernmetastasen werden häufig in der Lunge oder der Leber detektiert (Hezel et al., 2006).

### **1.1.7 Therapieoptionen**

Da das Pankreaskarzinomen erst in späten Stadien zu Symptomen führt, werden die meisten PDACs erst diagnostiziert, wenn der Tumor bereits gestreut hat. Bei Erstdiagnose sind nur etwa 10-15% der PDACs resektabel (Park et al., 2021). Davon zu unterscheiden sind die Borderline-resektablen, die lokal fortgeschrittenen sowie die metastasierten Karzinome. Bei Diagnosestellung sind über 50% der Pankreaskarzinome bereits metastasiert. Bei etwa 30% spricht man von einem lokal-fortgeschrittenem Stadium (Park et al., 2021). Die einzig potenziell kurative Therapie besteht aus einer kompletten chirurgischen Resektion, welche durch unterschiedliche adjuvante und neoadjuvante Therapieverfahren wie Chemo,- und/oder

Strahlentherapie unterstützt wird. Bis vor ein paar Jahren wurde die Resektabilität rein von anatomischen Gegebenheiten abhängig gemacht. Heutzutage werden auch biologische Faktoren wie bspw. die Höhe des Tumormarkers CA19-9 sowie konditionale Voraussetzungen wie der sog. ‚ECOG (*eastern cooperative oncology group*) Performance Status‘ bzw. in Deutschland der ‚Karnofsky-Index‘ berücksichtigt (AWMF, 2021). In den meisten Fällen ist jedoch keine Resektion mehr möglich. Abhängig vom Stadium sowie den konditionalen Gegebenheiten kommen sowohl adjuvante, als teilweise auch neoadjuvant Mono,- oder Kombinations-Chemotherapien mittels FOLFIRINOX, Gemcitabin, Capecitabin oder nab-Paclitaxel zum Einsatz (AWMF, 2021; Doi et al., 2008). Nachdem zuvor lange von neoadjuvanter Chemotherapie sowie einer Radiotherapie abgeraten wurde, gewannen diese Verfahren in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung. Als palliatives Therapiekonzept kommen zudem bereits Immuntherapien zum Einsatz (AWMF, 2021). Nach erfolgter Resektion und adjuvanter Chemotherapie erleiden die Patientinnen und Patienten jedoch sehr häufig Rezidive (Gillen, Schuster, Meyer Zum Buschenfelde, Friess, & Kleeff, 2010; Katz et al., 2009).

### **1.1.8 Prognose**

Anteilig an der Inzidenz stellt das Pankreaskarzinom den Tumor mit der schlechtesten Prognose dar. Es verläuft zumeist lange Zeit asymptomatisch und weist erst in späten Stadien Symptome auf. Zum einem führt dieser Umstand dazu, dass das Pankreaskarzinom in den meisten Fällen zu spät detektiert wird und bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht hat. Zum anderen erschwert die extreme Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms die Therapie erheblich (Campbell et al., 2010). Die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt aktuell bei etwa 10%; damit ist das Pankreaskarzinom neben dem Mesotheliom der Tumor mit der geringsten Überlebenswahrscheinlichkeit (Ferlay et al., 2015; Robert-Koch-Institut, 2021; Siegel, Miller, & Jemal, 2018). Im Falle eines resektablen Befundes beträgt die mittlere Überlebenszeit bei leitliniengerechter Therapie mit kompletter Resektion und adjuvanter Chemotherapie je nach Literatur zwischen 30-35 Monate (Gemenetzis et al., 2019; Picozzi et al., 2017). In einem metastasierten Stadium beträgt die

durchschnittliche Überlebenszeit hingegen lediglich 12 Monate (Pishvaian et al., 2020).

### **1.1.9 Bedeutung einer Kras-Mutation**

Kras ist als GTP-bindendes Protein der Ras Familie an diversen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben beteiligt. Dabei gilt Kras als Protoonkogen. Eine Kras-Mutation, welche zu einem konstitutiv aktivierten Kras führt, ist in nahezu allen Pankreaskarzinomen der grundlegende Pathomechanismus und ist in etwa 90% dieser nachweisbar mutiert (Jones et al., 2008; Sun, Zhang, & Li, 2020). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine induzierte Kras Mutation im Mausmodell bereits sehr früh zu Vorgängerkäsionen des PDACs führt. Eine Inaktivierung derer führte wiederum zu einer Erholung des Gewebes (Collins et al., 2012). Dabei ist das Allel G12D am häufigsten mutiert. Dabei wird Glycin an der 12ten Stelle des KRAS Proteins durch Asparaginsäure ersetzt. (Collins & Pasca di Magliano, 2013). Bei der Entwicklung der Mausmodelle klassischer Weise auf diese Mutation zurückgegriffen. Auch in dieser Arbeit wurde ein Mausmodell mit einem mutiertem G12D Allel verwendet.

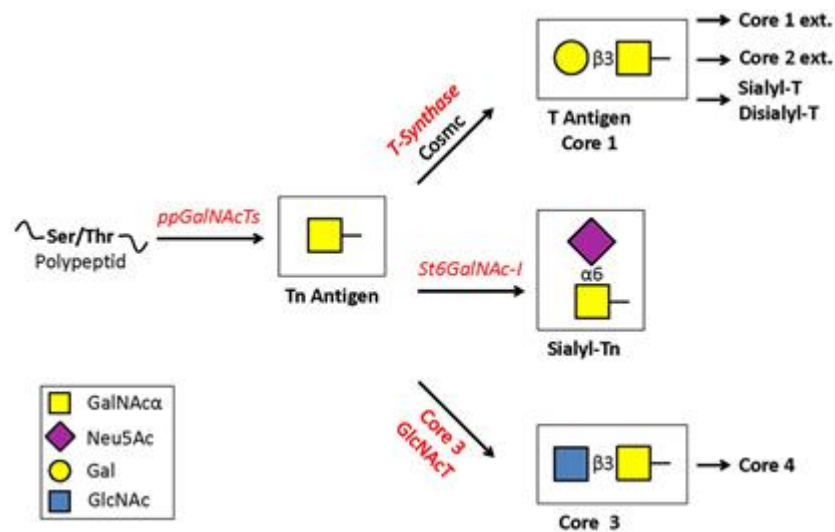
## 1.2 Glykosylierung

### 1.2.1 Glykane

Glykane sind Zuckerstrukturen, welche als Oligosaccharide an Proteine oder Lipide gebunden sind. Dabei können 10 verschiedene Monosaccharide wie beispielsweise Glucose, Galactose oder N-Acetylgalactosamin (GalNAc) zu einer großen Bandbreite an Oligosacchariden kombiniert werden (Cummings & Pierce, 2014). Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation werden die Zuckerreste kovalent an spezielle Aminosäuren der Proteine gebunden. Es werden zwei verschiedene Gruppen von Glykanen unterschieden: Die an Asparagin kovalent gebundenen N-Glykane und die an Serin oder Threonin gebundenen O-Glykane. Unter physiologischen Bedingungen weisen Zellen auf ihrer Zelloberfläche sowohl N-Glykane als auch O-Glykane auf. Dabei machen O-Glykane etwa 80% der Oberflächenglykane aus. (Schjoldager et al., 2012)

Glykantragende Proteine können als Strukturproteine zur Stabilität der Zellmembran beitragen oder als Membranproteine die Zell-Zell-Interaktion begünstigen. Des Weiteren tragen Glykane zur korrekten Rezeptorfunktion und der Ausübung der ursprünglichen Zellfunktion bei und spielen als Bestandteil der Glykokalyx bei der Erkennung durch das Immunsystem eine entscheidende Rolle. Als Bestandteil von sezernierten Muzinen sorgen sie für eine verbesserte Gleitfähigkeit (Cummings, 2009; Stowell, Ju, & Cummings, 2015). Nahezu alle membrangebundenen und sezernierten Proteine sind glykosyliert (Steentoft et al., 2013).

## 1.2.2 O-GalNAc Glykosylierung



**Abbildung 3:** O-GalNAc Glykosylierung

Physiologischer weise wird während der O-Glykosylierung ein GalNAc an einen Serin- oder Threonin-Rest eines Proteins kovalent gebunden. Spezifische Transferasen, sog. ppGalNAcTs katalysieren diese Prozesse. Das dadurch entstandene Tn-Antigen (GalNAcα1-O-Ser/Thr) bildet daher den Grundbaustein für die Bildung weiterer Glykanstrukturen. Die mit Abstand häufigste Modifikation ist die Bildung des sogenannten T-Antigens, welche auch als Core-1 Struktur bekannt ist. Die T-Synthase bindet dabei eine Galaktose kovalent an das Tn-Antigen. Dieses kann danach weiter elongiert werden. Essenziell ist dabei das Mitwirken des Chaperons „Cosmc“.

GalNAc: N-Acetylgalaktosamin, ppGalNAcT: α-N-Acetylgalactosaminyltransferasen, Ser: Serin, Thr: Threonin

Modifiziert nach (Brockhausen, 2006)

Die Glykosylierung von Proteinen ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen und findet sowohl im Golgi-Apparat als auch in Endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt.

Bei der O-GalNAc Glykosylierung wird ein N-Acetylgalactosamin (GalNAc) an einen Serin,- oder Threonin-Rest (GalNAcα1-O-Ser/Thr) eines Proteins α-glykosidisch gebunden (Dahr, Uhlenbruck, Gunson, & Van Der Hart, 1975). Dieser Schritt wird durch spezifische Enzyme, sogenannte Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (pp-GalNAcTs), welche im Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert sind, katalysiert (Rottger et al., 1998). Dabei fungiert ein Uridin-5′-



Diphosphat-N-Acetylgalaktosamin (UDP-GalNAc) als Donor zur Übertragung eines GalNAcs. Die dadurch entstandene Struktur wird Tn-Antigen (*T-antigen-nouvelle*) genannt. Das Tn-Antigen bildet somit einen Grundbaustein diverser wichtiger O-Glykane des Organismus.

Das Tn-Antigen kann durch weitere Glykotransferasen zu mindestens drei weiteren Glykanstrukturen modifiziert werden. Die Core-1- $\beta$ 1,3-Galactosyltransferase (C1galT1 oder T-Synthase) kann die Core-1-Struktur (T-Antigen) synthetisieren. Diese Modifikation tritt mit Abstand am häufigsten auf und steht bei dieser Arbeit im Mittelpunkt. Um ihre Funktion ausüben zu können ist die T-Synthase jedoch auf ihr einziges Chaperon „Cosmc“ (C1gal1C1) angewiesen (Hanisch, 2001; Ju, Otto, & Cummings, 2011). Cosmc ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und verhindert eine Fehlfaltung und Aggregation der T-Synthase (Ju & Cummings, 2002)

Die Core-3- $\beta$ 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase (Core-3- $\beta$ 3GlcNAcT) katalysiert den zweiten Modifikationsweg und bildet die Core-3-Struktur, welche zur Core-4-Struktur elongiert werden kann. Der dritte Modifikationsweg wird durch die Sialyltransferase (ST6GalNAc-I) katalysiert, welche das sog. Sialyl-Tn-Antigen synthetisiert (Ju, Brewer, D'Souza, Cummings, & Canfield, 2002). In dieser Arbeit soll die Auswirkung einer differentiellen O-Glykosylierung auf das Adenokarzinom des Pankreas beleuchtet und analysiert werden.

### **1.2.3 Pathologisch veränderte Glykansynthese**

Der Pathomechanismus der Tumorentstehung ist ein äußerst komplexer Prozess, welcher zahlreichen Einflussfaktoren unterliegt. Neben Umweltfaktoren und endogenen, zellulären Ursachen scheinen auch veränderte Zuckerstrukturen von Proteinen einen großen Einfluss auf die Tumorentstehung, Progression, Metastasierung und Prognose zu haben. Zahlreiche Studien konnten in diversen Tumorentitäten eine aberrante O-Glykosylierung nachweisen (Fuster & Esko, 2005; Radhakrishnan et al., 2014; Stowell et al., 2015). So werden in etwa 90% aller Tumorentitäten ein Tn oder STn-Antigen nachgewiesen (Desai, 2000). Verkürzte Zuckerstrukturen auf Krebszellen können zu einer fehlenden Erkennung durch das Immunsystem führen. Die Folge ist eine inadäquate Immunreaktion, welche ein

ungehindertes Ausbreiten der Tumorzellen begünstigt. Da O-Glykane auf diversen membranösen und sezernierten Glykoproteinen vorkommen, kann eine aberrante O-Glykosylierung Veränderungen in der Signalgebung, den Rezeptorfunktion und dem Metabolismus hervorrufen (Ju et al., 2011). Stowell et al. konnten dabei zeigen, dass eine veränderte Glykosylierung sowohl in den frühen als auch in den späten Stadien der Tumorprogression und Metastasierung auftreten kann.

#### 1.2.4 Das Tn-Antigen

Seit der Erstbeschreibung des Tn-Antigens im Rahmen der Darstellung des Tn-Syndroms durch Moreau et al im Jahre 1957 ist eine veränderte Glykosylierung von Proteinen in den Fokus der Wissenschaftler gerückt. Daher stellen die verkürzten Zuckerstrukturen ein neues *Target* für innovative, spezifische Antitumorthérapien dar.

Das Tn-Antigen bildet während der O-Glykosylierung den Grundbaustein weiterer Glykanstrukturen. Physiologischer Weise ist das Tn-Antigen im gesunden Organismus nicht nachweisbar. Etwa 70-90% der Dickdarm-, Blasen-, Prostata-, Lungen-, Magen-, Zervix-, und Ovarial-Karzinome sind Tn-positiv (Desai, 2000; Springer, 1984, 1997). In 75-90% der PDACs und bis zu 67% der Vorgängerläsionen konnte Tn detektiert werden (Hofmann et al., 2015). Dieser Umstand verdeutlicht erneut, was für einen großen Einfluss eine differentielle O-Glykosylierung auf den Organismus und die Tumorentstehung zu haben scheint. In humanen Tumoren beruht die Tn-Expression in nahezu allen Fällen auf einer Mutation des Cosmc-Gens (Ju et al., 2008).

Aufgrund des häufigen Vorkommens von Tn und STn in Tumoren eignen sich diese sehr gut als prognostische Biomarker (Ju et al., 2013). Da in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, dass der Nachweis dieser mit einer schlechten Prognose, schnellen Progression und frühen Metastasierung einhergehen (Springer, 1997; Tsuchiya et al., 1999), werden sie bereits im klinischen Alltag als prognostische Biomarker verwendet (Stowell et al., 2015). Insbesondere die Kombination aus einem Tn/STn-Nachweis mit weiteren Glykobiomarkern, wie z.B. Ca19-9 und CA125 kann die Spezifität der Diagnostik verbessern (Agrawal, 2017).

### 1.2.5 Das molekulare Chaperon Cosmc

Chaperone spielen bei der Synthese von Glykanen oder Proteinen eine zentrale Rolle. Sie werden auch Anstandsdamen genannt und verhindern die Fehlfaltung und Aggregation gewisser Synthesen. Versagt dieser Mechanismus, werden die Synthesen ubiquiniert und proteosomal abgebaut (Stowell et al., 2015). Cosmc (C1gal1C1) ist im endoplasmatischen Retikulum der Zelle lokalisiert und ist das Chaperone der T-Synthase, welche wiederum das Tn-Antigen synthetisiert. Während 24 Gene für verschiedene pp-GalNAcTs identifiziert werden konnten, ist bisher lediglich ein einziges Cosmc-Gen bekannt (Ju & Cummings, 2002; Miwa, Gerken, Jamison, & Tabak, 2010). Im Mausmodell wurde bei einem *whole-body* knockout von Cosmc eine embryonale Letalität verzeichnet, was bereits auf die immense Bedeutung von Cosmc für den gesamten Organismus schließen lässt (Ju et al., 2011).

Bei einem Verlust oder Fehlfunktion von Cosmc oder der T-Synthase kann das Tn-Antigen nicht weiter modifiziert werden. Die Folge ist das Vorkommen verkürzter Zuckerstrukturen, wie dem Tn- oder STn-Antigen, welche physiologischer Weise im Organismus nicht zu finden sind. Daraus resultieren diverse Funktionseinschränkungen der jeweiligen Zelle. In humanen Krebszellen entsteht die Tn-Expression durch eine Mutation oder Deletion des einzigen X-Chromosomalen Cosmc-Gens (Ju et al., 2008).

### 1.2.6 Bedeutung des Tn-Antigens für neue Therapien

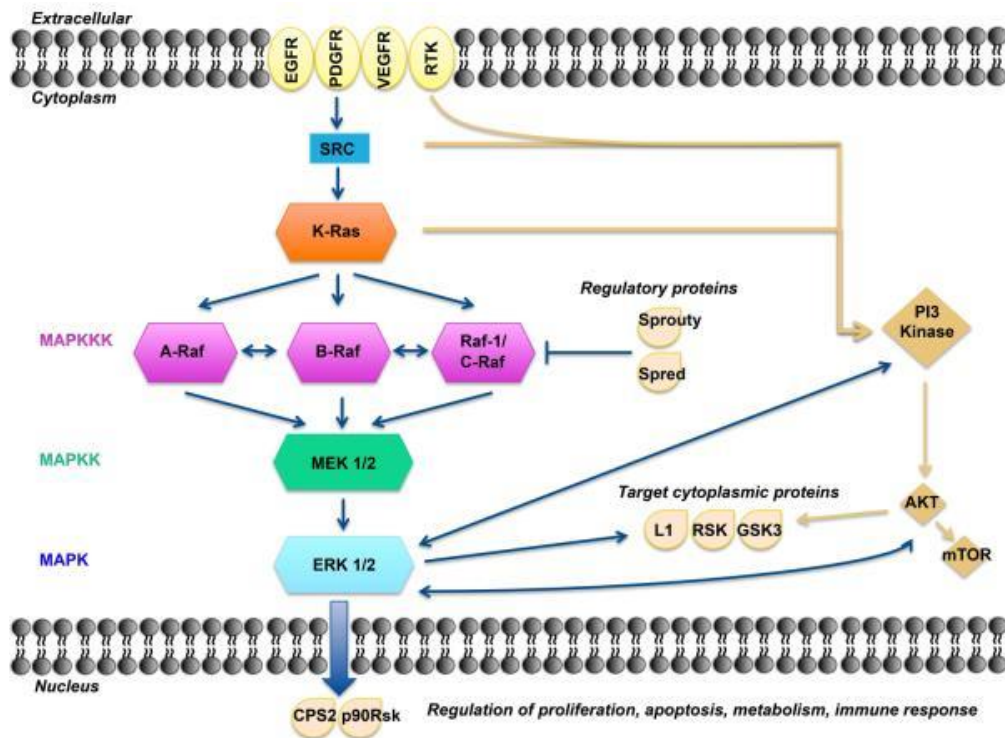
Da Tn und STn lediglich im Tumorkontext aufzufinden sind, stellen sie Folge dessen einen spezifischen Angriffspunkt von Tumoren dar. Springer et al. versuchten bereits 1993 erstmals einen Impfstoff auf der Basis von Tn oder STn herzustellen. Heutzutage sind Tn-basierte Impfstoffe bereits ein essenzieller Teil vieler Anti-Tumortherapien (Brooks et al., 2008; Julien et al., 2009; Lo-Man et al., 2004; Springer, Desai, Tegtmeyer, Spencer, & Scanlon, 1993). Damit diese Therapieprinzipien funktionieren, ist es selbstverständlich notwendig, dass die Tumorzellen Tn auf ihrer Oberfläche exprimieren (Ju et al., 2011).

Der begrenzte Zugang zu natürlichen Tn ist ein limitierender Faktor dieses Therapieansatzes, sodass Tn meist enzymatisch oder chemisch hergestellt wird. Darüber hinaus ist die Herstellung der Immunoadjuvantien von Kohlenhydrat-basierten Impfstoffen äußerst komplex und erschwert somit die Herstellung (Galonic & Gin, 2007).

Ein weiterer Therapieansatz ergibt sich aus der enzymatischen oder chemischen Koppelung von GalNAc an Ser/Thr-Reste von MUC1-Peptidfragmenten (Napoletano et al., 2007). Makrophagen oder dendritische Zellen erkennen und internalisieren als Zellen des Immunsystems die Tn-tragenden MUC1 Muzine über ihren Galaktose-bindenden Glykorezeptor "MGL" (auch Clec10a oder CD301). Über die humanen-Leukozyten Antigene HLA präsentieren sie daraufhin das internalisierte Tn und induzieren somit eine Anti-Tumor-Immunantwort (Napoletano et al., 2007). Klinische Studien konnten eine Wirksamkeit der Anti-Tn Antikörper in Kolon,- Brust und Nierenkarzinomen nachweisen (Zlocowski et al., 2019).

## 1.3 Signalwege

### 1.3.1 Der Map-Kinase-Signalweg



**Abbildung 4:** Darstellung des MapK / ERK Signalweges

Der MapK / ERK-Signalweg wird über externe Stimuli wie Wachstumssignale oder mutierte Rezeptoren wie EGFR aktiviert. Auch ein mutiertes und damit konstitutiv aktiviertes Kras kann zu einer dauerhaften Aktivierung des MapK-Signalweges führen. Dieser Signalweg führt primär zu einer gesteigerten Proliferation und Invasion der Zelle.

Modifiziert nach Burroto (Burotto, Chiou, Lee, & Kohn, 2014)

EGFR: epidermal growth factor receptor; ERK: extracellular-signal regulated kinases; MapK: mitogen activated protein kinase

Der Map-Kinase (ERK)-Signalweg ist an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen wie Wachstum, Proliferation, Migration, Überleben und Differenzierung beteiligt. Dieser Signalweg ist in etwa 30% aller Tumorentitäten mutiert bzw. verändert (McCubrey et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass ein veränderter MapK-Signalweg in

humanen Tumoren zu einem gesteigerten Überleben, Metastasierung und einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führt (De Luca, Maiello, D'Alessio, Pergameno, & Normanno, 2012).

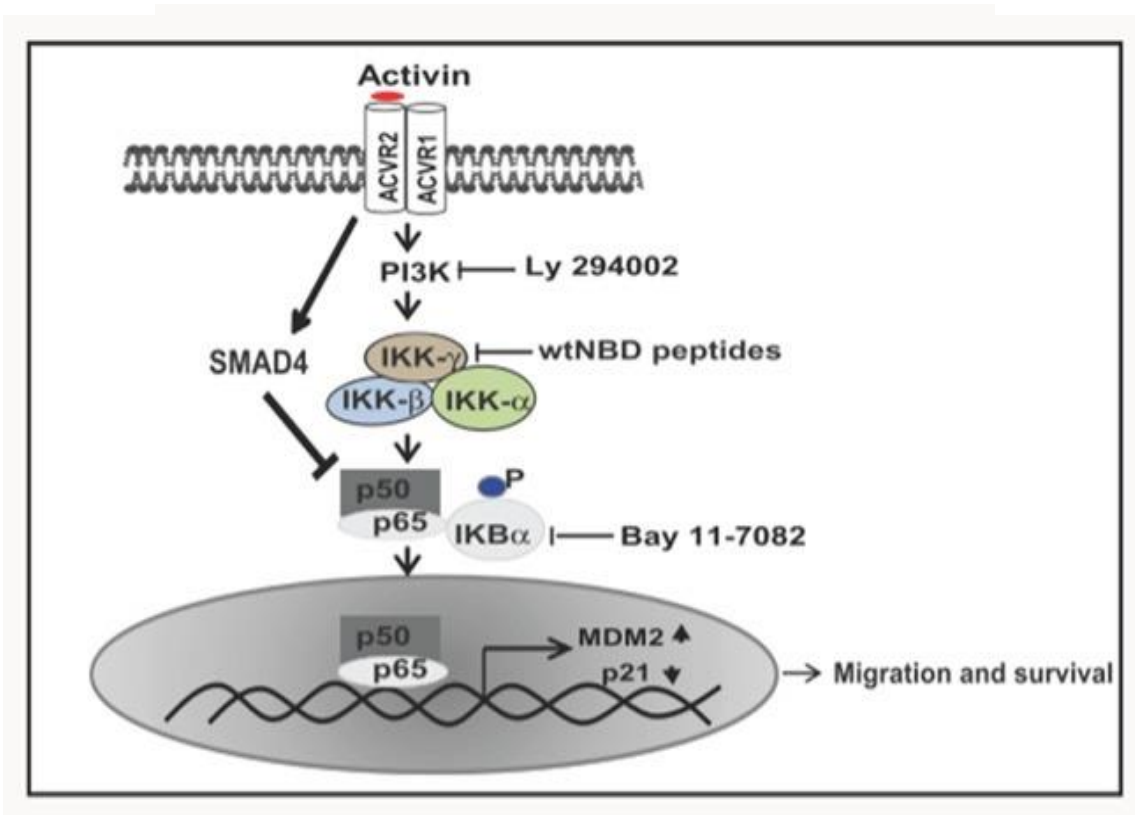
Es gibt vier unabhängige MapK-Signalwege: den klassischen MapK / ERK-Signalweg, den Big-MAP-Kinase-1 (BMK-1) -Signalweg, den c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK)-Signalweg und den p38-MapK-Signalweg (Cossa et al., 2013).

Der MapK-Signalweg wird durch extrazelluläre Stimuli aktiviert, wie Bsp. von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Meloche & Pouyssegur, 2007; Roux & Blenis, 2004). Die Aktivierung des MapK-Signalweges erfolgt dabei über Tyrosinkinase-Rezeptoren oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren. Insbesondere Mutationen von EGFR und RAS führen zur Überaktivierung dieses Signalweges (Burotto et al., 2014). Anschließend führt dies durch Phosphorylierungen zur sequenziellen Aktivierung von RAS, RAF, MEK und ERK. RAF kommt in drei unterschiedlichen Isoformen (a-RAF, b-RAF und c-RAF) vor. Diese sind an unterschiedlichen Stellen der Zelle lokalisiert und haben dementsprechend unterschiedliche Zielstrukturen und Funktionen. RAF phosphoryliert und aktiviert die MEK-Moleküle. MEK führt anschließend über Phosphorylierung zur Aktivierung der Map-Kinasen (ERK) (Robinson & Cobb, 1997). Die Map-Kinasen ERK regulieren unter anderem die Transkription bestimmter Gene, die beispielsweise für das Wachstum der Zelle und die Organisation des Zytoskeletts zuständig sind. Je nach Lokalisation der verschiedenen ERK's liegen verschiedene Zielstrukturen derer vor (Yang, Sharrocks, & Whitmarsh, 2013). Im Zytosol phosphorylieren sie beispielsweise Zytoskelettproteine wie GSK-3, die wiederum die Zellbewegung, die Zelladhäsion oder Interaktion mit anderen Signalwegen beeinflussen (Ma, Chen, Erdjument-Bromage, Tempst, & Pandolfi, 2005). Im Kern bewirkt ERK eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Zellzyklusprogression fördern (Zassadowski, Rochette-Egly, Chomienne, & Cassinat, 2012).

Der MapK / ERK-Signalweg und nachfolgende Interaktionen sind höchst komplexe Prozesse, welche in Tumorzellen oft dysreguliert sind. De Luca et al konnten zeigen, dass der MapK / ERK Signalweg vor allem an der Proliferation und der Invasion von Tumorzellen beteiligt ist (De Luca et al., 2012). Die pro-kanzerogene oder pro-apoptotische Signalgebung hängt dabei von der Dauer der MapK / ERK-Aktivierung ab (Burotto et al., 2014). Der MapK / ERK-Signalweg kann jedoch auch pro-onkogene

Signale anderer Signalkaskaden antagonisieren, was wiederum von der gewebespezifischen Mikroumgebung des Tumors abhängt. Des Weiteren bestehen Wechselwirkungen zwischen dem Tumor und dem Immunsystem, was darüber entscheiden kann, ob der Signalweg pro-apoptotisch oder überlebenssteigernd wirkt (Burotto et al., 2014). Auch innerhalb der vier verschiedenen MapK-Signalwege gibt es Interaktionen. Die JNK-, und MapK p38-Signalwege verhalten sich beispielweise teilweise antagonistisch (E. F. Wagner & Nebreda, 2009).

### 1.3.2 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg



**Abbildung 5:** Darstellung des NF- $\kappa$ B Signalweges

NF- $\kappa$ B (p50/p65) liegt mit der I $\kappa$ B (IKKB)-Kinase komplexiert im Zytosol vor. Der IKK-Komplex (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ ) führt über Phosphorylierung zur Aktivierung von I $\kappa$ B. Über Ubiquitinierung erfolgt der proteosomale Abbau der I $\kappa$ B-Proteine. Dies führt zur Freisetzung von NF- $\kappa$ B, welches in den Nucleus translozieren und dort die Transkription verschiedener Ziel Gene initiieren kann.

(Hayden & Ghosh, 2008; Jana et al., 2017)

I $\kappa$ B $\alpha$ : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor  $\alpha$ ; IKK $\alpha$ : I $\kappa$ B kinase alpha; IKK $\beta$ : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta; NF- $\kappa$ B: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Inflammation, Immunologie und Apoptose (Viatour, Merville, Bours, & Chariot, 2005).

Es gibt drei aktivierende Signale des NF- $\kappa$ B Weges. Der erste klassische Aktivierungsweg wird durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  aktiviert (Hsu, Xiong, & Goeddel, 1995).

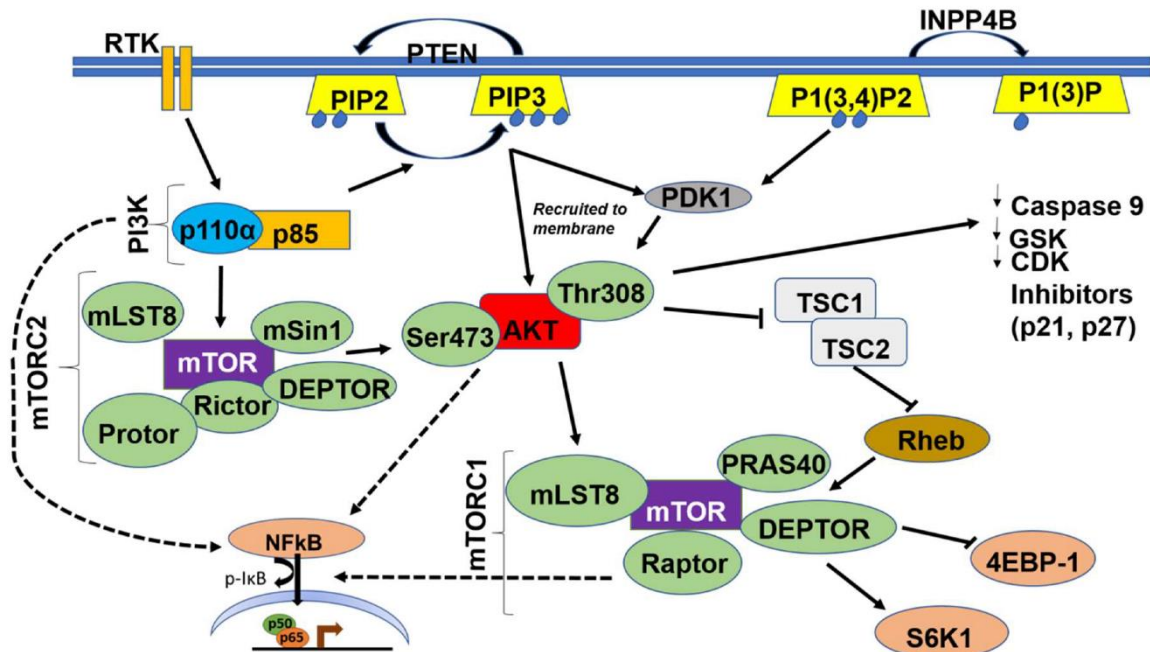
Der sogenannte alternative Weg wird durch Komponenten des Immunsystems, wie z.B. den T-Zell-Rezeptor CD40 aktiviert (Coope et al., 2002). Der atypische Weg ist IKK unabhängig und wird durch DNA-Schäden induziert (Kato, Delhase, Hoffmann, & Karin, 2003).

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) liegt komplexiert mit der I $\kappa$ B (IKKB)-Kinase in einem inaktivierten Zustand im Zytosol vor. Der entscheidende Regulationsschritt besteht in der Aktivierung der I $\kappa$ B durch den sog. IKK -Komplex, welcher wiederum aus drei I $\kappa$ B-Kinasen besteht. IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  dienen dabei als katalytische Untereinheiten der Kinase und führen zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung, und der proteosomale Abbau der I $\kappa$ B-Proteine (Hayden & Ghosh, 2008). (Yamamoto & Gaynor, 2004). IKBKG (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma*) ist eine Untereinheit der I $\kappa$ B-Kinase, welche NF- $\kappa$ B aktiviert. Kommt es zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , wird dieses abgebaut und führt zur Freisetzung der NF- $\kappa$ B-Dimere. NF- $\kappa$ B kann somit in den Nucleus translozieren und dort die Transkription verschiedener Ziel Gene initiieren. NF- $\kappa$ B wirkt dabei anti-apoptotisch und fördert somit das Zellwachstum (Baldwin, 2001; Karin & Lin, 2002).

Da NF- $\kappa$ B durch proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  aktiviert wird, liegt es nahe, dass eine veränderte NF- $\kappa$ B Aktivität in Tumoren nachweisbar ist. Dies führt über eine gesteigerte Proliferation und Angiogenese zu einem Fortschreiten der Tumorerkrankung. Insbesondere eine konstitutiv erhöhte Aktivität des IKK-Komplexes konnte in Tumoren beschrieben werden (Biswas et al., 2004).



### 1.3.3 Der PI3K/Akt-Signalweg



**Abbildung 6:** Darstellung des PI3K/Akt Signalweges

Der Signalweg wird über Wachstumsfaktoren aktiviert. Die PI3K phosphoryliert PIP2 zu PIP3, wodurch die PDK1 aktiviert wird. Diese phosphoryliert anschließend Akt, welches über verschiedene Mechanismen zu einer gesteigerten Proliferation, Angiogenese oder Metastasierung der Zelle führt.

PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PIP2: Phosphatidylinositol-,4,5-trisphosphat, PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, PDK: Phosphoinositide-dependent kinase 1

(Ghoneum & Said, 2019)

Der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) /Akt (Proteinkinase B) /mTor (*mechanistic Target of Rapamycin*) Signalweg reguliert diverse Prozesse wie Proliferation, Überleben, Angiogenese und Metastasierung. Auch dieser Signalweg ist vielen Tumoren überaktiviert (Manning & Cantley, 2007). Der Signalweg kann durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin über zahlreiche Rezeptoren aktiviert werden. Unter anderem über Tyrosinkinase-Rezeptoren, G-Proteingekoppelte-Rezeptoren (GPCR) oder durch ein konstitutiv aktiviertes Ras. Diese aktivieren daraufhin die PI3K

wodurch die Signalkaskade in Gang gesetzt wird (Dbouk et al., 2012; Engelman, 2009). Die PI3K phosphoryliert PIP2 zu PIP3. PIP3 induziert daraufhin Andockstellen für die PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*). PDK1 phosphoryliert anschließend Akt, welches somit aktiv wird (Franke et al., 1995).

Sobald Akt aktiviert ist phosphoryliert es diverse andere Proteine. Zum einem inaktiviert es Proteine wie GSK-3 $\beta$  (Glykogensynthase-kinase-3- $\beta$ ), welche an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind oder pro-apoptotische Proteine wie Bad (Cross, Alessi, Cohen, Andjelkovich, & Hemmings, 1995; Datta et al., 1997; Diehl, Cheng, Roussel, & Sherr, 1998). Dies führt zu einem gesteigertem Zellüberleben und Wachstum. Des Weiteren aktiviert Akt die IKK-alpha, welcher zu Freisetzung und Aktivierung von NF $\kappa$ B führt (Guo, Coppola, & Cheng, 2016; Ozes et al., 1999).

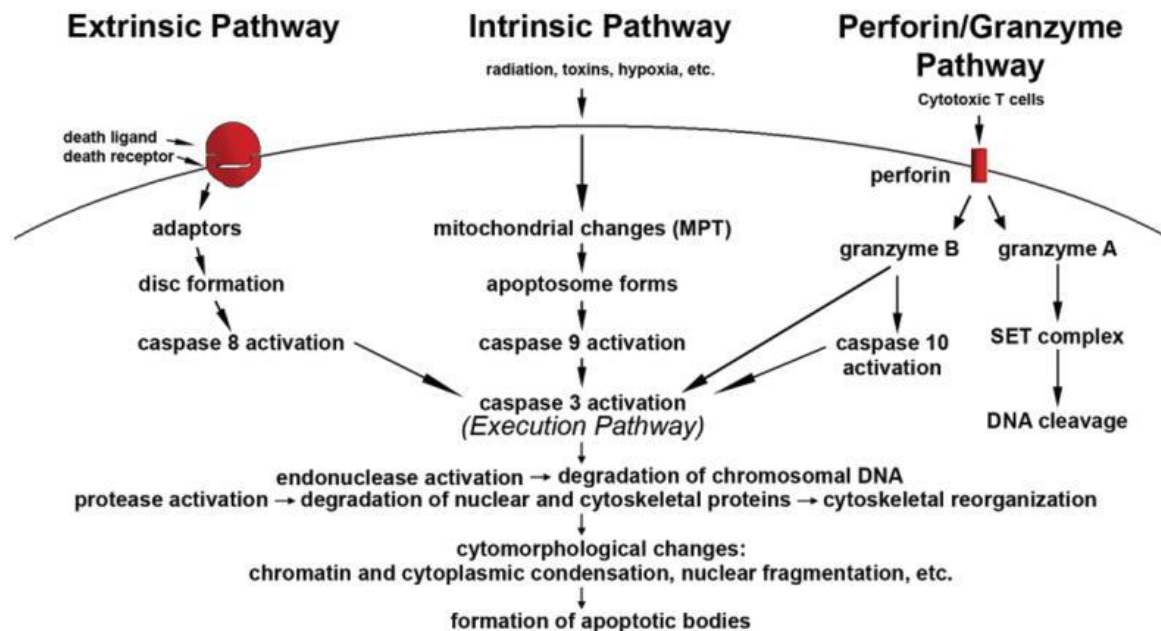
Ein konstitutiv aktivierter PI3K-Signalweg kann über Akt ein erhöhtes Metastasierungspotential vermitteln. Indem Akt die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und ZEB1 induziert und aktiviert, führt es zur Aktivierung der sogenannten Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT). Diese Transkriptionsfaktoren regulieren Vimentin, N,- und E-Cadherine, woraufhin das Aktin-Zytoskelett reorganisiert wird, um die Motilität der Tumorzellen zu erleichtern (Gonzalez & Medici, 2014; Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).

Ein regulierendes Protein dieser Kaskade ist PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). PTEN liegt zytoplasmatisch vor und kann Akt antagonisieren. Als negativer Feedbackmechanismus führt eine Akt-Aktivierung automatisch zu einer PTEN Translokation. Indem PTEN PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert führt es zur Inaktivierung von Akt (Liu, Cheng, Roberts, & Zhao, 2009). Wenn PTEN einmal in den Nucleus transloziert führt es zur chromosomalen Stabilität und initiiert DNA-Reparatur Mechanismen. Eine der häufigsten Aberrationen dieses Signalweges beruhen daher auf dem Verlust oder der Fehlfunktion von PTEN (Engelman, 2009; Liu et al., 2009). Ein mutiertes Ras wie Kras kann zu einer Inhibierung von PTEN führen und somit zur Tumorentstehung führen (Ersahin, Tuncbag, & Cetin-Atalay, 2015). Der Verlust von PTEN und p53 wurde in verschiedenen Tumorentitäten festgestellt (Liu et al., 2009).

Der PI3K/Akt Signalweg ist eng mit dem MapK-Signalweg verknüpft. So kann Ras und dementsprechend Kras sowohl PI3K als auch RAF aktivieren. Beide Signalwege

vermitteln durch Co-regulierende Proteine ein gesteigertes Zellüberleben. (Fruman & Rommel, 2014; Zimmermann & Moelling, 1999).

### 1.3.4 Der Apoptose-Signalweg



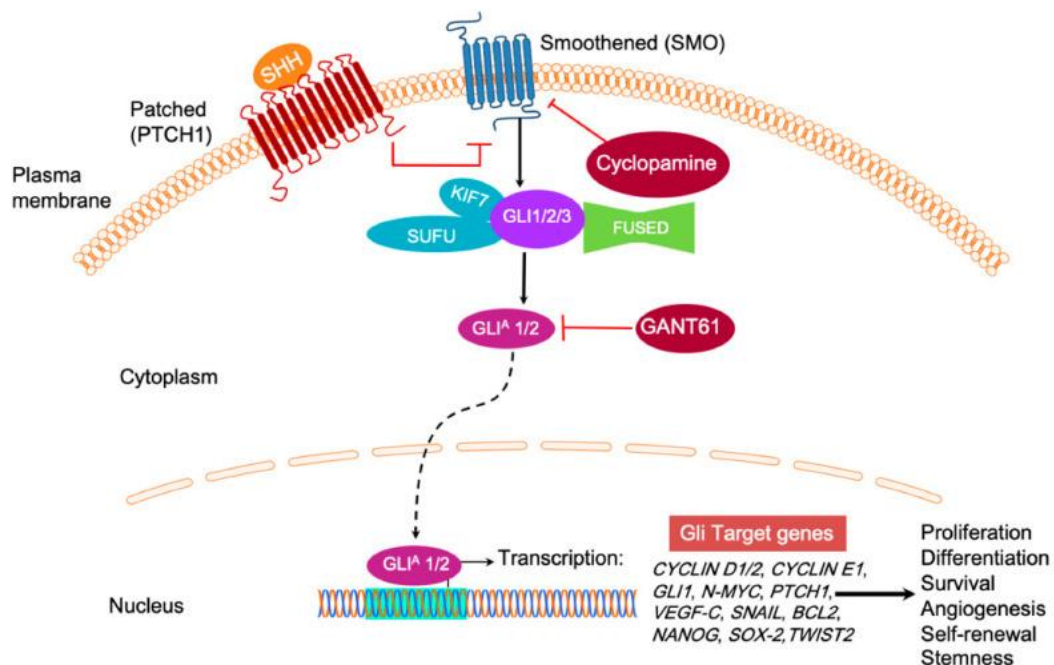
**Abbildung 7:** Exemplarische Darstellung des Apoptose Signalweges mit den Initiatorcaspasen 8,9,10 sowie der beispielhaften Effektorcaspase 3. Über verschiedene Stimuli kann dieser essentielle Signalweg in Gang gesetzt werden. Über Initiatorcaspasen werden sog. Effektorcaspasen aktiviert, welche schlussendlich zur Apoptose der Zelle führt.

(Elmore, 2007)

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein äußerst wichtiger zellulärer Mechanismus, der vor Entartung infizierter oder mutierter Zellen im Organismus schützen soll. Die Inhibierung von pro-apoptotischen Signalwegen ist ein typisches Malignitätskriterium von Tumoren. Der Signalweg kann sowohl durch extrinsische, als auch intrinsische und die Perforin/Granenzym Stimuli ausgelöst werden (Elmore, 2007). Caspasen sind Proteasen und regulieren diesen Ablauf. Die Caspasen 8, 9, 10 und 12 sind sogenannte Initiatorcaspasen und werden je nach Caspase durch verschiedene Faktoren bzw. Stimuli aktiviert. Beispielsweise werden die Caspasen 8

und 10 durch den Fas-Liganden oder den TNF-Rezeptor aktiviert (Budihardjo, Oliver, Lutter, Luo, & Wang, 1999). Die Caspase 9 wird durch DNA-Schäden induziert und die Caspase 12 über ER-Stress (Nakagawa et al., 2000). Sobald die Initiatorcaspasen aktiviert sind, spalten und aktivieren sie die stromabwärts gelegene Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Diese induzieren wiederum über verschiedene Effektorproteine die Apoptose. Hochregulierte Caspasen sprechen daher für einen gesteigerten Zelltod; supprimierte Caspasen führt ein vermehrtes Zellüberleben.

### 1.3.5 Der Shh/ Patched-Signalweg



**Abbildung 8:** Darstellung des Shh (Sonic-Hedgehog) -Signalweges. Im Fokus unserer Arbeit steht das Protein Shh mit seinem Rezeptor ‚patched‘. Der Signalweg spielt insbesondere bei der Embryogenese sowie Regenerationsprozessen eine Rolle. Eine Aktivierung dessen führt zu einer vermehrten Proliferation, Angiogenese sowie Überleben der Zelle.

**Shh:** sonic hedgehog

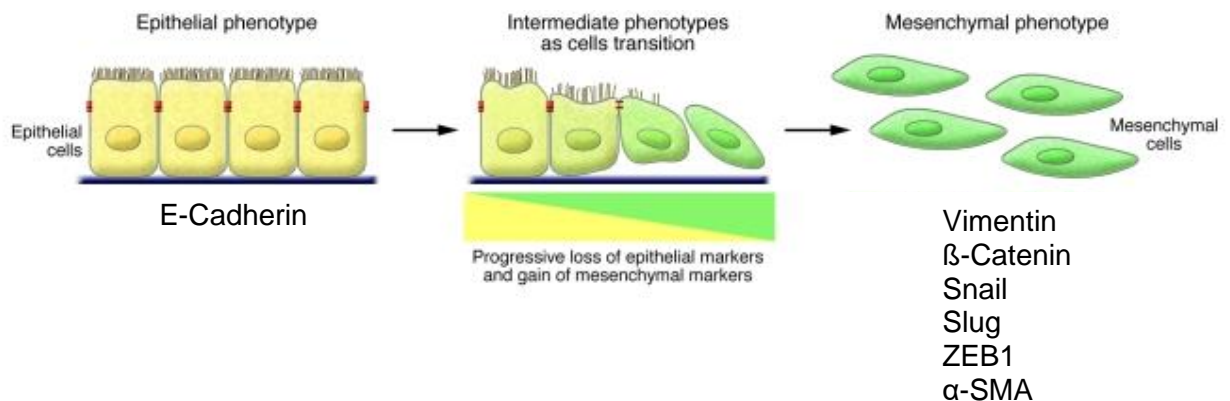
(Iriana, Asha, Repak, & Sharma-Walia, 2021)

Der Hedgehog-Signalweg spielt bei der Embryogenese eine entscheidende Rolle. Eine Dysregulation dessen ist mit embryonalen Defekten und Tumoren assoziiert (Hezel et al., 2006; Taipale & Beachy, 2001; Varjosalo & Taipale, 2008). In etwa einem Drittel der Tumore konnte ein veränderter Shh-Signalweg nachgewiesen werden

(Murone, Rosenthal, & de Sauvage, 1999). Im erwachsenen Organismus spielt dieser Signalweg hingegen eine untergeordnete Rolle oder ist inaktiviert (Skoda et al., 2018).

Jedoch konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg bei der Regeneration des exokrinen Pankreas eine große Rolle spielt (Fendrich et al., 2008). Es wurde beobachtet, dass die Expression von Shh im Rahmen des Pankreaskarzinoms mit einer schnelleren Progression assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe um Bailey et al. untersuchte pankreatische Tumorzelllinien, welche Shh überexprimierten. Die Analysen dieser zeigten, dass es durch eine Überexpression von Shh zu einem erhöhtem Tumolvolumen und einer vermehrten Metastasierung kam (Bailey, Mohr, & Hollingsworth, 2009). Shh und Patched spielen bei diesem Signalweg die größte Rolle. Bei Abwesenheit von Shh blockiert patched als Tumorsuppressor den Signalweg, weshalb die Zielgene nicht transkribiert werden können (Skoda et al., 2018). Bindet Shh an seinen Rezeptor patched so werden diese zusammen lysosomal abgebaut und die Blockade des Signalweges wird aufgehoben (Mastronardi, Dimitroulakos, Kamel-Reid, & Manoukian, 2000). Indem dieser Signalweg die Transkription von Cyclin D und E induziert, wird die Zellzyklus Progression gefördert (Duman-Scheel, Weng, Xin, & Du, 2002). Des Weiteren induziert dieser Signalweg die Transkription von VEGF-A, einem Wachstumsfaktor, welcher zu einer gesteigerten Angiogenese führt, welches Kennzeichen einer erhöhten Malignität ist (Morrow et al., 2009). Auch das Bcl-2 Gen gilt als Zielgen. Bcl-2 ist an der Regulation der Apoptose beteiligt und führt zu einem vermehrtem Zellüberleben (Bigelow et al., 2004).

## 1.4 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)



**Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT)**

Bei der EMT erlangen epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften und können somit migrieren und entsprechend metastasieren. Entsprechend ihres Vorkommens und der Beteiligung an den unterschiedlichen Phasen der EMT sind exemplarische Proteine aufgeführt.

Modifiziert nach (Kalluri & Weinberg, 2009)

Die Epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) ist ein Prozess, bei welchem epitheliale Zellen im Rahmen der Metastasierung mesenchymale Eigenschaften erlangen. Dies beruht auf einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, was zu einer gesteigerten Motilität der Zelle führt. Die Zellen können sich somit aus ihrem epithelialen Verband lösen und zur Metastasierung beitragen. Physiologischer weise findet dieser Prozess während der embryonalen Entwicklung statt (Aigner et al., 2007; Cadigan & Nusse, 1997; Oh, Kim, Shin, Park, & Kang, 2011; Wheelock & Johnson, 2003).

Um sich aus einem Zellverbund lösen zu können, muss die Adhäsion der Zellen verringert werden. Sogenannte Cadherine vermitteln diese Zell-Zell-Adhäsion und stellen den entscheidenden Dreh und Angelpunkt der EMT dar (Peinado, Olmeda, & Cano, 2007). Insbesondere E-Cadherin trägt zur Stabilisierung und Adhäsion von Zellen bei. Ein vermindertes E-Cadherin führt daher zu einer verminderten Adhäsion der Zelle und wird im Tumorkontext als prognostisch ungünstig beschrieben. Es konnte

beobachtet werden, dass es bei der herabgesetzten E-Cadherin Expression zu einer vermehrten N-Cadherin Expression kommt. Dieser Umschlag wird als „Cadherin-Switch“ beschrieben (Aigner et al., 2007). Vimentin ist ein Filament mesenchymalen Ursprungs und ist zu strukturellen Änderungen fähig. Die Vimentin-Expression bzw. Aktivierung unterliegt der Regulation durch Signalkaskaden wie dem PI3K-Signalweg. Akt ist als Effektor dieses Signalweges in der Lage Vimentin zu aktivieren (Gonzalez & Medici, 2014; Matter & Balda, 2007).  $\beta$ -Catenin stellt die Verbindung zwischen den Cadherinen und dem Aktin des Zytoskeletts her.  $\beta$ -Catenin gilt dabei als Proto-Onkogen und ist in vielen Tumorentitäten mutiert (Celen, Ross, Arighi, & Wu, 2015; Reichert, Muller, & Hunziker, 2000).

Der Prozess der EMT wird durch die Transkriptionsfaktoren: Snail, Slug und ZEB reguliert und kontrolliert.  $\beta$ -Catenin aktiviert beispielsweise Slug. Slug gilt wie auch Snail und ZEB1 als Transkriptionssuppressor von E-Cadherin und führt somit zu einer gesteigerten EMT (Aigner et al., 2007; Bolos et al., 2003; Inukai et al., 1999).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Allgemeine Chemikalien sowie deren Hersteller sind im Folgenden aufgelistet und wurden mindestens mit analysenreiner (pro analysis, p.a.) Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien, Verbrauchsmittel und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methoden-Beschreibung aufgeführt. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Abcam (Cambridge, UK); Applied Biosystems (Darmstadt); BD Biosciences Clontech (Heidelberg); biolab (Braunschweig); Bio-Rad Laboratories GmbH (München); BMG Labtech (Ortenberg); Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) via New England Biolabs GmbH; Dako (Waldbronn); Eppendorf AG (Hamburg); GE Healthcare; Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe); Hettich (Tuttlingen); Invitrogen GmbH(Karlsruhe); Marienfeld (Lauda Königshofen); Merck Biosciences GmbH (Schwalbach am Taunus); NEB (Berlin); Nunc GmbH & Co. KG (Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden); Peqlab (Darmstadt); Pierce/Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn); R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt); Roth (Karlsruhe); Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg); Schleicher & Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); Thermo Fischer Scientific (Bremen); Thermo Scientific (Bonn); Typon (Baden-Baden); Vector (Burlingame, USA)



## 2.1.2 Onlinedatenbanken und Werkzeuge

Name	Aufgabe	Web-Adresse
Pubmed	Publikations-Datenbank	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/">Home - PMC - NCBI (nih.gov)</a>
Robert-Koch-Institut	Aktuelles Krebsregister	<a href="https://www.krebsdaten.de/">Krebs in Deutschland für 2017/2018 (krebsdaten.de)</a>
AWMF	S3 Leitfaden zum exokrinen Pankreaskarzinom	<a href="https://www.awmf.org/">Kurzversion - S3-Leitlinie Pankreaskarzinom (awmf.org)</a>

**Tabelle 1:** Onlinedatenbanken und Werkzeuge

## 2.1.3 Mausmodelle

Die für dieses Projekt verwendeten Mauslinien wurden in der Versuchstierhaltung des UKE gezüchtet und behördlich genehmigt. Alle verwendeten Mauslinien haben C57BL/6J als genetischen Hintergrund. Es wurden ausschließlich konditional-transgene Mauslinien verwendet, welche durch das Einkreuzen der Pankreas-spezifischen Cre-deleter Mauslinie Ptf1a-Cre (Jax #023329) aktiviert wurden. Die Mauslinie LSL-KrasG12D (Jax #008179) wurde zur Induktion eines Pankreaskarzinoms verwendet. Um die O-Glykosylierung im Pankreas zu verändern, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma GenOway eine gefloxt C1galt1c1 (Cosmc) Mauslinie generiert (Wolters-Eisfeld et al., 2018). Um Ptf1a-Kras zu erhalten wurden heterozygote Ptf1a-Mäuse mit homozygoten LSL-KrasG12D Mäusen verpaart. Um Ptf1a-Kras-Cosmc Mäuse zu erhalten, wurden Ptf1aCre/+;Cosmc-/- mit geflochten homozygoten Kras;Cosmc verpaart. Somit sind die resultierenden Genotypen für Ptf1a-Cre und Kras immer heterozygot und für Cosmc homozygot.

## 2.1.4 Primär Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Katalog #	Spezies	IH	WB
<b>Akt (pan)(C67E7)</b>	Cell Signaling	4691	Kaninchen		1:1000
<b>Anti-alpha smooth muscle actin antibody (1A4)</b>	Abcam	Ab-7817	Maus	1:100	
<b>Calnexin</b>	Santa Cruz	Sc-11397	Kaninchen		1:200
<b>Caspase 12 Antibody</b>	Cell Signaling	2202	Kaninchen		1:1000
<b>Caspase 3 (8G10)</b>	Cell Signaling	9665	Kaninchen		1:1000
<b>Caspase 8-Antibody</b>	Cell Signaling	4927	Kaninchen		1:1000
<b>CD175 (BRIC111)</b>	Invitrogen	MA1-80055	Maus	1:100	1:1000
<b>CD175s</b>	Antikoerper	ABIN356328	Maus	1:100	1:1000
<b>E-Cadherin (24E10)</b>	Cell Signaling	3195	Kaninchen		1:1000
<b>GAPDH (FL-335)</b>	Santa Cruz	Sc-25778	Kaninchen		1:500
<b>GRP 78 (H-129)</b>	Santa Cruz	Sc-13968	Kaninchen		1:500
<b>Histone H2B (C-19)</b>	Santa Cruz	Sc-8651	Ziege		1:500
<b>HSP70</b>	Cell Signaling	4872	Kaninchen		1:1000
<b>HSPA8 (D12F2)</b>	Cell Signaling	8444	Kaninchen		1:1000
<b>IKK<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling	2682	Maus		1:1000
<b>IKK<math>\beta</math> (D30C6)</b>	Cell Signaling	8943	Kaninchen		1:1000
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> (L35A5)</b>	Cell Signaling	4814	Maus		1:1000

<b>Ki67</b>	Abcam	Ab15580	Kaninchen	1:500
<b>NF-κB p65 (D14E12)</b>	Cell Signaling	8242	Kaninchen	1:1000
<b>P38 MAPK (D13E1) XP</b>	Cell Signaling	8690	Kaninchen	1:1000
<b>P44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)</b>	Cell Signaling	4695	Kaninchen	1:1000
<b>Patched 1/PTCH</b>	R&D Systems	MAB413220	Ratte	1:500
<b>Phospho Akt (Ser473) (D9E) XP</b>	Cell Signaling	4060	Kaninchen	1:2000
<b>Phospho Akt (Thr308) (D25E6) XP</b>	Cell Signaling	13038	Kaninchen	1:1000
<b>Phospho GSK-3β(Ser9)</b>	Cell Signaling	5558	Kaninchen	1:1000
<b>Phospho-c-Raf (Ser259)</b>	Cell Signaling	9421	Kaninchen	1:1000
<b>Phospho-IκBα (Ser32) (14D4)</b>	Cell Signaling	2859	Kaninchen	1:1000
<b>Phospho-NF-κB p65 (Ser536)</b>	Cell Signaling	3033	Kaninchen	1:1000
<b>Phospho-PDK1(C49H2)</b>	Cell Signaling	3438	Kaninchen	1:1000
<b>Phospho-PTEN(Ser380)</b>	Cell Signaling	9551	Kaninchen	1:1000

<b>SAPK/JNK Antibody</b>	Cell Signaling	9252		Kaninchen		1:1000
<b>SLUG Antibody</b>	<b>Polyclonal</b> Thermo Fisher	PA1-86737		Kaninchen		1:1000
<b>SNAIL Antibody</b>	<b>Polyclonal</b> Thermo Fisher	PA5-11926		Kaninchen		1:1000
<b>Sonic Hedgehog/Shh</b>	R&D Systems	AF464		Ziege		1:200
<b>TCF8/ZEB1 (D80D3)</b>	Cell Signaling	3396		Kaninchen		1:1000
<b>Vimentin (D21H3)</b>	Cell Signaling	5741		Kaninchen	1:100	1:1000
<b>B-Catenin (D10A8) XP</b>	Cell Signaling	8480		Kaninchen		1:1000

**Tabelle 2:** Verwendete Primär-Antikörper

### 2.1.5 Sekundär Antikörper

Kopplung	Herkunft	Katalog #	Spezies	Spezifität	Verdünnung
HRP	Cell Signaling	#7074	Ziege	Kaninchen	1:2000
HRP	Invitrogen	#31460	Ziege	Kaninchen	1:3000
HRP	Dako	P 0449	Kaninchen	Ziege	1:2000
HRP	Santa Cruz	Sc-2055	Ziege	Maus	1:3000
HRP	Santa Cruz	Sc-2004	Ziege	Kaninchen	1:3000
HRP	Santa Cruz	Sc-2354	Maus	Ziege	1:7000
HRP	Cell Signaling	#7077	Ziege	Ratte	1:2000
HRP	Cell Signaling	#7076	Pferd	Maus	1:2000
HRP	Santa Cruz	Sc-2954	Huhn	Maus	1:5000

Tabelle 3: Verwendete Sekundär Antikörper

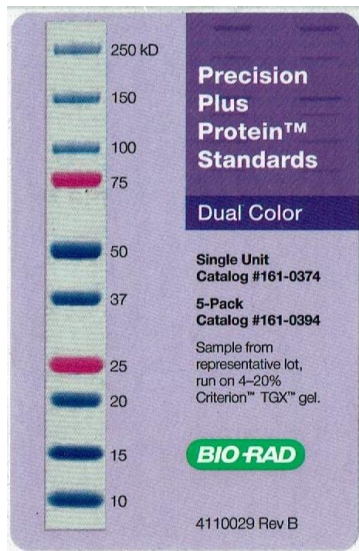
### 2.1.6 Lektine

Abkürzung	Bezeichnung	Herkunft	Katalog #	Glykospezifität	Konjugat
VVA, VVL	Vicia Villosa Lectin	Vector Laboratories	AL-1233	Tn-Antigen	Agarose
PNA	Peanut Agglutinin	Vector Laboratories	AL-1073	Core 1	Agarose
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin	Vector Laboratories	B-1035	Tn-Antigen	Biotin
PNA	Peanut Agglutinin	Vector Laboratories	B-1075	Core 1	Biotin
VVA	Vicia Villosa Lectin	Vector Laboratories	B-1235	Tn-Antigen	Biotin

Tabelle 4: Verwendete Lektine

## 2.1.7 Molekulargewichtstandards

Die verwendeten Molekulargewichtstandards wurden von der Firma Bio-Rad bezogen. Für die jeweilige Proteinleiter wurden durchschnittlich 15µl auf ein Mini-Protean TGX Gel von Bio-Rad aufgetragen.



**Abbildung 10:** Molekulargewichtstandard Precision Plus Dual Color, Bio-Rad

## 2.1.8 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit sterilem deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt.

Homogenisierungspuffer	50 mM Tris, pH 7,5 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,32 M Saccharose
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 800ml mit dH <sub>2</sub> O pH 7,4
Probenpuffer für SDS-PAGE (5x Laemmli-Puffer)	0.312M Tris/HCl pH 6.8 5 % (w/v) SDS 20 % Glycerol 0,000 5% (w/v) Bromphenolblau 4 % (w/v) DTT oder β-Mercaptoethanol
RIPA-Puffer	50 mM Tris, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40

SDS Laufpuffer	30,3 Tris/HCL
	144g Glycin
	10g SDS
	Ad 1l mit dH2O
TBS-T	0,1 mM Tris/HCl
<i>(tris buffered saline with Tween 20)</i>	1,5 mM NaCl
	0,1% Tween 20
	pH 7,5
Denaturierungspuffer	60,06 M Harnstoff
	58,44 M NaCl
	121,14 Tris
	154,20 M DTT
	pH 7,4



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung eines Lysates

#### Lösungen:

RIPA Puffer (Thermo)

**Durchführung:** Die Tötung der zu untersuchenden Tiere erfolgte mittels CO<sub>2</sub> Vergasung mit anschließender Dekapitation. Die Bauchdecke wurde eröffnet und das Pankreas unter Beachtung weiterer Organe entnommen. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Es wurde pro Organ ca. 1ml RIPA Puffer (Thermo) mit 100fach verdünnten Protease & Phosphataseinhibitor von Thermo angesetzt. Je nach Größe des Organs wurden 0,5-1ml des Ansatzes in einen Glaskolben gegeben. Das entnommene Pankreas wurde in ca. 5x5mm große Stücke zerkleinert, in den Glaskolben überführt und durch etwa 20-maliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Anschließend konnte das Lysat mittels BCA-Test auf die Proteinkonzentration untersucht und mittels Western Blot Assay analysiert werden. Ansonsten wurde das Lysat bei -20°C weggefroren.

### 2.2.2 Sialyl-Verdau

#### Lösungen:

Denaturierungspuffer      s. häufig verwendete Lösungen

Laemmli Puffer              s. häufig verwendete Lösungen

Aquadest

**Durchführung:** Um einen Sialyl-Verdau vorzunehmen, wurde jeweils 1µl Denaturierungspuffer von BioLabs zum Lysat hinzugegeben. Die zu verwendende Menge des Lysats wurde zuvor via BCA Test ermittelt. Der Ansatz wurde bei 100°C für 10min im Thermomix (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden jeweils 2µl Neuraminidase (BioLabs) und 1µl G1 Puffer (BioLabs). Um ein Endvolumen von 10µl zu erreichen wurde der jeweilige fehlende Rest mit Aquadest aufgefüllt. Dieser

Ansatz wurde bei 37°C für 45 min inkubiert. Danach wurde der Laemmli Puffer hinzugegeben und bei 95°C für 5 min im Thermomix inkubiert. Anschließend konnten die Proben für einen Western Blot ins Gel pipettiert werden.

### 2.2.3. Gewebefraktionierung

#### Lösungen:

Homogenisierungspuffer s. häufig verwendete Lösungen

Ansatz 1. 1,5ml Homogenisierungspuffer pro Lysat

1:100 Phosphatase (Thermo)

1:100 Protease Inhibitor (Thermo)

Ansatz 2 150µl RIPA Puffer (Sigma) pro Lysat

1:100 Phosphatase

1:100 Protease Inhibitor

**Durchführung:** Das nach der Präparation gewonnene Gewebe wurde unter Verwendung des Homogenisierungspuffers zu einem Homogenat verarbeitet. Die weitere Fraktionierung in Zellkerne, Membranen und Zytosol gelang wie folgt:

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten alle auf Eis. Das homogenisierte Gewebe wurde mit den 1,5ml des ersten Ansatzes in einen Glaskolben gegeben und durch etwa 20maliges Auf und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 2ml Tube überführt und bei 1000g für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß überführt und erneut bei 1000g für 15min zentrifugiert. Das Pellet, welches die Zellkerne beinhaltete, wurde mit 100µl RIPA Ansatz suspendiert. Der Überstand wurde zuvor abpipettiert und bei 20.000g für 2 Stunden zentrifugiert. Das Pellet, welches die Membranen darstellte, wurde mit 50µl RIPA-Ansatz suspendiert. Der Überstand beinhaltete das Zytosol. Alle Fraktionen wurden entweder bei -20°C weggefroren oder mit dem BCA Test auf ihre Proteinkonzentration analysiert.

## 2.2.4 Immunblot-Analyse (Western Blot)

### 2.2.4.1 BCA-Test (Proteinbestimmung)

**Durchführung:** Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einzelner Proben wurde das *BCA Protein Assay Kit* von Thermo verwendet. Die 96-well Mikrotiter Platten wurden von eppendorf bezogen. Das Gesamtvolumen des jeweiligen Ansatzes betrug 210µl. Die BCA Lösung bestand aus den Reagenzien A und B, welche in einem Verhältnis von 50:1 gemischt wurden. 200µl der BCA Lösung wurden mit 10µl der zu analysierenden Probe versetzt, gemischt und bei 37°C für 20 min inkubiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, um die Messgenauigkeit zu erhöhen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Protein-Standardreihe 0-2000µg/ml BSA (0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000µg/ml) in der gleichen Weise, wie die zu analysierenden Proben angesetzt. Mittels FLUOstar Omega (BMG LABTECH) erfolgte die Messung bei einer Extinktion von 562nm. Anhand der gemessenen Extinktionen konnten unter Betrachtung der linearen Regression die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden.

### 2.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

#### Lösungen:

SDS Laufpuffer

s. häufig verwendete Lösungen.

**Durchführung:** Unter Verwendung von SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Proteine der einzelnen Proben mittels Elektrophoresekammern von BioRad anhand ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Mini-PROTEAN TGX Gele 4-15% (Bio-Rad) verwendet. Zuvor wurden die Proben im Verhältnis 5:1 mit Laemmli Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Anhand der durch den BCA-Test ermittelten Proteinkonzentrationen wurden die dementsprechenden Volumina in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandart wurde der Precision Plus Protein Standard von Bio-Rad verwendet. Bei 80 Volt erfolgte zunächst für 10

min die Elektrophorese des Sammelgels. Für das Trenngel wurde die Spannung auf 100Volt erhöht und etwa 50 min durchlaufen.

#### 2.2.4.3. Elektrophoretischer Membranentransfer

##### Lösungen:

Transferpuffer	Glycin 288g Tris Base 60,4g Methanol 200ml 1,8l dH <sub>2</sub> O
TBST	s. häufig verwendete Lösungen 0,05 % TWEEN® 20
Blockierlösung	5% Magermilchpulver (Biorad) oder BSA (Sigma) in TBS-T

**Durchführung:** Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts auf einem Trenngel aufgetrennt. Danach folgt der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 oder 0,45 µm Porengröße) (GE Healthcare Life Science). Die folgenden Schritte passierten alle unter Verwendung des Transferpuffers. Zunächst wird das Transfersandwich, bestehend aus jeweils zwei Schwämmen, zwei dünnen Whatman®-Papieren, der Nitrocellulosemembran und dem zu transferierenden Gel zusammengestellt, und nach Angaben des Herstellers in die Transferkammer überführt. Alle Bestandteile des Sandwiches wurden vor dem Gebrauch in Blotpuffer eingeweicht und Luftblasen eliminiert. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt, einem Kühlpack und einem Rührfischchen versehen und bei 4°C für 60min bei konstanten 100Volt in Betrieb genommen.

Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu unterbinden, wurden die Membranen anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der oben genannten Blockierlösung inkubiert.

#### 2.2.4.4. Immunreaktion

##### Lösungen:

TBS-T	s. häufig verwendete Lösungen
Blockierlösung	5%ig Magermilchpulver in TBS-T

**Durchführung:** In Anschluss an den einstündigen Blockiervorgang mittels 5%iger Magermilchpulverlösung wurde der Primärantikörper (s. Tabelle 2) in der jeweils angegebenen Verdünnung der Blockierlösung hinzugefügt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Es folgten 5 Waschschrte á 5 min in TBS-T. Der HRP gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 3) wurde den Membranen in der entsprechenden Verdünnung in 15ml Blockierlösung oder TBS-T hinzugefügt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Erneut wurden 5 Waschschrte á 5 min mit TBS-T vorgenommen. Die eigentliche Nachweisreaktion erfolgte via ECL Detektion, welche im folgenden Abschnitt erläutert wird.

#### 2.2.4.5. ECL Detektion

Die Nachweisreaktion erfolgte über die an den Zweitantikörper kovalent gebundene Meerrettichperoxidase (HRP), welche katalytisch ECL (*Enhanced chemiluminescence*) als Substrat unter Lichtemission umsetzt.

**Durchführung:** Um die HRP gekoppelten Sekundärantikörper nachzuweisen wurden zunächst die beiden Chemiluminiszenzreagenzien (Pierce ECL Western Blotting Substrate bzw. SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific) im Verhältnis 1:1 gemischt. Pro Membran wurden etwa 200µl Ansatz benötigt. Der Ansatz wurde auf die Membranen gegeben und für etwa 3 min inkubiert. Zur anschließenden Fixierung der Membranen in der Filmkassette wurden Klarsichthüllen verwendet. Zur endgültigen Detektion wurden in der Dunkelkammer

Röntgenfilme (DV-B Medical X-ray film, Typon Röntgen-Film) aufgelegt, unterschiedlich lange exponiert und anschließend entwickelt.

#### **2.2.4.6 Entfernung der Antikörper des Western Blots**

##### **Lösungen:**

Stripping Lösung	Eisessig
	5 M NaCl
	Ad dH <sub>2</sub> O
	Tris Puffer pH 8

**Durchführung:** Die Nitrocellulosemembran wurde bei Raumtemperatur (RT) für etwa 30 min. auf dem Schüttler mit der Strippinglösung inkubiert. Nach kurzem Waschen mit Aquadest wurde die Membran für 15 min bei RT mit Tris puffer (pH8) neutralisiert. Es folgte ein kurzer Waschgang mit TBS-T. Anschließend konnte die Membran für eine Stunde mit der Blockierlösung inkubiert werden.

## 2.2.5 Immunhistochemie

### 2.2.5.1 Entparaffinierung

#### Lösungen:

TBS-T s. häufig verwendete Lösungen

Xylol

100% Ethanol

96% Ethanol

80% Ethanol

70% Ethanol

Citrat Puffer pH6 (Dako)

**Durchführung:** Die Einbettung und Zuschnitte der in Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebe erfolgte in Zusammenarbeit mit der Core Facility Mauspathologie des UKEs.

Nachdem die Paraffinschnitte beschriftet wurden, wurde diese zunächst entparaffiniert. Alle folgenden Schritte wurden jeweils einmal wiederholt. Dazu wurden die Schnitte jeweils 5 min. in Xylol, 3 min. in 100% Ethanol, 3 min. in 96% Ethanol, sowie 3 min. in 80% Ethanol getaucht. Danach wurden die Schnitte einmalig für 3 min. in 70% Ethanol getaucht und anschließend für 5 min in Aqua dest gewaschen. Für das Retrieval wurde die Target retrieval solution Citrat pH6 von Dako 1:10 mit 25ml Aqua dest verdünnt. Die Schnitte wurden in diesem Ansatz in einem Schnitthalter für 2x5 min. bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Verdampfte Flüssigkeit wurde immer mit Aqua dest aufgefüllt. Die Schnitte mussten danach ca. 60 min bei Raumtemperatur in der Lösung abkühlen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte mit genügend Flüssigkeit bedeckt waren und nicht trockenfallen konnten. Anschließend wurde die Schnitte 3x5 min. in TBS-T gewaschen.

### 2.2.5.2. Antikörperfärbung

#### Lösungen:

TBS-T s. häufig verwendete Lösungen

Xylol

100% Ethanol

96% Ethanol

80% Ethanol

70% Ethanol

Citrat Puffer pH6 (Dako)

Hämalaun

**Durchführung:** Die Schnitte wurden nach obigen Schema entparaffiniert. Zum Färben wurde das Cell tissue Staining Kit von R&D Systems benutzt. Zunächst wurden die Organe mit einem Fettstift von Dako (Dako Pen) umrandet. Für 5 min wurden 3-4 Tropfen des Peroxidase Blocks auf die Schnitte gegeben. Danach wurden die Schnitte für 5 min in TBS-T gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend für 12 min mit 3-4 Tropfen des Serum Blocks bedeckt. Danach wurden die Schnitte ohne weiteren Waschschrift für 12 min mit 3-4 Tropfen des Avidin Blocks bedeckt. Anschließend wurde 3x5 min. mit TBS-T gewaschen. Als letzter Blockierungsschritt wurden 3-4 Tropfen des Biotin Blocks auf die Schnitte gegeben. Danach 3x3 min mit TBS-T waschen. Der jeweilige Antikörper wurde je nach Angaben des Herstellers mit Antibody Diluent von Dako verdünnt. Es wurden jeweils 200µl des Ansatzes pro Schnitt benötigt und dementsprechend angesetzt. Die Schnitte wurden bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer mit dem Antikörper bedeckt und inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x10 min in TBS-T gewaschen. Der entsprechende Anti-Kaninchen oder Anti-Maus Sekundär Antikörper wurde aus dem Cell Tissue Staining kit von R&D Systems verwendet. Anschließend wurde 3x10min in TBS-T gewaschen. Das HSS-HRP (Vial B) musste für 30 min auf den Schnitten inkubieren. Danach wurde 3x2 min mit TBS-T waschen. Um das DAB-Chromogen Gemisch anzusetzen mussten pro ml Chromogenpuffer



1 Tropfen DAB-Chromogen hinzugegeben werden. Da 200µl pro Schnitt benötigt wurden, wurde ein entsprechender Ansatz angesetzt. Anschließend betrachtete man die Schnitte unter dem Mikroskop und stoppte die Zeit, bei welcher sich die Schnitte rot färbten. Anschließend wurde für 2x5 min in Aqua dest gewaschen. Die Schnitte wurden danach kurz in Hämalan gebadet und anschließend so lange mit Leitungswasser gewaschen, bis keine Blaufärbung des Wasser zu beobachten war. Um die Schnitte einzudeckeln wurde „Mikrosopy Aquatex“ von Merck und Deckgläser von Marienfeld verwendet.

### 2.2.5.3. Fluoreszenzfärbung

#### Lösungen:

TBS-T s. häufig verwendete Lösungen

Xylol

100% Ethanol

96% Ethanol

80% Ethanol

70% Ethanol

Citrat Puffer pH6 (Dako)

Hämalan

**Durchführung:** Die Schnitte wurden nach bekannten Schema entparaffiniert. Zur Blockierung wurde Carbofree Blocking Solution von Vektor 1:10 mit HSM Puffer versetzt. Da 200µl pro Schnitt benötigt wurden, wurde die Blockierlösung dementsprechend angesetzt. Bei einer Färbung mit Lektinen wurde dieses nach Angaben des Herstellers mit HSM Puffer verdünnt und 200µl pro Schnitt aufgetragen und 60 min inkubiert. Anschließend wurde 3x5 min gewaschen. Zum Eindeckeln wurde Dapifluoromount von abcam verwendet. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am „Keyence Biorevo BZ9000“.

Falls ein Antikörper verwendet wurde, mussten die Schnitte nach dem Waschen zunächst mit dem Serum Block aus dem Cell tissue staining kit von R&D systems für 12 min blockiert werden. Danach wurde 3x5 min mit TBS-T gewaschen. Der Primär-Antikörper wurde je nach Angaben des Herstellers mit Antibody Diluent von Dako verdünnt, aufgetragen und bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht auf den Schnitten inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x5 min gewaschen und anschließend der fluoreszierende Sekundär-Antikörper (Alexa) je nach Angaben des Herstellers mit TBS-T verdünnt und für 60 min auf den Schnitten inkubiert. Die verwendeten Sekundär-Antikörper sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Danach wurde 3x5 min mit TBS-T gewaschen. Zum Eindeckeln wurde Dapifluoromount von abcam verwendet. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am „Keyence Biorevo BZ9000“.

#### **2.2.6. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

##### **Lösungen:**

Hämalaun

Eosin G Lösung (Roth)

Aqua dest.

80% Ethanol

96% Ethanol

100% Ethanol

Xylol

**Durchführung:** Die H&E Färbung ist die Standardfärbung der Histologie. Wir bedanken uns ganz herzlich für die Anfertigung der Färbungen durch die Mauspathologie Facility des UKE. Die Schnitte wurde nach bekannten Schema entparaffiniert.

Anschließend wurden die Objektträger kurz mit A. dest gespült und für etwa 5-10 sec. in Hämalaun (Roth) gefärbt. Dies färbt die Zellkerne blau. Danach wurde sie 5-

10 sec. In ca. 0,1% HCl getaucht. Die Objektträger wurden danach für etwa mehrmals für 5-10 sec. unter laufenden Leitungswasser gespült und anschließend erneut kurz mit A. dest gespült. Das vorläufige Ergebnis wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Danach wurde die Schnitte für 5 sec in der Eosin G (Roth) Lösung gebadet. Diese färbt Kollegen sowie Zytoplasma rot. Danach wurde für kurz mit 80% Ethanol Lösung und anschließend je 2x für 5 sec. in 96% sowie 100% Ethanol Lösung gespült. Zuletzt wurden die Schnitte 2x etwa 5 min in Xylol gebadet. Mit der Pipette wurde 1 Tropfen Eukitt/Entellan auf das Gewebe geträufelt und mit Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckelt und anschließend mit Ethanol geputzt.

### **2.2.7. Masson-Goldner-Trichom-Färbung**

#### **Lösungen:**

100% Ethanol

96% Ethanol

80% Ethanol

70% Ethanol

60 % Ethanol

50% Ethanol

Hämatoxylin nach Weigert (Roth)

Azophloxin Lösung (Sigma)

Goldner Lösung (Roth)

Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung (Roth)

Essigsäure

Aqua dest

10%ige Essigsäure wird 1:10 mit A dest verdünnt.

**Durchführung:** Wir bedanken uns ganz herzlich für die Anfertigung der Färbungen durch die Mauspathologie Facility des UKE. Die Schnitte wurden nach bekanntem Schema entparaffiniert. Danach wurden diese mit Hämatoxylin (Roth) 5 min inkubiert und anschließend für 5 min unter fließendem Leitungswasser gehalten. Danach wurden die Schnitte für 30 Sekunden in 1%iger Essigsäure gespült. Anschließend für 10 min in Azophloxin-Lösung (Sigma) inkubiert. Danach wurde erneut für 30 Sekunden in 1%iger Essigsäure gespült und für 1min in Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung (Roth) inkubiert. Es wurde erneut für 30 Sekunden in 1%iger Essigsäure gespült und für 2 min in der Goldner Lösung (Roth) inkubiert. Die Schnitte wurden wiederholt für 30 Sekunden in 1%iger Essigsäure gespült und entsprechend der aufsteigenden Alkoholreihe behandelt. Zum Eindeckeln wurde Neo-Mount® verwendet.

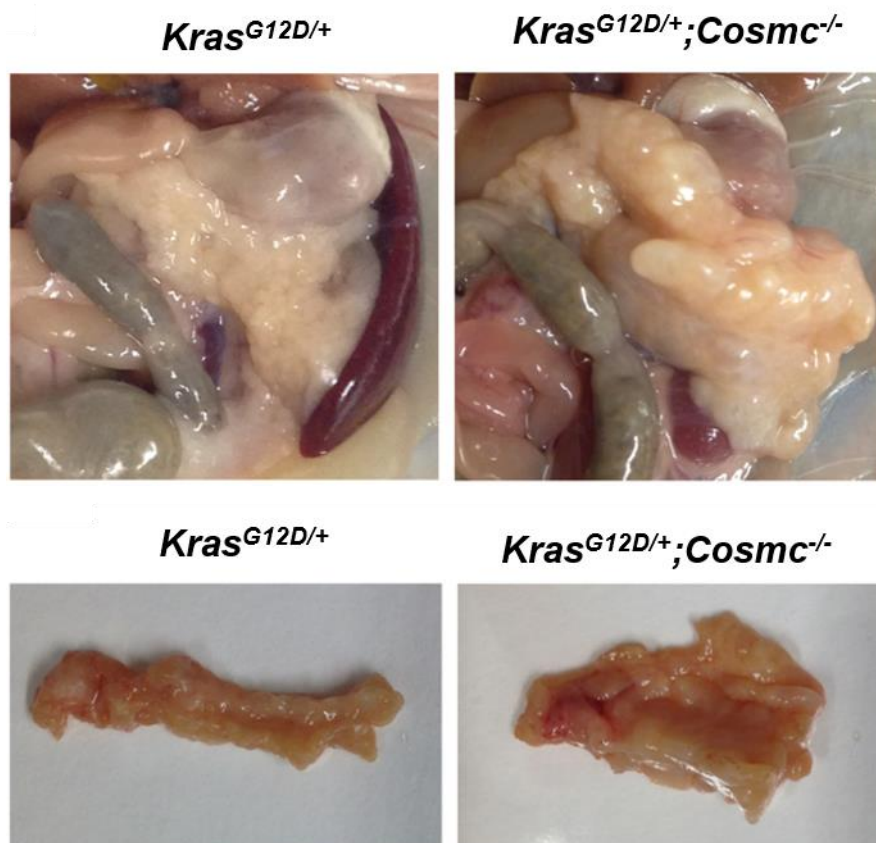
Zellkerne zeigen sich dunkelbraun bis schwarz, Zytoplasma und Muskulatur Ziegelrot, und Bindegewebe grün.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Grundlagen

In den folgenden Experimenten wurden prinzipiell zwei Altersstufen von Tieren untersucht. Die jungen Tiere waren vier Monate und die alten zwölf Monate alt. Zur besseren Übersicht wurden die Genotypen mit WT (Wildtyp),  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  sowie  $Cosmc^{-/-}$  abgekürzt.

#### 3.2 Makroskopische Analyse der Pankreata

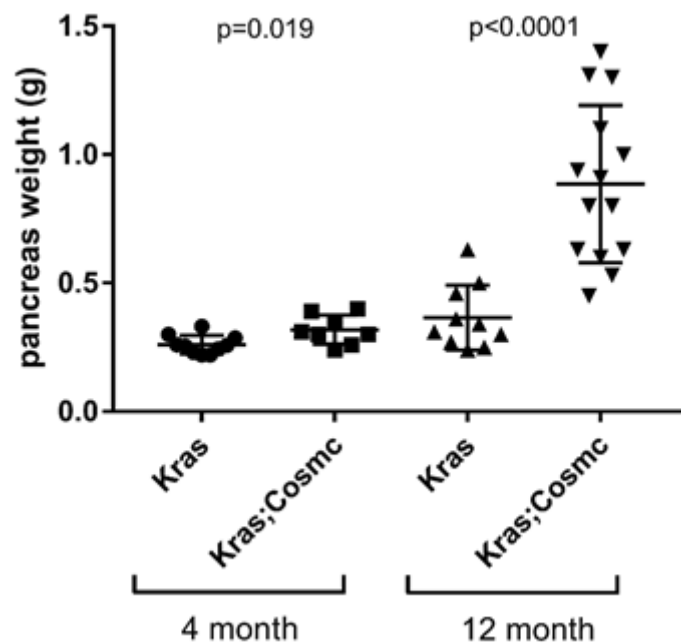


**Abbildung 11:** Exemplarische, makroskopische Darstellung der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  *in situ* und *ex vivo*. Im Vergleich ist eine signifikante Größenzunahme des Pankreas des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zu verzeichnen.

Alter: 12 Monate

Nach Präparation der Mäuse erfolgte zunächst die makroskopische Begutachtung, sowie die Protokollierung des Gewichts (s. Abb. 11, 12). Das Pankreas des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  präsentiert sich physiologisch schmal und schien lediglich leicht verfettet. Im Vergleich dazu zeigt sich das Pankreas des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bereits *in situ* stark hyperplasiert und inhomogen. Das Organ ist knotig durchzogen und massiv hyperplasiert. Ex vivo sind knotige Veränderungen des Organs tastbar.

### 3.3 Analyse der Organgewichte

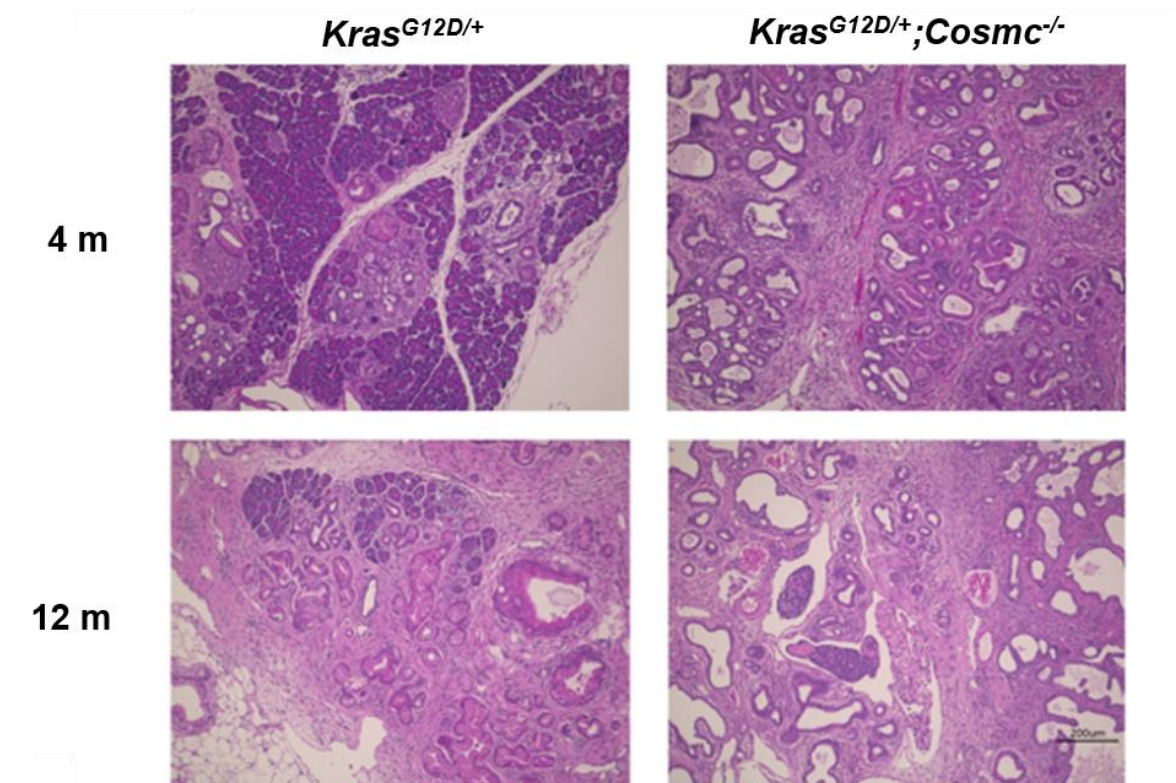


**Abbildung 12:** Vergleich der Gewichte der Pankreata der 4. und 12. Monate alten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$ , - und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Angegeben sind die Einzelwerte der Tumorgewichte mit dem dazugehörigen Median. Der Unterschied zwischen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Alter von 12 Monaten ist statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ).

Nach der Organentnahme wurden die Pankreata beider Genotypen gewogen und anschließend verglichen. Im Vergleich weisen die Organe der vier Monate alten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  noch keinen signifikanten Unterschied der Organgewichte auf. Mit zwölf Monaten hingegen zeigt sich, dass die Pankreata

des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Schnitt etwa doppelt so schwer waren, wie die der gleichaltrigen  $Kras^{G12D/+}$  Tiere.

### 3.4 Histologische Analyse der Pankreata



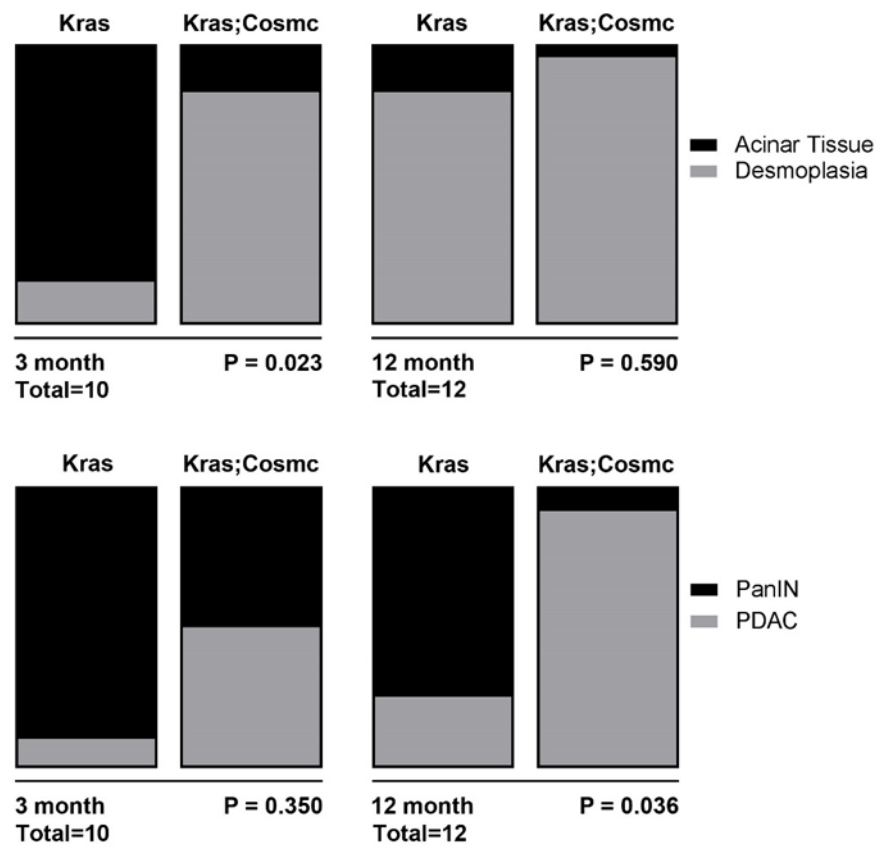
**Abbildung 13:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Zum Vergleich der Progression wurden zwei Altersstufen (Obere Zeile: Vier Monate, untere Zeile: Zwölf Monate) analysiert. (Originalvergrößerung 40x)

Zur übersichtlichen Darstellung des Gewebeaufbaus wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung der Pankreaskarzinome der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  in zwei verschiedenen Altersstufen vorgenommen. Die duktaalen Adenokarzinome der vier Monate alten  $Kras^{G12D/+}$ -Mäuse weisen noch große Anteile an intakten exokrinen Pankreasgewebe auf, welche sich als dunkel-violett gefärbte Azini darstellen. Insbesondere um die Gefäße des Organs zeigt sich die beginnende Fibrose des Pankreas. Vereinzelt sind erweiterte ductale Strukturen der ehemaligen Azini erkennbar. Bereits mit zwölf Monaten hat sich das Parenchym des Pankreas des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  massiv verändert. Während der Anteil an intakten Azini stark

zurückgegangen ist, hat sich die Fibrose weiter ausgedehnt. Darüber hinaus zeigen die Organe eine starke Verfettung.

Im Vergleich dazu weisen die Pankreata der vier Monate alten  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  Mäuse keine physiologischen Strukturen mehr auf. Bereits im jungen Alter ist das Pankreas vollständig umgebaut. Es besteht eine Hyperplasie der Ductus und eine bereits stark ausgeprägte Fibrose. Mit zwölf Monaten hat der fibrotische Anteil weiter zugenommen. Die Gänge stellen sich ausgedehnt und entrundet dar.

### 3.5 Histopathologische Charakterisierung



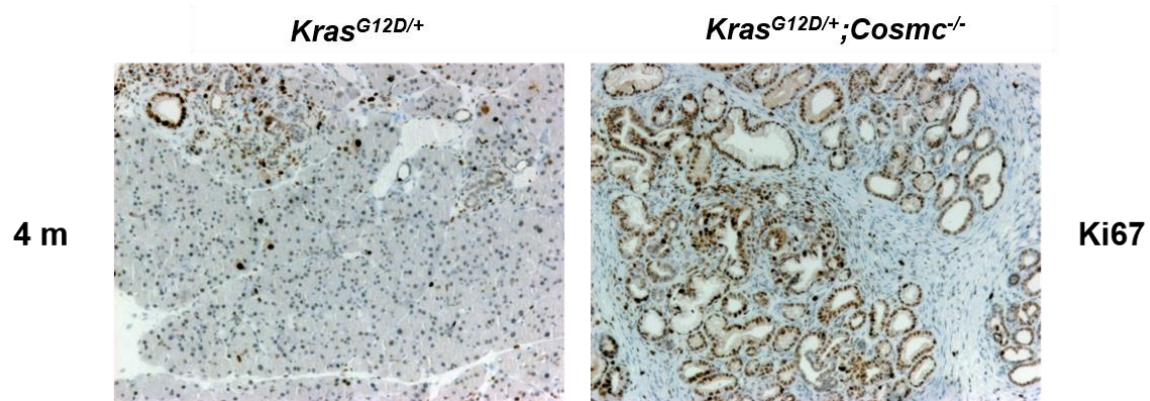
**Abbildung 14:** Gegenüberstellung der pathologischen Gewebeanalysen der drei Monate und zwölf Monate alten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Obere Zeile: Darstellung der jeweiligen Anteile von physiologischen Azini (*Acinar tissue*) und desmoplastischen Gewebe (*Desmoplasia*). Untere Zeile: Anteilige Darstellung der Vorläuferläsion (PanIn) und dem Duktalen Adenokarzinom (PDAC).

PanIn: Pankreatische intraepitheliale Neoplasie; PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma



Die histopathologische Analyse der Pankreata veranschaulicht, dass das Gewebe des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bereits im jungen Alter von drei Monaten einer massiven desmoplastischen Reaktion unterliegt. Der fibrotische Anteil ist dabei signifikant ( $p=0,023$ ) höher als bei den Pankreata des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$ . Im Alter von zwölf Monaten weist das Gewebe von  $Kras^{G12D/+}$  einen ähnlich hohen Anteil an desmoplastischen Gewebe auf wie  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Des Weiteren verdeutlicht die untere Abbildung, dass die Tumore von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bereits mit drei Monaten zu etwa der Hälfte aus manifesten Karzinomen bestehen.  $Kras^{G12D/+}$  weist hingegen nur einen kleinen Anteil an Karzinomen und einen großen Anteil an Pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIn) als Vorläuferläsion des Karzinoms auf. Im Alter von zwölf Monaten bestehen nahezu alle Tumore des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  aus manifesten Karzinomen und weisen somit einen signifikanten ( $p=0,036$ ) Unterschied zu den Tumoren von  $Kras^{G12D/+}$  auf. Die Tumore des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  weisen auch mit zwölf Monaten etwa 75% Vorläuferläsionen (PanIn) und 25% manifeste Karzinome auf.

### 3.6 Proliferation

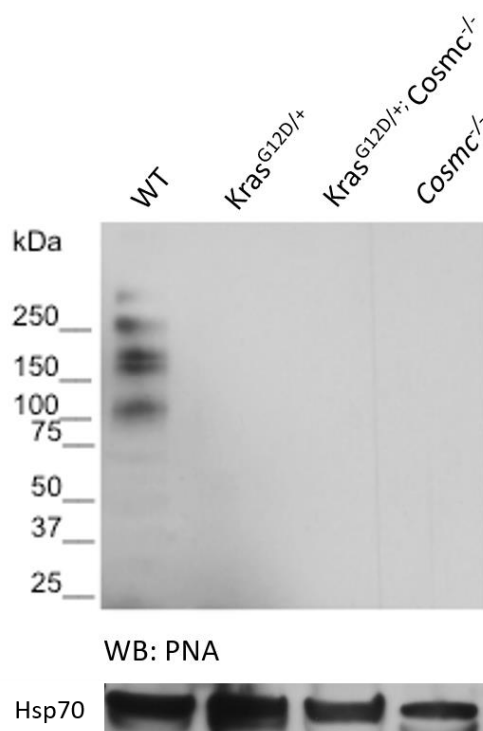


**Abbildung 15:** Immunhistochemische Analyse der Pankreata der vier Monate alten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Darstellung des Proliferationsmarkers Ki-67 (Braune Färbung) mittels des monoklonalen Antikörpers Anti-Ki67 von Abcam (Originalvergrößerung 40x).

Um das Ausmaß der Proliferation des Tumorgewebes der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zu analysieren wurde eine immunhistochemische Färbung mittels eines monoklonalen Anti Ki-67 Antikörpers (Abcam) vorgenommen. Ki-67 ist ein Proliferationsmarker und stellt sich in der immunhistochemischen Färbung braun dar. Das Parenchym von  $Kras^{G12D/+}$  weist insbesondere in den desmoplastisch umgebauten Arealen einige Braunfärbungen auf. Das physiologische Gewebe zeigt hingegen nur sehr vereinzelt eine Braunfärbung. Das Gewebe von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt im Vergleich dazu eine deutliche Färbung der ductalen Strukturen, welche einem ständigen Umbau und dementsprechend einer erhöhten Proliferationsrate unterliegen.

### 3.7 Differentielle O-Glykosylierung

Da der Pathomechanismus der Tn-Entstehung auf einer differentiellen O-Glykosylierung basiert, wurden sowohl histopathologische Färbungen als auch Western-Blot Analysen mittels verschiedenen Lektinen und Antikörpern durchgeführt, um veränderte O-Glykane zu detektieren.



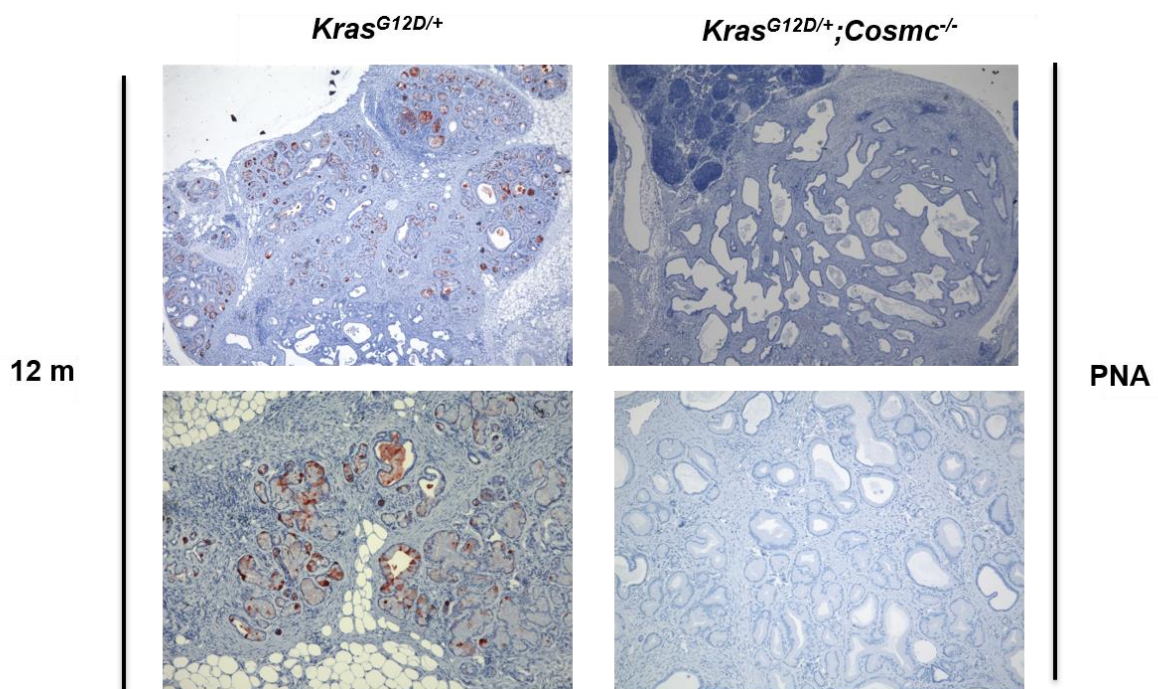
**Abbildung 16:** Western-Blot Analyse von Proteinlysaten aus den Pankreata der Genotypen: WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  mittels des T-Antigen detektierenden Lektins PNA (Vector). Der Wildtyp zeigt eine starke physiologische T-Antigen Expression.

Hsp70 (Cell Signaling) als Ladekontrolle.

PNA: Peanut Agglutinin; WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

Um die T-Antigen Expression im Sinne einer physiologischen O-Glykosylierung darstellen zu können, wurde ein Western-Blot mittels des Lektins PNA (Peanut agglutinin von Vector) durchgeführt. Der Wildtyp zeigt eine starke Expression des physiologischen T-Antigens. Die verschiedenen Banden verdeutlichen, dass unterschiedlich schwere Proteine o-glykosyliert sind. Die Proteinlysate der anderen Genotypen zeigen hingegen keine Expression des T-Antigens und weisen somit keine normale O-Glykosylierung von Proteinen auf



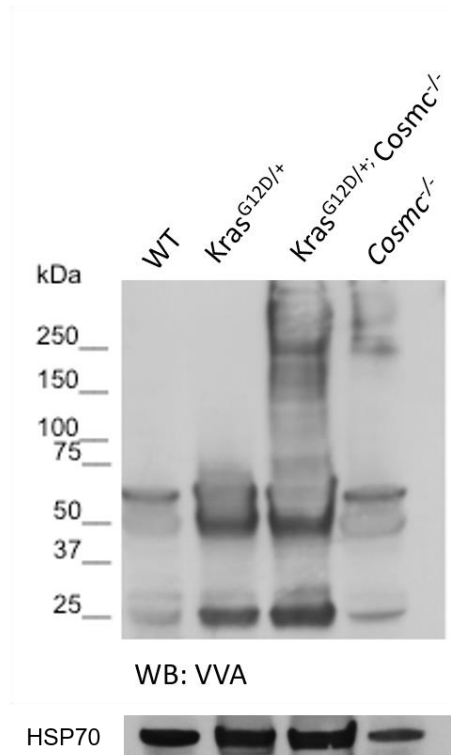
**Abbildung 17:** Immunhistochemische Darstellung der T-Antigen Expression der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Anfärbung des Gewebes mittels des T-Antigen detektierenden Lektins PNA von Vector (Rotfärbung). (Originalvergrößerung obere Zeile: 40x; untere Zeile 100x)

PNA: Peanut Agglutinin

Analog zu dem vorangegangenen Western-Blot wurde die T-Antigen Expression histologisch unter Verwendung des Lektins PNA dargestellt. Das Parenchym des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  weist sowohl in der 40fachen als auch in der 100fachen

Vergrößerung eine Anfärbbarkeit der restlichen physiologischen Azini auf. Teilweise zeigt sich eine Färbung des ductalen Epithels. Die Muzine in den erweiterten Ductuli weisen ebenfalls eine deutlichen Färbung auf.

Das Gewebe des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt hingegen keine T-Antigen Expression.



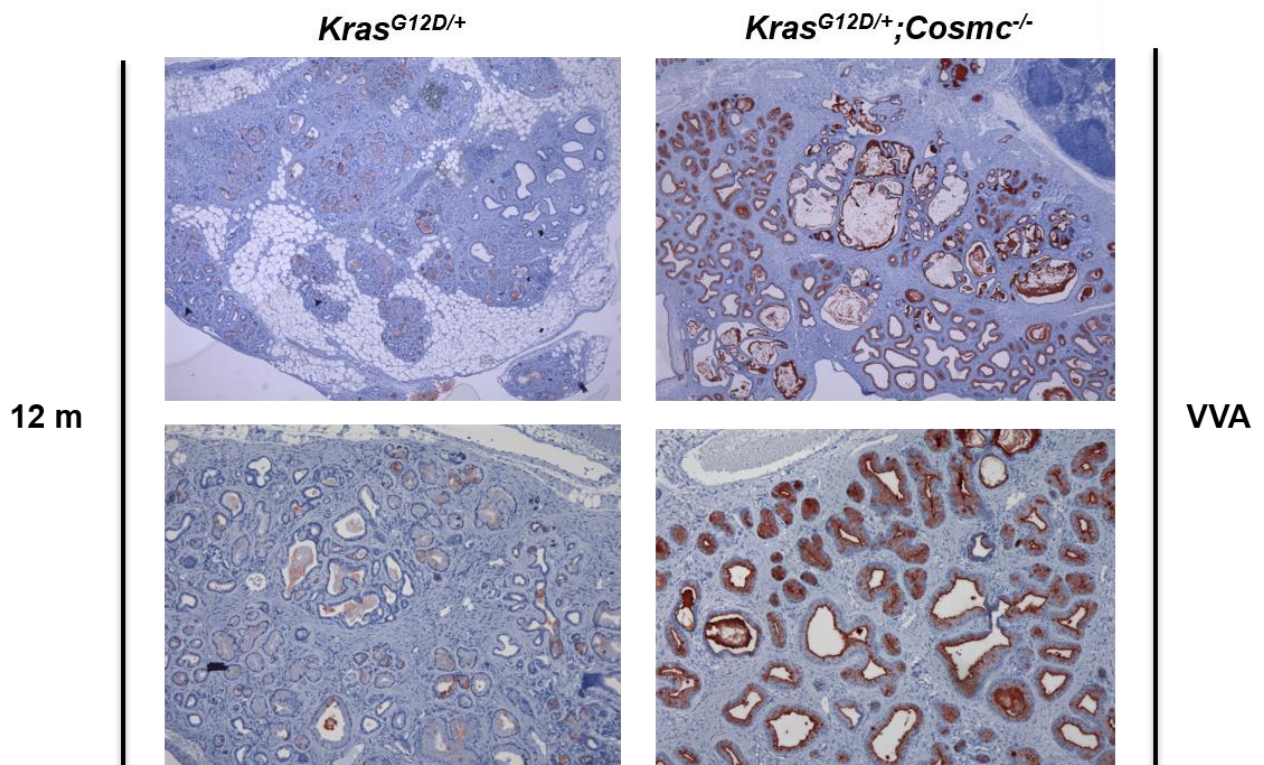
**Abbildung 18:** Western-Blot Analyse der pankreatischen Proteinlysate der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  mittels des Tn-detektierenden Lektins VVA (Vector).

Hsp70 (Cell Signaling) als Ladekontrolle.

VVA: Vicia villosa Lectin; WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

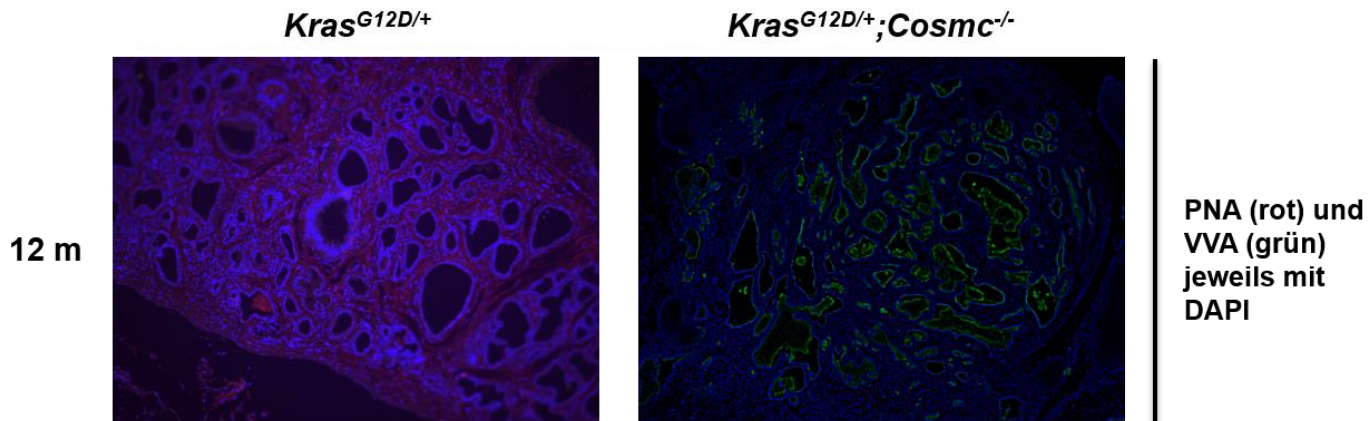
Die Western-Blot Analyse der Pankreaslysate mittels des Lektins VVA (Vector) zeigt eine starke Tn-Expression der Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Das variierende Bandenmuster lässt darauf schließen, dass je nach Genotyp unterschiedliche Proteine differentiell o-glykosyliert sind. Der Wildtyp und  $Kras^{G12D/+}$  weisen keine Tn-Expression im Sinne einer differentiellen O-Glykosylierung auf. Die Banden oberhalb von 75kDa stellen dabei die spezifische Bindung des Tn Antikörpers an Tn-tragende Proteine dar. Alles unterhalb von 75kDa stellen die unspezifische Banden der leichten und schweren Antikörperketten dar.



**Abbildung 19:** Immunhistochemischer Nachweis des Tn-Antigens (Rotfärbung) unter Verwendung des Lektins VVA (Vector). Vergleich der Pankreata der zwölf Monate alten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . (Originalvergrößerung obere Zeile: 40x; untere Zeile 100x)

VVA: Vicia villosa Lectin

Zur histologischen Darstellung des Tn-Antigens wurde das Lektin VVA (Vector) verwendet. Sowohl in der Übersichtsaufnahme als auch in der 100fachen Vergrößerung, zeigt das Pankreasgewebe des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  eine leichte Anfärbarkeit. Zum einen zeigen sich einige Azini leicht angefärbt, zum anderen zeigen auch intraductale Strukturen wie Muzine eine leichte Tn-Expression. Das Parenchym des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt hingegen ubiquitär eine starke Anfärbarkeit. Sowohl das Epithel, welches die hyperplasierten Ductuli umgibt, als auch die intraductalen Muzine zeigen eine starke Färbung.

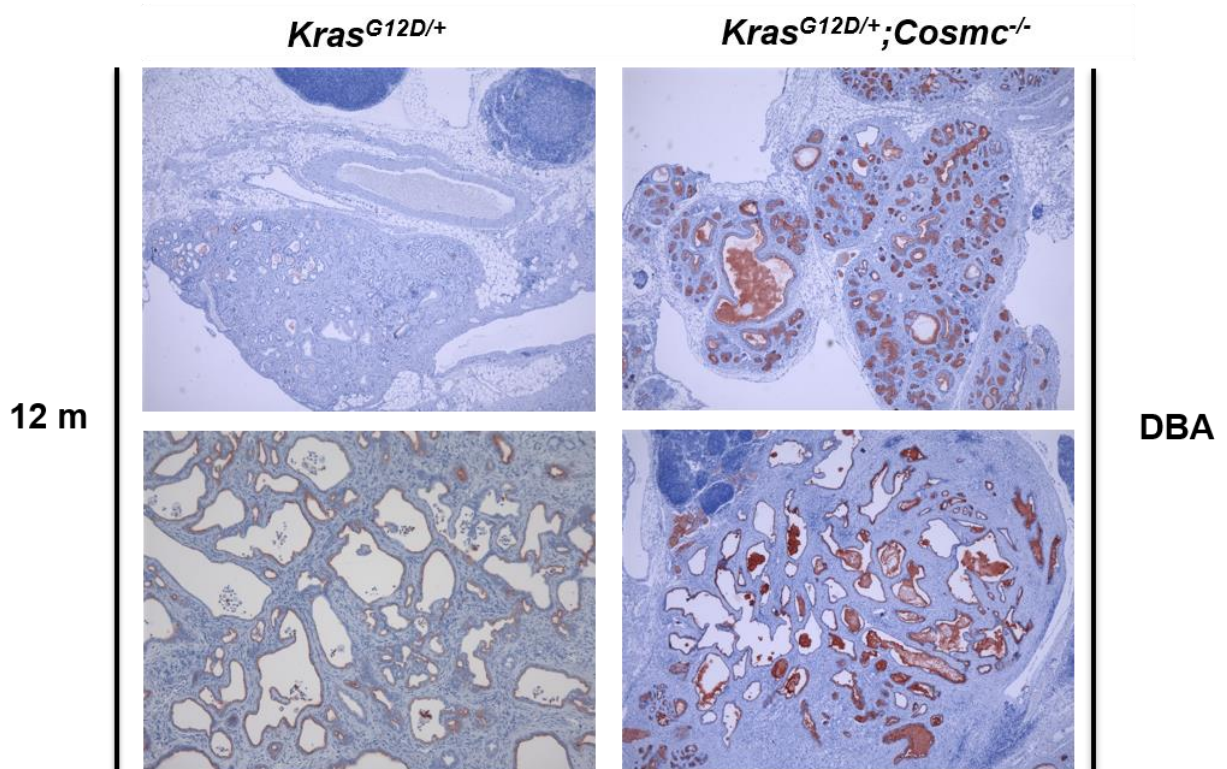


**Abbildung 20:** Fluoreszenzfärbung der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  mittels der Lektine PNA (Rotfärbung) und VVA (Grünfärbung) von Vector. PNA detektiert das physiologische T-Antigen. VVA detektiert das Tn-Antigen. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (Blaufärbung) angefärbt. (Originalvergrößerung 40x)

PNA: Peanut Agglutinin; VVA: Vicia villosa lectin; DAPI: 4', 6-Diamidino-2-phenylindol

Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mittels der Lektine PNA (Vector) und VVA (Vector). Als Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Das Gewebe des  $Kras^{G12D/+}$  Genotypen zeigt insbesondere im Stroma zwischen den Ductuli, als Zeichen einer T-Antigen Expression, eine deutliche Rotfärbung. Vereinzelt zeigt sich auch intraductal eine leichte Rotfärbung der Muzine. Eine Grünfärbung als Nachweis einer Tn-Antigen Expression ist hingegen nicht sichtbar.

Im Parenchym der  $Kras^{G12D};Cosmc^{-/-}$  Maus kann eine starke Tn-Expression (Grünfärbung) beobachtet werden. Sowohl das ductale Epithel als auch intraductale Strukturen wie Muzine weisen eine starke Grünfärbung auf. Eine Rotfärbung als Zeichen einer physiologischen O-Glykosylierung ist hingegen nicht nachweisbar.

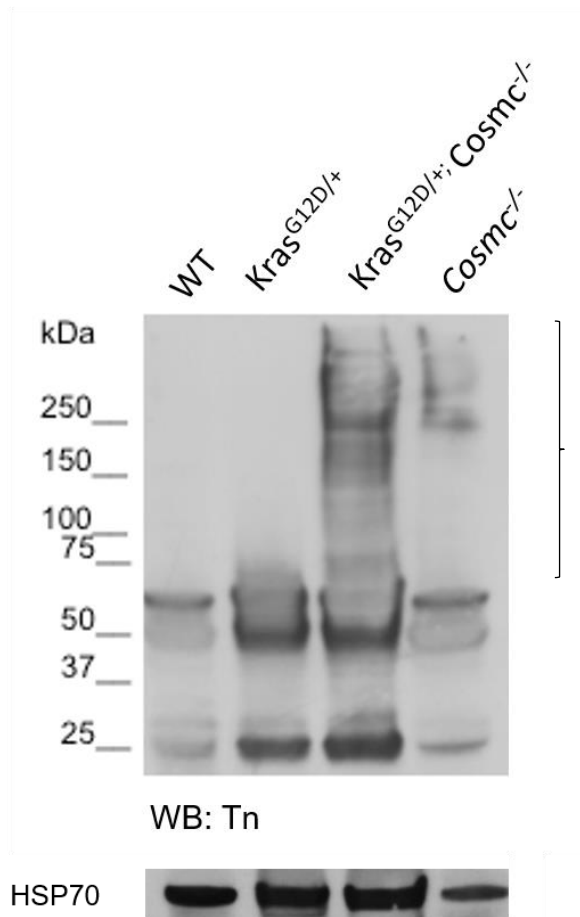


**Abbildung 21:** Immunhistochemische Analyse der Pankreata der Genotypen *Kras*<sup>G12D/+</sup> und *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*Cosmc*<sup>-/-</sup> mittels des N-acetylgalaktosamin-detektierenden Lektins DBA (Vector). DBA bindet N-Acetylgalaktosamin, welches ein Bestandteil des Tn-Antigens ist.

(Originalvergrößerung obere Zeile: 40x; untere Zeile 100x)

DBA: Dolichos Biflorus Agglutinin

Die Verwendung des Lektins DBA stellt eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des Tn-Antigens dar. Indem es an N-Acetylgalaktosamin bindet, welches ein Bestandteil des Tn-Antigens ist, zeigt auch DBA das Verteilungsmuster der Tn-Expression auf. Im Gegensatz zu der immunhistochemischen Färbung mittels VVA zeigt der Genotyp *Kras*<sup>G12D/+</sup> hier eine leichte Färbung des ductalen Epithels. Eine Färbung des Stromas ist nicht nachweisbar. Das Verteilungsmuster des Genotypen *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*Cosmc*<sup>-/-</sup> ähneln hingegen dem der VVA Färbung.



**Abbildung 22:** Western-Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Darstellung der Tn-Expression mittels des monoklonalen Anti-CD-175 Antikörpers (Invitrogen).

HSP70 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

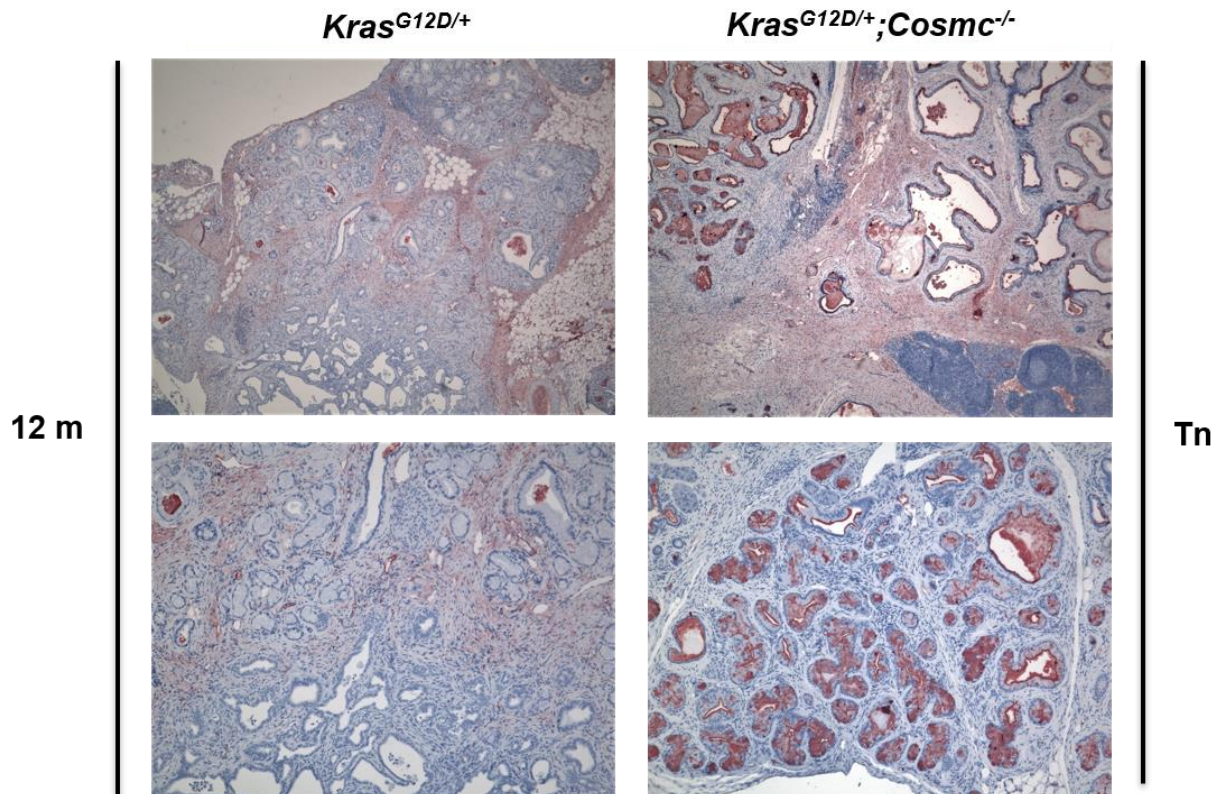
WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

Um die Western-Blot Analyse mittels des Lektins VVA erneut zu bestätigen wurde ein spezifischer Anti Tn-Antikörper (Anti-CD175 (BRIC111) von Invitrogen) verwendet. Die Banden oberhalb von 75kDa stellen dabei die spezifische Bindung des Tn-Antikörpers an Tn-tragende Proteine dar. Alles unterhalb von 75kDa sind unspezifische Banden der leichten und schweren Antikörperketten.

Das Organlysat des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt ein ausgeprägtes Bandenmuster, was darauf schließen lässt, dass viele Proteine unterschiedlichen Gewichtes aberrant o-glykosyliert sind. Der  $Cosmc^{-/-}$  Genotyp zeigt ebenfalls eine Tn-Expression von Proteinen, während der Wildtyp und  $Kras^{G12D/+}$  kein Tn-Antigen exprimieren.



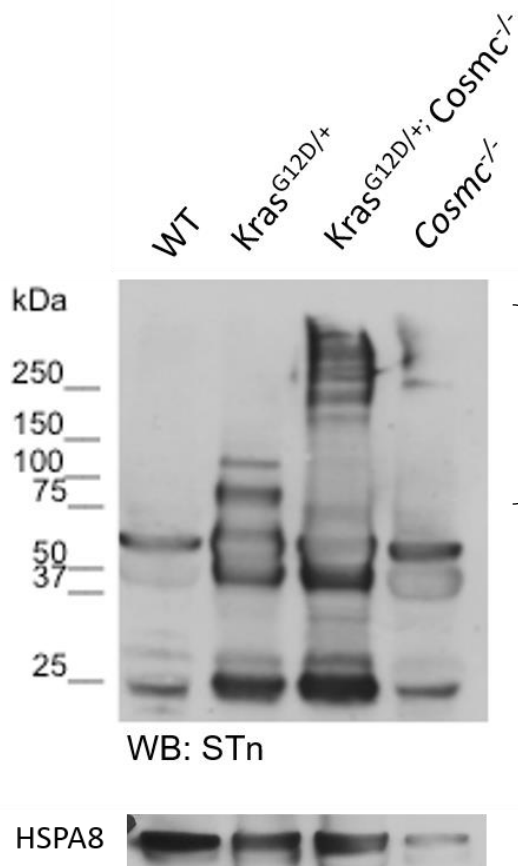


**Abbildung 23:** Immunhistochemische Darstellung der Tn-Expression (Rotfärbung) des Pankreasparenchyms der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  mittels des mAK Anti-CD175 (Invitrogen).

(Originalvergrößerung obere Zeile 40x, untere Zeile 100x)

mAK: monoklonaler Antikörper

Um die Lokalisation der Tn-Expression zu analysieren wurde eine immunhistochemische Färbung der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  mittels eines Anti-Tn-Antikörpers (Anti-CD175 von Invitrogen) vorgenommen. Das Pankreas des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  zeigt eine leichte Färbung des Stromas. Sowohl die verbliebenen physiologischen Azini als auch die hyperplastischen Ductuli zeigen hingegen keine Anfärbbarkeit. Im Vergleich dazu zeigt das Stroma des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  ebenfalls eine schwache Färbung. Analog zu der immunhistochemischen Färbung mittels VVA zeigt sich das ductale Epithel und die Muzine von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  stark Tn-positiv.



**Abbildung 24:** Western-Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Darstellung der STn-Expression mittels des monoklonalen Anti-CD-175s Antikörpers (Antikörper).

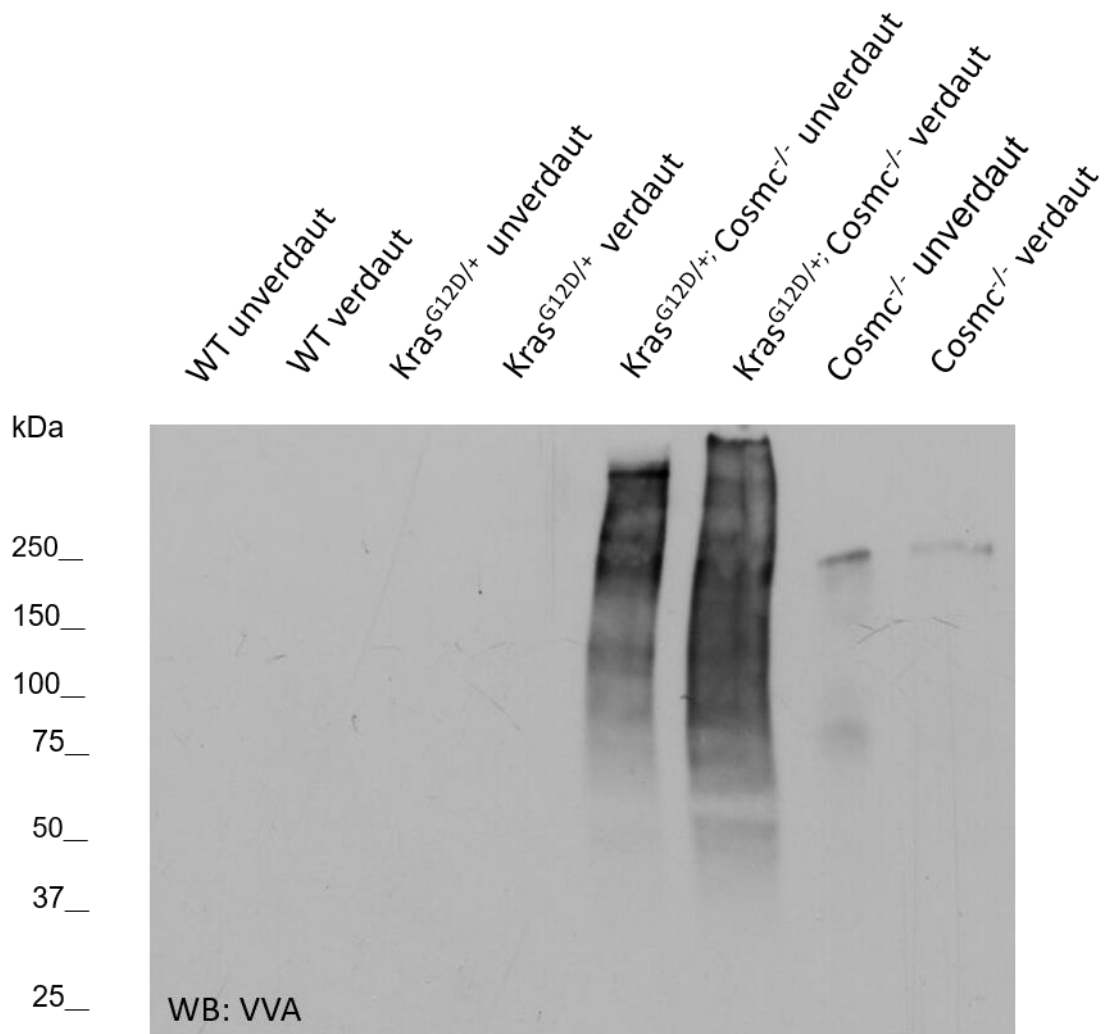
HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

STn: Sialyl-Tn; WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

Das Tn-Antigen kann als Grundstruktur zu drei weiteren Glykanstrukturen modifiziert werden. Eine mögliche Modifizierung führt zu der Bildung des Antigens „Sialyl-Tn“(STn). Da auch STn vermehrt in Tumoren gefunden wird, wurde ein Western Blot unter Verwendung eines Anti-STn-Antikörpers vorgenommen. Analog zu dem Anti-Tn-Western Blot zeigen sowohl  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  als auch  $Cosmc^{-/-}$  eine STn Expression.

### 3.8 Sialyl-Verdau



**Abbildung 25:** Western-Blot Analyse mittel VVA von Vector der Proteinlysate der Genotypen WT, Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup>. Verglichen wird die Tn-Expression der unverdauten Proteinlysate der Pankreata mit jenen, welche Sialyl-verdaut wurden. Da dieselben Proben aus vorherigen Western Blots mit identischer Konzentration verwendet wurde, wurde auf eine weitere Ladekontrolle verzichtet.

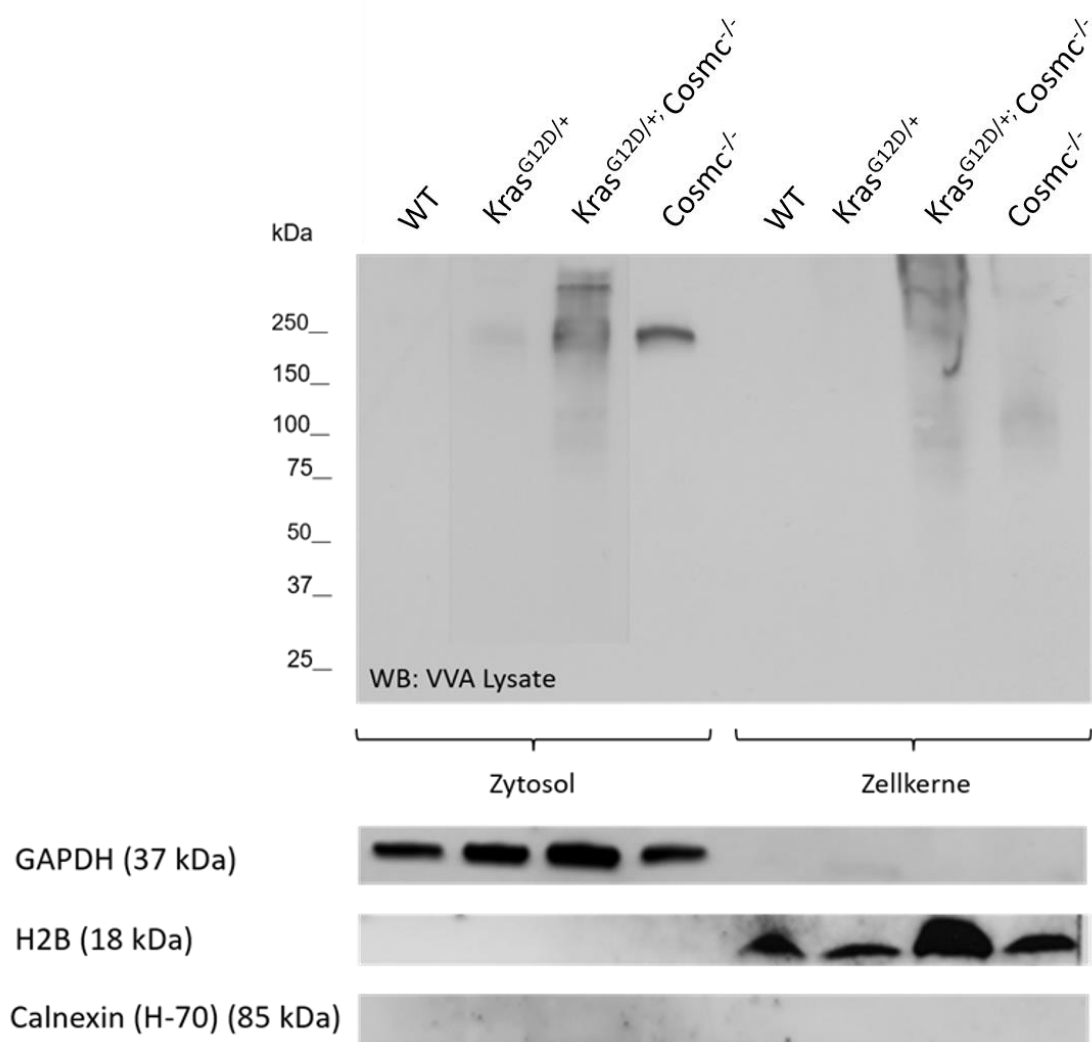
VVA: *Vicia villosa* Lectine; WT: Wildtyp

Alter 12 Monate

Zur Quantifizierung des Vorkommens von Tn und STn wurde ein Sialyl-Verdau der Lysate vorgenommen. Dabei wurde die Sialyl-Gruppe des STn durch den Verdau

abgespalten, sodass das Tn Antigen verblieb und durch das Lektin VVA detektiert werden konnte. Gegenüber gestellt sind jeweils die unverdauten und verdauten Proben der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Der Genotyp  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt zwischen den verdauten und den unverdauten Proben variierende Bandenmuster. Die Proteine, welche zuvor STn trugen und durch das VVA nicht detektiert werden konnten, zeigen sich nach dem Verdau als detektierbares Tn Antigen.  $Cosmc^{-/-}$  weist jeweils vereinzelte Banden auf, jedoch erscheinen nach dem Verdau keine neuen Banden. Die Genotypen WT und  $Kras^{G12D/+}$  zeigen weder vor noch nach dem Verdau eine Tn-Expression.

### 3.9 Lysatfraktionierungen



**Abbildung 26:** Western Blot Analyse der Lysat-Fractionen Zytosol und Zellkerne der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Darstellung des Tn-Antigens mittels des Lektins VVA (Vector).

GAPDH (Santa Cruz) als Nachweis der zytosolischen Fraktion. H2B (Santa Cruz) als Nachweis der Zellkern-Fraktion. Calnexin (Santa Cruz) als Nachweis der Membran-Fraktion.

VVA: Vicia villosa lectine; WT: Wildtyp

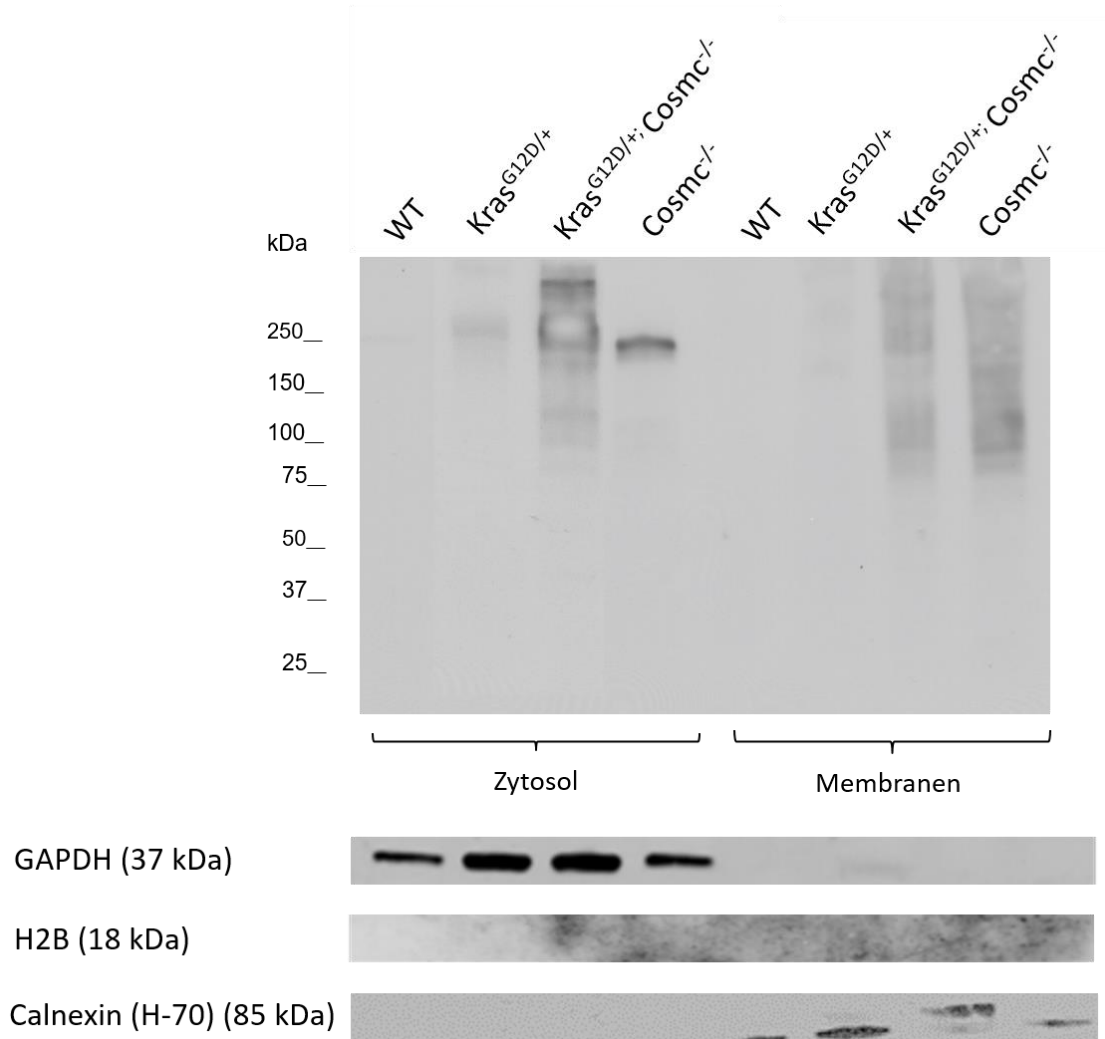
Alter: 12 Monate

Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgte zur einheitlichen Darstellung. Die Proben sind auf demselben Gel gelaufen und den restlichen Blots entsprechend angeordnet.

Um die genaue Lokalisation des Tn-Antigens in der Zelle zu untersuchen, wurde eine Fraktionierung (in Zytosol, Zellkerne und Membranen) der Proteinlysate der Pankreata vorgenommen. Anschließend wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Zur Überprüfung der einzelnen Fraktionen wurden spezifische, Fraktions-assoziierte Ladekontrollen durchgeführt. GAPDH ist ein zytosolisch exprimiertes Protein, H2B ist Bestandteil der Histone im Zellkern und Calnexin ist ein membranassoziiertes Protein.

Der Genotyp  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  scheint insbesondere zytosolisch vorliegende Tn-tragende Proteine zu exprimieren.  $Cosmc^{-/-}$  zeigt in der zytosolischen Fraktion ebenfalls eine Bande. Die Genotypen WT und  $Kras^{G12D/+}$  weisen hingegen keine zytosolische Tn Expression auf.

In der Zellkernfraktion zeigt  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  als einziger Genotyp eine Tn-Expression.



**Abbildung 27:** Western Blot Analyse der Lysat-Fractionen Zytosol und Membranen mittels des Tn-detektierenden Lektins VVA (Vector). Verglichen werden die Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+}; Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ .

GAPDH (Santa Cruz) als Nachweis der zytosolischen Fraktion. H2B (Santa Cruz) als Nachweis der Zellkern-Fraktion. Calnexin (Santa Cruz) als Nachweis der Membranfraktion.

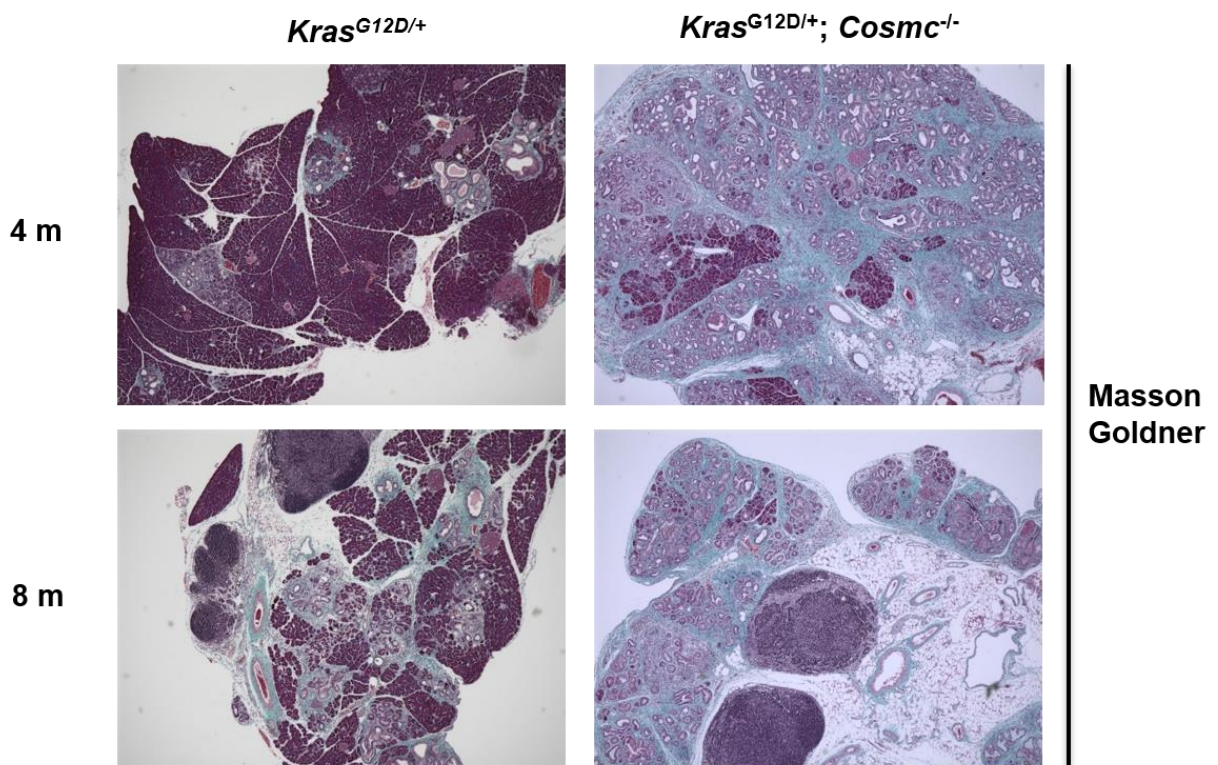
VVA: Vicia villosa lectine; WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

Die Analyse der Membranfraktion ergab, dass sowohl  $Kras^{G12D/+}; Cosmc^{-/-}$  als auch  $Cosmc^{-/-}$  eine starke Tn-Expression von membranassoziierten Proteinen aufweisen. Die ausgeprägten, jedoch unterschiedlichen Bandenmuster lassen darauf schließen, dass je nach Genotyp verschiedene, membranassoziierte Proteine Tn exprimieren.

### 3.10 Fibrosierung

Ein Charakteristikum des Pankreaskarzinoms stellt die starke Fibrosierung des Gewebes dar. Da eine *Kras*-Mutation im Vergleich dazu eher zu einer langsameren desmoplastischen Reaktion neigt, sollte die Auswirkung einer aberranten O-Glykosylierung auf die Fibrosierung des Parenchyms untersucht werden. Dafür wurden sowohl immunhistochemische Methoden als auch Western-Blot Analysen angewendet.

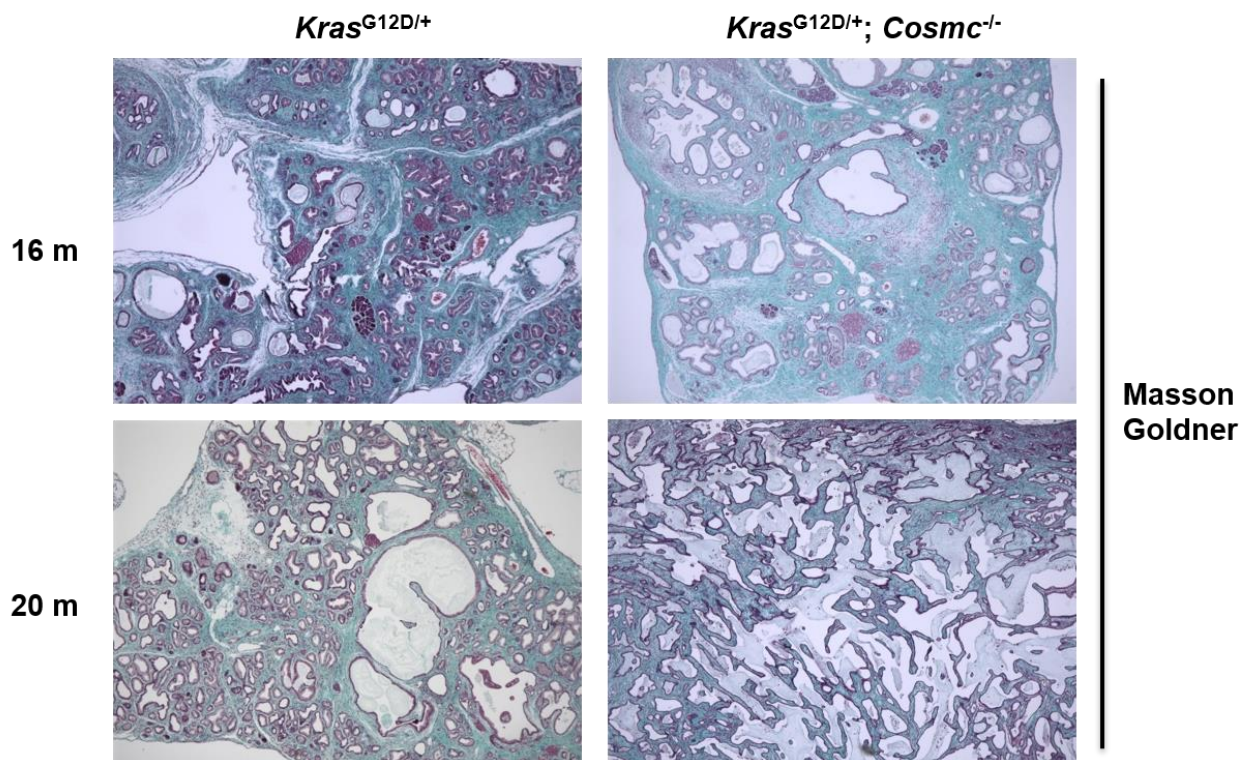


**Abbildung 28:** Masson Goldner Färbung der Pankreata der Genotypen *Kras*<sup>G12D/+</sup> und *Kras*<sup>G12D/+;Cosmc</sup><sup>-/-</sup> junger Altersstufen. Der fibrosierte Anteil des Pankreas stellt sich grün dar. Die verbliebenden physiologischen Areale des Pankreas erscheinen violett. (Obere Zeile: 4 Monate, untere Zeile: 8 Monate).

(Originalvergrößerung 40x)

Bereits im Alter von vier Monaten zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen ab. Das Parenchym des Genotypen *Kras*<sup>G12D/+</sup> weist nur vereinzelt

fibrotische Anteile, insbesondere um die Gefäße herum auf. Bei dem Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  macht die Fibrose bereits den größten Anteil des Parenchyms aus. Im zeitlichen Verlauf nimmt der fibrotische Anteil bei  $Kras^{G12D/+}$  weiter zu, erreicht allerdings nicht das Ausmaß des fibrotischen Anteils von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Zwischen den zwei Altersstufen der  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  Genotypen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.



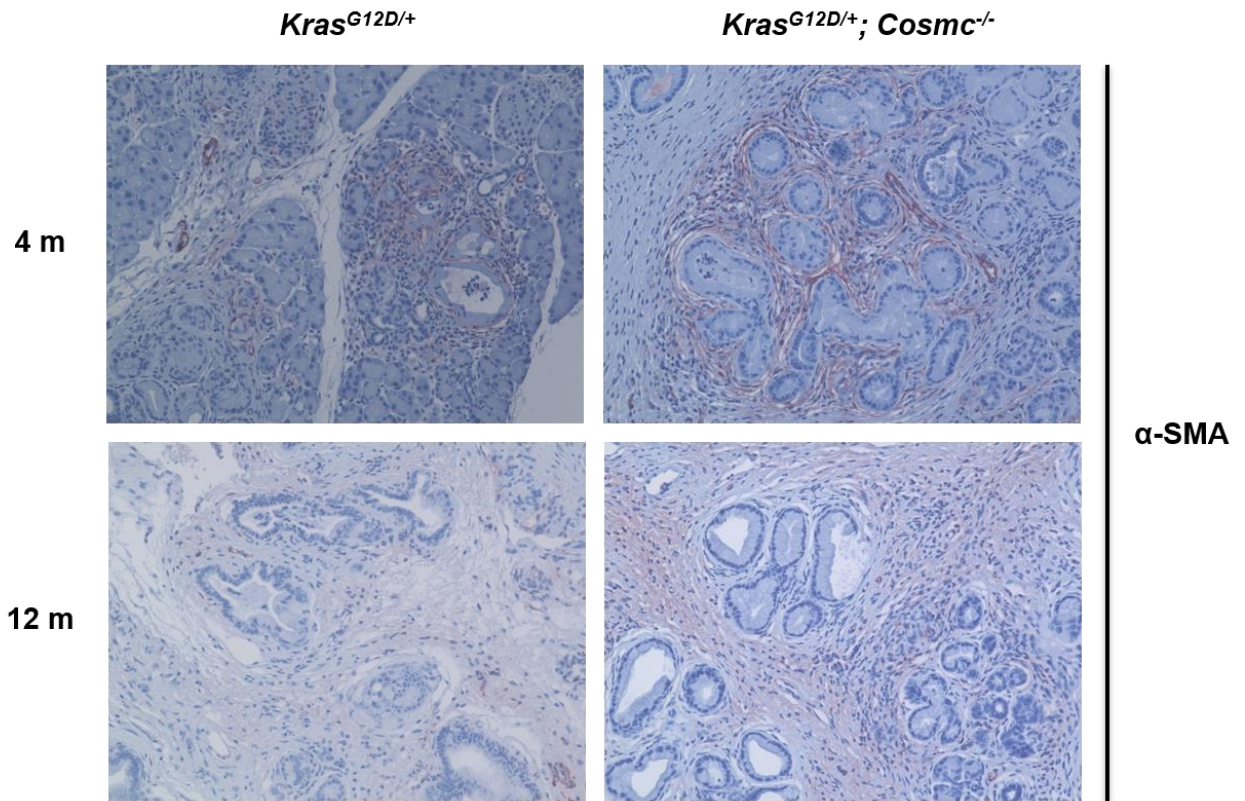
**Abbildung 29:** Masson-Goldner Färbung der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Alter von 16 und 20 Monaten. Der fibrotische Anteil stellt sich grün dar. Physiologische Areale zeigen sich violett.

(Originalvergrößerung 40x)

Um den Verlauf der Fibrosierung mit zunehmendem Alter weiter beurteilen zu können, wurden zwei weitere Altersstufen (16 und 20 Monate) immunhistochemisch untersucht. Während der Unterschied zwischen den beiden Genotypen in den jüngeren Altersstufen sehr eindeutig war, ließ sich bei den älteren Tieren kein derart deutlicher Unterschied mehr ausmachen. Beide Organe weisen einen sehr großen Anteil an fibrotischem Gewebe auf. Im Gegensatz zu  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  weist



$Kras^{G12D/+}$  allerdings noch Anteile intakter Azini auf. Auffällig ist jedoch, dass die Fibrose bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  aufgrund der massiven ductalen Hyperplasie anteilig zurückging.



**Abbildung 30:** Immunhistochemische Darstellung des Fibrose-assoziierten Proteins  $\alpha$ -SMA (Rotfärbung) unter Verwendung des mAK Anti-alpha-smooth-muscle-actin-antibodys (1A4) (Abcam). Zum Vergleich der Progression wurden zwei Altersstufen (Obere Zeile: 4 Monate, untere Zeile: 12 Monate) der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  analysiert. (Originalvergrößerung 200x)

$\alpha$ SMA: *Smooth muscle actin  $\alpha$*

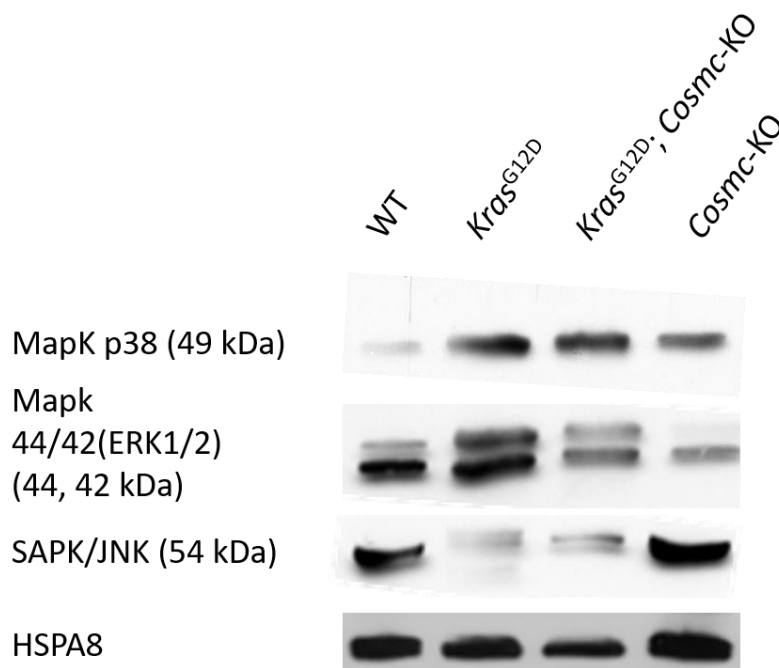
Um das Ausmaß der Fibrosierung weiter zu analysieren wurde eine immunhistochemische Färbung mittels eines Anti- $\alpha$ -SMA Antikörpers (Abcam) unternommen.  $\alpha$ -SMA wird eine Rolle in der Entstehung der Fibrosierung zugesprochen. Während das Parenchym des vier Monate alten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  eine leichte Färbung des Stromas aufweist, zeigt das Pankreas des älteren Tieres keinen derartigen Effekt. Im Vergleich dazu zeigt das Gewebe des jüngeren Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  eine deutliche Färbung des Stromas. Das 16 Monate

alte Gewebe zeigt ebenfalls ein ähnliches Verteilungsmuster der  $\alpha$ -SMA Expression.

### 3.11 Veränderung der Signalkaskaden

Um die Auswirkung einer differentiellen O-Glykosylierung im Rahmen der Tumorentstehung bezüglich Proliferation, Metastasierung und Apoptoseverhalten zu analysieren wurden diverse Signalkaskaden mittels Western-Blot analysiert.

#### 3.11.1 Map-Kinase Signalweg



**Abbildung 31:** Western-Blot der pankreatischen Proteinlysate der Genotypen WT, Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup>. Darstellung der an dem MAPK-Signalweg beteiligten Proteine MapK38, MapK44/42 und SAPK/JNK mittels mAK (Cell Signaling).

HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

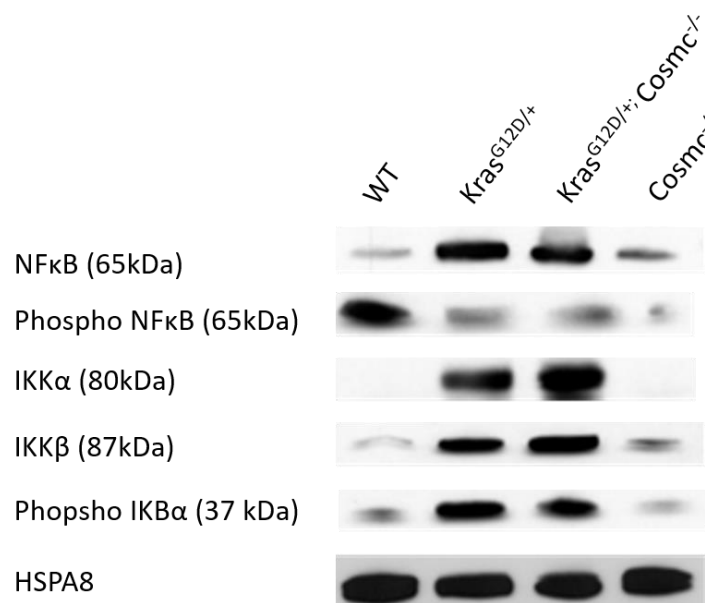
JNK: c-Jun N-terminal kinase; Mapk: Mitogen activated protein kinase; SAPK: Stress activated protein kinase; mAK: monoklonale Antikörper; WT: Wildtyp. Alter: 12 Monate

Während der Wildtyp bei MapK p38 nur ein schwaches Signal zeigt, zeigen die drei anderen Genotypen stärkere Signale. Die stärksten Signale weisen die tumorassoziierten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  auf.

MapK 44/42 (ERK 1/2) tritt als Doppelbande auf. Während MapK p44 das stärkste Signal in  $Kras^{G12D/+}$  zeigt, weisen der Wildtyp und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  eine schwächere MapKp44 Expression auf.  $Cosmc^{-/-}$  zeigt hingegen keine MapK44 Expression. Im Vergleich dazu weisen der Wildtyp und  $Kras^{G12D/+}$  ein starkes MapK42 Signal auf;  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  zeigen schwächere Signale.

SAPK/JNK wird in den tumorassoziierten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  nur sehr schwach exprimiert, während der Wildtyp und  $Cosmc^{-/-}$  starke Signale aufweisen. Zusammenfassend führt ein Knockout von  $Cosmc$  bei einer zeitgleichen Mutation von  $Kras$  zu einem anderen Aktivierungsmuster des MapK-Signalweges als bei einem alleinigen Ausfall dessen.

### 3.11.2 NF- $\kappa$ B-Signalweg



**Abbildung 32:** Western-Blot Analyse der Proteine des NFκB-Signalwegs (Cell Signaling). Verglichen werden die Genotypen WT; Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup>.

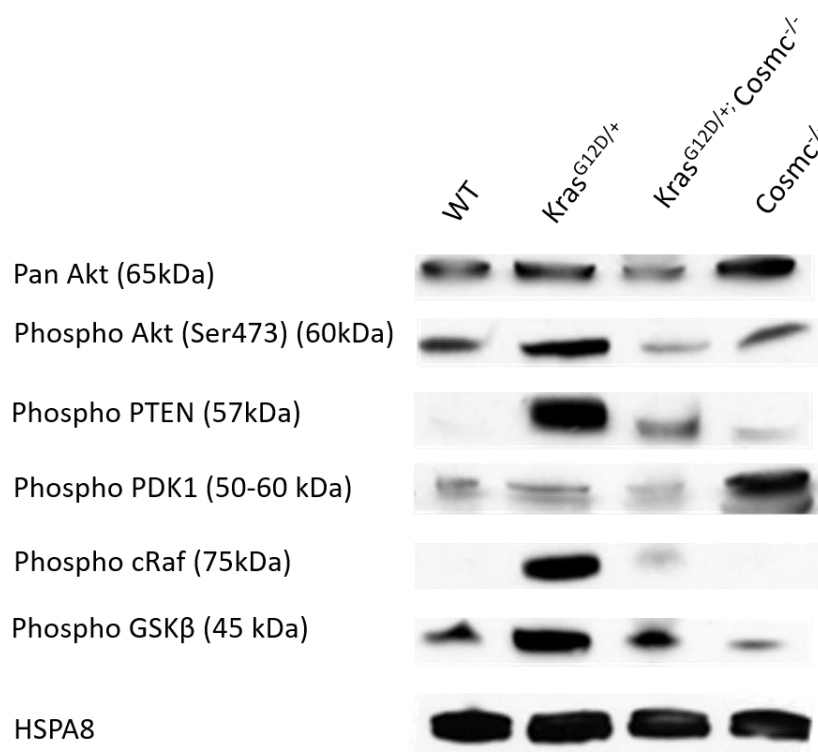
HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

IκBα: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α; IKKα: IκB kinase alpha; IKKβ: inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta; NFκB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

Es zeichnet sich deutlich ab, dass die beiden tumorassoziierten Genotypen Kras<sup>G12D/+</sup> und Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> eine starke Expression von NFκB, IKKα, IKKβ und Phospho-IκBα zeigen. Lediglich Phospho-NFκB zeigt im Wildtyp das stärkste Signal und scheint in den anderen Genotypen nur schwach exprimiert zu werden. Ein Cosmc-knockout scheint sich im Tumorkontext nicht maßgeblich auf die Aktivierung des NFκB-Signalweges auszuwirken.

### 3.11.3 PI3K/Akt-Signalweg



**Abbildung 33:** Western Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Darstellung der an dem PI3K/Akt-Signalweg beteiligten Proteine (Kit von Cell Signaling).

HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

Akt: Proteinkinase B; cRaf: c-rapidly accelerated fibrosarcoma/ serin/threonin Kinase, GSK3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase 3; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PTEN: Phosphatase and Tensin homolog; PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase-1; , WT: Wildtyp

Alter: 12 Monate

Pan-Akt wird im Wildtyp,  $Kras^{G12D/+}$  und  $Cosmc^{-/-}$  in etwa gleich stark exprimiert. Allein  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt eine schwächere Expression. Phospho-Akt zeigt starke Signale im Wildtyp und  $Kras^{G12D/+}$  und schwächere Signale in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ .

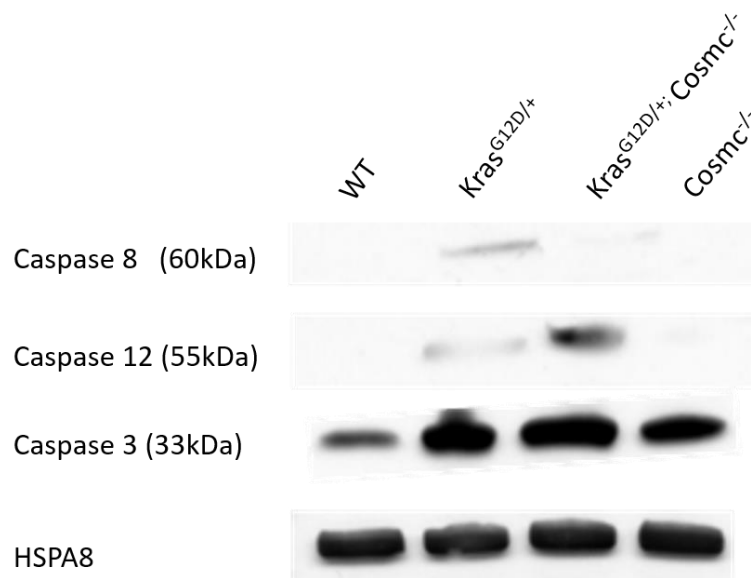
Phospho PTEN ist in  $Kras^{G12D/+}$  am stärksten exprimiert.  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  weisen schwache Signale auf, während der Wildtyp kein PTEN zu exprimieren scheint.

Phospho PDK1 zeigt das stärkste Signal in  $Cosmc^{-/-}$ , während die anderen drei Genotypen nur schwache Signale zeigen.

Phospho cRaf wird in  $Kras^{G12D/+}$  stark exprimiert und zeigt ein schwaches Signal in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Der Wildtyp und  $Cosmc^{-/-}$  zeigen keine Phospho cRaf Expression.

Phospho GSK3 $\beta$  zeigt das stärkste Signal in  $Kras^{G12D/+}$ . Der Wildtyp und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  weisen ebenfalls Banden auf, während  $Cosmc^{-/-}$  nur ein schwaches Signal zeigt. Zusammenfassend weist  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Gegensatz zu  $Kras^{G12D/+}$  durchgehend schwächere Signale auf.

### 3.11.4 Caspase/ Apoptose-Signalweg



**Abbildung 34:** Western-Blot Analyse der pankreatischen Proteinlysate der Genotypen WT, Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup>. Darstellung der an den Apoptose-Signalweg beteiligten Caspasen mittels mAK von Cell Signaling.

HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

mAK: monoklonaler Antikörper; WT: Wildtyp

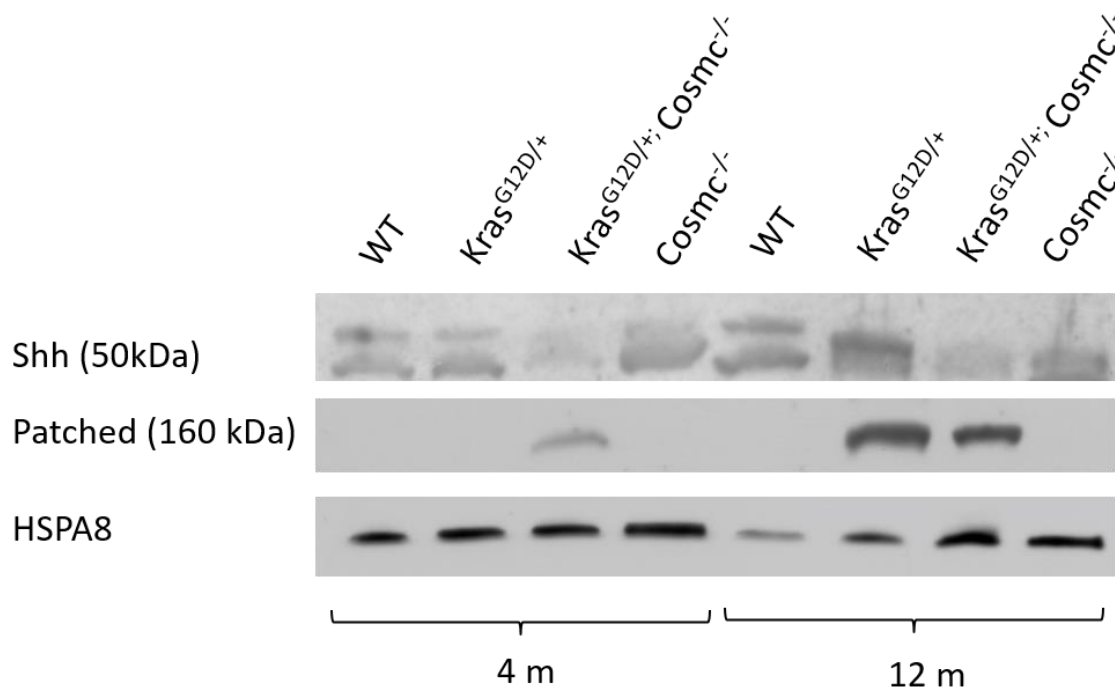
Alter: 12 Monate

Als Effektorproteine der Apoptose wurden die verschiedenen Caspasen via Western-Blot analysiert. Die Initiator-Caspase 8 wird lediglich in Kras<sup>G12D/+</sup> schwach exprimiert. Die anderen Genotypen zeigen kein Signal.

Die Caspase 12 wird in Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> am stärksten exprimiert, wohingegen Kras<sup>G12D/+</sup> ein schwaches Signal zeigt. Der Wildtyp und Cosmc<sup>-/-</sup> scheinen keine Caspase 12 zu exprimieren.

Die Effektor-Caspase 3 wird in Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup> sehr stark exprimiert und zeigt im Wildtyp ein schwächeres Signal. Ein Cosmc-knockout führt im Tumorkontext zu einer veränderten Aktivierung des Apoptose-Signalweges.

### 3.11.5 Shh/patched Signalweg



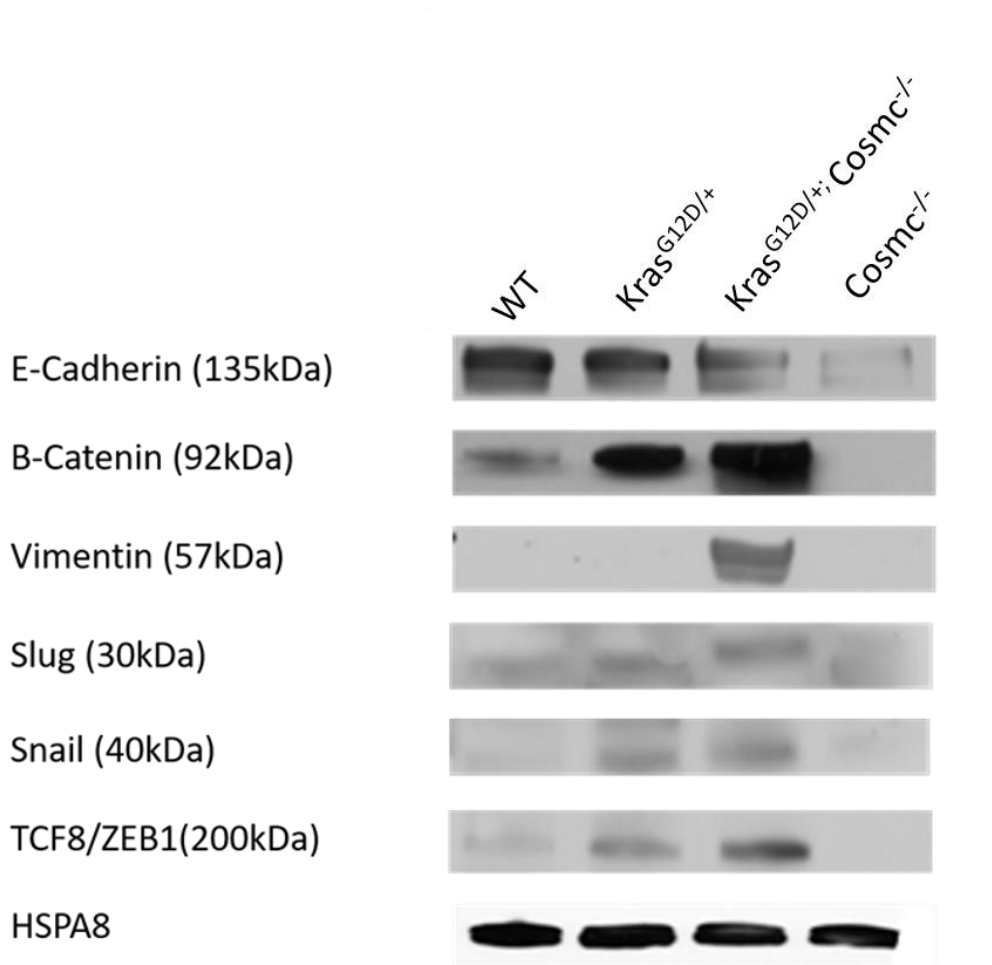
**Abbildung 35:** Western-Blot Analyse der Proteinlysate der 4 und 12 Monate alten Genotypen WT, Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup>. Darstellung der Proteine Shh und patched mittels monoklonaler Antikörper von R&D Systems.

HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle

Shh: Sonic hedgehog, WT: Wildtyp

Als entscheidender Signalweg der Embryonalentwicklung wurden die beteiligten Proteine Shh und patched analysiert. Sowohl in den jungen als auch in den alten Mäusen zeigt Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> eine verminderte Expression von Shh. Die anderen Genotypen zeigen eine etwa gleichstarke Expression von Shh. Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> weist in beiden Altersstufen eine patched Expression auf. Kras<sup>G12D/+</sup> zeigt hingegen erst mit 12 Monaten eine patched Expression. Eine veränderte O-Glykosylierung führt im Falle des Shh-Signalweges zu einer schwächeren Aktivierung desselben.

### 3.12 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)



**Abbildung 36:** Western-Blot Analyse der Proteinlysate der 4 Monate alten Genotypen WT, *Kras<sup>G12D/+</sup>*, *Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup>* und *Cosmc<sup>-/-</sup>*. Dargestellt sind die an der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition beteiligten Proteine, welche mittels monoklonaler Antikörper von Cell Signaling detektiert wurden.

HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle.

ZEB1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1; TCF8: Transcription factor 8; WT: Wildtyp

Die Fähigkeit zur Metastasierung wird als wichtiges Malignitätskriterium gewertet. Um diese zu untersuchen, erfolgte eine Western-Blot Analyse verschiedener Proteine, welche an der sog. „Epithelialen-Mesenchymalen-Transition“ beteiligt sind. Um den zeitlichen Verlauf der EMT zu analysieren wurden zwei verschiedene Altersstufen verwendet. Abbildung 36 zeigt den Westernblot der jungen Mäuse (4 Monate).

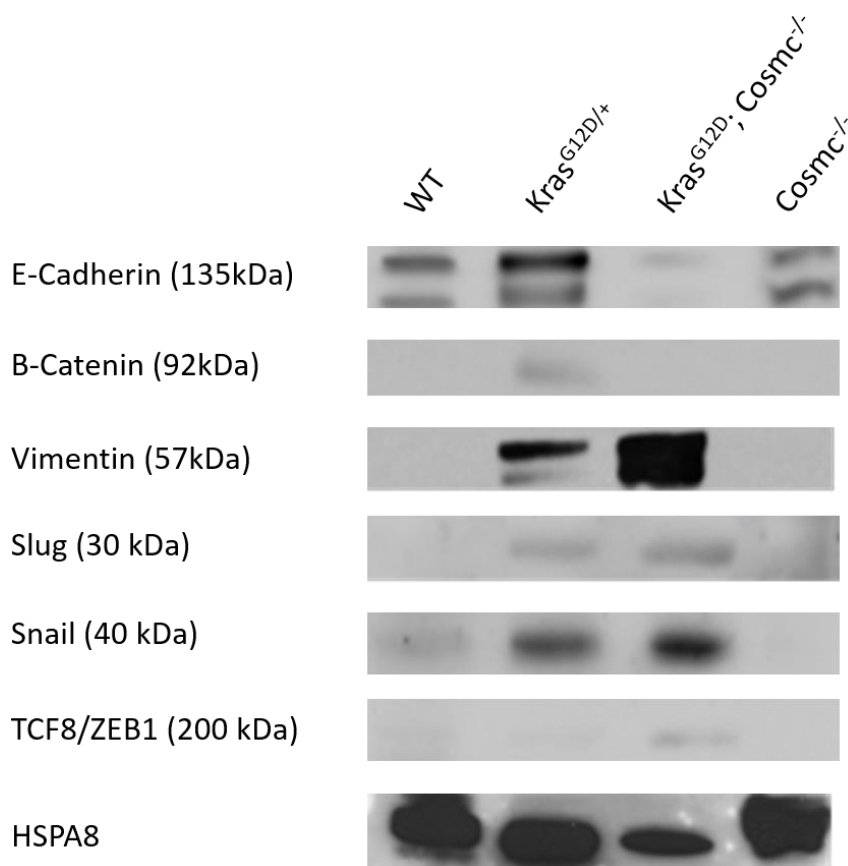


E-Cadherin wird im Wildtyp am stärksten exprimiert.  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigen ein schwächeres Signal, während  $Cosmc^{-/-}$  das schwächste Signal zeigt.

$\beta$ -Catenin zeigt in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Kras^{G12D/+}$  das stärkste Signal. Eine schwache Expression zeigt sich im Wildtyp.  $Cosmc^{-/-}$  hingegen zeigt keine  $\beta$ -Catenin Expression.

$Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigt eine deutliche Expression von Vimentin, während die restlichen drei Genotypen keine Vimentin Expression zeigen.

Slug zeigt in allen vier Genotypen schwache Signale. Snail hingegen wird lediglich in  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  exprimiert. TCF8/ZEB1 zeigt eine deutliche Expression in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Schwächere Signale sind bei  $Kras^{G12D/+}$  und dem Wildtyp zu sehen während  $Cosmc^{-/-}$  kein TCF8/ZEB1 exprimiert.

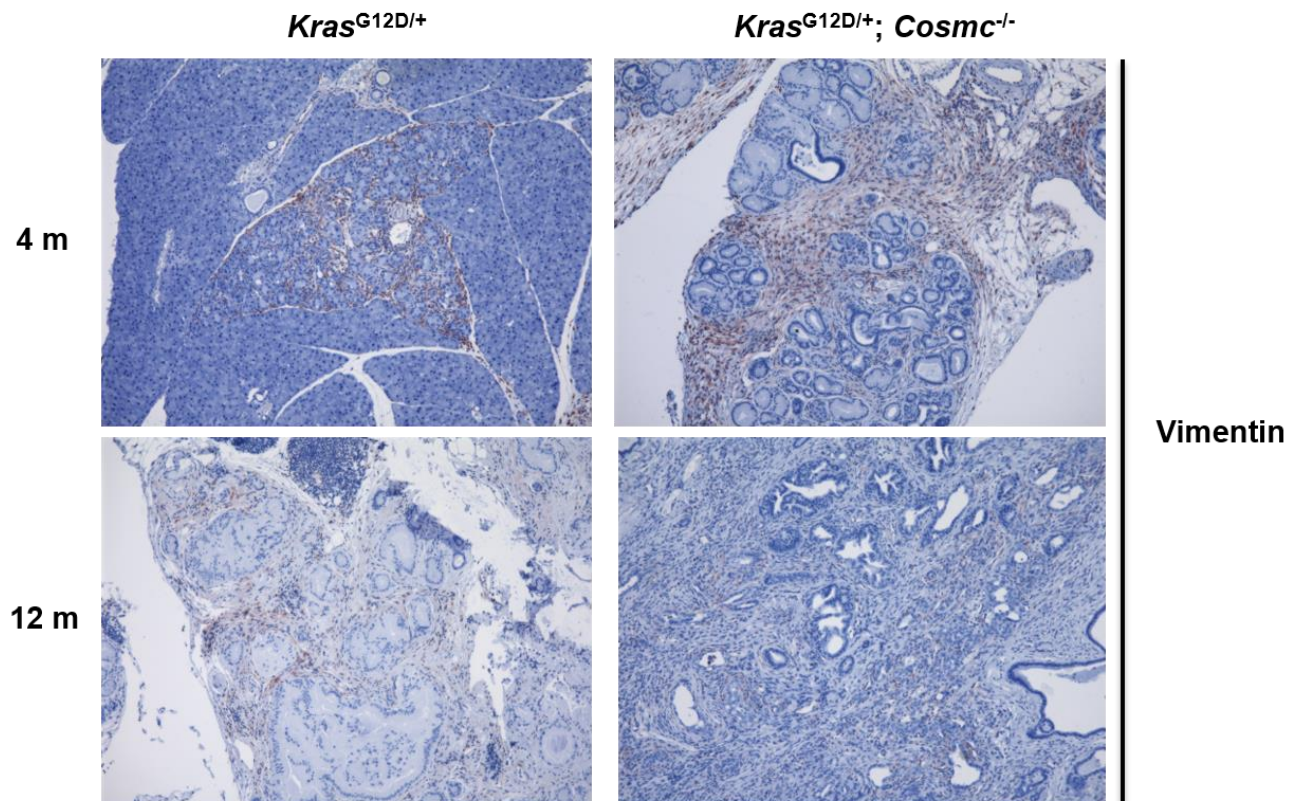


**Abbildung 37:** Western Blot Analyse der Proteinlysate der 12 Monate alten Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Darstellung der EMT-assoziierten Proteine (EMT Kit von Cell Signaling).

HSPA8 (Cell Signaling) als Ladekontrolle.

ZEB1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1; TCF8: Transcription factor 8; WT: Wildtyp

Analog zu der Western Blot Analyse der 4 Monate alten Tiere wurden Analysen der Lysate der 12 Monate alten Mäuse durchgeführt. Im Vergleich zeigte sich, dass  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Alter von 12 Monaten kein E-Cadherin mehr exprimierte. Des Weiteren zeigten die alten  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  Mäuse keine Expression von  $\beta$ -Catenin. Das Signal von Vimentin bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  war in beiden Altersstufen etwa gleich stark.  $Kras^{G12D/+}$  hingegen exprimierte mit zunehmendem Alter Vimentin. Die Western-Blots für Snail, Slug und TCF8/ZEB1 zeigen keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Altersstufen. Ein Knockout von *Cosmc* führt in beiden Altersstufen im Vergleich zu  $Kras^{G12D/+}$  zu einer veränderten Expression der beteiligten Proteine.



**Abbildung 38:** Immunohistochemische Färbung der Pankreata der 4 und 12 Monate alten Genotypen *Kras*<sup>G12D/+</sup> und *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *Cosmc*<sup>-/-</sup> mittels des Anti-Vimentin-Antikörpers (Cell Signaling). (Originalvergrößerung 40x)

Vimentin spielt bei der EMT als mesenchymales Filament eine zentrale Rolle und ist im Rahmen der EMT erhöht. Vimentin zeigte in den Western Blots deutliche Signale in *Kras*<sup>G12D/+</sup> und *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *Cosmc*<sup>-/-</sup>. In beiden Genotypen zeigt sich eine deutliche Rotfärbung des Stromas, rund um die Azini und Ductus herum. Während die Färbung bei *Kras*<sup>G12D/+</sup> mit dem Alter leicht zunahm, konnte bei *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *Cosmc*<sup>-/-</sup> analog zu den Western Blots keine Zunahme der Vimentin Expression gezeigt werden.

## 4. Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit der Frage, inwieweit sich eine veränderte O-Glykosylierung und eine damit einhergehende Tn-Antigen Expression auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms auswirkt. Es wurden die Pankreata der Genotypen Wildtyp,  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  verglichen, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich der beiden tumorassoziierten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  lag. Dabei wurden Veränderungen der Progression, Proliferation und Metastasierungsfähigkeit der Pankreaskarzinome erörtert und mittels immunhistochemischer Verfahren sowie Western-Blot Analysen dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit werden sowohl makroskopische Aberrationen als auch Veränderungen auf Zellebene aufgezeigt und in der Zusammenschau mit der aktuellen Literatur diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Auswirkung eines *Cosmc*-Knockouts auf das Pankreaskarzinom *in vivo* gezeigt.

Nach Präparation der Mäuse der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigte die makroskopische Begutachtung der Organe deutlich vergrößerte und inhomogene Pankreata des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  (s. Abb. 11). Der Tastbefund ergab ein deutlich verhärtetes und narbig verändertes Gewebe, was bereits auf einen malignen Prozess hindeutete. Passend dazu ergab die Analyse der Organgewichte der entnommenen Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Verlauf einen signifikanten Unterschied ( $p=0<,0001$ ). Während die Organe der vier Monate alten Tiere in etwa gleich schwer waren, so wiesen die Pankreata des Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  mit zwölf Monaten ein etwa doppelt so schweres Organ auf (s. Abb. 12). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte Tumormasse mit einer schlechteren Prognose und einem verringertem Gesamtüberleben korreliert (Benassai et al., 2000; Kurata et al., 2017; Yeo et al., 1995). Dementsprechend ist bei den Tumoren der  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  Genotypen von bösartigeren Phänotypen auszugehen.

In Abbildung 14 sind die histopathologischen Analysen der Organe dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der desmoplastische Umbau der Pankreata von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  wesentlich schneller voranschreitet als bei  $Kras^{G12D/+}$ . Bereits

im Alter von drei Monaten bestanden die Pankreata von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zu etwa als 75% aus desmoplastisch veränderten Gewebe. Dies verdeutlicht, dass eine Tn-Expression auf mikroskopischer Ebene schon sehr früh zu malignen Veränderungen im Gewebe führt. Die Gegenüberstellung von Vorläuferläsionen zu Karzinomen bestätigt diese Beobachtung erneut. Während  $Kras^{G12D/+}$  mit drei Monaten eher wenige manifeste Karzinome aufweist, finden sich in etwa der Hälfte der Organe von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bereits Karzinome. Im Alter von zwölf Monaten zeigten sich bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  fast ausschließlich PDACs, wohingegen  $Kras^{G12D/+}$  noch einen großen Anteil an Vorläuferläsionen wie den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIn) aufweist.

Passend dazu zeigte die HE-Färbung in Abbildung 13, dass bereits im Alter von vier Monaten ein auffälliger Unterschied zwischen den Geweben der beiden Genotypen existiert. Während das Pankreas von  $Kras^{G12D/+}$  noch große Anteile an intakten, physiologischen Azini aufweist, ist das Parenchym von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  stark desmoplastisch verändert. Es sind zahlreiche erweiterte Gangsysteme mit einer dazwischenliegenden Fibrose zu erkennen. Physiologisches Pankreasgewebe ist hingegen nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz zu der makroskopischen Größenzunahme scheint sich eine veränderte O-Glykosylierung mikroskopisch also schon von Beginn an auf die Karzinogenese auszuwirken.

Zusammenfassend führt eine aberrante O-Glykosylierung als Folge eines  $Cosmc$ -Knockouts durch eine gesteigerte Proliferation zu einer Größen-, und Gewichtszunahme des Tumors.

Um die gesteigerte Proliferationsrate der  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  Tumore weiter zu analysieren wurden immunhistochemische Färbungen mittels des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Ki-67 ist ein nukleäres Antigen und wird in sich-teilenden Zellen exprimiert. Daher wird Ki67 in diversen Tumorentitäten als Proliferationsmarker genutzt (Gerdes et al., 1984). Die immunhistochemische Ki67 Färbung in Abbildung 15 zeigte bereits im Alter von vier Monaten einen deutlichen Unterschied zwischen den Geweben der beiden Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Der Genotyp  $Kras^{G12D/+}$  weist vereinzelt Braunfärbungen auf, welche insbesondere in den desmoplastisch umgebaut Arealen auftreten. Im physiologischen Pankreasgewebe finden sich ebenfalls vereinzelte Färbungen.

Dies beruht am ehesten auf der Tatsache, dass das Gewebe in einer Tumorumgebung einer ständigen Regeneration unterliegt und somit Zellteilungen stattfinden. Bei gleichen Altersstufen wies  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  erwartungsgemäß eine vermehrte Expression von Ki67 auf, welche insbesondere in den Epithelien der erweiterten Gänge akzentuiert war.

Zum Nachweis einer physiologischen O-Glykosylierung wurde sowohl eine Western-Blot Analyse als auch eine immunhistochemische Färbung mittels des Lektins PNA durchgeführt (s. Abb. 16 und 17). PNA detektiert das physiologische T-Antigen und weist somit eine physiologische O-Glykosylierung des murinen Pankreas nach (Bird, 1964).

In der Western-Blot Analyse wies lediglich der Wildtyp eine physiologische O-Glykosylierung auf. Bei  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  konnte hingegen keine T-Antigen Expression via Western Blot verzeichnet werden. In der Histologie (s. Abb. 17) zeigte das Parenchym von  $Kras^{G12D/+}$  hingegen eine Färbung für PNA. Sowohl das Epithel der Ductus als auch intraductale Strukturen zeigen eine Anfärbbarkeit. Da  $Kras^{G12D/+}$  ohne  $Cosmc$ -knockout nicht zwangsläufig einer veränderten O-Glykosylierung unterliegt, ist eine T-Antigen-Expression durchaus vorstellbar. Die Negativität für PNA im Western-Blot beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Tatsache, dass im denaturierten Gesamtlisat die Epitop-Bindung zu schwach war und es somit im gesunden Pankreas reaktiv, nicht aber in fibrotisch umgebauten Gewebe erschien.

Zum Nachweis einer Tn-Expression wurden analog zum PNA Nachweis Western-Blot Analysen und immunhistochemische Färbungen mittels der Lektine VVA und DBA sowie der Antikörper Anti-Tn und Anti-STn durchgeführt. VVA und DBA sind pflanzliche Lektine, welche als glykanbindende Proteine spezifische GalNAc-Reste binden (Babino et al., 2003; Nash, Neves, Faast, Pierce, & Dalton, 2007; Tollefsen & Kornfeld, 1983).

Der VVA-Western-Blot (s. Abb. 18) sowie der Anti-Tn-Western-Blot (Abb. 22) zeigten deutliche Signale in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$ . Das Bandenmuster unterschied sich zwischen den beiden Genotypen dabei deutlich. Diese Beobachtung zeigt, dass Proteine von unterschiedlicher Molekulargröße Tn tragen. Im Vergleich weist das ausgeprägtere Bandenmuster von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$

darauf hin, dass im Tumorkontext vermehrt Proteine aberrant o-glykosyliert sind als bei einem alleinigen Ausfall von Cosmc.

Der Wildtyp und  $Kras^{G12D/+}$  zeigten hingegen keine Tn-Expression. In Kombination mit dem negativen PNA Blot galt eine differentielle O-Glykosylierung der Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Cosmc^{-/-}$  als nachgewiesen.

Bei den immunhistochemischen Färbung mittels des Anti-Tn-Antikörpers, VVA und DBA (s. Abb. 23, Abb. 19 und Abb. 21) zeigte  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  eine starke Färbung des Gewebes. Auch hier sind insbesondere die ductalen Epithelien und intraductale Strukturen wie Muzine gefärbt. Im Vergleich mit der Ki67 Färbung passt der Umstand dazu, dass sowohl die Ki67-, als auch die Tn-Expression in den proliferierenden Gangsystemen der Tumoren stattfinden. Im Western-Blot konnte eigens eine Tn-Expression von hochmolekularen Proteinen nachgewiesen werden. In der Histologie zeigten sich passend dazu intraductale Muzine stark Tn-positiv. Da Muzine hochmolekulare Gewichte aufweisen (Ramsey, Rushton, & Ehre, 2016), bestärken sich diese Ergebnisse also gegenseitig.

In der VVA (s. Abb. 19) sowie DBA-Färbung (s. Abb. 21) zeigte  $Kras^{G12D/+}$  ebenfalls eine leichte Anfärbbarkeit einiger Gangstrukturen. Dies könnte beispielweise auf einer unspezifischen Bindung des Lektins beruhen. Li et al. deuten auf die teils unspezifische Bindung von Lektinen und Antikörpern an andere Kohlenhydratstrukturen hin (Li, Anver, Butcher, & Gildersleeve, 2009). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der Tumor im Verlauf ohne externe Einflüsse eine veränderte O-Glykosylierung entwickelt hat. Da in 75-90% der Pankreaskarzinome Tn nachweisbar ist (Hofmann et al., 2015), besteht die Möglichkeit, dass Tn im ‚normalen‘ Prozess der Tumorprogression exprimiert wird.

In der Tn-Färbung (s. Abb. 23) hingegen zeigte sich das Stroma des  $Kras^{G12D/+}$  Tumors positiv. Da die vorherigen Färbungen mit VVA und DBA bei  $Kras^{G12D/+}$  eine Färbung in den ductalen Strukturen zeigte, beruht die Anfärbung des Stromas sehr wahrscheinlich auf einer unspezifischen Bindung des Antikörpers.

Im Gegensatz zum Anti-Tn Western-Blot zeigte  $Kras^{G12D/+}$  im Anti-STn Western-Blot (s. Abb. 24) mehrere Banden. Nach Betrachtung der vorangegangenen histologischen Färbungen, welche bei  $Kras^{G12D/+}$  teilweise positiv imponierten, könnte das Signal im Anti-STn Western-Blot ebenfalls dafürsprechen, dass  $Kras^{G12D/+}$  eigenständig

eine aberrante O-Glykosylierung etablierte. Insgesamt muss im Rahmen dieser Arbeit bedacht werden, dass viele verschiedene Mäuse des Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  analysiert wurden, und jeder Tumor möglicherweise eine veränderte O-Glykosylierung etabliert haben könnte. Jedoch kann parallel dazu ebenfalls oder ausschließlich eine physiologische T-Antigen-Expression erfolgen. Daher sind die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen an unterschiedlichen Pankreata eventuell nicht vollständig deckungsgleich.

Zur weiteren Differenzierung einer Tn- und STn-Expression wurde ein Sialyl-Verdau der Proteinlysate vorgenommen und anschließend durch einen VVA-Western-Blot (s. Abb. 25) analysiert. Bei den unverdauten Proben von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  war ein ausgeprägtes Bandenmuster sichtbar. Nach dem Verdau zeigte sich anderes und ausgedehnteres Bandenmuster. Die Proteine, welche zuvor STn trugen, zeigten sich nun als Tn-tragend und konnten somit im Western-Blot mittels VVA nachgewiesen werden.

Um die genaue Lokalisation von Tn in der Zelle zu detektieren, wurde eine Fraktionierung der Proteinlysate vorgenommen (s. Abb. 26 und Abb. 27). Dabei wurden die drei Fraktionen Zellkerne, Zellmembranen und Zytosol getrennt und mittels VVA-Western-Blot analysiert. Die Zytosolfraktion zeigte in  $Cosmc^{-/-}$  eine starke Bande und ein schwächeres Bandenmuster in der Membranfraktion.  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  scheint sowohl zytosolische als auch Zellkern,- und Membran-assoziierte Tn-Antigene zu exprimieren. Zellen interagieren untereinander hauptsächlich über die Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Da eine Tn-Expression mit einer verminderten Immunantwort des Körpers gegen den Tumor assoziiert ist (Ju et al., 2011), passt der Umstand, dass beide Tn exprimierenden Genotypen Tn auf ihrer Oberfläche tragen.

Die Fibrosierung des tumorassoziierten Stromas unterliegt diversen Signalkaskaden und ist ein hochkomplexer Prozess. Eine Fibrosierung des Gewebes gilt im Tumorkontext als Malignitätszeichen und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dabei spielen insbesondere sogenannte Tumor-assoziierte Fibroblasten eine zentrale Rolle. Sie können durch direkten Zell-Zellkontakt Tumorprogression, Invasion und Metastasierung des Tumors vermitteln (Huang,



Xu, Liu, Liu, & Li, 2014). Da das PDAC als ein äußerst stromareicher Tumor gilt (Pan, Liao, Niu, Zhou, & Zhao, 2015), ist es anzunehmen, dass die Fibrose Auswirkungen auf das Verhalten des Tumors hat. Daher wurde eine Masson-Goldner-Trichom-Färbung der Pankreata der Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  angefertigt (s. Abb. 28 und Abb. 29). Diese spezielle Färbung stellt fibrosiertes Gewebe grün dar (Goldner, 1938). Um die Expansion der Fibrose im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, wurden die Gewebe von vier, acht, sechzehn und zwanzig Monate alten Tieren untersucht.

Die Masson-Goldner-Trichom-Färbung konnte insbesondere bei den vier Monate alten Tieren einen signifikanten Unterschied der Fibrosierung beider tumorassozierten Genotypen darstellen. Während  $Kras^{G12D/+}$  noch große Anteile an physiologischen Azini aufwies, zeigte  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  ausgedehnte fibrotische Areale, welche die hyperplastischen Ductus umgaben. Physiologische Azini waren nur vereinzelt nachweisbar. Mit zunehmendem Alter glich sich das Ausmaß der Fibrose jedoch in etwa an. Diese Beobachtung spricht dafür, dass sich eine veränderte O-Glykosylierung vor allem zu Beginn der Tumorentstehung stark auf die Fibrosierung und Progression der  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  Tumore auswirkt. Diese Beobachtung unterstreicht zudem die Ergebnisse der histopathologischen Ergebnisse der Abbildung 14.

Zur weiteren Differenzierung der Fibrosierung wurde eine immunhistochemische Färbung mittels eines Anti- $\alpha$ -SMA-Antikörpers durchgeführt.  $\alpha$ -SMA wird von Tumor-assoziierten Fibroblasten exprimiert; ist im Tumor erhöht nachweisbar und kann daher als Fibrose-Marker herangezogen werden (Huang et al., 2014; Quante et al., 2011). Die Abbildung 30 stellt die  $\alpha$ -SMA-Färbung dar und unterstreicht die Beobachtungen der Masson-Goldner-Trichom Färbung. Der  $Cosmc$ -Knockout führt zu einer vermehrten Expression von  $\alpha$ -SMA im Bereich des Stromas, was für eine Expansion des fibrotischen Anteils spricht.

Um die genaueren Abläufe auf Zellebene zu erörtern wurden einige Signalwege via Western-Blot analysiert. Diese Signalwege sind an der Steuerung der Proliferation, Apoptose und Metastasierung beteiligt.

Einer davon ist der MapK-Signalweg. Es existieren vier unabhängige MapK-Signalwege: der klassischen MapK / ERK-Signalweg, der Big-MAP-Kinase-1 (BMK-

1) Signalweg, der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) Signalweg sowie der p38-MapK-Signalweg (Cossa et al., 2013). Ein konstitutiv aktivierter MapK-Signalweg führt zu vermehrtem Zellüberleben sowie Differenzierung und ist in vielen Tumorentitäten mutiert (De Luca et al., 2012; McCubrey et al., 2007). Zwei dieser Signalwege wurden mittels einer Western-Blot Analyse untersucht (s. Abb. 31). Während der Wildtyp bei MapK p38 nur ein schwaches Signal aufweist, zeigen die drei anderen Genotypen stärkere Signale. Die stärksten Signale zeigen die tumorassoziierten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass der MapK-Signalweg dort vermehrt aktiviert ist. Dass bei  $Cosmc^{-/-}$  im Gegensatz zum Wildtyp ebenfalls ein stärkeres Signal zu beobachten ist, zeigt, dass eine veränderte O-Glykosylierung unabhängig von einer Tumorentstehung zur Aktivierung dieses potenziell pro-onkogenen Signalweges führen kann.

Die Map-Kinasen 44/42 (ERK1/2) stehen am Ende der Signalkaskade und führen zur Transkription der entsprechenden Zielgene. Sie treten als Doppelbande auf. Die stärksten Signale zeigen sich in  $Kras^{G12D/+}$ . An dieser Stelle scheint ein  $Cosmc$ -knockout nicht zwangsläufig zu einer Hochregulation dieser Kinasen zu führen.

SAPK/JNK wird hingegen in den tumorassoziierten Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  nur sehr schwach exprimiert, während der Wildtyp und  $Cosmc^{-/-}$  starke Signale aufweisen. Dieser MapK-Signalweg scheint in den Tumorproben dementsprechend supprimiert zu sein. Es scheinen je nach Genotyp verschiedene ERK-Kinasen aktiviert zu sein. Wagner et al. postulierten, dass der JNK und p38 MapK Signalweg teilweise antagonistische Effekte auf die Proliferation und das Zellüberleben haben und eine spezifische Feinabstimmung zwischen diesen beiden Signalwegen besteht (E. F. Wagner & Nebreda, 2009). Daher würde der Umstand passen, dass der p38-Signalweg in den Tumorproben verstärkt aktiviert, der JNK Signalweg hingegen supprimiert ist. Passend dazu zeigen der Wildtyp sowie  $Cosmc^{-/-}$  schwache p38 Expressionen und starke SAPK/JNK Expressionen.

Des Weiteren wurde der NF- $\kappa$ B-Signalweg analysiert. NF- $\kappa$ B spielt eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion und der Immunantwort. In der Abbildung 32 zeichnet sich deutlich ab, dass die beiden tumorassoziierten

Genotypen  $Kras^{G12D/+}$  und  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bis auf Phospho-NF- $\kappa$ B eine starke Expression aller beteiligten Kinasen und Transkriptionsfaktoren zeigen. Da dieser Signalweg physiologisch im Organismus abläuft und Vorgänge auf Zellebene reguliert, zeigen auch der Wildtyp und  $Cosmc^{-/-}$  eine schwache Expression dieser (Hayden & Ghosh, 2008).

Ein alleiniger Ausfall von  $Cosmc$  scheint hingegen zu keiner vermehrten Aktivierung des Signalweges zu führen. Im Vergleich zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden tumorassoziierten Genotypen, was darauf schließen lässt, dass eine aberrante O-Glykosylierung in diesem Kontext keine größeren Auswirkungen auf die Aktivierung dieses Signalweges hat.

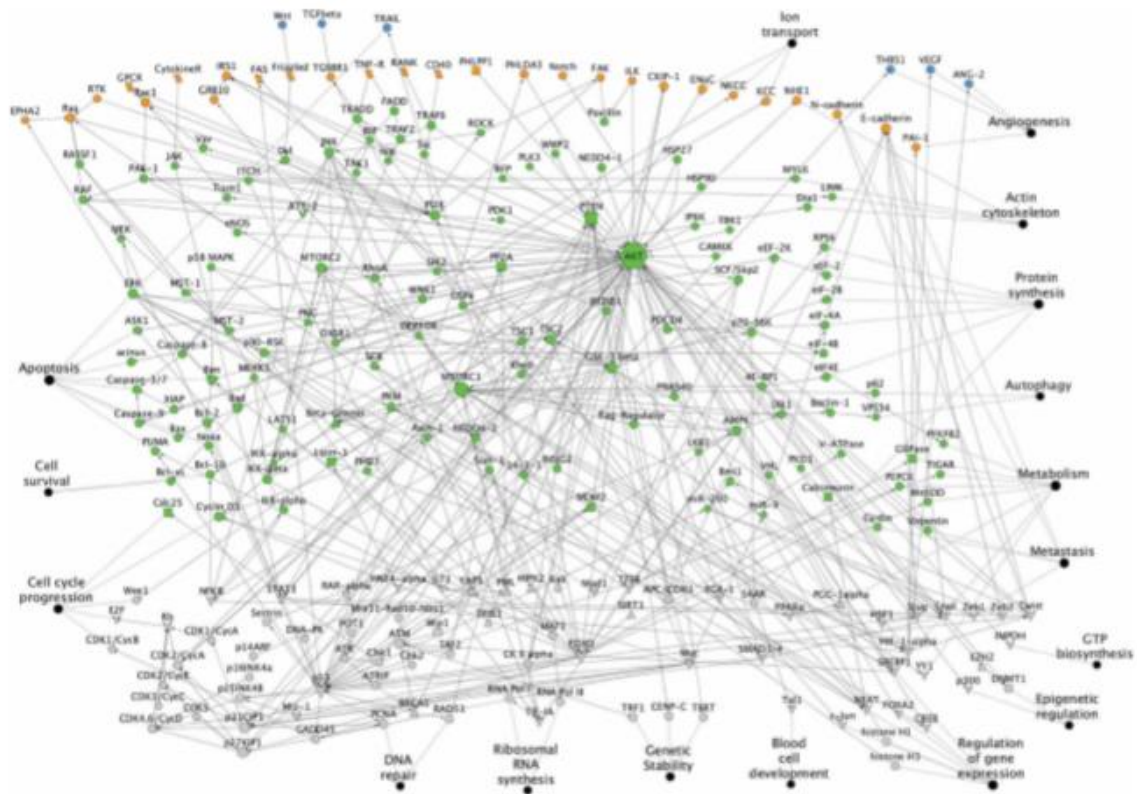
Ein weiterer Signalweg, welcher an essenziellen Prozessen wie Proliferation, Überleben, Angiogenese und Metastasierung beteiligt ist, ist der PI3K/Akt-Signalweg. Dieser ist in vielen Tumoren verstärkt nachweisbar (Manning & Cantley, 2007). Das Bandenmuster des Wildtyps spiegelt sehr wahrscheinlich den physiologischen Zustand der Aktivierung dieses Signalweges wider. Pan-Akt umfasst dabei diverse Akt-Kinasen. Pan-Akt wird in allen Genotypen etwa gleich stark exprimiert (s. Abb. 33).

In der Zusammenschau weist  $Kras^{G12D/+}$  bis auf Phospho-PDK1 die stärksten Signale in allen analysierten Proteinen auf. Da  $Kras^{G12D/+}$  die stärkste Phospho-Akt Expression aufweist, führt dies als negativer Feedbackmechanismus zu einer erhöhten PTEN Expression, welches Akt im zweiten Schritt inaktiviert. Des Weiteren zeigt  $Kras^{G12D/+}$  die stärkste Phospho-GSK3 $\beta$  Expression. Akt inhibiert durch Phosphorylierung die GSK3 $\beta$ , welche als Regulator des Zellzyklus fungiert. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle. Da  $Kras^{G12D/+}$  das stärkste Phospho-Akt Signal aufweist, passt es der Umstand, dass in  $Kras^{G12D/+}$  die stärkste Phospho-GSK3 $\beta$ -Expression (inaktivierte Variante) vorliegt.

$Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  weist ein ähnliches, jedoch durchgehend schwächeres Bandenmuster auf. Es ist davon auszugehen, dass dieser Signalweg in  $Kras^{G12D/+}$  vermehrt aktiviert ist. Phospho-PDK1 zeigt als Induktor von Akt das stärkste Signal in  $Cosmc^{-/-}$ , während die anderen drei Genotypen nur schwache Signale zeigen. Daher zeigt Pan-Akt auch sehr wahrscheinlich das stärkste Signal in  $Cosmc^{-/-}$ . Dies könnte dafürsprechen, dass ein alleiniger  $Cosmc$ -knockout zu einer vermehrten

Aktivierung von PI3K/Akt führt. Ansonsten zeigt *Cosmc*<sup>-/-</sup> ein ähnliches Bandenmuster wie der Wildtyp.

Zusammenfassend scheint der *Cosmc*-knockout bei *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*Cosmc*<sup>-/-</sup> im Gegensatz zu einer alleinigen *Kras*-Mutation zu einer Suppression dieses Signalweges zu führen.



**Abbildung 39:** Vollständige Darstellung des PI3K/Akt-Signalweges

(Ersahin et al., 2015)

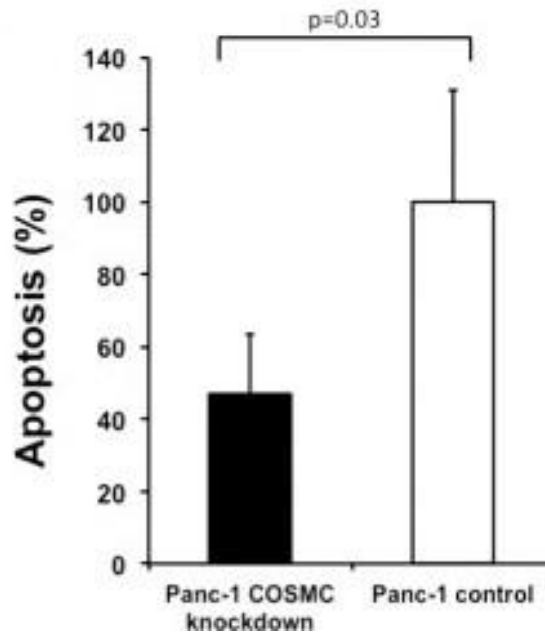
Betrachtet man jedoch das tatsächliche Ausmaß der Interaktionen des PI3K/Akt-Signalweges wird deutlich, dass eine vollständige Beurteilung dessen durch unsere Western-Blot Analysen nicht gänzlich möglich ist.

Als Effektorproteine der Apoptose wurden verschiedene Caspasen via Western Blot analysiert (s. Abb. 34). Die Initiatorcaspase Caspase 8 wird lediglich in *Kras*<sup>G12D/+</sup> schwach exprimiert. Die anderen Genotypen zeigen hingegen kein Signal. Die Caspase 12 wird in *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*Cosmc*<sup>-/-</sup> am stärksten exprimiert, was darauf schließen lässt, dass die über die Caspase 12 aktivierte Apoptose-kaskade in diesem Genotyp vermehrt aktiviert ist. Die Effektor-Caspase 3 wird in *Kras*<sup>G12D/+</sup>,

Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup> sehr stark exprimiert, was für eine vermehrte Apoptose im Gewebe spricht. Auch wenn zwischen Kras<sup>G12D/+</sup> und Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> kein deutlicher Unterschied nachweisbar ist, so zeigt Cosmc<sup>-/-</sup>, dass eine Tn-Expression alleine zu einer vermehrten Apoptose führen kann.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die Apoptose für den Untergang der Tumorzellen oder für das Absterben physiologischen Gewebes im Sinne einer pro-onkogenen Entwicklung spricht. In Tumorzellen ist die Apoptose tendenziell eher verringert, was zu einer vermehrten Proliferation und Progression des Tumors führt. In Studien mit Tumorzelllinien, welche einem Cosmc-knockout unterlagen, konnte eine verminderte Apoptose-Rate der Tumorzellen (s. Abb. 40) verzeichnet werden (Hofmann et al., 2015). Da in unseren Versuchen -im Gegensatz zu der genannten Studie- Gesamtproteinlysate und somit auch normales Gewebe analysiert wurde, lässt sich vermuten, dass die starken Signale in Kras<sup>G12D/+</sup>, Kras<sup>G12D/+</sup>;Cosmc<sup>-/-</sup> und Cosmc<sup>-/-</sup> für einen Untergang von gesundem Gewebe stehen.

Ein Beispiel für Apoptose-vermittelnde Rezeptoren ist die TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) -Rezeptorfamilie. Da die TRAIL-Rezeptoren O-glykosydische Strukturen enthalten, kann eine veränderte O-Glykosylierung die Rezeptorfunktion maßgeblich beeinflussen. Wagner et al. haben in einem Versuch die weitere Modulation des Tn-Antigens in pankreatischen Tumorzelllinien geblockt, um die Auswirkung einer veränderten O-Glykosylierung auf die TRAIL-Rezeptoren zu untersuchen. Sie konnten eine verminderte Sensitivität der Rezeptoren gegenüber ApoL2, einen potenziellen Liganden der TRAIL-Rezeptoren, verzeichnen. Folglich wurde die pro-apoptotische Signalgebung weniger stimuliert und somit ein stärkeres Überleben der Tumorzellen erreicht (K. W. Wagner et al., 2007). Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine aberrante O-Glykosylierung über den Apoptose-Signalweg zu einem besseren Überleben und somit zu einer schnelleren Progression der Tumorzellen führt.



**Abbildung 40:** Vergleich der Apoptose-Rate (%) von pankreatischen Krebszelllinien mit und ohne Cosmc-knockout. Die Cosmc-knockout Zelllinie weist eine signifikant ( $p=0,03$ ) geringere Apoptose-Rate auf.

(Hofmann et al., 2015)

Der Shh (Sonig-Hedgehog) -Signalweg ist durch Beeinflussung des Zellzyklus maßgeblich an der Embryogenese beteiligt. Ein vermehrt aktivierter Shh-Signalweg kann in der Embryonalphase zu schweren Fehlbildungen und im Erwachsenenalter zum Auftreten von Tumoren führen (Ingham & McMahon, 2001). Shh bindet an seinen Rezeptor ‚Patched‘ und führt über eine Hemmung dessen zur Regulation des Zellzyklus. Honselmann et al. konnten bereits zeigen, dass ein veränderter Shh-Signalweg eine große Rolle in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms spielt (Honselmann et al., 2015; Lauth & Toftgard, 2011).

Die Abbildung 35 zeigte sowohl im Alter von vier Monaten als auch im Alter von zwölf Monaten eine in etwa gleich starke Expression von Shh der Genotypen WT,  $Kras^{G12D/+}$  und  $Cosmc^{-/-}$ .  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  hingegen wies in beiden Altersstufen schwächere Signale auf. In diesem Zusammenhang scheint sich ein Cosmc-knockout nicht maßgeblich auf diesen Signalweg auszuwirken. Es erscheint sogar so, als würde sich ein Cosmc-knockout im Tumorkontext eher hemmend auf diesen Signalweg auswirken. Der Rezeptor Patched wurde im Alter von vier Monaten lediglich in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  vermehrt exprimiert. Da Shh über eine Hemmung von Patched auf den Zellzyklus wirkt, verwundert es nicht, dass  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bei einer geringen Shh-Expression eine starke Patched-Expression aufweist.

Obwohl in den Western-Blot-Analysen der Signalwege MapK-, PI3K/Akt-, NF- $\kappa$ B und Shh keine deutliche Hyperaktivierung in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zu verzeichnen war, zeigten die vorangegangene Untersuchung deutlich, dass  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  im Gegensatz zu  $Kras^{G12D/+}$  zu einer erhöhten Proliferation und Progression der Tumore neigt. Die Ergebnisse der Signalkaskaden-Analysen beruhen entweder auf einer zufälligen Momentaufnahme, oder diese Signalkaskaden sind nicht maßgeblich an der Auswirkung eines *Cosmc*-knockouts beteiligt. Darüber hinaus sind wie in Abbildung 39 gezeigt deutlich mehr Proteine an diesen Vorgängen beteiligt, als wir in unseren Western Blot Analysen abdecken konnten. Es existieren zahlreiche weitere Signalwege, welche im Rahmen der Karzinogenese von immenser Bedeutung sind und Gegenstand weiterer Studien sein könnten.

Die Prognose einer Tumorerkrankung hängt maßgeblich von der Metastasierungstendenz eines Tumors ab. Es existiert ein Prozess, bei dem ortständige Zellen die Fähigkeit zur Migration erlangen. Dieser Vorgang beruht auf einer Reorganisation des Zytoskeletts und wird ‚Epitheliale-Mesenchymale-Transition‘ (EMT) genannt. Zur weiteren Analyse der EMT erfolgten Western-Blot Analysen zwei verschiedener Altersgruppen (s. Abb. 36 und Abb. 37). Im Laufe der EMT kommt es zu einem Verlust von E-Cadherin, wodurch es den Zellen ermöglicht wird sich aus ihrem Zellverband zu lösen und zu migrieren (Aigner et al., 2007). Thomas et al konnten in Zelllinien mit einem *Cosmc*-knockout eine erhöhte EMT verzeichnen. Interessant war der Umstand, dass eine Re-Aktivierung des *Cosmc*-Gens zu einer MET (mesenchymalen-epithelialen-Transition), also zu einer Rückbildung der mesenchymalen Eigenschaften der Zellen führte (Thomas, Sagar, Caffrey, Grandgenett, & Radhakrishnan, 2019). Im Wildtyp konnte daher das stärkste E-Cadherin Signal beobachtet werden.  $Kras^{G12D/+}$  zeigte ein ähnlich starkes Signal während  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  ein schwächeres Signal zeigte. Im Alter von zwölf Monaten ließ sich kein E-Cadherin bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  nachweisen. Im Rahmen der EMT schien es bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  progredient zu einem E-Cadherin-Verlust gekommen zu sein. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Nachweis einer schnelleren Progression und dem erhöhten Potential zur Metastasierung, welches mit dem Alter steigt. *Cosmc*<sup>-/-</sup> schien nahezu kein E-Cadherin zu exprimieren. Dies veranschaulicht, dass eine veränderte O-

Glykosylierung auch ohne eine Tumorassoziation zu einer Umwandlung der Zelleigenschaften im Sinne einer erhöhten Migrationsrate führen kann.

$\beta$ -Catenin stellt die Verbindung zwischen dem Aktin des Zytoskeletts und den Cadherinen her und ist im Tumorkontext erhöht.  $\beta$ -Catenin führt über Induktion der entsprechenden Transkriptionsfaktoren zu einer Suppression von E-Cadherin, was wiederum die EMT begünstigt (Celen et al., 2015). Sowohl  $Kras^{G12D/+}$  als auch  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  wiesen als tumorassoziierte Genotypen die stärksten Signale auf, wobei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  das stärkste Signal zeigt. Dies spricht für eine vermehrte EMT als Zeichen eines erhöhten Metastasierungspotenzials bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . Eine schwache Expression zeigte sich im Wildtyp, welche wahrscheinlich als physiologisches Vorkommen dessen betrachtet werden kann.  $Cosmc^{-/-}$  zeigte hingegen keine  $\beta$ -Catenin Expression. Auffällig ist, dass im Alter von zwölf Monaten die  $\beta$ -Catenin Expression der anderen drei Genotypen rückläufig war.

Vimentin ist ein mesenchymales Filament und im Rahmen der EMT vermehrt nachweisbar (Gonzalez & Medici, 2014).  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigte bereits mit vier Monaten eine deutliche Expression von Vimentin, während die restlichen drei Genotypen keine Vimentin Expression aufwiesen. Im Alter von zwölf Monaten exprimierte  $Kras^{G12D/+}$  ebenfalls Vimentin. Dieser Umstand zeigt erneut, dass  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  bereits in früheren Stadien als  $Kras^{G12D/+}$  pro-onkogene Eigenschaften erlangt.

Die Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und ZEB1 gelten als Regulatoren der EMT und führen über die Suppression von E-Cadherin zum Verlust der Zelladhäsion (Aigner et al., 2007). Alle drei Transkriptionsfaktoren wurden in den tumorassoziierten Genotypen in beiden Altersstufen etwa gleich stark exprimiert. Auf Transkriptionsebene scheint sich bzgl. dieser Transkriptionsfaktoren keine Auswirkung eines  $Cosmc$ -knockouts zu manifestieren.

Ergänzend zu den Western-Blot Analysen wurde eine immunhistochemische Färbung mittels eines Anti-Vimentin-Antikörpers durchgeführt (s. Abb. 38). Anhand der Immunhistochemie zeigte sich, dass Vimentin insbesondere in Bereichen exprimiert wird, in denen Umbauprozesse als Zeichen einer malignen Entartung stattfinden. So zeigte sich in beiden Genotypen eine deutliche Rotfärbung des



Stromas, rund um die Azini und Ductus. Während die Färbung bei  $Kras^{G12D/+}$  mit dem Alter leicht zunahm, wies  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  analog zu den Western Blots von Anfang an eine vermehrte Vimentin Expression auf, welche mit zunehmenden Alter jedoch stagnierte.

Zusammenfassend führt ein  $Cosmc$ -knockout im Tumorkontext zu einer gesteigerten EMT und entsprechend zu einer erhöhten Metastasierungsfähigkeit.

Generell muss bedacht werden, dass unsere ältesten Tiere etwa 20 Monate alt waren, eine Maus jedoch bis zu drei Jahre alt werden kann. Die endgültigen Langzeiteffekte einer aberranten O-Glykosylierung auf das Pankreaskarzinom sind daher nicht vollends geklärt und bieten Raum für weitere Studien. Des Weiteren ist die Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem Tumor von immenser Bedeutung und bedarf ebenfalls weiterer, differenzierter Forschungen.

Unsere Hypothese besagte, dass eine veränderte O-Glykosylierung zu einem bösartigeren Phänotyp des Pankreaskarzinoms führen würde. Wir vermuteten, dass es durch einen  $Cosmc$ -knockout zu einer gesteigerten Proliferation, schnelleren Progression sowie zu einer gesteigerten Invasion und Metastasierung kommen würde. Wir konnten eine schnellere Größenzunahme sowie eine gesteigerte Fibrosierung als Zeichen einer erhöhten Proliferation der Tumore von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  verzeichnen. Die histopathologischen Analysen von  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  zeigten zudem eine deutliche schnellere Progression von Vorgängerläsionen des PDACs zu manifesten Karzinomen. Des Weiteren konnte eine gesteigerte EMT als Zeichen einer erhöhten Metastasierungstendenz sowie Veränderungen verschiedener Signalkaskaden nachgewiesen werden. Zusammenfassend bestätigten sich unsere Hypothesen: Eine durch einen  $Cosmc$ -knockout induzierte Tn-Expression führt bei dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu einem bösartigeren, invasiveren Phänotypen, welcher eine schnellere Progression, Wachstum sowie erhöhte Metastasierungstendenz aufweist.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen einer aberranten O-Glykosylierung infolge eines *Cosmc*-knockouts auf die Proliferation, Progression und Fähigkeit zur Metastasierung des duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) *in vivo* gezeigt. Dafür wurden Western-Blot Analysen, histopathologische Auswertungen sowie immunhistochemische Färbungen der Pankreata der Mauslinien:  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ , und  $Cosmc^{-/-}$  mit wildtypischen Mauslinien verglichen. Im Fokus standen dabei die beiden tumorassoziierten Genotypen  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  und  $Kras^{G12D/+}$ .  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  wies deutlich schwerere sowie hyperplasierte und narbig durchzogene Organe auf. Histopathologisch zeigten sich deutlich mehr Vorläuferläsionen sowie manifeste Karzinome als in der gleichen Altersgruppe der  $Kras^{G12D/+}$  Tiere. Auch mikroskopisch konnte in der HE-Färbung bereits im jungen Alter ein deutlicher, desmoplastischer Umbau mit Verdrängung der physiologischen Azini sowie eine Hyperplasie der Ductus verzeichnet werden. Passend dazu imponierte in der Ki-67 Färbung eine gesteigerte Proliferationsrate in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .

Durch die Gegenüberstellung von Western-Blot Analysen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte der Nachweis einer physiologischen sowie differentiellen O-Glykosylierung. Nach Fraktionierung des Gewebes in Zytosol, Zellkerne sowie Membranen, zeigte sich eine recht gleichmäßige Verteilung der Tn Expression in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . In einer Masson-Goldner-Trichom-Färbung konnte, gestützt durch Ergebnisse der  $\alpha$ -SMA Färbung, eine starke Zunahme der Fibrosierung des Pankreasgewebes in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  nachgewiesen werden.

Die Analysen einzelner Signalkaskaden ergaben kein eindeutiges Ergebnis, wiesen jedoch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen auf und zeigten vermehrt pro-onkogene Tendenzen bei  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .

Eindrücklich war der Nachweis einer erhöhten EMT (Epithelialen-Mesenchymalen-Transition), als Zeichen einer gesteigerten Metastasierungstendenz in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .

## 6. Summary

This study shows the effect of an aberrant O-glycosylation caused by a Cosmc-knockout on proliferation, progression and metastasis in ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDAC) *in vivo*. For this purpose, the pancreata of the mouse lines:  $Kras^{G12D/+}$ ,  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ , and  $Cosmc^{-/-}$  were compared with wild-typical mouse lines in Western-Blots analysis and immunohistochemical staining. The main focus was on the two tumor-associated genotypes  $Kras^{G12D/+}$  and  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  exhibited significantly heavier organs as well as hyperplasia and scarring. Histopathologically, there were significantly more precursor lesions and manifest carcinomas than in the same age group of  $Kras^{G12D/+}$  animals. Even microscopically, a clear desmoplastic transformation with displacement of physiological acini and hyperplasia of the ductus could be observed in the HE staining at a young age. Correspondingly, a Ki-67 stain showed an increased rate of proliferation in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .

Physiological O-glycosylation was demonstrated in comparison with aberrant O-Glycosylation by different Western-Blots and Staining. After fractionation of the tissue into cytosol, cell nuclei and membranes, a fairly even distribution of the Tn expression in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  was observed. In a Masson-Goldner-Trichom staining, supported by a  $\alpha$ -SMA staining, a strong increase of tissue-fibrosis in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  was detected.

Analysis of different signaling-pathways did not yield a clear result, but showed obvious differences between the genotypes and revealed increased oncogenic tendencies of  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ . The evidence of an increased epithelial-mesenchymal-transition (EMT) as a sign of an elevated metastatic tendency in  $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$  was impressive.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
ApoL2	Apoptose Ligand 2
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMK-1	Big-MAP-Kinase-1
BRCA	Breast Cancer early-onset
CA125	cancer antigen 125
Ca19-9	cancer antigen 19-9
Core-3-b3GlcNAcT	Core-3-b1,3-N-Acetylglukosaminyltransferase
COSMC	C1galt1C1; Core 1 $\beta$ 3-galaktosyltransferase spezifisches molekulares Chaperon
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extracellular matrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelialen-Mesenchymalen-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
GalNac	N-Acetylgalactosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglukosamin

GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-kinase-3- $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNPCC	Hereditäres nicht-polypösen Kolonkarzinom
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat-shock-protein
KO	Knockout
I $\kappa$ B $\alpha$ :	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor $\alpha$
IKK $\alpha$	I $\kappa$ B kinase alpha
IKK $\beta$	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IKBKG	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit gamma
INK4	Inhibitors of CDK4
IPMN	Intraductale papillär-muzinöse Neoplasie
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinase
mAK	Monoklonaler Antikörper
MapK	mitogen activated protein kinase
MEK	MapK-ERK-Kinase
MGL	Makrophagen Galaktose Lektin
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
mTor	mechanistic Target of Rapamycin
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PanIN	Intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

PDK	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-,4,5-trisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PNA	peanut-agglutinin
pp-GalNAcTs	Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferasen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
SDS	sodium dodecyl sulfat
Ser.	Serin
Shh	sonic hedgehog
Sialyltransferase	ST6GalNAc-I
$\alpha$ -SMA	smooth muscle actin alpha
STn-Antigen	Neu5Aca2-6GalNAca-1-O-Ser/Thr
T-Antigen	Core-1-O-Glykan (CD176)
T-Synthase	Core-1- $\beta$ 1,3-Galaktosyltransferase; C1galt1
TBST	tris buffered saline
TCF8	Transcription factor 8
Thr.	Threonin
Tn-Antigen	GalNAca-1-O-Ser/Thr (CD175)
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
UDP-GalNAc	Uridin-5'-Diphosphat-N-Acetylgalaktosamin
VEGF-A	vascular endothelial growth factor

VVL/VVA

Vicia cilliosa lectin

Wild/WT

Wildtyp

ZEB1

Zinc finger E-box-binding homeobox 1

## 8. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Onlinedatenbanken und Werkzeuge.....	33
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Primär Antikörper.....	34-36
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Sekundär Antikörper.....	37
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Lektine.....	37

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anatomie des Pankreas.....	8
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung des Zusammenhanges zwischen Genmutationen und Vorgängerläsionen des PDACs.....	11
<b>Abbildung 3:</b> O-GalNAc Glykosylierung.....	16
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung des MapK / ERK Signalweges.....	21
<b>Abbildung 5:</b> Darstellung des NF- $\kappa$ B Signalweges.....	23
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung des PIK3/Akt Signalweges.....	25
<b>Abbildung 7:</b> Exemplarische Darstellung des Apoptose Signalweges mit den Initiatorcaspasen 8,9,10 sowie der beispielhaften Effektorcaspase 3.....	27
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung des Shh (Sonic-Hedgehog) -Signalweges.....	28
<b>Abbildung 9:</b> Vereinfachte Darstellung der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT).....	30
<b>Abbildung 10:</b> Molekulargewichtstandart Precision Plus Dual Color, Bio-Rad...38	
<b>Abbildung 11:</b> Makroskopische Darstellung der Pankreata der Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ <i>in situ</i> und <i>ex vivo</i> .....	53



<b>Abbildung 12:</b> Vergleich der Gewichte der Pankreata der 4. und 12. Monate alten Genotypen $Kras^{G12D/+}$ , - und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .....	54
<b>Abbildung 13:</b> Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Pankreata der Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .....	55
<b>Abbildung 14:</b> Gegenüberstellung der pathologischen Gewebeanalysen der drei Monate und zwölf Monate alten Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ ...56	
<b>Abbildung 15:</b> Immunhistochemische Analyse der Pankreata der vier Monate alten Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .....	57
<b>Abbildung 16:</b> Western Blot Analyse von Proteinlysaten aus den Pankreata der Genotypen: WT, $Kras^{G12D/+}$ , $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ und $Cosmc^{-/-}$ mittels des T-Antigen detektierenden Lektins PNA.....	58
<b>Abbildung 17:</b> Immunhistochemische Darstellung der T-Antigen Expression der Pankreata der Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ .....	59
<b>Abbildung 18:</b> Western Blot Analyse der pankreatischen Proteinlysate der Genotypen WT, $Kras^{G12D/+}$ , $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ und $;Cosmc^{-/-}$ mittels des Tn-detektierenden Lektins VVA.....	60
<b>Abbildung 19:</b> Immunhistochemischer Nachweis des Tn-Antigens (Rotfärbung) unter Verwendung des Lektins VVA (Vector).....	61
<b>Abbildung 20:</b> Fluoreszenzfärbung der Pankreata der Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ mittels PNA (Rotfärbung) und VVA (Grünfärbung).....	62
<b>Abbildung 21:</b> Immunhistochemische Analyse der Pankreata der Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ mittels des N-acetylgalaktosamin-detektierenden Lektins DBA (Vector).....	63
<b>Abbildung 22:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT, $Kras^{G12D/+}$ , $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ und $Cosmc^{-/-}$ mittels Tn Antikörper .....	64
<b>Abbildung 23:</b> Immunhistochemische Darstellung der Tn-Expression (Rotfärbung) des Pankreasparenchyms der Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ mittels des mAK Anti-CD175 (Invitrogen).....	65

<b>Abbildung 24:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> mittels STn-Antikörper.....	66
<b>Abbildung 25:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> nach Sialylverdau.....	67
<b>Abbildung 26:</b> Western Blot Analyse der Lysat-Fractionen Zytosol und Zellkerne der Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> .....	68
<b>Abbildung 27:</b> Western Blot Analyse der Lysat-Fractionen Zytosol und Membranen mittels des Tn-detektierenden Lektins VVA.....	70
<b>Abbildung 28:</b> Masson Goldner Färbung der Pankreata der Genotypen Kras <sup>G12D/+</sup> und Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> junger Altersstufen.....	71
<b>Abbildung 29:</b> Masson-Goldner Färbung der Pankreata der Genotypen Kras <sup>G12D/+</sup> und Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> im Alter von 16 und 20 Monaten.....	72
<b>Abbildung 30:</b> Immunhistochemische Darstellung des Fibrose-assoziierten Proteins $\alpha$ -SMA (Rotfärbung) unter Verwendung des mAK Anti-alpha-smooth-muscle-actin-antibodys (1A4) (Abcam).....	73
<b>Abbildung 31:</b> Western Blot der pankreatischen Proteinlysate der Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> .....	74
<b>Abbildung 32:</b> Western Blot Analyse der Proteine des NF $\kappa$ B-Signalwegs.....	75
<b>Abbildung 33:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> des PI3K Signalweges .....	76
<b>Abbildung 34:</b> Western Blot Analyse der pankreatischen Proteinlysate der Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> .....	78
<b>Abbildung 35:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der 4 und 12 Monate alten Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> .....	79
<b>Abbildung 36:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der 4 Monate alten Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> .....	80
<b>Abbildung 37:</b> Western Blot Analyse der Proteinlysate der 12 Monate alten Genotypen WT, Kras <sup>G12D/+</sup> , Kras <sup>G12D/+</sup> ;Cosmc <sup>-/-</sup> und Cosmc <sup>-/-</sup> .....	81

<b>Abbildung 38:</b> Immunhistochemische Färbung der Pankreata der 4 und 12 Monate alten Genotypen $Kras^{G12D/+}$ und $Kras^{G12D/+};Cosmc^{-/-}$ mittels des Anti-Vimentin-Antikörpers (CellSignaling).....	83
<b>Abbildung 39:</b> Vollständige Darstellung des PI3K/Akt-Signalweges.....	92
<b>Abbildung 40:</b> Vergleich der Apoptose-Rate (%) von pankreatischen Krebszelllinien mit und ohne Cosmc-knockout.....	94

## 10. Literaturverzeichnis References

- Agrawal, S. (2017). Potential prognostic biomarkers in pancreatic juice of resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Clinical Oncology*, 8(3), 255-260. doi:10.5306/wjco.v8.i3.255
- Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., . . . Eger, A. (2007). The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*, 26(49), 6979-6988. doi:10.1038/sj.onc.1210508
- Antwi, S. O., Bamlet, W. R., Pedersen, K. S., Chaffee, K. G., Risch, H. A., Shivappa, N., . . . Petersen, G. M. (2018). Pancreatic cancer risk is modulated by inflammatory potential of diet and ABO genotype: a consortia-based evaluation and replication study. *Carcinogenesis*, 39(8), 1056-1067. doi:10.1093/carcin/bgy072
- AWMF. (2021, 01.2022). S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. Retrieved from [Online im Internet] [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-0100Lk\\_Exokrines-Pankreaskarzinom\\_2022-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0100Lk_Exokrines-Pankreaskarzinom_2022-01.pdf) [Stand 13.02.22, 16:44]
- Babino, A., Tello, D., Rojas, A., Bay, S., Osinaga, E., & Alzari, P. M. (2003). The crystal structure of a plant lectin in complex with the Tn antigen. *FEBS Letters*, 536(1-3), 106-110.
- Bailey, J. M., Mohr, A. M., & Hollingsworth, M. A. (2009). Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*, 28(40), 3513-3525. doi:10.1038/onc.2009.220
- Baldwin, A. S., Jr. (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 3-6. doi:10.1172/jci11891
- Benassai, G., Mastroilli, M., Quarto, G., Cappiello, A., Giani, U., Forestieri, P., & Mazzeo, F. (2000). Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. *Journal of Surgical Oncology*, 73(4), 212-218.
- Bigelow, R. L., Chari, N. S., Uden, A. B., Spurgers, K. B., Lee, S., Roop, D. R., . . . McDonnell, T. J. (2004). Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1197-1205. doi:10.1074/jbc.M310589200
- Bird, G. W. (1964). ANTI-T IN PEANUTS. *Vox Sanguinis*, 9, 748-749.
- Biswas, D. K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A. B., & Iglehart, J. D. (2004). NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 10137-10142. doi:10.1073/pnas.0403621101
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., & Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 3), 499-511.
- Brockhausen, I. (2006). Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep*, 7(6), 599-604. doi:10.1038/sj.embor.7400705
- Brooks, S. A., Carter, T. M., Royle, L., Harvey, D. J., Fry, S. A., Kinch, C., . . . Rudd, P. M. (2008). Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(1), 2-21.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 269-290. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.269
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J. M., & Kohn, E. C. (2014). The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*, 120(22), 3446-3456. doi:10.1002/cncr.28864
- Cadigan, K. M., & Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes and Development*, 11(24), 3286-3305.

- Campbell, P. J., Yachida, S., Mudie, L. J., Stephens, P. J., Pleasance, E. D., Stebbings, L. A., . . . Futreal, P. A. (2010). The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, *467*(7319), 1109-1113. doi:10.1038/nature09460
- Celen, I., Ross, K. E., Arighi, C. N., & Wu, C. H. (2015). Bioinformatics Knowledge Map for Analysis of Beta-Catenin Function in Cancer. *PloS One*, *10*(10), e0141773. doi:10.1371/journal.pone.0141773
- Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J. C., Galban, S., Galban, C. J., . . . Pasca di Magliano, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(2), 639-653. doi:10.1172/jci59227
- Collins, M. A., & Pasca di Magliano, M. (2013). Kras as a key oncogene and therapeutic target in pancreatic cancer. *Frontiers in Physiology*, *4*, 407. doi:10.3389/fphys.2013.00407
- Coope, H. J., Atkinson, P. G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., . . . Ley, S. C. (2002). CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO Journal*, *21*(20), 5375-5385.
- Cossa, G., Gatti, L., Cassinelli, G., Lanzi, C., Zaffaroni, N., & Perego, P. (2013). Modulation of sensitivity to antitumor agents by targeting the MAPK survival pathway. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(5), 883-894.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, *378*(6559), 785-789. doi:10.1038/378785a0
- Cummings, R. D. (2009). The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular Biosystems*, *5*(10), 1087-1104. doi:10.1039/b907931a
- Cummings, R. D., & Pierce, J. M. (2014). The challenge and promise of glycomics. *Chemistry and Biology*, *21*(1), 1-15. doi:10.1016/j.chembiol.2013.12.010
- Dahr, W., Uhlenbruck, G., Gunson, H. H., & Van Der Hart, M. (1975). Molecular basis of Tn-polyagglutinability. *Vox Sanguinis*, *29*(1), 36-50.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, *91*(2), 231-241.
- Dbouk, H. A., Vadas, O., Shymanets, A., Burke, J. E., Salamon, R. S., Khalil, B. D., . . . Backer, J. M. (2012). G protein-coupled receptor-mediated activation of p110beta by Gbetagamma is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal*, *5*(253), ra89. doi:10.1126/scisignal.2003264
- De Luca, A., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Pergameno, M., & Normanno, N. (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *16 Suppl 2*, S17-27. doi:10.1517/14728222.2011.639361
- Desai, P. R. (2000). Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Transfusion Medicine Reviews*, *14*(4), 312-325. doi:10.1053/tmrv.2000.16229
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes and Development*, *12*(22), 3499-3511.
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., . . . Yoshida, S. (2008). Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surgery Today*, *38*(11), 1021-1028. doi:10.1007/s00595-007-3745-8
- Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., & Du, W. (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature*, *417*(6886), 299-304. doi:10.1038/417299a

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews: Cancer*, 9(8), 550-562. doi:10.1038/nrc2664
- Ersahin, T., Tuncbag, N., & Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular Biosystems*, 11(7), 1946-1954. doi:10.1039/c5mb00101c
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 18(16), 4266-4276. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-3114
- Fendrich, V., Esni, F., Garay, M. V., Feldmann, G., Habbe, N., Jensen, J. N., . . . Maitra, A. (2008). Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology*, 135(2), 621-631. doi:10.1053/j.gastro.2008.04.011
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. doi:10.1002/ijc.29210
- Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., . . . Tsichlis, P. N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 81(5), 727-736.
- Fruman, D. A., & Rommel, C. (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 13(2), 140-156. doi:10.1038/nrd4204
- Fuster, M. M., & Esko, J. D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews: Cancer*, 5(7), 526-542. doi:10.1038/nrc1649
- Galonic, D. P., & Gin, D. Y. (2007). Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines. *Nature*, 446(7139), 1000-1007. doi:10.1038/nature05813
- Gemenetzi, G., Groot, V. P., Blair, A. B., Laheru, D. A., Zheng, L., Narang, A. K., . . . He, J. (2019). Survival in Locally Advanced Pancreatic Cancer After Neoadjuvant Therapy and Surgical Resection. *Annals of Surgery*, 270(2), 340-347. doi:10.1097/sla.0000000000002753
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of Immunology*, 133(4), 1710-1715.
- Ghoneum, A., & Said, N. (2019). PI3K-AKT-mTOR and NFkappaB Pathways in Ovarian Cancer: Implications for Targeted Therapeutics. *Cancers*, 11(7). doi:10.3390/cancers11070949
- Gillen, S., Schuster, T., Meyer Zum Buschenfelde, C., Friess, H., & Kleeff, J. (2010). Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Medicine*, 7(4), e1000267. doi:10.1371/journal.pmed.1000267
- Goldner, J. (1938). A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *American Journal of Pathology*, 14(2), 237-243.
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7(344), re8. doi:10.1126/scisignal.2005189
- Guo, J. P., Coppola, D., & Cheng, J. Q. (2016). IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22853. doi:10.1074/jbc.A111.287433
- Hanisch, F. G. (2001). O-glycosylation of the mucin type. *Biological Chemistry*, 382(2), 143-149. doi:10.1515/bc.2001.022
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), 344-362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*, 20(10), 1218-1249. doi:10.1101/gad.1415606

- Hidalgo, M., Cascinu, S., Kleeff, J., Labianca, R., Lohr, J. M., Neoptolemos, J., . . . Heinemann, V. (2015). Addressing the challenges of pancreatic cancer: future directions for improving outcomes. *Pancreatology*, *15*(1), 8-18. doi:10.1016/j.pan.2014.10.001
- Hofmann, B. T., Schluter, L., Lange, P., Mercanoglu, B., Ewald, F., Folster, A., . . . Wolters-Eisfeld, G. (2015). COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, *14*, 109. doi:10.1186/s12943-015-0386-1
- Honselmann, K. C., Pross, M., Jung, C. M., Wellner, U. F., Deichmann, S., Keck, T., & Bausch, D. (2015). Regulation mechanisms of the hedgehog pathway in pancreatic cancer: a review. *Jop*, *16*(1), 25-32. doi:10.6092/1590-8577/2894
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Anver, M. R., Biankin, A. V., Boivin, G. P., . . . Tuveson, D. A. (2006). Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Research*, *66*(1), 95-106. doi:10.1158/0008-5472.can-05-2168
- Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, *81*(4), 495-504.
- Hu, J. X., Zhao, C. F., Chen, W. B., Liu, Q. C., Li, Q. W., Lin, Y. Y., & Gao, F. (2021). Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. *World Journal of Gastroenterology*, *27*(27), 4298-4321. doi:10.3748/wjg.v27.i27.4298
- Huang, L., Xu, A. M., Liu, S., Liu, W., & Li, T. J. (2014). Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(47), 17804-17818. doi:10.3748/wjg.v20.i47.17804
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(44), 9694-9705. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes and Development*, *15*(23), 3059-3087. doi:10.1101/gad.938601
- Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., . . . Look, A. T. (1999). SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Molecular Cell*, *4*(3), 343-352.
- Iriana, S., Asha, K., Repak, M., & Sharma-Walia, N. (2021). Hedgehog Signaling: Implications in Cancers and Viral Infections. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3). doi:10.3390/ijms22031042
- Jana, A., Krett, N. L., Guzman, G., Khalid, A., Ozden, O., Staudacher, J. J., . . . Jung, B. (2017). NFkB is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. *Oncotarget*, *8*(23), 37377-37393. doi:10.18632/oncotarget.16343
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., . . . Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, *321*(5897), 1801-1806. doi:10.1126/science.1164368
- Ju, T., Brewer, K., D'Souza, A., Cummings, R. D., & Canfield, W. M. (2002). Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(1), 178-186. doi:10.1074/jbc.M109060200
- Ju, T., & Cummings, R. D. (2002). A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 16613-16618. doi:10.1073/pnas.262438199
- Ju, T., Lanneau, G. S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S. R., . . . Cummings, R. D. (2008). Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Research*, *68*(6), 1636-1646. doi:10.1158/0008-5472.can-07-2345
- Ju, T., Otto, V. I., & Cummings, R. D. (2011). The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, *50*(8), 1770-1791. doi:10.1002/anie.201002313

- Ju, T., Wang, Y., Aryal, R. P., Lehoux, S. D., Ding, X., Kudelka, M. R., . . . Cummings, R. D. (2013). Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics: Clinical Applications*, 7(9-10), 618-631. doi:10.1002/prca.201300024
- Julien, S., Picco, G., Sewell, R., Vercoutter-Edouart, A. S., Tarp, M., Miles, D., . . . Burchell, J. M. (2009). Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *British Journal of Cancer*, 100(11), 1746-1754. doi:10.1038/sj.bjc.6605083
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. doi:10.1172/jci39104
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3(3), 221-227. doi:10.1038/ni0302-221
- Kato, T., Jr., Delhase, M., Hoffmann, A., & Karin, M. (2003). CK2 Is a C-Terminal I kappa B Kinase Responsible for NF-kappa B Activation during the UV Response. *Molecular Cell*, 12(4), 829-839.
- Katz, M. H., Wang, H., Fleming, J. B., Sun, C. C., Hwang, R. F., Wolff, R. A., . . . Evans, D. B. (2009). Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 16(4), 836-847. doi:10.1245/s10434-008-0295-2
- Klimstra, D. S., & Longnecker, D. S. (1994). K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *American Journal of Pathology*, 145(6), 1547-1550.
- Kurata, M., Honda, G., Murakami, Y., Uemura, K., Satoi, S., Motoi, F., . . . Yamaue, H. (2017). Retrospective Study of the Correlation Between Pathological Tumor Size and Survival After Curative Resection of T3 Pancreatic Adenocarcinoma: Proposal for Reclassification of the Tumor Extending Beyond the Pancreas Based on Tumor Size. *World Journal of Surgery*, 41(11), 2867-2875. doi:10.1007/s00268-017-4077-5
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 15(3), 178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Lauth, M., & Toftgard, R. (2011). Hedgehog signaling and pancreatic tumor development. *Advances in Cancer Research*, 110, 1-17. doi:10.1016/b978-0-12-386469-7.00001-3
- Li, Q., Anver, M. R., Butcher, D. O., & Gildersleeve, J. C. (2009). Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), 971-979. doi:10.1158/1535-7163.mct-08-0934
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8(8), 627-644. doi:10.1038/nrd2926
- Lo-Man, R., Vichier-Guerre, S., Perraut, R., Deriaud, E., Huteau, V., BenMohamed, L., . . . Leclerc, C. (2004). A fully synthetic therapeutic vaccine candidate targeting carcinoma-associated Tn carbohydrate antigen induces tumor-specific antibodies in nonhuman primates. *Cancer Research*, 64(14), 4987-4994. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0252
- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R. W., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., . . . Domellof, L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *New England Journal of Medicine*, 328(20), 1433-1437. doi:10.1056/nejm199305203282001
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121(2), 179-193. doi:10.1016/j.cell.2005.02.031
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009
- Mastronardi, F. G., Dimitroulakos, J., Kamel-Reid, S., & Manoukian, A. S. (2000). Co-localization of patched and activated sonic hedgehog to lysosomes in neurons. *Neuroreport*, 11(3), 581-585.
- Matter, K., & Balda, M. S. (2007). Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 9), 1505-1511. doi:10.1242/jcs.005975



- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., . . . Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1773*(8), 1263-1284. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001
- McWilliams, R. R., Rabe, K. G., Olswold, C., De Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, *104*(2), 388-394. doi:10.1002/cncr.21166
- Meloche, S., & Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, *26*(22), 3227-3239. doi:10.1038/sj.onc.1210414
- Miwa, H. E., Gerken, T. A., Jamison, O., & Tabak, L. A. (2010). Isoform-specific O-glycosylation of osteopontin and bone sialoprotein by polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-1. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(2), 1208-1219. doi:10.1074/jbc.M109.035436
- Morrow, D., Cullen, J. P., Liu, W., Guha, S., Sweeney, C., Birney, Y. A., . . . Cahill, P. A. (2009). Sonic Hedgehog induces Notch target gene expression in vascular smooth muscle cells via VEGF-A. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(7), 1112-1118. doi:10.1161/atvbaha.109.186890
- Murone, M., Rosenthal, A., & de Sauvage, F. J. (1999). Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Experimental Cell Research*, *253*(1), 25-33. doi:10.1006/excr.1999.4676
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, *403*(6765), 98-103. doi:10.1038/47513
- Napoletano, C., Rughetti, A., Agervig Tarp, M. P., Coleman, J., Bennett, E. P., Picco, G., . . . Nuti, M. (2007). Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells. *Cancer Research*, *67*(17), 8358-8367. doi:10.1158/0008-5472.can-07-1035
- Nash, R., Neves, L., Faast, R., Pierce, M., & Dalton, S. (2007). The lectin Dolichos biflorus agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells*, *25*(4), 974-982. doi:10.1634/stemcells.2006-0224
- Oh, J. E., Kim, R. H., Shin, K. H., Park, N. H., & Kang, M. K. (2011). DeltaNp63alpha protein triggers epithelial-mesenchymal transition and confers stem cell properties in normal human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38757-38767. doi:10.1074/jbc.M111.244939
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., & Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, *401*(6748), 82-85. doi:10.1038/43466
- Pan, B., Liao, Q., Niu, Z., Zhou, L., & Zhao, Y. (2015). Cancer-associated fibroblasts in pancreatic adenocarcinoma. *Future Oncology (London, England)*, *11*(18), 2603-2610. doi:10.2217/fon.15.176
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, *326*(9), 851-862. doi:10.1001/jama.2021.13027
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews: Cancer*, *7*(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2131
- Picozzi, V. J., Oh, S. Y., Edwards, A., Mandelson, M. T., Dorer, R., Rocha, F. G., . . . Kozarek, R. A. (2017). Five-Year Actual Overall Survival in Resected Pancreatic Cancer: A Contemporary Single-Institution Experience from a Multidisciplinary Perspective. *Annals of Surgical Oncology*, *24*(6), 1722-1730. doi:10.1245/s10434-016-5716-z
- Pishvaian, M. J., Blais, E. M., Brody, J. R., Lyons, E., DeArbeloa, P., Hendifar, A., . . . Petricoin, E. F., 3rd. (2020). Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched

therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncology*, 21(4), 508-518. doi:10.1016/s1470-2045(20)30074-7  
Puckett, Y., & Garfield, K. (2018). Cancer, Pancreas. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

StatPearls Publishing LLC.

- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., . . . Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2), 257-272. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.020
- Radhakrishnan, P., Dabelsteen, S., Madsen, F. B., Francavilla, C., Kopp, K. L., Steentoft, C., . . . Wandall, H. H. (2014). Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(39), E4066-4075. doi:10.1073/pnas.1406619111
- Ramsey, K. A., Rushton, Z. L., & Ehre, C. (2016). Mucin Agarose Gel Electrophoresis: Western Blotting for High-molecular-weight Glycoproteins. *J Vis Exp*(112). doi:10.3791/54153
- Reichert, M., Muller, T., & Hunziker, W. (2000). The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9492-9500.
- Robert-Koch-Institut. (2021, 29.11.2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. Retrieved from [Online im Internet]  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c25\\_bauchspeicheldruese.pdf?blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c25_bauchspeicheldruese.pdf?blob=publicationFile) [Stand 13.02.22, 17:10]
- Robinson, M. J., & Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 180-186.
- Rottger, S., White, J., Wandall, H. H., Olivo, J. C., Stark, A., Bennett, E. P., . . . Nilsson, T. (1998). Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science*, 111 ( Pt 1), 45-60.
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 320-344. doi:10.1128/mmbr.68.2.320-344.2004
- Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(22), 2140-2141. doi:10.1056/NEJMc1412266
- Schjoldager, K. T., Vakhrushev, S. Y., Kong, Y., Steentoft, C., Nudelman, A. S., Pedersen, N. B., . . . Clausen, H. (2012). Probing isoform-specific functions of polypeptide GalNAc-transferases using zinc finger nuclease glycoengineered SimpleCells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25), 9893-9898. doi:10.1073/pnas.1203563109
- Shi, C., Daniels, J. A., & Hruban, R. H. (2008). Molecular characterization of pancreatic neoplasms. *Advances in Anatomic Pathology*, 15(4), 185-195. doi:10.1097/PAP.0b013e31817bf57d
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7-33. doi:10.3322/caac.21654
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21442
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21590
- Skoda, A. M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., & Serman, L. (2018). The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. Udruzenje Basicnih Mediciniskih Znanosti*, 18(1), 8-20. doi:10.17305/bjbms.2018.2756
- Springer, G. F. (1984). T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 224(4654), 1198-1206.

- Springer, G. F. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 75(8), 594-602.
- Springer, G. F., Desai, P. R., Tegtmeier, H., Spencer, B. D., & Scanlon, E. F. (1993). Pancarcinoma T/Tn antigen detects human carcinoma long before biopsy does and its vaccine prevents breast carcinoma recurrence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 690, 355-357.
- Steenfot, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T., . . . Clausen, H. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO Journal*, 32(10), 1478-1488. doi:10.1038/emboj.2013.79
- Stowell, S. R., Ju, T., & Cummings, R. D. (2015). Protein glycosylation in cancer. *Annual Review of Pathology*, 10, 473-510. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040438
- Suda, K., Nobukawa, B., Takase, M., & Hayashi, T. (2006). Pancreatic segmentation on an embryological and anatomical basis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 13(2), 146-148. doi:10.1007/s00534-005-1039-3
- Sun, H., Zhang, B., & Li, H. (2020). The Roles of Frequently Mutated Genes of Pancreatic Cancer in Regulation of Tumor Microenvironment. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820920969. doi:10.1177/1533033820920969
- Taipale, J., & Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411(6835), 349-354. doi:10.1038/35077219
- Thomas, D., Sagar, S., Caffrey, T., Grandgenett, P. M., & Radhakrishnan, P. (2019). Truncated O-glycans promote epithelial-to-mesenchymal transition and stemness properties of pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(10), 6885-6896. doi:10.1111/jcmm.14572
- Tollefsen, S. E., & Kornfeld, R. (1983). The B4 lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine residues alpha-linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 5172-5176.
- Tsuchiya, A., Kanno, M., Kawaguchi, T., Endo, Y., Zhang, G. J., Ohtake, T., & Kimijima, I. I. (1999). Prognostic Relevance of Tn Expression in Breast Cancer. *Breast Cancer*, 6(3), 175-180.
- Varjosalo, M., & Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes and Development*, 22(18), 2454-2472. doi:10.1101/gad.1693608
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., & Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and I-kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(1), 43-52. doi:10.1016/j.tibs.2004.11.009
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews: Cancer*, 9(8), 537-549. doi:10.1038/nrc2694
- Wagner, K. W., Punnoose, E. A., Januario, T., Lawrence, D. A., Pitti, R. M., Lancaster, K., . . . Ashkenazi, A. (2007). Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine*, 13(9), 1070-1077. doi:10.1038/nm1627
- Warshaw, A. L., & Fernandez-del Castillo, C. (1992). Pancreatic carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 326(7), 455-465. doi:10.1056/nejm199202133260706
- Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 207-235. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135
- Wilentz, R. E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G. J., Kang, M., Goggins, M., . . . Hruban, R. H. (1998). Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Research*, 58(20), 4740-4744.
- Wolters-Eisfeld, G., Mercanoglu, B., Hofmann, B. T., Wolpers, T., Schnabel, C., Harder, S., . . . Bockhorn, M. (2018). Loss of complex O-glycosylation impairs exocrine pancreatic function and induces MODY8-like diabetes in mice. *Experimental and Molecular Medicine*, 50(10), 1-13. doi:10.1038/s12276-018-0157-3
- Yamamoto, Y., & Gaynor, R. B. (2004). I-kappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(2), 72-79. doi:10.1016/j.tibs.2003.12.003

- Yang, S. H., Sharrocks, A. D., & Whitmarsh, A. J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, *513*(1), 1-13. doi:10.1016/j.gene.2012.10.033
- Yeo, C. J., Cameron, J. L., Lillemoe, K. D., Sitzmann, J. V., Hruban, R. H., Goodman, S. N., . . . Pitt, H. A. (1995). Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Annals of Surgery*, *221*(6), 721-731; discussion 731-723.
- Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., & Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular Signalling*, *24*(12), 2369-2377. doi:10.1016/j.cellsig.2012.08.003
- Zimmermann, S., & Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, *286*(5445), 1741-1744.
- Zlocowski, N., Grupe, V., Garay, Y. C., Nores, G. A., Lardone, R. D., & Irazoqui, F. J. (2019). Purified human anti-Tn and anti-T antibodies specifically recognize carcinoma tissues. *Scientific Reports*, *9*(1), 8097. doi:10.1038/s41598-019-44601-9

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf diesem Weg zum Abschluss meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Maximilian Bockhorn danke ich für die Möglichkeit einer Promotion am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.

Herrn Dr. Gerrit Wolters-Eisfeld sowie Herrn Dr. Baris Mercanoglu möchte ich für die gute Betreuung und freundschaftliche Zusammenarbeit über die Jahre hinweg danken. Trotz des Umstandes, dass sie sowohl beruflich als auch privat über alle Maße eingespannt waren, standen sie uns Doktorant:innen immer mit Rat und Tat zur Seite.

Elena Neuburg danke ich für die gute Einarbeitung und kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Zudem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes für Allgemein Chirurgie für die konstruktive Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre im Labor.

Ein besonderer Dank gilt der Mauspathologie Facility des UKE, welche freundlicherweise spezielle Färbungen anfertigten sowie die histopathologischen Auswertungen vornahmen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner gesamten Familie, die mich über die Jahre hinweg tagelang nur am Schreibtisch sitzend erlebt hat. Ohne eure immerwährende Unterstützung, eurer offenes Ohr und die gute kulinarische Versorgung hätte ich diese Aufgabe wohl kaum bewältigen können. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter Christine Reinecke, welche mich in den Momenten der Verzweiflung aufzufangen wusste. Meiner lieben Oma Gerda Niemeier danke ich für ihre Liebe, die finanzielle Unterstützung sowie das hervorragende Essen. Ich danke meinem Vater Jürgen Reinecke dafür, dass er mir sicherlich durchweg gute Energie hat zukommen lassen, auch wenn er leider nicht mehr bei uns sein kann.

Fabian Lindner danke ich für den liebevollen Beistand, die konstant anhaltende Motivation und seinen unermüdlichen Optimismus, welche mich insbesondere in den letzten Zügen dieser Arbeit begleitet und gestützt haben.

Meinen Freunden Hannah Muhle, Lelia Lück, Ina Pieknick, Sissy Waschkowski, Ludwig Jesse Horst, Michael Gebauer, Max Gansel, Max Bossemeyer, Sven Hauck sowie Jan Hansen danke ich für die unermüdlichen Hilfestellungen, Gespräche und schöne Zusammenkünfte, die mich immer mit einem guten Gefühl haben nach Hause gehen lassen. Dem Kleeblatt, bestehend aus Emily Swientek, Sophia Hussain sowie Laura Sievers danke ich von ganzem Herzen für die seelische Unterstützung und die fantastischen Ablenkungsmanöver in schweren Zeiten.

## **12. Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

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: .....