

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Prof. Dr. med. Thilo Hackert

**Auswirkung der organspezifischen Überexpression der
Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase-2 auf die
Organmorphologie und den Metabolismus des murinen Pankreas**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sissy-Alina Waschkowski
aus Kiel

Hamburg 2024

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.11.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Till Clauditz**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. Maximilian Bockhorn**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung.....	6
1.2 Funktionsweise der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNT2).....	7
1.3 O-Glykosylierung	8
1.4 Krankheitsrelevanz von GalNT2	11
1.5 Lektine	12
1.6 Das Pankreas im Überblick.....	12
1.7 Pankreasentwicklung.....	13
1.8 Das Pankreas in Bezug auf Stress des endoplasmatischen Retikulums und Lipidhomöostase.....	15
2. Material.....	16
2.1 Pufferlösungen.....	16
2.2 Kits und Reagenzien zur Bearbeitung von Paraffinschnitten	17
2.3 Allgemeine Materialien Western Blot / Lektin Blot.....	21
2.4 Antikörper.....	22
2.5 Lektine	24
2.6 Materialien Organverarbeitung.....	24
2.7 Mausdatenbank	25
3. Methoden	27
3.1 Vorwort Methoden.....	27
3.2 Konditional transgene GalNT2 Mauslinie	27
3.3 Aufbereitung der murinen Pankreata	28
3.3.1 Proteinlysate.....	28
3.3.2. Bichionic Acid (BCA) Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	29
3.4 Deparaffinierung der Paraffinschnitte.....	29
3.5 Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung zur Vorbehandlung der Lektinfärbung/ Immunhistochemie/ Fluoreszenzfärbung.....	29
3.6 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	30
3.7 Masson-Goldner Färbung	31
3.8 Pikro-Siriusrot-Färbung.....	31
3.9 Immunhistochemie.....	31
3.10 Immunfluoreszenz und Lektincofärbung (fluoreszent)	32
3.11 Lektinfärbung	33
3.12 Western Blot	34

3.13 Lektin Blot	36
3.14 Lektin-Pulldown.....	36
3.15 Immunpräzipitation.....	37
4. Ergebnisse	39
4.1 Organmorphologie	39
4.1.1 Makroskopie.....	39
4.1.2 Mikroskopie.....	39
4.2 Gewebestrukturanalyse	42
4.2.1 Insulin	42
4.2.2 Lipase	43
4.2.3 Perilipin	45
4.2.4 Pikro-Siriusrot-Färbung.....	46
4.2.5 Masson-Goldner	47
4.3 Gewebereaktion.....	48
4.4 Organmorphologie unter Betrachtung von Malignitätskriterien:	49
4.5. Proteinexpression im Gewebe	49
4.5.1 GalNT2.....	49
4.5.2 Prox-1 Protein.....	51
4.6 Glycosilierungsprofil.....	55
4.6.1 Sambucus Nigra Lektin (SNA)	55
4.6.2 Peanut agglutinin (PNA).....	56
4.6.3 Jacalin-Blot	58
4.7 Shwachman-Bodian-Diamond Syndrom (SBDS)-Protein	59
4.8 Proteinstoffwechsel.....	60
4.8.1 Proteinprozeption	60
4.8.2 Ubiquitin	60
4.8.3 SUMO-1	61
4.8.4 Hitzeschockprotein 70.....	62
4.8.5 HSP 40.....	63
4.8.6 HSP 90.....	64
4.8.7 Inositol Requiring Enzyme-1 (IRE 1 α).....	64
4.8.8 Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein (BiP)	65
4.8.9 Proteindisulfidisomerase (PDI).....	65
4.8.10 C/EBP Homologous Protein (CHOP)	66
4.8.11 Calnexin.....	67
4.8.12 S6 ribosomales Protein	68

4.9 Lipidstoffwechsel.....	69
4.9.1 Acetyl-Coa-Carboxylase	69
4.9.2 Fettsäure-Synthase/ Fatty Acid Synthase (FAS).....	70
4.9.3 CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBP α)	71
4.9.4 Perilipin	71
4.10 Inflammation	72
4.10.1 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B)	72
4.10.2 Inhibitor of NF- κ B α (I κ B α)	73
4.10.3 I κ B Kinase Komplex β (IKK- β)	73
5. Diskussion	74
5.1 Einordnung der Ergebnisse.....	74
5.2 Gewebezusammensetzung und Zelldifferenzierung	75
5.3 Mechanismen Adipozyten versus Fibrose	78
5.4 Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation (ERAD) und ungefaltete Protein-Antwort / Unfolded Protein Response (UPR).....	81
5.5 Untergang oder Transformation der transgenen Zellen	83
5.6 Lipidstoffwechsel	85
5.7 Zusammenhänge zu ähnlichen Phänotypen an den Beispielen Prox-1 und SBDS-Protein.....	87
5.8 Ausblick	89
6.1 Zusammenfassung.....	90
6.2 Summary	91
7. Abkürzungsverzeichnis.....	92
8. Literaturverzeichnis	95
9. Danksagung	117
10. Lebenslauf Sissy-Alina Waschkowski.....	118
11. Eidesstattliche Versicherung	119

1. Einleitung

1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für das Verständnis von Zellphysiologie und der Entstehung von Krankheiten ist es von großer Bedeutung die intra- und interzellulären Signalvorgänge des menschlichen Körpers auf biochemischer Ebene zu erforschen (Adamska et al. 2017, Dutt et al. 2023). Häufig gelingt es hierdurch, Ursachen und potentielle Therapiemöglichkeiten zu identifizieren (Adamska et al. 2017). Die Kenntnis über zelluläre Kommunikation ist daher von hohem wissenschaftlichen Interesse und wird maßgeblich durch glykobiologische Vorgänge beeinflusst (Varki 2017).

Die Disziplin, welche die Interaktionen von Glykanen mit Proteinen und Lipiden untersucht, wird als Glykobiologie bezeichnet und erfuhr erst in den 1990er Jahren vermehrte Aufmerksamkeit (Van Den Steen et al. 1998, Cummings und Pierce 2014). Diese Arbeit dient daher der weiteren Schließung einer Wissenslücke der Glykobiologie. Eine besondere Rolle spielen hierbei O- und N-glykosidische Bindungen, durch welche Proteine posttranslationale Modifikationen erfahren (Van Den Steen et al. 1998). Insbesondere die Reaktion der O-Glykosylierung, welche durch UDP-GalNAc-Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen (GalNAc-Transferasen, GalNT) initiiert wird, soll genauer untersucht werden (Elhammer und Kornfeld 1986).

Da GalNAc-Transferasen durch posttranslationale Modifikationen Einfluss auf Zellfunktionen vermitteln, beispielsweise auf die Malignität von Tumorzellen des Pankreas oder die Regulation von Blutfetten, ist es von essentieller Bedeutung die Physiologie der GalNAc-Transferasen zu kennen (Kathiresan et al. 2008; Taniuchi et al. 2011). Es konnten Varianten dieser Enzyme im menschlichen Pankreas sowie in einigen Tumorzelllinien ausfindig gemacht werden (Sutherlin et al. 1997). Besonders in Pankreaskarzinomzelllinien zeigten sich erhöhte Werte der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (Sutherlin et al. 1997).

Daher liegt die Hypothese nahe, dass eine organspezifische Überexpression dieses Enzyms eine Auswirkung auf die Organstruktur sowie Stoffwechselforgänge des Pankreas haben könnte. Hierzu ist eine isolierte Betrachtung des Enzyms in Bezug auf das murine Pankreas sinnvoll. In der Dissertation von Neuburg wurde bereits eine Überexpression von GalNT2 in Bezug auf einen Knockout des COSMC-Gens untersucht (Neuburg 2021). Hierbei konnte gezeigt werden, dass es bei einer

isolierten Überexpression von GalNT2 im murinen Pankreas zu einer Binde- und Fettgewebsvermehrung kommt (Neuburg 2021). Diese Arbeit zielt nun auf eine genauere Charakterisierung der Zelltypen und des Metabolismus im murinen Pankreas bei GalNT2 Überexpression ab.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden spezifische Färbungen und Proteindetektionsmethoden herangezogen, um Ergebnisse zwischen Mauslinien des Wildtyps und einer Linie mit konditionaler GalNT2-Überexpression zu vergleichen.

1.2 Funktionsweise der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNT2)

Erstmalig wurde 1967 eine GalNAc-Transferase aus der submandibulären Drüse vom Schaf isoliert (McGuire und Roseman 1967). Die GalNAc-Transferasen wurden seither weiter eingeteilt und es sind mittlerweile über 15 Isotypen aus verschiedenen Wirten bekannt (White et al. 1995, Tian und Ten Hagen 2009, Levery et al. 2015). Die Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase-2 wird auch kurz GalNAc-Transferase 2 oder, wie im Folgenden, GalNT2 genannt (White et al. 1995). GalNAc-Transferasen sind in der Lage N-Acetylgalactosamin (GalNAc), von Uridin-Diphosphat-N-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc) ausgehend, über eine α -glykosidische Bindung mit einem Serin- oder Threoninrest (Thr) zu verbinden, wodurch eine sogenannte O-glykosidische Bindung entsteht (Serafini-Cessi et al. 1983, Campbell et al. 1998; Iwai et al. 2002). Der initiale Schritt der Verknüpfung von N-Acetylgalactosamin an Serin (Ser) geschieht höchstwahrscheinlich durch Reaktion mit dem Monosaccharid und nicht mit einer Kohlenhydratkette (Strous 1979). Für die Reaktion wurden experimentell keine Kofaktoren oder Trägermoleküle benötigt (Sugiura et al. 1982). Die Bindungsstelle für Galactosen der GalNTs befindet sich an der α -Untereinheit (Imberty et al. 1997). Die Lokalisation der GalNTs ist höchstwahrscheinlich in der Membran des Golgi-Apparates anzufinden, genauer gesagt im nukleusnahen Anteil dessen (Röttger et al. 1998, Giraudo et al. 2001, Uliana et al. 2006). Für die Lokalisation im Golgi-Apparat sind für die verschiedenen Isotypen auch unterschiedliche Targetingmechanismen untersucht, so ist für die korrekte Ziellokalisation der GalNT2 die funktionierende Kombination aus zytoplasmatischer und transmembraner Domäne erforderlich (Becker et al. 2018). Zudem konnte

experimentell gezeigt werden, dass es zu einer Veränderung der typischen Lokalisation der GalNT2 vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER) oder ins Zytoplasma kommen kann (Gill et al. 2010). Bei Fehlfunktion des Targetings wurden auch zytoplasmatische GalNAc-Transferasen detektiert (Becker et al. 2018).

1.3 O-Glykosylierung

Die O-Glykosylierung stellt eine posttranslationale Modifikation von Proteinen dar und findet nach dem Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum im Golgi-Apparat statt (Palade 1975; Röttger et al. 1998, Nelson und Cox 2005). O-Glykosylierungen entstehen, wie bereits beschrieben, zum einen durch die Verbindung von N-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit der Hydroxylgruppe der Aminosäuren Threonin oder Serin (Winzler et al. 1967, White et al. 1995). Weitere Möglichkeiten der O-glykosidischen Bindung von Proteinen stellen Verbindungen mit β -N-Acetylglucosamin (GlcNAc), α -Mannose (Man), α -Fucose (Fuc), β -D-Glucose (Glc) oder β -Galactose (Gal) dar (Leverly et al. 2015).

Die O-glykosidische Verbindung in Form von GalNAc- α 1-O-Ser/Thr wird auch Tn-Antigen genannt (Tian et al. 2009, Ju et al. 2011). Der Name Tn-Antigen wurde durch Dausset et al. geprägt und taucht in diesem Zusammenhang als abnormes Agglutinin bei Blutgruppen auf (Dausset et al. 1959). Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um N-Acetylgalactosamin, an Serin oder Threonin gebunden, handelt, welches beispielsweise auf humanen Erythrozyten vorkommt (Winzler et al. 1967, Dahr et al. 1974, Dahr et al. 1975). O-Glykosylierungen werden je nach Modifikation auch Core-Strukturen genannt, welche in unterschiedliche Typen eingeteilt werden und in der folgenden Abbildung (Abb.) 1 veranschaulicht werden (Iwai et al. 2002).

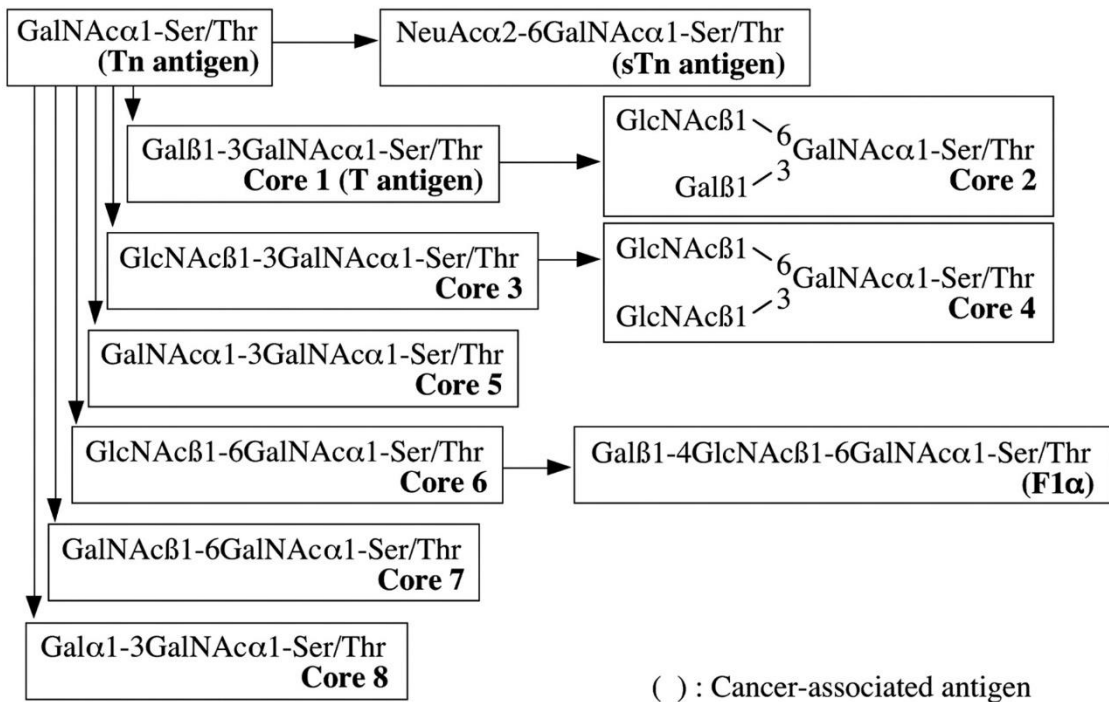


Abb. 1: Die Abbildung „*Biosynthetic pathways for the core structures of mucin type O-glycans.*“ aus (Iwai et al. 2002).

Das ubiquitäre Vorkommen der O-Glykosylierung wird durch verschiedene Studien gestützt (Yang et al. 2018). O-glykosylierte Proteine finden sich vor allem auf Zelloberflächen, in der extrazellulären Matrix oder in Zellorganellen und sind beispielsweise bei Zelladhäsion und Degranulationsvorgängen beteiligt (Yang et al. 2018). Die O-Glykosylierung ist eine häufige Modifikation von Glykoproteinen, wie zum Beispiel der Muzine (White et al. 1995). Diese sind mit einer Vielzahl an O-glykosidisch gebundenen Zuckermolekülen versehen, welche 50% der gesamten Molekülmasse ausmachen können (Shimizu und Yamauchi 1982; Springer 1994).

Ebenfalls befinden sich O-Glykosylierungen auf dem P-Selektin-Glykoproteinliganden-1 von humanen Leukozyten, welcher für das Rolling und die Extravasation eine wichtige Rolle spielt, und sind damit an immunologischen Vorgängen beteiligt (Mayadas et al. 1993; Wilkins et al. 1996). Das Zytokin Interleukin-2 ist ebenfalls O-glykosyliert (Conradt et al. 1985). Dieses wiederum kann die Verzweigung der O-Glykosylierungen von CD34⁺ Zellen und die Expression des P-Selektin-Liganden in CD8⁺ Zellen bewirken (Carlow et al. 2001). Die Aktivierung von humanen T-Lymphozyten geht auch mit einer Veränderung O-glykosylierter Strukturen einher (Piller et al. 1988).

Bei der Angiogenese scheinen O-glykosylierte Core 1 Strukturen beteiligt zu sein (Xia et al. 2004). Vorgänge der Endozytose sind ebenfalls von O-Glykanen beeinflusst, sodass bei verminderter Glykosylierungsrate eine vermehrte Endozytose stattfindet (Altschuler et al. 2000). Bei intrazellulärem Targeting vermitteln O-Glykane durch ihre Polarität den Zielort von funktionellen Zellbestandteilen, zum Beispiel den des Neurotrophinrezeptors (Yeaman et al. 1997).

Verkürzte O-Glykosylierungen werden im Zusammenhang mit Tumoren beschrieben (Konska et al. 2006). Das Tn-Antigen konnte als frühe Veränderung beim Mammakarzinom identifiziert werden (Konska et al. 2006). Es konnte für Brustkrebs eine signifikant erhöhte Tn-Antigen-Expression im Vergleich zu Normalgewebe festgestellt werden (Gill et al. 2013). Tn und Sialyl-Tn (sTN) wurden bei adenomatösen Polypen des Kolons detektiert (Itzkowitz et al. 1992). Beim hereditären nicht-polypösem Kolonkarzinom (HNPCC), beim sporadischen Kolonkarzinom und bei gesundem Gewebe konnte eine Expression des Tn-Antigens festgestellt werden, während nur die neoplastischen Proben positive Ergebnisse für sTn- und dem T-Antigen zeigten (Giuffrè et al. 1996). sTn und Tn-Antigen konnten immunhistochemisch beim Pankreaskarzinom identifiziert werden, wobei das gesunde Azinuszellgewebe ebenfalls Tn exprimiert, duktales Zellen hingegen nicht (Itzkowitz et al. 1991). Ebenso wurde eine Expression von sTn und Tn-Antigen bei der intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas festgestellt (Terada und Nakanuma 1996). Es konnten Anzeichen für eine humorale Immunität gegen O-glykosylierte Proteine bei Patient/-innen mit Mamma-, Kolon- und Pankreaskarzinom festgestellt werden (Kotera et al. 1994). Des Weiteren wiesen Melanom-Patient/-innen mit Anti-T-Antikörpern eine bessere Antwort auf eine Chemotherapie auf (Springer 1997). O-Glykosylierungen könnten daher in Zukunft als Zielstruktur für Krebstherapien untersucht werden (Radhakrishnan et al. 2014).

Insgesamt zeigt diese Übersicht die große Variabilität des Einflusses von O-Glykosylierungen auf zelluläre Funktionen, dennoch ist die Bedeutung der O-Glykosylierung derzeit noch nicht ausreichend erforscht (Hoffmann et al. 2016).

1.4 Krankheitsrelevanz von GalNT2

Da Prozesse der O-Glykosylierung auf viele zelluläre Funktionen Einfluss nehmen, sollen im Folgenden einige spezifische Auswirkungen von GalNT2 auf Zellphysiologie und Pathophysiologie beleuchtet werden (Leverly et al. 2015).

Zum Beispiel spielt die GalNT2 für den Fettstoffwechsel eine entscheidende Rolle, da bestimmte genetische Polymorphismen der GalNT2 mit Störungen dessen assoziiert sind (Kathiresan et al. 2008; Kato et al. 2021). Der Genpolymorphismus rs4846914 geht beispielsweise mit einem erniedrigten High-Density-Lipoprotein-Cholesterin (HDL-C) und einem erhöhten Triglyzeridwert einher, welcher als Risikofaktor für Arteriosklerose bekannt ist (Miller und Miller 1975, Kathiresan et al. 2008). Bei Überexpression von GalNT2 im Mausmodell konnten verminderte HDL-Cholesterin Werte festgestellt werden und bei Verminderung von GalNT2 entsprechend der umgekehrte Effekt, wodurch gezeigt wurde, dass GalNT2 im engen Zusammenhang mit HDL-Cholesterin steht (Teslovich et al. 2010). Eine Erhöhung der Cholesterinwerte im Serum ist bekanntermaßen mit der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit assoziiert (Kannel et al. 1961). Apolipoprotein C-III kann durch GalNT2 glykosyliert werden, wodurch es bei einer Loss-of-Function-Mutation zu niedrigeren postprandialen Lipidwerten kommt (Holleboom et al. 2011). Angiotensin-ähnliches Protein 3, welches ein Inhibitor der endothelialen Lipase darstellt und bei Knockout zu einem verminderten Plasma-HDL-Spiegel führt, wird von GalNT2 O-glykosyliert und scheint so dessen Aktivierung zu regulieren (Shimamura et al. 2007, Schjoldager et al. 2010).

Weiterhin wird vermutet, dass GalNT2 in Prozesse der Tumormalignität eingreift (Wu et al. 2011, Ho et al. 2014). Der Insulin-like growth Faktor (IGF)-1-Rezeptor wird von GalNT2 O-glykosyliert und inhibiert so dessen Signaltransduktion bei Überexpression von GalNT2 (Ho et al. 2014). In diesem Zusammenhang wird ein positiver Einfluss auf das Überleben von GalNT2 bei Neuroblastom Patient/-innen vermutet und es kommt bei Verminderung von GalNT2 zu einem größeren Tumorwachstum (Ho et al. 2014). Des Weiteren ist GalNT2 bei der Invasivität von oralen Plattenepithelkarzinomen von Bedeutung und wird dort vermehrt exprimiert (Lin et al. 2014). Als prognosebestimmender Faktor wird GalNT2 beim pulmonalen Adenokarzinom beschrieben (Yu et al. 2021). In Zellen des hepatozellulären Karzinoms wurde eine Herunterregulation von GalNT2 festgestellt (Wu et al. 2011).

Die Überexpression von GaINT2 in einer humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie führte zu einer Verminderung von Tumolvolumen und –gewicht (Wu et al. 2011). Bei einer Zelllinie des humanen Magenkarzinoms konnte eine vermehrte Expression von GaINT2 festgestellt werden (Hua et al. 2012). Hier kam es bei einer gesteigerten Aktivität von GaINT2 zu einer verminderten Proliferation und Invasivität der Tumorzellen (Hua et al. 2012). Zudem scheint es bei Pankreaskarzinomzelllinien experimentell zu einer Vermehrung von GaINT2 zu kommen (Sutherlin et al. 1997). Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte GaINT2 ein zukünftiges Target für die Tumortheraieforschung sein (Lin et al. 2014).

1.5 Lektine

Lektine sind glykanbindende Proteine, die in der Lage sind, bestimmte Kohlenhydratmuster auf Glykoproteinen zu erkennen (Berg et al. 2013). Es wird davon ausgegangen, dass unter anderem über diesen Weg die Steuerung von Zellfunktionen erfolgt (Berg et al. 2013). Lektine können sich auf den Oberflächen der Plasmamembranen befinden und so den Kontakt zwischen Zellen oder von Zellen zu Zielmolekülen herstellen (Nelson und Cox 2005). Die Bindung erfolgt durch nicht kovalente Wechselwirkungen (Berg et al. 2013). Beispiele für bekannte Zellfunktionen im Zusammenhang mit Lektinen sind der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der für das lysosomale Targeting zuständig ist, oder der Abbau von Ceruloplasmin in den Hepatozyten (Nelson und Cox 2005, Berg et al. 2013). Unter experimentellen Bedingungen werden die Lektinbindungen genutzt, um Glykoproteine aufzutrennen oder zu detektieren (Nelson und Cox 2005; Wolters-Eisfeld und Schumacher 2017). Dieser Eigenschaft wurde sich in dieser Arbeit im Rahmen des Lektin-Blots bzw. – Färbung bedient (Wolters-Eisfeld und Schumacher 2017).

1.6 Das Pankreas im Überblick

Das Pankreas ist ein retroperitoneales, im Oberbauch gelegenes Drüsenorgan mit endokriner und exokriner Funktion (Wharton 1934, Birmingham 1896). Es liegt in enger Lagebeziehung zu Duodenum, Jejunum, Niere, Magen, Kolon und zwischen Leber und Milz (Birmingham 1896). Seine Anteile werden anatomisch in Caput, Corpus und Cauda pancreatis eingeteilt (Birmingham 1896; Schünke et al. 2018). Es ist in Läppchen mit bindegewebigen Septen gegliedert, die den Ausführungsgang für das Pankreassekret umschließen (Wharton 1934, Langerhans

1869, Harris und Gow 1893). Die Hauptmasse des Pankreas macht das exokrine Gewebe aus (Schünke et al. 2018). Dieses wird durch die serösen Azinusdrüsenzellen gebildet, welche die Verdauungsenzyme Amylase, Lipase, Elastase, Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidasen sezernieren (Welsch et al. 2014). Das Sekret der Azinuszellen wird über die Pankreasgänge durch die Vatersche Papille ins Duodenum abgegeben (Wharton 1934). Die Langerhans-Inseln stellen den endokrinen Anteil dar und sind für die Sekretion von Insulin über die β -Zellen ins Blut zuständig (Wharton 1934, Hard 1946). Auch sind die α -Zellen in den Langerhans-Inseln lokalisiert und stellen die Quelle von Glucagon dar (Sutherland und De Duve 1948, De Duve 1953). Sie wurden 1869 erstmals von Paul Langerhans beschrieben (Langerhans 1869; Ramírez-Domínguez 2016). Sie nehmen einen kleineren Anteil der Pankreasmasse ein und wurden historisch auch als sekundäre Zellgruppe bezeichnet (Harris und Gow 1893). Ist die Bauchspeicheldrüse erkrankt, kann es zu Symptomen wie epigastrischen Schmerzen, Übelkeit, Ikterus, Stuhlveränderung oder Hyperglykämien kommen, welche Hinweise auf beispielsweise eine Pankreatitis oder ein Pankreaskarzinom geben können (Southwell 1944).

1.7 Pankreasentwicklung

Das Pankreas entsteht aus einer dorsal und ventral gelegenen Organknospe des Vorderdarms, die sich später hinter dem Duodenum vereinigen (Sadler 2014, Coulier 2016). Es entwickelt sich in enger Beziehung zur Leber (Wharton 1934).

Das spätere interlobuläre Bindegewebe entsteht aus dem dorsalen Mesenterium in das die Pankreasanlage einwächst (Wharton 1934). Die primitiven Gefäßsprosse erhält es ebenfalls aus dem dorsalen Mesenterium (Wharton 1934). Auf molekularer Ebene sind verschiedene Faktoren für die Pankreasentwicklung verantwortlich (Sadler 2014, Dassaye et al. 2016). Für die epitheliale und endokrine Entwicklung des Pankreas ist das pankreatische und duodenale Homeoboxprotein 1 (PDX1) entscheidend (Jonsson et al. 1994, Ahlgren et al. 1996). So wurde experimentell in Mäusen mit homozygoter Loss-of-Funktion-Mutation des PDX 1 sogar das komplette Fehlen des Pankreas gezeigt (Jonsson et al. 1994). Allerdings scheint die mesenchymale Entwicklung von diesem Gen losgelöst zu sein (Ahlgren et al. 1996). Die Faktoren Activin- β und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2) sind in der Lage die Expression des endodermalen Sonic Hedgehog Proteins (SHH)

zu vermindern (Hebrok et al. 1998). Normalerweise exprimiert das pankreatische Endoderm kein SHH (Hebrok et al. 1998). Sofern das pankreatische Endoderm experimentell SHH exprimiert kommt es zu einer verminderten Produktion von PDX 1 und Insulin (Hebrok et al. 1998). Somit werden Activin- β und FGF-2 als Faktoren angesehen, die die Expression von PDX 1 und Insulin fördern können und somit zur Pankreasentwicklung beitragen (Hebrok et al. 1998). Die Abwesenheit von SHH wird auch als wichtiger Faktor für die embryonale Pankreasentwicklung gesehen, da es bei Anwesenheit des Proteins eher zu einer intestinalen Differenzierung des pankreatischen Mesoderms kommt (Apelqvist et al. 1997).

Des Weiteren ist PAX6 für die Entwicklung der Langerhans-Inseln erforderlich, da durch homozygote Mutation eine signifikante Verminderung der Insel-Zellen beobachtet wurde (Sander et al. 1997). Während das PAX6 Gen besonders für die Entwicklung der α -Zellen wichtig ist, ist PAX4 für die Entwicklung der β -Zellen entscheidend (Sosa-Pineda et al. 1997, St-Onge et al. 1997).

Das Prospero Homebox Protein 1 (PROX 1) wurde in der dorsalen Pankreasanlage der Maus detektiert und zeigt sich ebenfalls während der Morphogenese in unterschiedlichen Konzentrationen (Oliver et al. 1993). Das Ptf1a-Gen scheint besonders für die Entwicklung des exokrinen Gewebes entscheidend zu sein (Krapp et al. 1998). Kawaguchi et al. konnten Ptf1a allerdings auch in der Entwicklung der duktafen und endokrinen Pankreaszellen ausfindig machen (Kawaguchi et al. 2002). Ptf1a konnte sowohl in der ventralen als auch in der dorsalen Pankreasanlage gefunden werden (Burlison et al. 2008). Ptf1a und PDX 1 werden zwar in pankreatischen Vorläuferzellen gleichzeitig exprimiert, doch scheinen ihre Funktionen unabhängig zu sein (Burlison et al. 2008). Auch kommt es bei Knock-out des Hlxb9-Gens zu einer verminderten Expression von PDX 1, weshalb auch für dieses Gen ein Zusammenhang der weiteren Differenzierung der embryonalen Zellen gesehen wird (Harrison et al. 1999). Die Transkriptionsfaktoren GATA-4 und GATA-6 spielen ebenfalls eine Rolle bei der Pankreasentwicklung der Maus (Ketola et al. 2004). Hierbei seien GATA-4 bei der exokrinen und GATA-6 bei der endokrinen Entwicklung beteiligt (Ketola et al. 2004). Insgesamt spielen viele Faktoren bei der Organogenese des Pankreas eine Rolle, weshalb hier nur einzelne ausgewählt beschrieben werden (Dassaye et al. 2016). Durch den engen Zusammenhang der Organentwicklung von Pankreas und Leber vermutet man auch in der Pathogenese von Krankheiten einen Zusammenhang (Wharton 1934).

1.8 Das Pankreas in Bezug auf Stress des endoplasmatischen Retikulums und Lipidhomöostase

Inflammationsreaktionen stehen im engen Zusammenhang zu Stress des endoplasmatischen Retikulums sowie oxidativem Stress (Bettaieb et al. 2016; Zeeshan et al. 2016). Zum Abbau von fehlerhaften Proteinen gibt es sowohl die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) über das Ubiquitin-Proteasom-System sowie die Antwort auf ungefaltete Proteine, auf Englisch *unfolded protein response* (UPR) (Plempner und Wolf 1999, Friedlander et al. 2000). Der letztgenannte Mechanismus dient der Unterstützung des erstgenannten bei zellulärem Stress (Friedlander et al. 2000).

Die Reaktion der Zelle auf einen erhöhten Anfall von ungefalteten Proteinen und demnach der UPR zeigte sich, indem erhöhte Expressionen von Hitzeschockproteinen beobachtet wurden (Chapman et al. 1998).

Hitzeschockproteine befinden sich im ER Lumen und dienen der Proteinfaltung (Chapman et al. 1998; Yoshida et al. 2006). Die Antwort auf ungefaltete Proteine scheint ebenfalls im Zusammenhang mit der Lipidhomöostase zu stehen (Volmer und Ron 2015). So gibt es Transkriptionsfaktoren, die sowohl auf die Antwort der ungefalteten Proteine wirken als auch auf die Lipogenese (Lee et al. 2008).

In Bezug auf das Pankreas ist es bekannt, dass eine chronische Pankreatitis mit vermehrtem ER-Stress und der ungefalteten Proteinantwort einhergeht (Sah et al. 2014). Zudem scheint es bei Mechanismen der Pankreatitis neben dem ER-Stress zu Auffälligkeiten des Lipidmetabolismus im Pankreas zu kommen (Biczko et al. 2018). Daher wurden in unserer Arbeit die Akteure dieser Mechanismen neben den allgemeinen Veränderungen durch GalNT2 Überexpression genauer untersucht.

2. Material

2.1 Pufferlösungen

Tabelle (Tab.) 1: Allgemeine Materialien zur Erstellung der Pufferlösungen:

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr.
Trizma [®] Base	Sigma-Aldrich, Steinheim	T1503
Glycine Reagent Plus [®]	Sigma-Aldrich, Steinheim	G7126
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, Steinheim	P1379
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Sigma-Aldrich, Steinheim	L3771
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3957.1
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	322415

Tab. 2: Ansätze Pufferlösungen:

Pufferlösung	Inhaltsstoffe	Beschreibung
SDS PAGE Lauf Puffer (10x)	Tris Base 30,3 g Glyzin 144g SDS 10g auf 1L H ₂ O	Für die Gebrauchslösung wurde der Ansatz nochmals zehnfach mit H ₂ O verdünnt.
Transferpuffer (10x)	Glyzin 288g Tris Base 60,4g Methanol 200ml	Bestandteile in 1,8L H ₂ O auflösen und bis 2 L auffüllen. Der Ansatz wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch nochmals zehnfach mit H ₂ O verdünnt

TBS-T	Tris/HCL 60,57g	Tris und NaCL wurden in zweifach destilliertem H ₂ O gelöst und dann auf einen Liter aufgefüllt. Der pH wurde auf 7,4 gebracht. Für den Gebrauch wurde die Ansatzlösung mit H ₂ O zehnfach verdünnt und mit Tween zu 0,05% versetzt (5ml auf 10L).
(Tris-buffered-Salin mit Tween20) (10x)	NaCl 87,66 g	
	0,05% Tween	
Stripping Lösung	NaCl 29,22g 29ml HCL	Die Komponenten wurden auf einen Liter H ₂ O aufgefüllt.

2.2 Kits und Reagenzien zur Bearbeitung von Paraffinschnitten

Tab.3 Materialien Entparaffinierung

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr.
Xylol	J.T. Baker, Deventer (NL)	28973.328
Ethanol	J.T Baker, Deventer (NL)	8025.2500
Citrat Puffer Target Solution PH6 (10x Konzentration) Dako Retrieval (10x)	Dako, California, USA	S1699
TBS-T Puffer	(siehe Pufferlösungen)	-
Destilliertes Wasser	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	-

Tab. 4: Materialien HE Färbung

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr.
Mayers Hämalan Solution	Merck, Darmstadt	109249
Entellan® Neu	Merck, Darmstadt	1079610100
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Roth, Karlsruhe	X883.1
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt	109057.1000
Ethanol	J.T Baker, Deventer (NL)	8025.2500
Xylol	J.T. Baker, Deventer (NL)	28973.328
Deckgläser	Roth, Karlsruhe	0657.2

Tab. 5: Materialien Masson Goldner

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr.
Eisen(III)chlorid	Merck, Darmstadt	1.05512.0250
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt	104302
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt	1.05231
Ponceau de Xylidine	Waldeck GmbH & Co KG, Münster	1B207
Azophloxin	Waldeck GmbH & Co KG, Münster	1B103
HCL-Ethanol	Merck, Darmstadt	100327
Lichtgrün	Merck, Darmstadt	1.15941.0025
Molybdatphosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt	1.00532
Orange G	Waldek GmbH & Co.KG	1A116
Eukitt®	Merck, Darmstadt	03989

Tab. 6: Lösungen Masson Goldner

Lösungen Masson Goldner

Stammlösung:

Im Verhältnis 1:2 Lösung A mit Lösung B gemischt

Lösung A:

1g Säurefuchsin in

100ml Aqua dest

1ml Essigsäure

bei 56°C versetzen

Lösung B :

1g Ponceau de Xylidine in

100ml Aqua dest

1ml Essigsäure

bei 56°C vermischen

Azophloxinlösung:

5g Azophloxin in

100ml Aqua dest

2ml Essigsäure

**Masson-Goldner Gebrauchslösung/
Masson Lösung:**

50ml Stammlösung

10ml Azophloxinlösung

440ml Essig (0,2%)

Eisenhaematoxylin nach Weigert:

Lösung A und B im Verhältnis 1:1
gemischt

Lösung A:

475ml Aqua dest

5ml HCL 25%

20 ml Eisen-3-Chloridlösung

Lösung B:

10g Hämatoxylin

1000ml 96% Ethanol mischen

Phosphormolybdänsäure-Orange:

3g Molybdätsäurehydrat

2g Orange G

100ml Aqua dest

Lichtgrün 0,1%:

0,1g Lichtgrün

0,2ml Essigsäure 100%

100ml Aqua dest

Tab. 7: Pikro-Siriusrot-Färbung

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr
Sirius Red Farbstoff	Polysciences, Warrington (PA) USA	09400
Pikrinsäure(2,4,6-Trinitrophenol), PA	Merck, Darmstadt	88891
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt,	109057.1000
Eukitt®	Merck, Darmstadt	03989

Tab. 8: Materialien Lektinfärbung

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr
Dako Pen	Dako, Glostrup	S200230-2
Cell & Tissue Staining Kit	R&D Systems, Abingdon	CTS005
Gibco Hank's Balanced Salt Solution	(Biochrom GmbH, Berlin)	L2035
Mayers Hämalaun Solution	Merck, Darmstadt	109249
Aquatex®	Merck, Darmstadt	108562
Carbo-Free Blocking Solution (10x konzentriert)	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)	SP-5040

2.3 Allgemeine Materialien Western Blot / Lektin Blot

Tab. 9: Materialien Western Blot

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr
Proteinlysate	(siehe Materialien Organverarbeitung)	-
SDS Running Puffer	(siehe Pufferlösungen)	-
Transfer Puffer	(siehe Pufferlösungen)	-
TBS-T Puffer	(siehe Pufferlösungen)	-
Laemmli Sample Puffer	Bio-Rad, München	161-0737
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M3148
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	1706404
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München	1610374
Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Precast Gels	Bio-Rad, München	4568023, 4568043

Amersham™ Protran® Western Blotting Membranes	GE Healthcare Life Sciences, Marlborough (MA,USA)	10600002
CL-XPosure Film	Thermo Fischer Scientific, Rockford (USA)	34091
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fischer Scientific, Rockford (USA)	34075
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München	1703930
Ponceau S - Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P7170

Tab. 10: Materialien Lektin Blot

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr
Streptavidin-Protein-HRP	Thermo Scientific, Rockford, IL (USA)	21126
Hanks' Balanced Salt Solution ohne Phenolrot	(Biochrom GmbH, Berlin	L2035
Carbo-Free Blocking Solution (10x konzentriert)	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)	SP-5040

2.4 Antikörper

Tab. 11: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller, Ort	Verwendung	Artikelnr
Anti-Bile salt-activated lipase antibody (Rabbit)	Abcam plc.	WB, IHC	ab79131
Insulin Antikörper (Rabbit)	Cell Signaling Technology, Inc	IHC	#4590
Perilipin (D1D8) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	IHC	#9349
GALNT2 Polyclonal Antibody (Rabbit)	Thermo Fisher Scientific GmbH	WB, IF	PA5- 21541
Anti-Prox-1 Antikörper (Rabbit)	Abcam plc	WB, PD	ab38692

Anti-Prox-1 Antikörper (Rabbit)	Abcam plc	IF	ab199359
S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	ICH, WB	#2217
Ubiquitin (P4D1) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#3936
SUMO-1 Antibody (Rabbit)	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#4930
HSP70 Antibody	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#4872
HSP40 (C64B4) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#4871
HSP90 (C45G5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#4877
IRE1α (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#3294
BiP (C50B12) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#3177
PDI (C81H6) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#3501
C/EBPα (D56F10) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#8178
NF-κB p65 (D14E12) XP[®] Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#8242
IκBα (L35A5) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#4814
(N-terminal Antigen)			
Acetyl-p53 (Lys379) Rabbit Antibody	Cell Signaling Technology, Inc	WB, IHC	#2570
Fatty Acid Synthase (C20G5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	#3180
Calnexin (H-70) Antibody (Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	WB	sc-11397
SBDS Polyclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific GmbH		PA5-42760

CHOP Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc	WB	L63F7
-----------------------	--------------------------------	----	-------

WB (Western Blot) , IHC (Immunhistochemie), IF (Immunfluoreszenz), PD (Pull down)

Tab. 12: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller, Ort	Artikelnr
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody	Thermo Fisher Scientific GmbH	31460
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568	Thermo Fisher Scientific GmbH	A-11011
Goat Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc	#7076
Goat Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc	#7074

2.5 Lektine

Tab. 13: Lektine

Lektin	Hersteller, Ort	Artikelnr
Biotinylated PNA	Vector Laboratories, Burlingame	B-1075-5
Biotinylated VVA	Vector Laboratories, Burlingame	B-1235-2
Biotinylated DBA	Vector Laboratories, Burlingame	B-1035-5
Biotinylated SNA	Vector Laboratories, Burlingame	B-1305-2
Biotinylated Jacalin	Vector Laboratories, Burlingame	B-1155-5
PNA Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Inc	L-21409

2.6 Materialien Organverarbeitung

Tab. 14: Materialien Proteinlysats

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr
Ripa-Buffer	Thermo Fisher Scientific	89900

Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X	Thermo Fisher Scientific	78429
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf SE	Modell 5417R

Tab 15. Materialien BCA Test

Material	Hersteller, Ort	Artikelnr
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
96-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific	-
Fluostar Omega Microplate Reader	BMG LABTECH GmbH	-

2.7 Mausdatenbank

Tab. 16: Mausdatenbank zur Herstellung der Lysate transgen

Maus ID	Genotyp	Organ	Alter in Wochen
676	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	4
283	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	4
200	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	4
218	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	6
234	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	6
310	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	6

312	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	6
679	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	12
680	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	12
681	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	12
682	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	12
683	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	12
684	Ptf1a-Cre; GalNT2-TG (heterozygot)	Pankreas	24

Tab. 17: Mausdatenbank zur Herstellung der Lysate Wildtyp

Maus ID	Genotyp	Organ	Alter in Wochen
116	Wildtyp	Pankreas	4
252	Wildtyp	Pankreas	4
677	Wildtyp	Pankreas	4
220	Wildtyp	Pankreas	6
232	Wildtyp	Pankreas	6
306	Wildtyp	Pankreas	6
308	Wildtyp	Pankreas	6
678	Wildtyp	Pankreas	12
685	Wildtyp	Pankreas	24
688	Wildtyp	Pankreas	24

3. Methoden

3.1 Vorwort Methoden

Die in dieser Arbeit angewandte Methodik lehnt sich an die Vorarbeit der Dissertation von Neuburg an und dient der Erweiterung der bereits gewonnenen Erkenntnisse (Neuburg 2021). Bei den Methoden handelt es sich um Standardverfahren, welche den arbeitsgruppenintern angepassten Protokollen unterliegen (Neuburg 2021).

3.2 Konditional transgene GalNT2 Mauslinie

Das Cre/loxP Rekombinase-System ist eine gängige Methode zur Etablierung einer konditional transgenen Mauslinie (Jaisser 2000). Die Cre-Rekombinase ist in der Lage genomische DNA-Fragmente zwischen zwei loxP-Stellen auszuschneiden (Abremski und Hoess 1984). Sie kann in einem transgenen Mausmodell durch Kombination mit einem gewebespezifische Promoter nur in dem entsprechenden Gewebe exprimiert werden (Jaisser 2000). Für eine Überexpression eines Gens ist es somit möglich, ein gefloxtes Stopcodon (lox-stop-lox (LSL)) vor das Transgen zu inserieren, sodass das Gen nach Ausschneiden des Stopcodons durch die Cre-Rekombinase exprimiert wird (Jaisser 2000). Dieses Vorgehen wurde auch in dieser Arbeit angewandt, sowie in der Dissertation von Neuburg (Neuburg 2021).

Um die Cre-Rekombinase Pankreas-spezifisch zu exprimieren, wurde sie an das Ptf1a-Gen gekoppelt (Kawaguchi et al. 2002). Eine zusätzliche Kopie des Gens GalNT2 wurde im Rosa26 Locus eingefügt, welcher häufig für Knock-in-Linien transgener Mäuse verwendet wird (Casola 2010). Die Genexpression wird durch ein gefloxtes Stopcodon (lox-stop-lox) vor dem CAG-Promotor unterbunden und kann wie oben beschrieben durch Einkreuzen einer gewebespezifischen Cre-Rekombinase aktiviert werden (Abremski und Hoess 1984; Jaisser 2000).

Die verwendete Mauslinie (siehe Abb. 2) stellte die Nachkommengeneration von transgenen Elterntieren dar. Dabei wies eines der beiden Elterntiere die heterozygote Modifikation $Ptf1a^{+/Cre}$ auf und das andere eine homozygote Anlage von LSL-GalNT2 (GalNT2 mit einem von loxP-Stellen umgebenen Stopcodon) im Rosa26 Genlocus. Somit entstanden die Genotypen der Nachkommen mit den genetischen Varianten $Ptf1a^{+/+}$; $Rosa\ 26^{+/GalNT2-Tg}$ als Wildtyp Mäuse (WT) zur Kontrolle und $Ptf1a^{+/Cre}$; $Rosa\ 26^{+/GalNT2-Tg}$ als transgene Tiere (TG) bezeichnet (siehe Abb. 2) (Neuburg 2021).

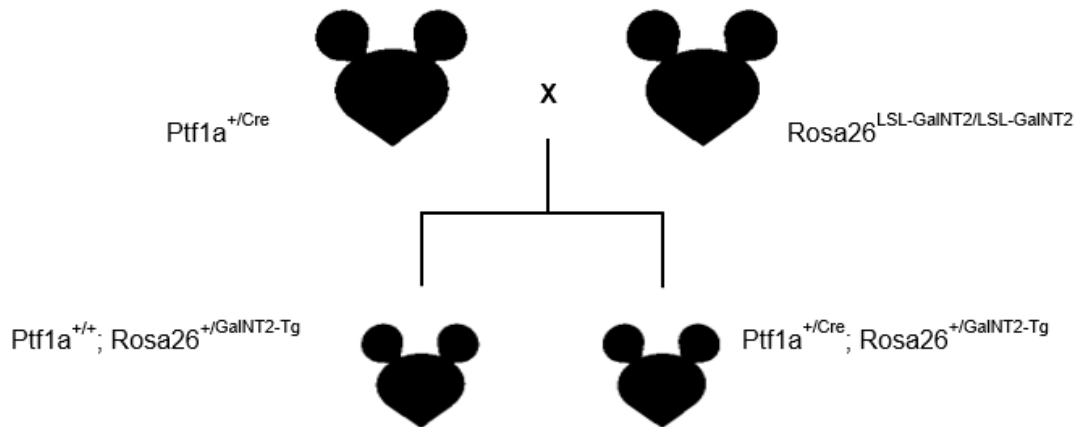


Abb. 2: oben: Mauslinien der Elterngeneration gekreuzt aus den Genotypen $Ptf1a^{+/Cre}$ x $Rosa26^{LSL-GalNT2/LSL-GalNT2}$, unten: Nachkommengeneration mit den Genotypen $Ptf1a^{+/+}; Rosa26^{+/GalNT2-Tg}$ (Wildtyp Mäuse (WT)) sowie $Ptf1a^{+/Cre}; Rosa26^{+/GalNT2-Tg}$ (transgene Mäuse (TG)). Modellskizze entsprechend der Vorarbeit von Neuburg (Neuburg 2021).

3.3 Aufbereitung der murinen Pankreata

Der Bezug der Mauslinie erfolgte aus der ansässigen Forschungstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Tötung der Tiere erfolgte mittels Kohlenstoffdioxid. Danach wurden die Tiere auf Eis präpariert und die zu untersuchenden Organe entnommen. Je nach Methode der Weiterverarbeitung wurden die Organe entweder bei -80 Grad Celsius tiefgefroren, direkt weiterverarbeitet oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (Neuburg 2021).

3.3.1 Proteinlysate

Zur Durchführung von Methoden zur Proteindetektion wurden Proteinlysate aus den murinen Pankreata hergestellt. Die Organe wurden wie bereits beschrieben entweder frisch entnommen oder von -80° aufgetaut und jeweils in einem Eppendorf-Tube auf Eis gelagert. Es wurde ein Puffer angesetzt mit 990µl Ripa-Buffer (Thermo Fisher Scientific) und 10 µl Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X, Thermo Fisher Scientific). Das Pankreas wurde in einen Glashomogenisator mit 2 cm² Kolbenfläche gegeben und je nach Organgröße 500-1000µl des Puffers hinzugegeben. Die Komponenten wurden mit dem passenden

Zylinder in einer rhythmischen, drehenden Auf- und Abbewegung zu einer homogenen Masse zerdrückt. Danach wurde die Flüssigkeit in Eppendorf-Tubes überführt und in der Eppendorf Zentrifuge (Modell 5417R) über 12 Minuten bei 4°C bei 1400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nur das überstehende Zelllysat wurde hinterher abpipettiert und aufbewahrt. Die Pellets wurden verworfen. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert und weiterverwendet oder bei -30° eingefroren (Neuburg 2021).

3.3.2. Bichionic Acid (BCA) Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Analyse der Proteinkonzentration wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Die Lysate wurden aufgetaut, zentrifugiert und 1:10 mit H₂O verdünnt und dann zu je 10µl in einer 96-Well-Platte (Thermo Fischer Scientific) appliziert. Dazu kamen 200µl des Ansatzes aus dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Ansatz: 7840 µl Reagent A und 160µl Reagent B (50:1)). Anschließend inkubierte die 96-Wellplatte für 30 Minuten im Wärmeinkubator bei 37°C. Danach erfolgte eine photometrische Analyse der Proteinkonzentration mittels Fluostar Omega Microplate Reader. Die Daten wurden mittels der Omega-Software in die Proteinkonzentration der spezifischen Lysate umgerechnet (Neuburg 2021).

3.4 Deparaffinierung der Paraffinschnitte

Die Superfrost Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden in einem Färbegestell mit dem passenden Färbekasten aus Glas eingesetzt. Das Gestell mit den Objektträgern wurde zu jeweils 5 Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur in Xylol getaucht. Danach erfolgte die Entparaffinierung zu jeweils 3 Minuten in absteigender Alkoholreihe: zunächst zweimal 3 Minuten in 100% Ethanol, zweimal in 96% Ethanol, einmal in 80% Ethanol und schließlich einmal in 70% Ethanol. Die Ethanolverdünnungen wurden dabei jeweils mit destilliertem Wasser angesetzt. Schließlich erfolgte die Inkubation der Objektträger für zweimal 2 Minuten in H₂O (Neuburg 2021).

3.5 Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung zur Vorbehandlung der Lektinfärbung/ Immunhistochemie/ Fluoreszenzfärbung

Nach der Deparaffinierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in einen mikrowellengeeigneten Behälter eingesetzt. Das Behältnis wurde mit dem Citratpuffer aus Citrat (pH 6, Konzentration 10x) und H₂O im Verhältnis 1:10 befüllt.

Anschließend wurden die Präparate zweimal über fünf Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt. Jeweils nach dem Erhitzungsvorgang wurde die Pufferlösung mit H₂O bis zur vorherigen Füllhöhe aufgefüllt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben für zwei Minuten in ein Glasgestell mit H₂O eingestellt und anschließend fünf Minuten mit dem TBS-T-Puffer gewaschen. Diese Schritte dienten der Vorbereitung verschiedener Färbemethoden (Shi et al. 1991, Neuburg 2021).

3.6 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Bei diesem HE Färbeprotokoll handelt es sich um ein arbeitsgruppenintern etabliertes Schnellprotokoll (Neuburg 2021). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur und unter dem Abzug durchgeführt.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte deparaffiniert (siehe Deparaffinierung) und in einem H₂O befüllten Gefäß aus Glas feucht gehalten. Um die Schnitte beim Färben vor dem Aneinanderkleben zu schützen, wurden sie in einem Glasgestell stabilisiert.

Den ersten Schritt der Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellte das Eintauchen der Schnitte in Mayers Hämalaunlösung für fünf Sekunden dar, zur Anfärbung der Zellkerne. Nach jedem Schritt erfolgte ein Abtropfen über fünf Sekunden. Im zweiten Schritt wurden die Schnitte zur Differenzierung in 0,1% Salzsäure überführt und dort für zehn Sekunden belassen. Das Bläuen wurde mittels Leitungswasser durchgeführt. Das Leitungswasser wurde mehrmals gewechselt, bis dieses sich nicht mehr blau verfärbt hat. Danach wurden die Gewebeschnitte mit H₂O gespült.

Nun wurden die zu färbenden Schnitte mit Eosin G-Lösung 0,5% für fünf Sekunden gegengefärbt. Danach ließ man die überschüssige Farbe abtropfen.

Anschließend erfolgte für jeweils fünf Sekunden ein Eintauchen der Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe. Die Glasgefäße waren dabei mit 80% Ethanol, zweimal 96% Ethanol und zweimal 100% Ethanol befüllt.

Am Ende wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten in Xylol belassen.

Die Schnitte wurden mit Entellan® und Deckgläsern der Firma Roth eingedeckelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich unter den Deckgläsern keine Luftblasen bildeten. Die Färbung diente der mikroskopischen Übersichtsbeurteilung der Präparate (Taboas und Ceremsak 1967, Neuburg 2021).

3.7 Masson-Goldner Färbung

Die Paraffinschnitte wurden bis zu einer Alkoholkonzentration von 80% deparaffiniert (siehe Deparaffinierung), dann fünf Minuten in der Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert belassen. Anschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült. Zur Differenzierung zwischen Zytoplasma und Kern wurden die Schnitte wenige Sekunden in HCl-Ethanol (0,5%) eingetaucht.

Danach wurden die Proben fünf Minuten in destilliertem Wasser belassen und dann sieben Minuten in die Masson-Goldner-Gebrauchslösung getaucht. Schließlich wurden die Proben mit 1%iger Essigsäure gespült (ca. 30 Sekunden). Im folgenden Schritt folgte die dreiminütige Inkubation im Phosphomolybdänsäure-Orange-Ansatz, danach erneutes Spülen für 30 Sekunden in 1%iger Essigsäure. Für fünf Minuten wurden die Schnitte nun in 0,1% Lichtgrünlösung belassen und hinterher ebenfalls mit 1%iger Essigsäure gespült. Die Schnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, von 80% über 96% auf 100% Ethanol zu jeweils zweimal fünf Minuten. Danach wurden die Proben zweimal fünf Minuten in Xylol getaucht und mit Eukitt eingedeckelt. Die Masson-Goldner Färbung ist eine seit Jahrzehnten etablierte Färbemethode (Goldner 1938).

3.8 Pikro-Siriusrot-Färbung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte deparaffiniert (siehe Deparaffinierung) und in H₂O feucht gehalten. Dann wurden die Gewebeproben für eine Stunde mit 0,1% Siriusrot Farbstoff in Pikrinsäure benetzt. Anschließend wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten in 0,5%iger Salzsäurelösung differenziert.

Nun erfolgte das Baden der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit jeweils zweimal 80%, 96% und 100%igem Alkohol. Anschließend wurden die Schnitte jeweils für zweimal fünf Minuten in Xylol getaucht. Das Eindeckeln erfolgte mit Eukitt. Die Pikro-Siriusrot-Färbung wurde ebenfalls zur Detektion von Kollagengewebe angewandt (Constantine und Mowry 1968; Lattouf et al. 2014).

3.9 Immunhistochemie

Im Anschluss an die Deparaffinierung und die Epitopdemaskierung erfolgte das Aufzeichnen einer wasserabweisenden kreisförmigen Begrenzung mit dem Dako Pen. Im Anschluss wurden für die Schnitte fünf Minuten mit dem Peroxidase-Blocking-Reagenz beschichtet und vorsichtig fünf Minuten lang im TBS-T-Puffer

gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 15 Minuten mit dem Serum Blocking Reagenz, welches je nach Primärantikörper ausgewählt wurde. Die überstehende Flüssigkeit wurde anschließend von den Objektträgern vorsichtig abgeklopft.

Den nächsten Schritt stellte das Einwirken von jeweils drei Tropfen der Avidin-Blocking-Lösung für 15 Minuten mit anschließendem fünfminütigen Waschen in TBS-T-Puffer. Danach erfolgte die Inkubation von drei Tropfen des Biotin-Blocking-Reagenz für 15 Minuten, ebenfalls mit anschließendem Waschen in TBS-T-Puffer für fünf Minuten. Überstehende Flüssigkeit wurde vorsichtig abgeklopft und die Gewebeschnitte nun mit dem Primärantikörper entsprechend der empfohlenen Verdünnung im Datenblatt benetzt und über Nacht gekühlt inkubiert. Der Ansatz des Primärantikörpers wurde dabei mit einem Antibodydiluent (Dako) erstellt.

Nach der Inkubation wurden die Proben dreimal für zehn Minuten gewaschen, der überstehende Puffer wurde erneut abgeklopft.

Nun wurden die Gewebeschnitte für 60 Minuten mit dem entsprechendem biotinylierten Sekundärantikörper des Färbekits benetzt und danach erneut dreimal für zehn Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen.

Als nächstes wurden drei Tropfen der HSS-HRP-Lösung (Horseradishperoxidase gekoppeltes Streptavidin in 0.01M PBS) für 30 Minuten auf die Gewebeproben gegeben, dann erneutes Waschen für dreimal zwei Minuten.

Nun wurde erneut der überschüssige Puffer abgeklopft und die jeweils 200µl AEC-Chromogen-Lösung (1 Tropfen von 2%igem 3-Amino-9-Ethylcarbazol auf 2ml Azetat-Puffer mit 0,1% H₂O₂) für drei bis 20 Minuten auf die Schnitte gegeben. Dann erfolgte ein Waschvorgang für zweimal fünf Minuten in H₂O. Die Gegenfärbung erfolgte wie bei der Lektinfärbung mittels Inkubation in Mayers Häkalaunlösung für fünf Sekunden mit anschließendem Waschen unter Leitungswasser bis dieses keine Farbe mehr annahm. Das Eindeckeln erfolgte mit Aquatex®. Die Immunhistochemie wurde zur Detektion bestimmter Proteine in fixierten Gewebeschnitten durchgeführt (Shi et al. 1997, Neuburg 2021).

3.10 Immunfluoreszenz und Lektincofärbung (fluoreszent)

Für die Immunfluoreszenz erfolgten die gleichen Arbeitsschritte, wie bei der Immunhistochemie bis zum Einwirken des Primärantikörpers über Nacht. Nach der

Inkubation des Primärantikörpers wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen. Danach wurde eine Lösung mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:1000 und dem fluoreszierendem Lektin in der Endkonzentration 5µg/ml in HBSS unter lichtgeschützten Bedingungen angesetzt. Die Schnitte wurden mit dieser Ansatzlösung für eine Stunde benetzt und in einer lichtdichten Färbekammer aufbewahrt. Danach erfolgte ein dreimal zehnminütiger Waschschrift in TBS-T-Puffer, ebenfalls unter abgedunkelten Bedingungen (Van Damme 2011; Neuburg 2021).

3.11 Lektinfärbung

Die Lektinfärbung stellt eine etablierte Methode zur Metastasenanalyse dar (Wolters-Eisfeld und Schumacher 2017).

Alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach der Entparaffinierung und Epitopdemaskierung wurden die Objektträger in eine Färbekammer gelegt. Mit dem Dako Pen wurde ein wasserabweisender Kreis um die Gewebeschnitte gezeichnet, sodass Inkubationslösungen nicht vom Objektträger abfließen konnten.

Zunächst wurden die Proben für fünf Minuten mit drei Tropfen der Peroxidase-Blocking-Lösung (3% Wasserstoffperoxid) benetzt und anschließend für fünf Minuten mit dem TBS-T-Puffer gespült. Um die unspezifischen Lektinbindungen zu vermindern, wurden die Schnitte 15 Minuten mit einer glykoproteinfreien Blocking-Lösung (glyco-free blocking solution, Vector Laboratories) inkubiert (Wolters-Eisfeld und Schumacher 2017). Die überschüssige Lösung wurde von den Schnitten abgeklopft. Danach erfolgte die 15-minütige Benetzung mit dem Avidin-Blocking-Reagenz (Avidinlösung mit 0,1% NaN₃). Anschließend wurden die Objektträger erneut fünf Minuten in TBS-T-Puffer gewaschen. Die Ansatzlösung der Lektine wurde entsprechend der im Datenblatt angegebenen Konzentration mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) verdünnt und zu je 200 µl auf die Proben gegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde.

Danach wurden die Proben dreimal zu jeweils zehn Minuten mit dem TBS-T-Puffer im Glasgestell gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte erneut in die Färbekammer gelegt und mit jeweils drei Tropfen der HRP-Lösung (Horseradishperoxidase gekoppeltes Streptavidin in 0.01M PBS) bedeckt. Dann erfolgte das Waschen der Schnitte zu dreimal zwei Minuten in TBS-T.

Den nächsten Schritt stellte die Inkubation mit jeweils 200 µl der AEC Lösung (1 Tropfen von 2%igem 3-Amino-9-Ethylcarbazol auf 2ml Azetat-Puffer mit 0,1% H₂O₂) für maximal 20 Minuten dar. Danach wurden die Proben für fünf Minuten in H₂O gewaschen.

Als Gegenfärbung wurden die Proben für fünf Sekunden mit Mayers Häkalaunlösung unter dem Abzug gefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit Leitungswasser gewaschen, bis keine Färbung des Wassers mehr sichtbar war.

Die Proben wurden mit Aquatex[®] eingedeckelt. Diese Methode wurde zur Analyse des Glykosylierungsprofils angewandt (Wolters-Eisfeld und Schumacher 2017, Neuburg 2021).

3.12 Western Blot

Zur Vorbereitung wurden das Proteinlysate, der Laemmli-Ansatz und die Precision Plus Protein™ Lösung auf Eis gelagert. Die Proteinlysate wurden zunächst 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend die Laemmli-Lösung mit dem Lysatansatz im Verhältnis 1:5 versetzt.

Anschließend wurden die Laemmli-Ansätze kurz zentrifugiert und für fünf Minuten bei 95°C im Heizblock zur Denaturierung erhitzt (Mahmood und Yang 2012).

Parallel wurde die Western-Blot-Vorrichtung (Mini Trans-Blot[®] Cell) mit den vorgefertigten Mini-PROTEAN[®] Gelen vorbereitet und mit dem SDS-Running-Puffer befüllt.

Von der Precision Plus Protein™ Lösung wurden je Probenreihe einmal 10 µl in eine eigene Geltasche gegeben, um später die Größen der gelaufenen Proteine abschätzen zu können.

Entsprechend der Proteinkonzentrationen der Laemmli-Ansätze wurden jeweils 40µg Protein je Probe in je eine Geltasche hineingegeben. Teilweise wurde die Proteinkonzentration auf 60 µg erhöht um bestimmte Proteine nachzuweisen.

Anschließend wurde die Western-Blot-Kammer verschlossen und für zehn Minuten eine Spannung von 80 Volt angelegt, dann wurde die Spannung für 50 Minuten auf 100 Volt erhöht. Mittels Gelelektrophorese sollten die negativ geladenen Proteine zur positiven Elektrode wandern und sich so der Größe nach auftrennen (Mahmood und Yang 2012).

Der nächste Schritt stellte das Überführen der Gele in die Blottingkammer dar.

Dafür wurden zunächst Whatman® Filterpapiere entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten, jeweils zwei Schwämme mit Transferpuffer benetzt und das Gel aus der Halterung entfernt. Aus diesen Komponenten wurde das Gel mit der Nitrozellulosemembran in der Mitte mit außen jeweils zwei Whatman® Filterpapieren und jeweils einem Schwamm auf beiden Seiten geschichtet. Mit einer Rolle wurden überschüssige Luftblasen aus der Konstruktion entfernt. Schließlich wurde die Schichtung in die Halterung für den Blottingvorgang eingespannt, sodass sich die Nitrozellulosemembran zwischen Gel und positivem Pol befand, und die Blotting-Kammer mit Transferpuffer und einem gefrorenen Kühlakku befüllt. Das Blotting erfolgte für eine Stunde bei 100 Volt im Kühlraum bei 4°C. Während des Vorgangs erfolgte das ständige Rühren durch einen Rührfisch.

Danach wurde das Gel mit der Nitrozellulosemembran aus der Vorrichtung entnommen und die Geldaschen und Proteinbanden auf die Membran abgezeichnet.

Nun erfolgte ein dreimal fünfminütiger Waschschrift der Nitrozellulosemembran in einem Gefäß mit TBS-T-Puffer auf dem Schüttler.

Anschließend erfolgte die Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung (Romero-Calvo et al. 2010). Danach erfolgte ein erneutes Waschen mit TBS-T Puffer bis die Farbe entfernt war.

Für eine Stunde wurde die Membran mit 5% Milchlösung (Blocking-Grade-Blocker in TBS-T) oder BSA blockiert, dann wurde der Primärantikörper entsprechend der im Datenblatt angegebenen Verdünnung hinzugegeben. Die Inkubation fand über Nacht auf dem Schüttler im Kühlraum statt.

Am Folgetag wurde die Membran fünfmal fünf Minuten in TBS-T-Puffer auf dem Schüttler gewaschen.

Entsprechend dem Datenblatt wurde nun ein mit Horseradishperoxidase konjugierter Sekundärantikörper (meist in 5%-iger Milchlösung) hinzugegeben und für eine Stunde lichtgeschützt auf dem Schüttler zur Inkubation belassen.

Für die Detektion des Signals wurden die Membranen für drei Minuten mit dem Reaktionsgemisch des SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate Kits benetzt. Die Lösung wurde dabei im Verhältnis 1:1 der bereitgestellten Reagenzien

angesetzt und zum Mischen gevortext. Es wurde darauf geachtet, dass beim Benetzen keine Luftblasen entstanden sind.

Danach wurde die Membran in eine lichtabschirmende Kassette eingelegt und eine durchsichtige Folie zwischengelegt, um den Kontakt der feuchten Membran zum Röntgenfilm zu vermeiden. Danach erfolgte die Entwicklung des Röntgenfilms in der Dunkelkammer. Hierfür wurden unterschiedliche Röntgenfilme jeweils zu einigen Sekunden bis mehreren Minuten in die Kassette mit der Membran eingespannt und anschließend entwickelt. Die Ergebnisse wurden anschließend am PC eingescannt. Durch die Western Blot Methode sollten Aussagen über die Proteinmengen im Vergleich von Wildtyp zu transgen getroffen werden (Burnette 1981; Neuburg 2021).

3.13 Lektin Blot

Die Durchführung des Lektin Blots erfolgte nach den gleichen Arbeitsschritten wie der Western Blot bis zum dreimal fünfminütigen Waschschrift in TBS-T nach dem Blotting-Vorgang.

Der Blockiervorgang wurde dabei mittels einer glykoproteinfreien Blockierlösung (Carbo-Free Blocking Solution in zehnfacher Verdünnung mit HBSS) über Nacht auf dem Schüttler im Kühlraum durchgeführt.

Für den Lektinansatz wurden zunächst 32 µl Lektin mit 2 µl Streptavidin-Protein-HRP und 100 µl HBSS vermischt und 30 Minuten inkubiert. Dann wurde der Lektinansatz entsprechend der gewünschten Zielkonzentration zur Blockierlösung auf die Membran gegeben. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug eine Stunde.

Anschließend wurden die Membranen nochmals fünfmal fünf Minuten auf dem Schüttler mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion des Signals erfolgte auf die gleiche Weise wie beim Western Blot (Van Damme 2011, Cao et al. 2013, Neuburg 2021).

3.14 Lektin-Pulldown

Zunächst wurden zwei Eppendorf-Tubes mit 400 µl Agarose Bound Lectin befüllt, dann mit 1 ml HBSS versetzt und geschwenkt. Die Emulsion wurde für 30 Sekunden bei 500 Umdrehungen pro Minute (27 g) zentrifugiert und der wässrige Überstand verworfen. Danach erfolgte ein erneutes versetzen mit 1 ml HBSS und

Zentrifugation für 30 Sekunden bei 100 g. Erneut wurde der wässrige Überstand verworfen. Dieses Prozedere stellte den Waschschrift des Agarose gebundenen Lectins dar.

Die Eppendorf-Tubes mit Agarose gebundenem Lektin wurden nun mit 700 µl HBSS versetzt und mit abgeschnittener Pipettenspitze gemischt. Um die gleichmäßige Konzentration der Agarose Beads zu gewährleisten, wurden die Emulsionen nochmals in ein gemeinsames Gefäß überführt. Von der Gesamtemulsion wurden die gewünschte Anzahl Eppendorf-Tubes mit jeweils 300 µl befüllt und für später aufbewahrt.

Nun wurden jeweils 200 µg Protein Pankreaslysat von Wildtyp und GaINT2 Überexpression in neue Eppendorf-Tubes gegeben und mit 80 µl HBSS und 10 µl Glykoprotein denaturierendem Puffer versetzt. Anschließend wurden die Ansätze für fünf Minuten bei 98°C im Heizblock denaturiert.

Nun wurden die Tubes mit den 300 µl Agarose gebundenem Lektin mit 1 ml HBSS aufgefüllt, vermischt und anschließend mit den denaturierten Proteinlysaten aufgefüllt. Das Gemisch inkubierte für eine Stunde in einem Tube Rotator. Danach wurden die Proben für 30 Sekunden bei 100 g zentrifugiert.

Als Nächstes wurde der Überstand verworfen und die Proben mit 1,5 ml HBSS versetzt. Das Gemisch wurde für eine Minute auf in dem Tube Rotator belassen. Anschließend wurde es zentrifugiert und daraufhin der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und der Überstand erneut verworfen. Es wurden jeweils 20 µl des Laemmli-Ansatzes hinzugegeben und kurz gevortext. Die Proben wurden anschließend erneut für fünf Minuten bei 98°C im Heizblock denaturiert und danach kurz zentrifugiert. Dann waren die Proben bereit, um im Western Blot verwendet zu werden. Durch diese Methode sollten Proteinglykosylierungen passend zum ausgewählten Lektin untersucht werden (Van Damme 2011, Dutt et al. 2023).

3.15 Immunpräzipitation

Zunächst wurde die gewünschte Anzahl an Eppendorf-Tubes bereitgestellt und mit 200 µg Protein des Pankreaslysates, 600 µl HBSS und 40 µl Protein A/G PLUS Agarose befüllt. Für das Pipettieren der Agaroselösung wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet. Der Ansatz inkubierte 30 Minuten in dem Tube Rotator,

wurde anschließend zentrifugiert und nur der Überstand, in dem sich das gelöste Protein befindet, weiterverwendet.

Anschließend wurde der abgenommene Überstand mit 10 µl des gewünschten Antikörpers in einem Eppendorf-Tube vermischt und inkubiert über Nacht bei 4°C auf dem Tube Rotator.

Die Proben wurden erneut mit 40 µl Protein A/G PLUS Agarose versetzt, um eine Bindung der Antikörper-gebundenen Proteine herzustellen. Der Ansatz inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Tube Rotator. Dann wurden sie für 30 Sekunden bei 100 g zentrifugiert und der Überstand verworfen, sodass die Antikörper-Proteinkomplexe welche Agarose gebunden hatten, übrigblieben. Die Agaroselösung wurde mit 1 ml HBSS vermischt, hat auf dem Rotator für fünf Minuten inkubiert, wurde für 30 Sekunden bei 100 g zentrifugiert und schließlich wurde erneut der Überstand verworfen.

Nun wurden 20 µl des Laemmli-Ansatzes hinzugegeben und das Gemisch für fünf Minuten bei 98°C auf dem Heizblock denaturiert. Anschließend standen die Proben für den Western Blot bereit. Dieses Verfahren sollte dazu dienen, Antikörper-bindende Proteine aus einem Lysat zu extrahieren (DeCaprio und Kohl 2017).

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit im Hinblick auf die Morphologie der Pankreata und den Einfluss auf die Proteinexpression beschrieben. Hierfür werden die Wildtyp-Tiere mit den transgenen Tieren verglichen.

4.1 Organmorphologie

4.1.1 Makroskopie

In der Beurteilung der Makroskopie der Organe direkt nach dem Entnahmezeitpunkt ließen sich die Ergebnisse von Neuburg reproduzieren, welche die gleiche Mauslinie für ihre Versuche verwendete (Neuburg 2021). In den Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Organgewichte der GalNT2-transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp signifikant niedriger waren (Neuburg 2021). Bei Präparation der Organe dieser Arbeit fiel passend zu den bekannten Ergebnissen auf, dass die Pankreata der transgenen Tiere im Vergleich zu Wildtypen gleichen Alters fragiler sowie von geringerer Größe und Gewicht erschienen.

4.1.2 Mikroskopie

Um den histomorphologischen Einfluss der GalNT2 Überexpression auf das murine Pankreas zu untersuchen, wurde eine HE-Färbereihe der unterschiedlichen Altersstufen der Tiere angefertigt. Das Mausmodell wurde bereits in der Dissertation von Neuburg mittels HE-Färbung analysiert (Neuburg 2021). In der aktuellen Arbeit wurden Paraffinschnitte von 2, 4, 6, 7, 8 und 15 Wochen (W) alten Tieren verwendet. Somit wurde die Beurteilung um die 6, 8, und 15 Wochen alten Tiere erweitert. Die Schnitte wurden in toto mikroskopisch beurteilt und repräsentative Aufnahmen angefertigt, siehe Abb. 3 und 4.

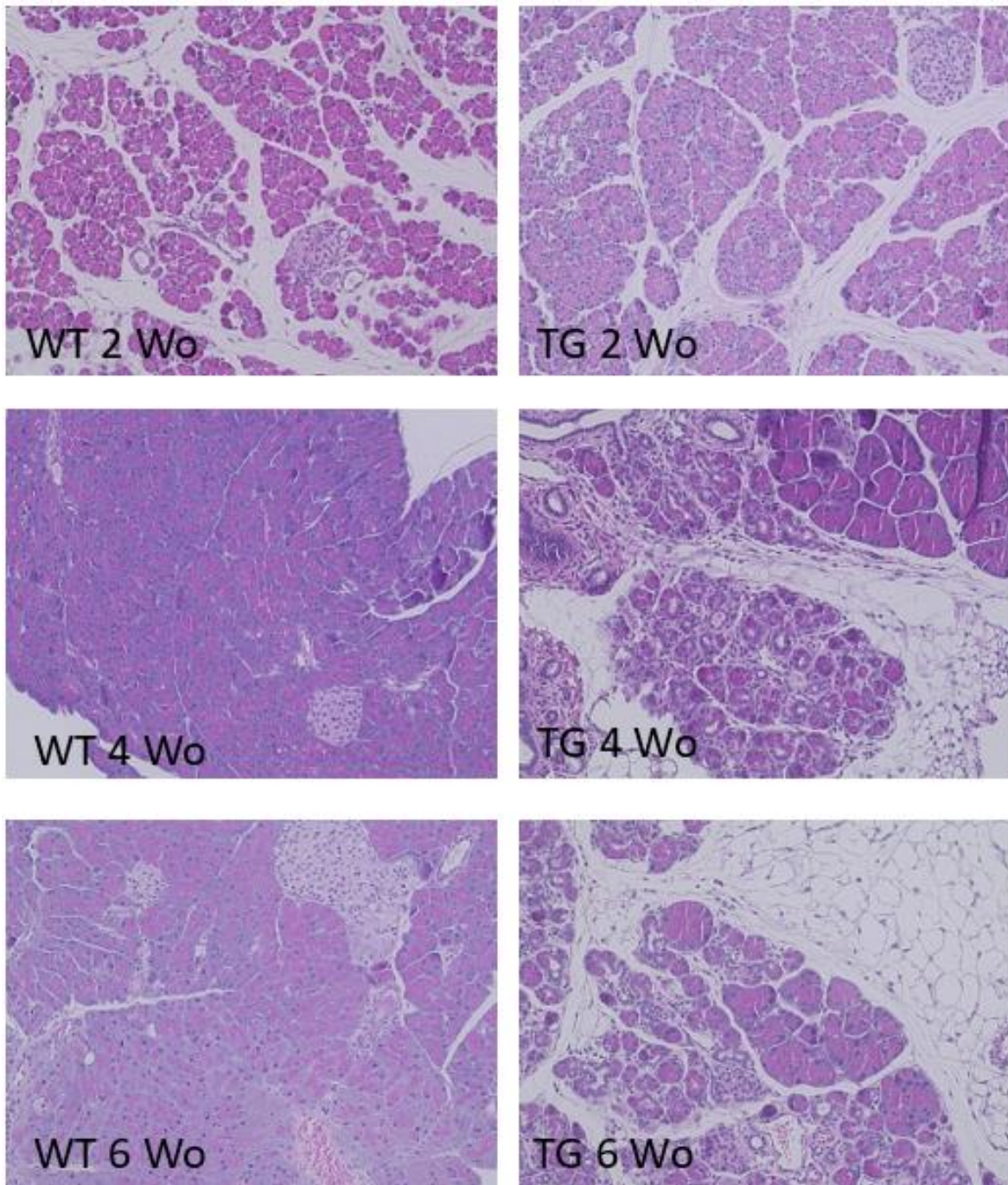


Abb. 3: histologische Aufnahmen zur Gegenüberstellung der HE-Färbung, Wildtypen (WT) links und transgene Tiere (TG) rechts, sortiert nach Alter in Wochen (Wo), Altersstufen zwei bis sechs Wochen.

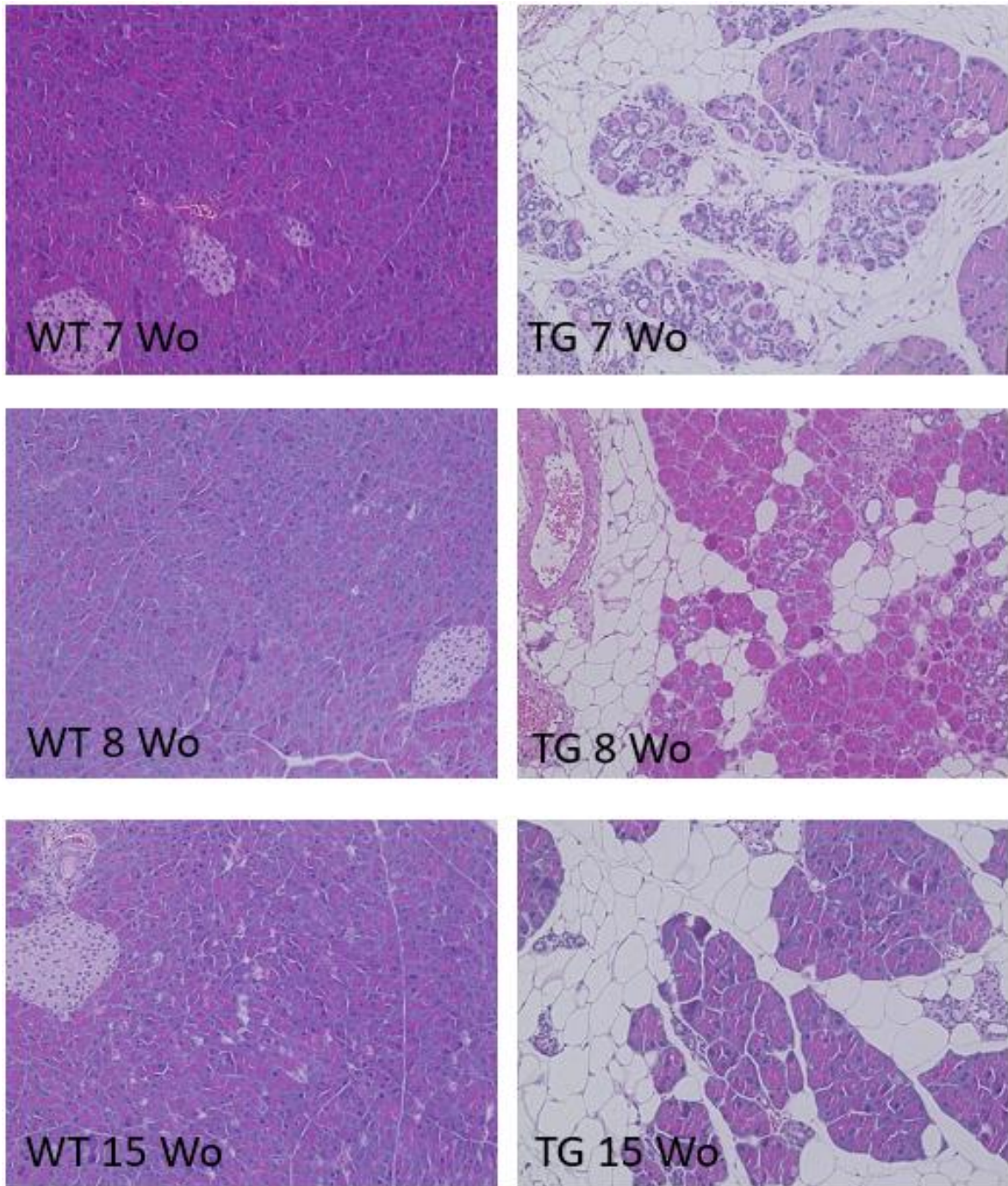


Abb. 4: histologische Aufnahmen zur Gegenüberstellung der HE-Färbung, Wildtypen (WT) links und transgene Tiere (TG) rechts, sortiert nach Alter in Wochen (Wo), Altersstufen sieben bis 15 Wochen.

Die zwei Wochen alten Organe ähnelten sich strukturell stark (Neuburg 2021). Sowohl die Wildtyp als auch die transgenen zwei Wochen alten Tiere wiesen eine lockere Läppchenstruktur mit regelrecht angelegten und gut abgrenzbaren Langerhans-Inseln auf. Ebenfalls zeigten sich physiologische Ganganschnitte.

Bei vier Wochen traten im Gegensatz zu den Vorergebnissen von Neuburg die ersten Veränderungen zwischen Wildtyp und transgen auf (Neuburg 2021). Die Wildtypen wiesen nun eine dichte Läppchen- bzw. Azinistruktur auf, während im transgenen Modell (4 Wochen) die Azini in unterschiedlicher Größe erschienen. Zudem waren bei den transgenen Pankreata (4 Wochen) bindegewebig anmutende Strukturen erkennbar und es zeigte sich das Erscheinen von fettgewebsartigen Zellen innerhalb der Pankreasläppchen.

Die Morphologie der Wildtypen von sieben bis 15 Wochen war strukturell nicht unterscheidbar. Hingegen ließ sich im transgenen Modell mit dem Älterwerden eine stetige Vermehrung verschiedener Zellreihen erkennen (Neuburg 2021). Bei den transgenen Tieren von 6 bis 8 Wochen fiel zunehmend das interlobuläre, am ehesten als Fettgewebe zu bezeichnende, Gewebe auf und es waren vermehrt bindegewebig anmutende Zellen zu erkennen (Neuburg 2021). Als zusätzliche Erkenntnis im Vergleich zur Vorarbeit von Neuburg zeigten sich bei den älteren 15 Wochen alten transgenen Tieren deutlich weniger bindegewebige Strukturen als bei 6 bis 8 Wochen. Der bindegewebsartige Anteil erreichte somit im Alter von 6 bis 8 Wochen sein Maximum. Des Weiteren fand sich weiterhin bei 15 Wochen (transgen) ein großer Anteil an Fettgewebe.

4.2 Gewebestrukturanalyse

Zur genaueren Identifikation der Art der Gewebeveränderung beziehungsweise zum Nachweis der Zellarten wurden spezifische Färbungen als Indikator herangezogen.

4.2.1 Insulin

Zum Nachweis des pankreasspezifischen Zelltyps der insulinproduzierenden β -Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln wurden immunhistochemische Färbungen zur Detektion von Insulin mit einem Anti-Insulin Antikörper durchgeführt (siehe Abb. 5 und 6) (Witt 2013). Hierbei zeigte sich bei beiden Mauslinien eine Reaktivität im Bereich der Langerhans-Inseln. Ausgespart blieben dabei jeweils die äußeren Areale, welche normalerweise von den Glucagon-produzierenden Zellen eingenommen werden (Merino et al. 2015). Zusätzlich wurde beobachtet, dass es bei den transgenen Tieren zu Aussparungen der Anfärbbarkeit in den Innenbereichen der Inseln kam.

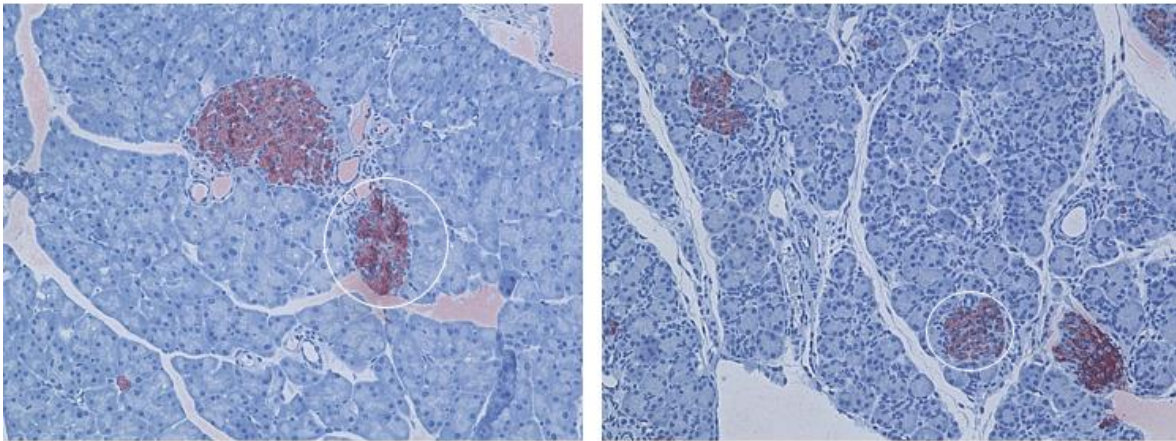


Abb. 5: Links Wildtyp 4 Wochen, rechts transgen 4 Wochen, weiße Kreise: exemplarische Markierung von Langerhans-Inseln.

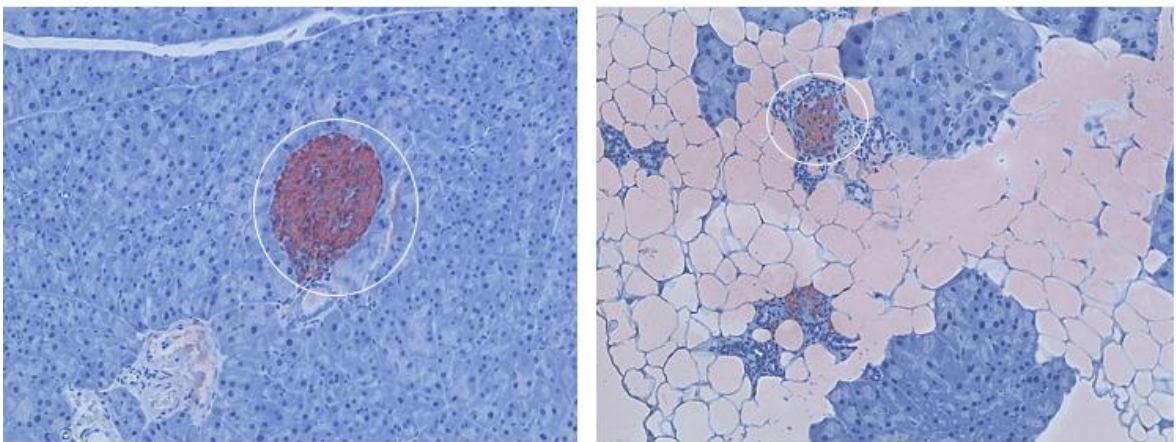


Abb. 6: Links Wildtyp 15 Wochen, rechts transgen 15 Wochen, weiße Kreise: exemplarische Markierung von Langerhans-Inseln.

4.2.2 Lipase

Zum Nachweis und Vergleich des exokrinen Azinuszellgewebes wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Anti-Lipase Antikörper durchgeführt. Es sind exemplarisch Schnitte von 4 und 15 Wochen alten Tieren aufgezeigt (siehe Abb. 7 und 8). Optisch imponierte die Färbung der transgenen Tiere in beiden Altersstufen dunkler. In beiden Modellen wirkte die Anordnung der positiven Areale granuliert und die Lokalisation stimmte mit dem histologisch als exokrin eingeordnetem Gewebe überein. Die Langerhans-Inseln beider Modelle sowie die fett- und bindegewebsartigen Zellen exprimierten regelhaft keine Lipase.

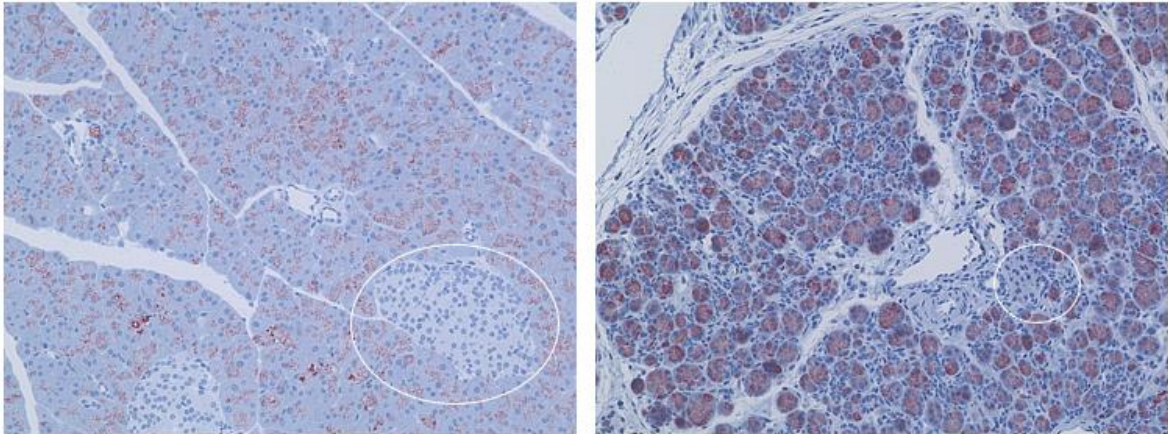


Abb. 7: Immunhistochemie (IHC) mit einem Anti-Lipase Antikörper; jeweils 4 Wochen alte Tiere, links Wildtyp, rechts transgenes Modell, weiße Kreise: exemplarische Markierung von Langerhans-Inseln.

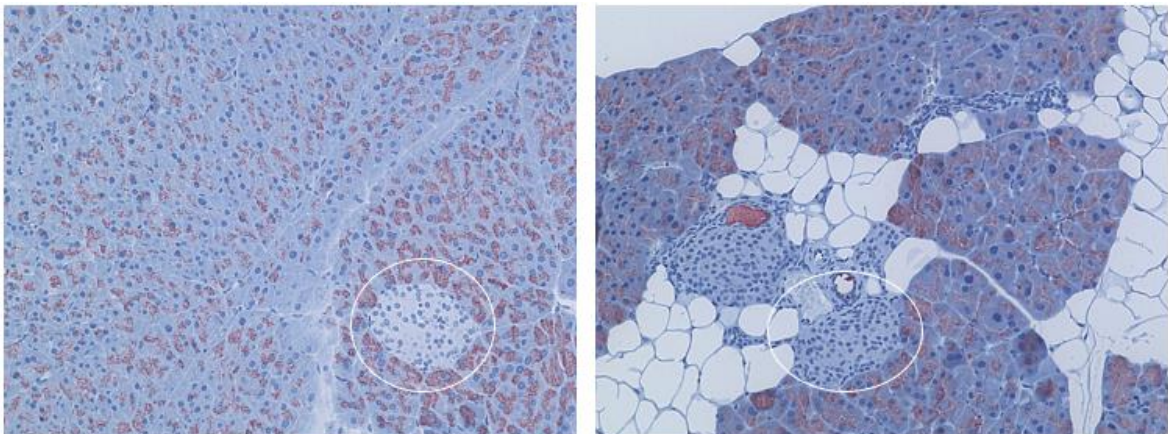


Abb. 8: Immunhistochemie (IHC) mit einem Anti-Lipase Antikörper; jeweils 15 Wochen alte Tiere, links Wildtyp, rechts transgenes Modell, weiße Kreise: exemplarische Markierung von Langerhans-Inseln.

Ergänzend zur Immunhistochemie wurde ein Western Blot mit einem Anti-Lipase-Antikörper durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Quantität der Expression von Lipase aufzuzeigen. Bei gleicher Proteinmenge zeigten sich keine Unterschiede der Bandenbreite zwischen Wildtyp und transgenem Modell. Zu sehen sind die Proben aus Tieren mit 4, 12 und 24 Wochen, jeweils im Vergleich Wildtyp zu transgen nebeneinander.

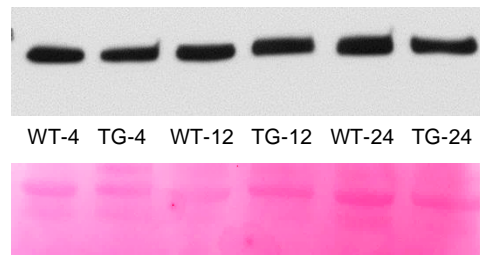


Abb. 9: oben: Western Blot mit einem Anti-Lipase-Antikörper; Wildtyp (WT) und transgen (TG) jeweils nebeneinander und nummeriert nach Alter von 4, 12 und 24 Wochen, Banden bei ca. 70 kDa, unten: Fotografie einer entsprechenden Ladekontrolle einer Ponceau-Färbung.

4.2.3 Perilipin

Es wurden immunhistochemische Färbungen mittels Anti-Perilipin-Antikörper vorgenommen. Diese dienten dazu, das Fettgewebe als solches nachzuweisen. Greenberg et al. identifizierten das 62 Kilodalton schwere Protein als spezifisch für Adipozyten, weshalb es in dieser Arbeit als Adipozytenmarker eingesetzt wurde (Greenberg et al. 1991). Die Färbungen wurden in den Altersstufen mit den größten als Fettzellen anmutenden Anteilen, also in den Altersstufen 8 und 15 Wochen, durchgeführt.

Im transgenen Modell wurde eine deutliche netzartige Positivität des Interlobulärraumes für Perilipin erkennbar. Die Aussparung der Färbung war passend zu den Adipozyten-typischen Lipidvakuolen. Daher wurde diese Gewebeformation im Folgenden als Adipozyten betrachtet. Der identifizierte Zelltypus änderte sich in den verschiedenen Altersstufen nicht.

Eine Positivkontrolle für Perilipin im Wildtyp-Gewebe ergab sich aus einem randständigen Anschnitt von peripankreatischem Fettgewebe eines untersuchten Wildtyp-Organ. Im Interlobulärraum konnte bei den wildtypischen Mäusen kein Fettgewebe auffindig gemacht werden.

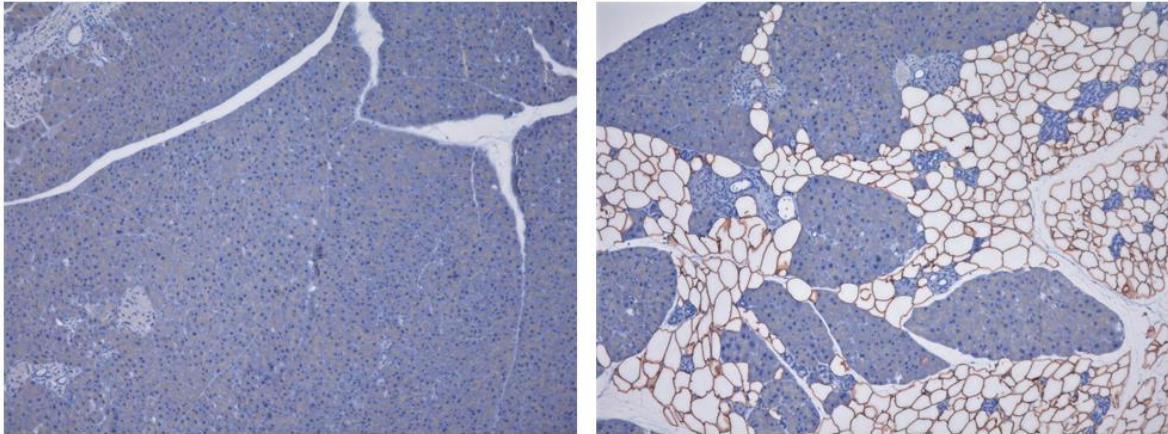


Abb. 10: Perilipin Immunhistochemie (rot gefärbt) 15 Wochen alter Tiere, links Wildtyp, rechts transgen.

4.2.4 Pikro-Siriusrot-Färbung

In der histologischen Übersichtsfärbung fanden sich bindegewebig anmutende Veränderungen (Neuburg 2021). Hier sollte geprüft werden, ob es sich um Kollagenfasern zwischen den Läppchen handelt, weshalb die Pikro-Siriusrot-Färbung bei 15 Wochen alten Tieren angewandt wurde (Junqueira et al. 1979).

Im Wildtyp zeigte sich eine geringe Anfärbung des Kollagens. In den Zwischenräumen der Läppchen sowie um die angeschnittenen Gänge und Blutgefäße wurde eine leichte Positivität für Kollagen festgestellt. Vergleichend dazu war das ähnliche Grundmuster ebenfalls bei den transgenen Tieren zu erkennen. Zusätzlich kam es bei den transgenen Tieren zu einer verstärkten Kollagendetektion im interlobulären Bereich aber auch zu einer Kollagenummauerung einzelner Azini und Langerhans-Inseln. Somit war insgesamt bei den transgenen Tieren ein verstärkter kollagenöser, bindegewebiger Organaufbau zu erkennen (Junqueira et al. 1979).

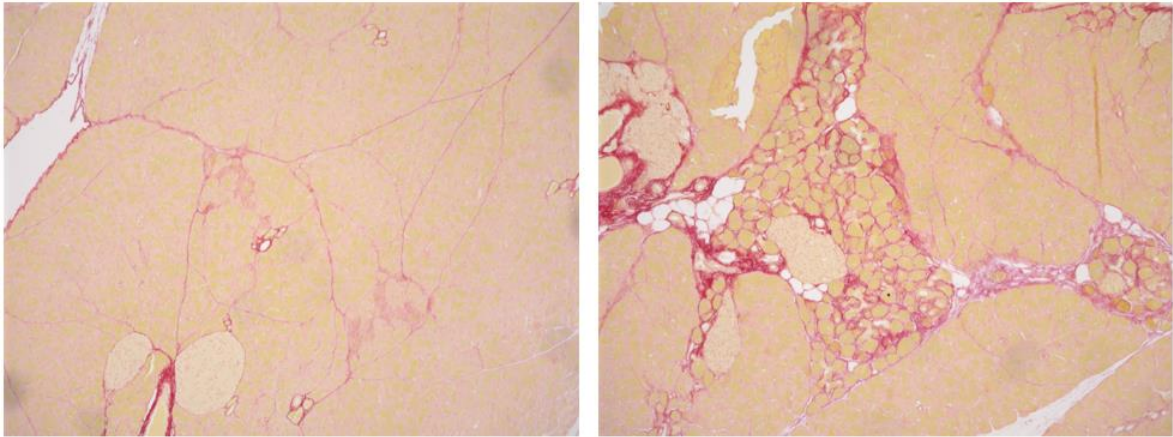


Abb. 11: Picro-Siriusrot-Färbung von Pankreas-Gewebeschnitten 15 Wochen alte Tiere, links Wildtyp, rechts Transgen, Kollagenfasern rot gefärbt.

4.2.5 Masson-Goldner

Eine weitere Methode um kollagenes Gewebe erkennbar zu machen, ist die Masson-Goldner Färbung (Chang und Kessler 2008). Diese Färbung wurde an Proben von 2, 4, 6, 7, 8 und 15 Wochen alten Wildtyp und transgenen Tieren durchgeführt.

Auch bei diesem Versuch ergaben sich beim Wildtyp nur leichte Kollagenzeichnungen (grünlich), im Interlobulärbereich aber deutliche Kollagenanreicherung im Bereich der Gefäße oder Gänge. Dieser Befund war bei allen Altersstufen im Wildtyp zu finden.

Im Altersverlauf der transgenen Tiere fand man hingegen eine zunehmende kollagenhaltige bindegewebige Vermehrung sowie Vermehrung des Fettgewebes von 2 bis 8 Wochen. Wie bei der Picro-Siriusrot-Färbung waren einzelne Azini von Kollagengewebe umgeben. Bei 15 Wochen erkannte man, wie auch schon in der HE-Färbereihe beobachtet, eine Verminderung der Kollagenanteile im Vergleich zu 7 Wochen.

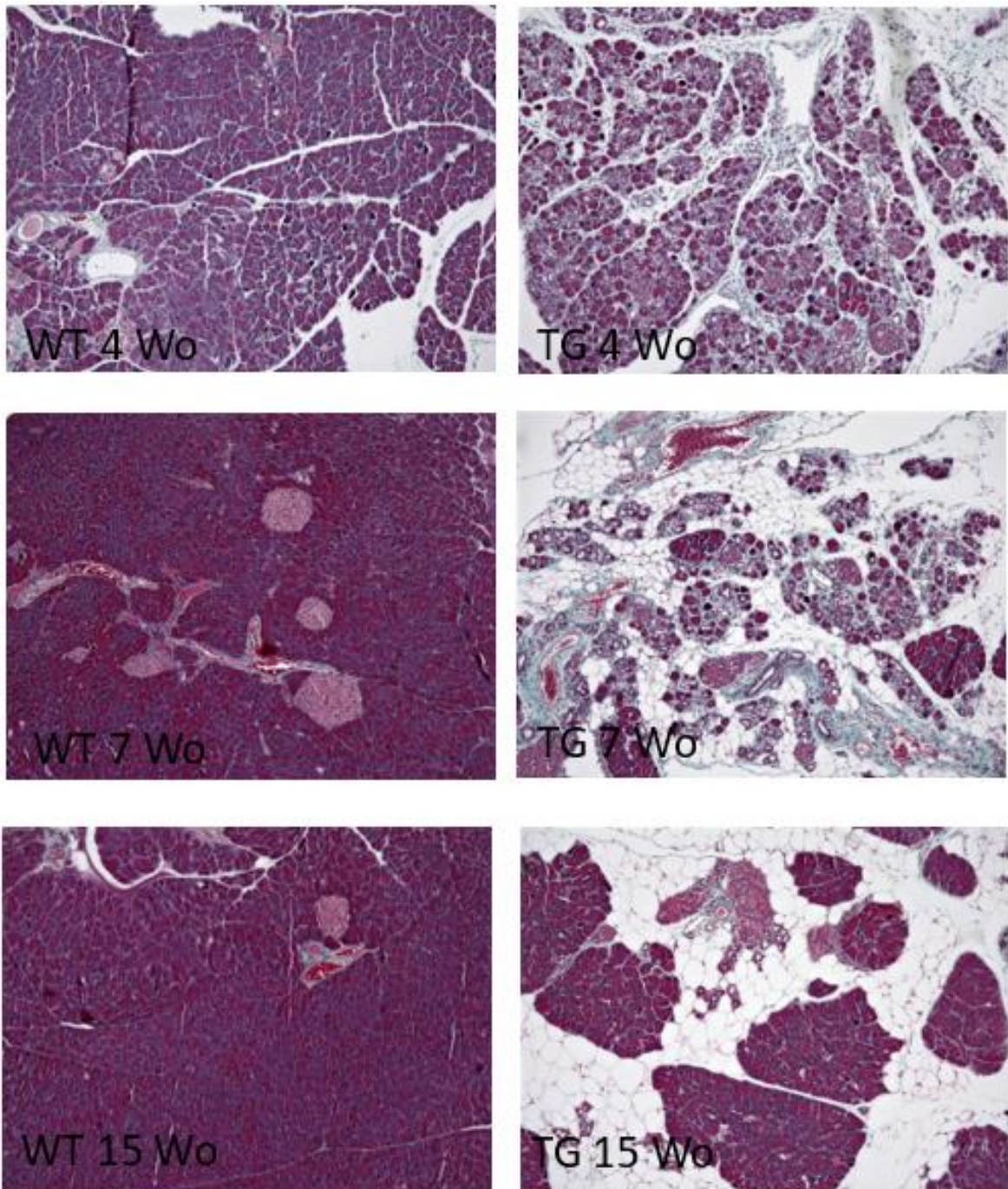


Abb. 12: Masson-Goldner Färbung links Wiltypen (WT) und rechts transgene Tiere (TG) von oben nach unten im Alter von 4,7,15 Wochen (Wo), Kollagenfasern (grün gefärbt).

4.3 Gewebereaktion

Aufgrund der Verschiebung der Gewebeanteile zu einem erhöhten Fettgewebs- und Bindegewebsanteil des Pankreas im transgenen Modell wurden mögliche Entzündungsreaktionen untersucht. Piao et al. nutzten zur Identifikation einer

Inflamationsreaktion des Pankreas Kriterien wie die Vergrößerung von Interlobulärsepten (Ödem), Azinuszellnekrose, Hämorrhagie und Entzündungszellinfiltrat (Piao et al. 2017).

Entsprechend dieser Kriterien beobachteten wir eine vermehrte bindegewebige Reaktion sowie Erweiterung des Interlobulärspaces innerhalb der transgenen Gruppe ab Woche vier.

Eine eindeutige histologische Nekrosereaktion konnte weder unter den Wildtypen noch in den transgenen Tieren festgestellt werden.

In keiner der Altersstufen der Modelle konnten Hämorrhagien festgestellt werden.

In beiden Mauslinien wurden mikroskopisch keine leukozytären Infiltrate aufgefunden. Die histologischen Befunde erfüllten daher nur eines von vier Kriterien einer Pankreatitisreaktion (Piao et al. 2017).

4.4 Organmorphologie unter Betrachtung von Malignitätskriterien:

Wie bereits beschrieben, exprimieren verschiedene Pankreasadenokarzinomzelllinien erhöhte Mengen an GaINT2-mRNA (Sutherlin et al. 1997). Gängige Kriterien zur Untersuchung von Pankreasgewebe auf Malignität sind Variabilität der Zellkerngrößen, Pankreasgangabbrüche und Gangdisorganisation (Hyland, Kheir, and Kashlan 1981). Über die gesamten Altersstufen der transgenen Tiere zeigten sich regelrechte Zellkern- und Gangformationen des Gewebes. Des Weiteren wurden in keinem der untersuchten Materialien Zellinvasion in Nerven- oder Gefäßstrukturen registriert.

Es konnte nach genannten Kriterien kein malignitätsverdächtiges Gewebe festgestellt werden (Hyland et al. 1981).

4.5. Proteinexpression im Gewebe

4.5.1 GaINT2

Wie anhand der Abbildung des Western Blots mit einem Anti-GaINT2-Antikörper zu erkennen war, zeigte sich bei den Versuchstieren für das Enzym GaINT2 sowohl im Wildtyp als auch im transgenen Typ eine Positivität. Die Bande ist hierbei im Wildtyp deutlich schwächer ausgeprägt, was durch die genetische Modifikation der Überexpression von GaINT2 im transgenen Modell zu erwarten war. In der Arbeit

von Neuburg fand sich keine Positivität der Wildtyp-Linie (Neuburg 2021). Gendatenbanken zeigen, dass GalNT2 physiologischerweise im Pankreas exprimiert sein sollte (National Library of Medicine - National Institutes of Health, 2023).

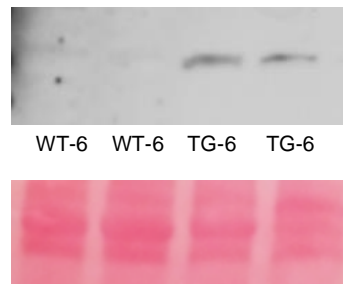


Abb. 13: oben: Western Blot mit einem Anti-GalNT2-Antikörper jeweils zweimal Wildtyp (WT) und transgen (TG) von links nach rechts nebeneinander der Altersgruppe 6 Wochen, Banden bei ca. 60 kDa, sowie unten: entsprechende Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

Die Anreicherung des Enzyms GalNT2 wurde in der Arbeit von Neuburg mittels Chromogenfärbung detektiert (Neuburg 2021). Hierbei wurde sowohl im exokrinen als auch im endokrinen Gewebe eine Positivität für GalNT2 festgestellt, wobei im Wildtyp kein Nachweis des Enzyms erfolgte (Neuburg 2021). In unserer Arbeit erfolgte die Detektion mittels Immunfluoreszenz. Im Bereich des transgenen Gewebes wurde die Lokalisation von GalNT2 stark in den Langerhans-Inseln und schwach im exokrinen Gewebe dargestellt. In den Wildtypen hingegen waren die Langerhans-Inseln negativ für GalNT2. Exemplarisch sind Bilder von 6 Wochen alten Tieren gezeigt. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen von Neuburg waren somit mit einer alternativen Methode reproduzierbar. Neu hierbei war die Untersuchung der älteren Gruppe der 15 Wochen alten Tiere. Im transgenen Modell zeigte sich ebenso eine Positivität der Langerhans-Inseln. Im Vergleich zu 6 Wochen alten transgenen Tieren zeigte sich bei 15 Wochen im Bereich der exokrinen Zellen kaum mehr eine Positivität für GalNT2.

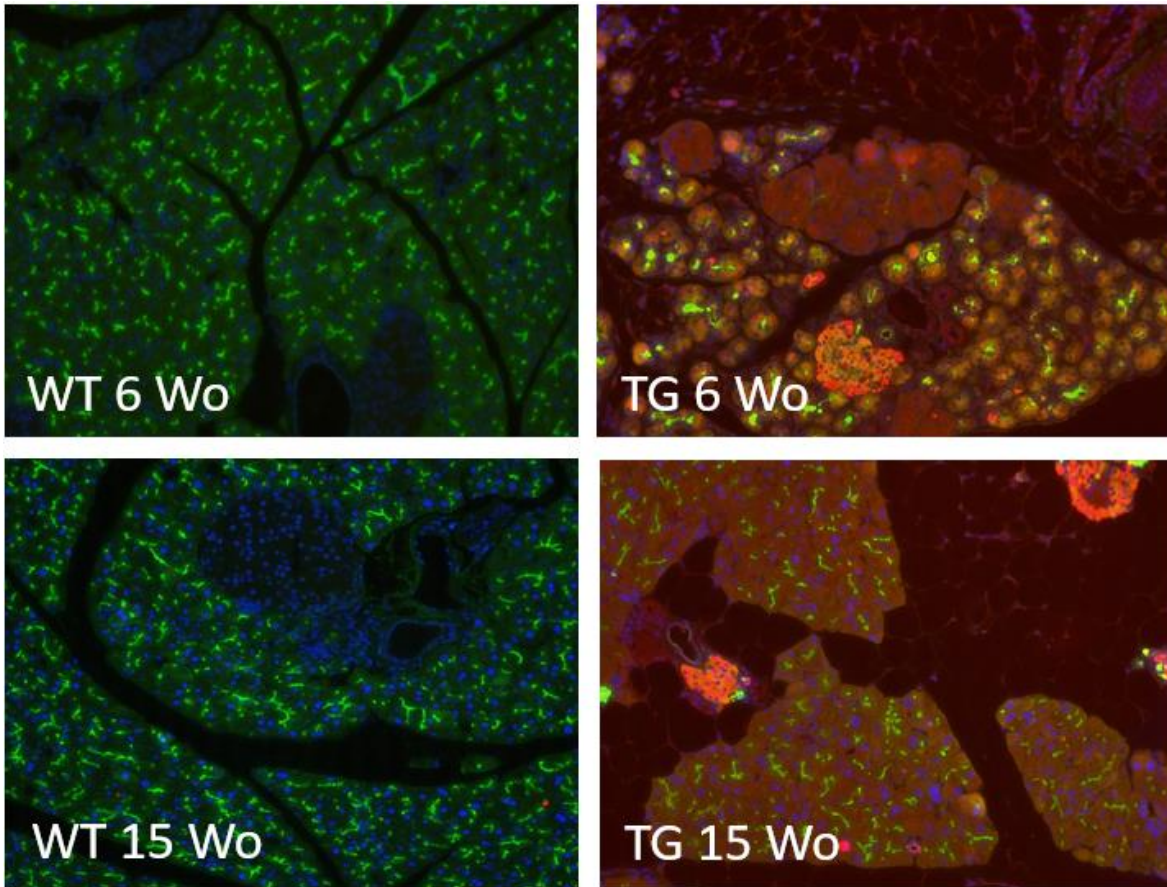


Abb.14: links jeweils Wildtyp, rechts transgen im Alter von 6 und 15 Wochen von oben nach unten, Zellkerne (DAPI - blau), GaINT2 (rot), T-Antigen bindendes PNA (grün).

4.5.2 Prox-1 Protein

Das Prox-1 Protein ist an der pankreatischen Organentwicklung beteiligt (Westmoreland et al. 2012). Das Prox-1 Gen kodiert für ein 83 Kilodalton (kDa) großes Protein, welches höchstwahrscheinlich einem alternativen Splicing unterliegt (Zinovieva et al. 1996). Bei einem Mangel an Prox-1 konnte in Versuchen gezeigt werden, dass es zu einer Abnahme des Azinuszellgewebes bei gleichzeitiger Zunahme des Fettgewebes des Organs kommt (Westmoreland et al. 2012). Außerdem scheint es tumorsupprimierende Eigenschaften zu besitzen (Drosos et al. 2016).

Aufgrund der ähnlichen morphologischen Auffälligkeiten von unserem Modell im Vergleich zu Prox-1 defizienten Pankreata untersuchten wir die Auswirkungen der GaINT2 Überexpression auf die Prox-1 Expression.

Wie in der Literatur beschrieben, fanden wir Prox-1 überwiegend in den großen und kleinen Gängen sowie zu geringem Anteil in den Randbereichen Langerhans-Inseln der Pankreata beider Mauslinien (Wang et al. 2005). Es zeigte sich insgesamt kein deutlicher Unterschied in dem Verteilungsmuster von Prox-1 im Vergleich Wildtyp zu transgen. Im zwei Wochen alten transgenen Modell gab es jedoch eine leichte Tendenz von vermehrter Prox-1 Expression der Ganganschnitte.

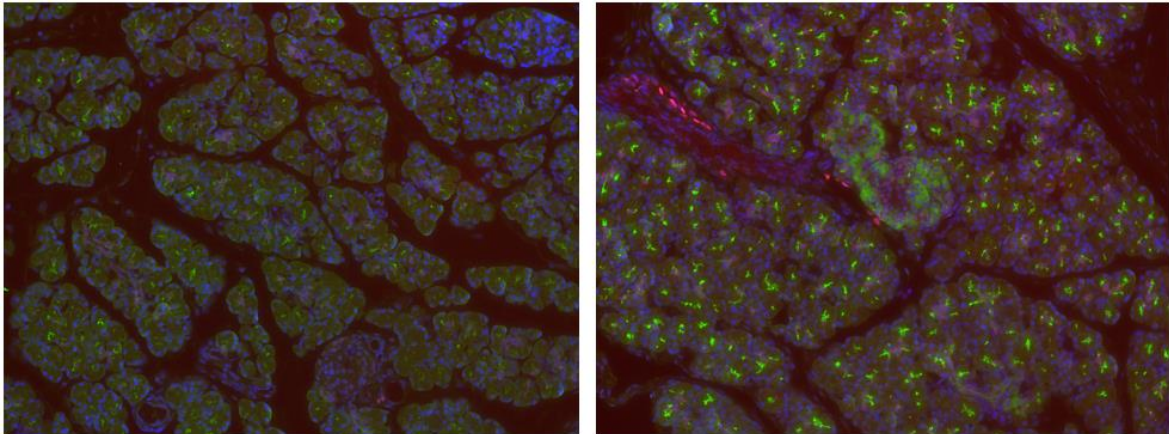


Abb. 15: Prox-1 Immunfluoreszenz der Altersgruppe 2 Wochen, Zellkerne (blau), Prox-1 (rot), T-Antigen (grün), links WT - rechts TG.

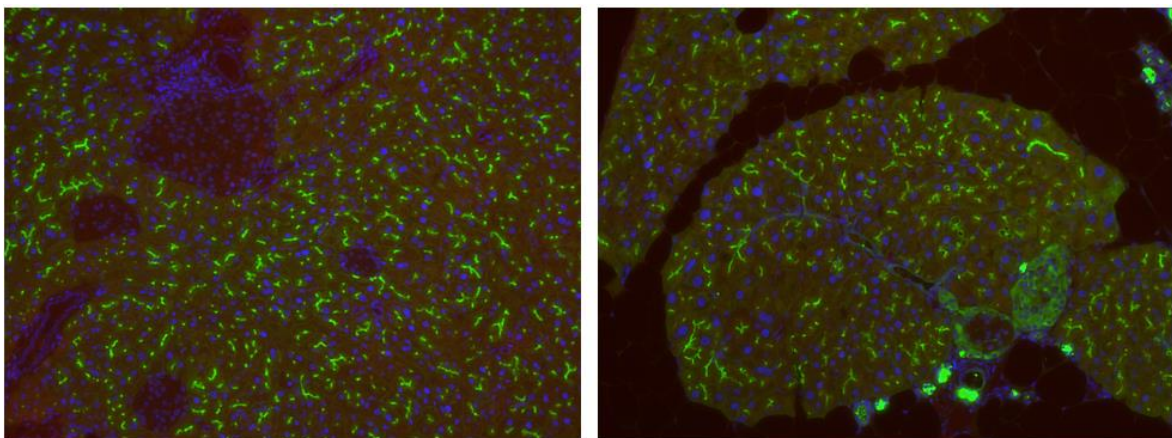


Abb. 16: Prox-1 Immunfluoreszenz der Altersgruppe 15 Wochen, Zellkerne (blau), Prox-1 (rot), T-Antigen (grün), links WT - rechts TG.

Zudem wurde die Proteinexpression von Prox-1 mittels Western Blot untersucht. Prox-1 Banden wurden in allen Wildtypen der Altersstufen vier, 12, und 24 Wochen auf erwarteter Höhe beobachtet. Im transgenen Modell wurden zwei niedrigere Banden bei 4 Wochen und ein Fehlen von Banden bei 12 und 24 Wochen festgestellt.

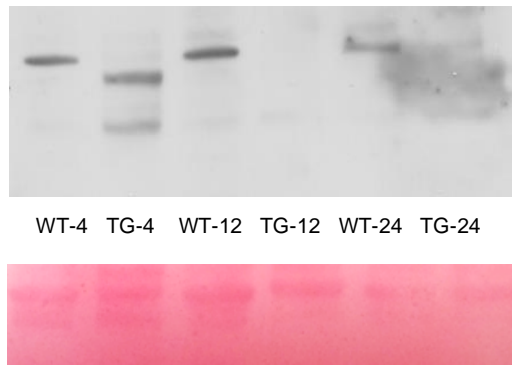


Abb. 17: oben: Prox-1 Western Blot jeweils Wildtyp (WT) und transgen (TG) in 4, 12, und 24 Wochen alten Tieren nebeneinander im Vergleich, hohe Banden bei ca. 90 kDa, die zwei niedrigeren Banden im transgenen Modell 4 Wochen alter Tiere bei ca. 75 und 60 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

Prox-1 wird laut Hersteller der verwendeten Antikörper bei 83 kDa erwartet, dabei wurden durch externe Forschungsgruppen weitere zusätzliche Banden beobachtet (Abcam plc., 2023a). Passend hierzu fanden wir im Prox-1-Immunopräzipitat auf verschiedenen Höhen Banden in beiden Mauslinien. Es zeigten sich bei der 90 kDa Bande erniedrigte Werte für Prox-1 im transgenen Modell (4 Wochen) und bei ca 75 sowie 60 kDa eine vermehrte Detektion im transgenen Modell (4 Wochen).

In den unbehandelten Lysaten erschien in beiden Linien zur kurzen Belichtungszeit keine Bande. Bei längerer Belichtung wurde in den Nativpräparaten die hohe Bande sichtbar.

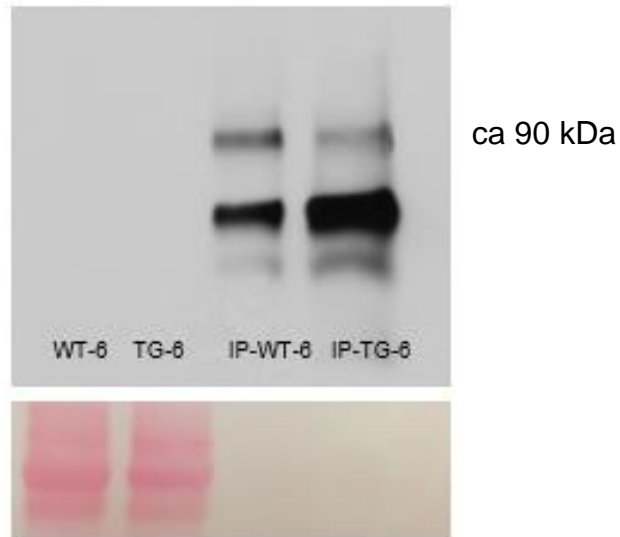


Abb. 18: oben: Prox 1 Western Blot aus zwei Proben links nativ WT- und TG-Lysat und zwei Proben aus der Prox-1 Immunopräzipitation (IP) rechts WT und TG im Alter von 6 Wochen, Banden der Immunopräzipitation auf den Höhen ca 90, 60 und 45 kDa, kurze Belichtung, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

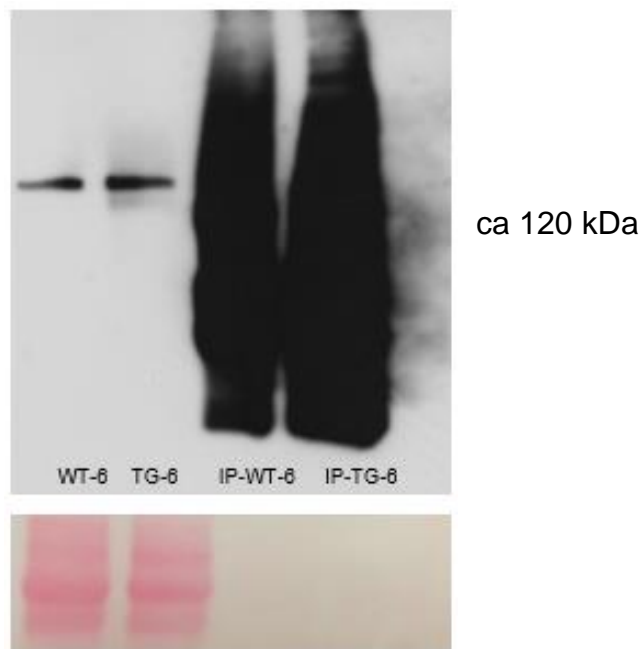


Abb. 19: oben: Prox 1 Western Blot aus zwei Proben links nativ WT- und TG-Lysat und zwei Proben aus der Prox-1 Immunopräzipitation (IP) rechts WT und TG im Alter von 6 Wochen, Banden der Wildtyp Lysate links bei ca. 120 kDa, lange Belichtung, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.6 Glycosilierungsprofil

4.6.1 Sambucus Nigra Lektin (SNA)

SNA ist ein Lektin, welches bevorzugt an Gal bzw GalNAc mit einer α 2,6-Bindung an Sialinsäure (STn Antigen) bindet und von Malagolini et al. als Marker für Apoptose und Nekrose identifiziert wurde (Malagolini et al. 2008, Chandrasekaran et al. 2016). Auch wurde gezeigt, dass im pankreatischen Normalgewebe zentroazinäre Zellen, endokrine Zellen, das Gangepithel und Bindegewebe reaktiv für SNA sind (Daten aus dem Meerschwein und Beagle-Hund) (Kameda et al. 1993; Ning et al. 2012). Vermehrte SNA Bindung konnte ebenfalls in einer Tumormlinie festgestellt werden und ging mit einer schlechten Prognose einher (dos-Santos et al. 2014). Daher wurde eine Lektin-Färbung der Altersstufen 2, 4, 6, 7, 8, 15 Wochen mit SNA durchgeführt, die zusätzlich zur Charakterisierung des Glykosylierungsphänotyps beitragen sollte.

Bei den Wildtypen wurden in den Altersstufen 4 bis 15 Wochen die gleiche Verteilung von SNA-Positivität, wie in der genannten Literatur beschrieben, gefunden. Gänge, Gefäße und Langerhans-Inseln stellten sich positiv dar, während das exokrine Pankreas negativ blieb. Die zentroazinären Zellen waren nicht eindeutig beurteilbar.

Die Langerhans-Inseln bei GalNT2 Überexpression erschienen schwächer positiv bis negativ für SNA. Das Fettgewebe stellte sich ebenfalls größtenteils negativ dar. Die Gänge und Gefäßumgebung stellten sich wie bei den Wildtypen rötlich dar. Wie schon in Masson-Goldner und Piko-Siriusrot-Färbungen wurde eine periazinäre und interlobuläre Anfärbung gesehen.

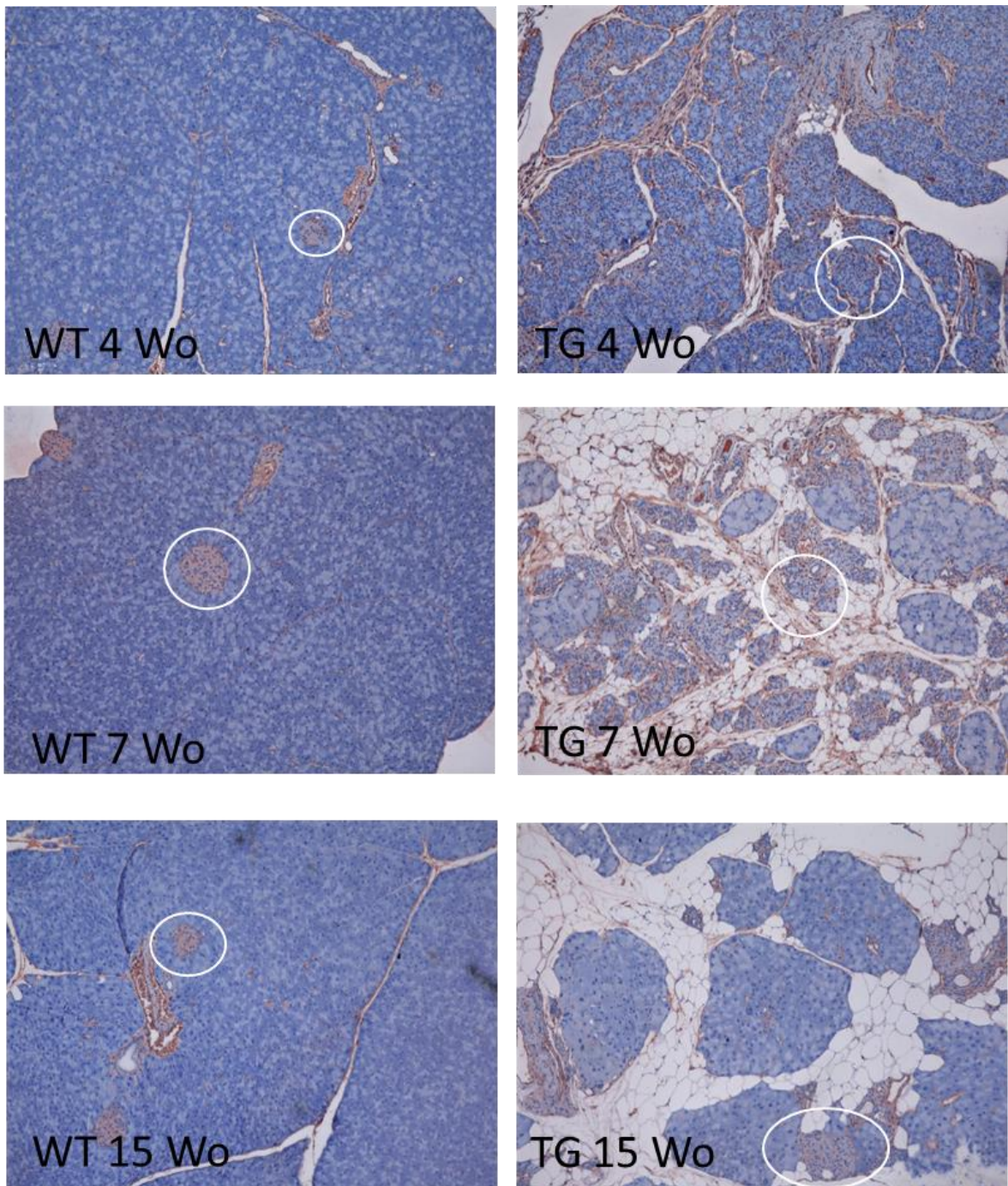


Abb. 20: Lektinhistochemie mit SNA (rot), jeweils WT links, TG rechts, von oben nach unten 4, 7, und 15 Wochen alte Tiere; weiße Kreise – Markierung Langerhans-Insel.

4.6.2 Peanut agglutinin (PNA)

PNA ist in der Lage an das T-Antigen und damit an O-Glykane zu binden (Lotan et al. 1975, Chacko und Appukuttan 2001).

Daher wurde die Verteilung von PNA mittels fluoreszierendem Lektin gleichzeitig mit der Verteilung von GalNT2 untersucht, um mögliche Rückschlüsse aus der Kolokalisation und damit die Auswirkung auf die O-Glykosylierung zu bilden. Wie in Abbildung 14 durch grüne Fluoreszenz zu erkennen ist, wurde eine granuläre Anheftung von PNA im Bereich des exokrinen Gewebes festgestellt; dies wurde bereits in der Arbeit von Neuburg gezeigt (Neuburg 2021). Es fiel die Positivität für PNA im Bereich der zentroaziniären Zellen auf, und wie bei Neuburg beschrieben, fand sich in den 6 Wochen alten transgenen Tieren eine leicht vermehrte Anreicherung von PNA in diesem Bereich (Neuburg 2021). Bei den älteren Tieren fand sich im Bereich des exokrinen Gewebes mit 15 Wochen kein Unterschied der PNA Anreicherung.

Hingegen war ein deutlicher Unterschied der Langerhans-Inseln aller Altersgruppen von 6 – 15 Wochen im Vergleich von Wildtyp und transgen zu erkennen, da es in den Langerhans-Inseln der transgenen Tiere zu einer grünen Fluoreszenz kam, welche im Wildtyp nicht sichtbar war. Somit ist im Bereich der Langerhans-Inseln der transgenen Tiere, bei zuvor beschriebener vermehrter Detektion von GalNT2 im direkten örtlichen Zusammenhang, ein vermehrtes Signal für PNA und damit der O-Glykanstruktur T-Antigen festgestellt worden. In der Kofärbung von GalNT2 und PNA lässt sich somit erstmals innerhalb eines Versuchsaufbaus die Lagebeziehung zwischen GalNT2 und O-Glykanen bzw. dem T-Antigen feststellen. Dies wurde durch die Arbeit von Neuburg bisher lediglich in separaten Versuchen beschrieben (Neuburg 2021).

Des Weiteren sollte der Nachweis O-glykosylierter Strukturen auf Proteinebene untersucht werden.

Wu et al. bedienten sich der Immunpräzipitation und anschließendem Immunoblotting mit dem *Vicia villosa* Lektin (VVA) zum Nachweis der Tn-Struktur des EGFR Rezeptors (Wu et al. 2011). Wir gingen hierbei ähnlich vor und führten eine Immunpräzipitation mittels Prox-1-Antikörper durch. Zum Nachweis eines möglichen T-Antigens wurde mit den Proben aus dem Immunpräzipitat ein Lektinblot mittels PNA durchgeführt. Es zeigte sich in beiden Proben eine Reaktivität im PNA Immunoblot. Die Probe mit GalNT2 Überexpression zeigte hierbei eine erhöhte Intensität im Vergleich zum Wildtyp. Die Banden wurden über der 250 kDa Marke beobachtet, anders als in den Prox-1 Kontrollen.

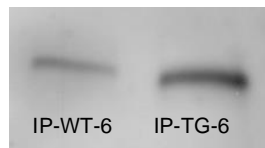


Abb. 21: Prox1-Immunopräzipitation (IP) im PNA Immunoblot der Altersstufe 6 Wochen, links Wildtyp, rechts transgen, Banden über 250 kDa.

Zudem wurde ein PNA-Pulldown vorgenommen und die Proben anschließend mittels PNA Immunoblot untersucht. Im Bereich der kleineren Proteine zeigte sich eine vermehrte Reaktivität für PNA unter den transgenen Tieren. Im Bereich der größeren Proteine scheint die Reaktivität der Wildtypen größer.

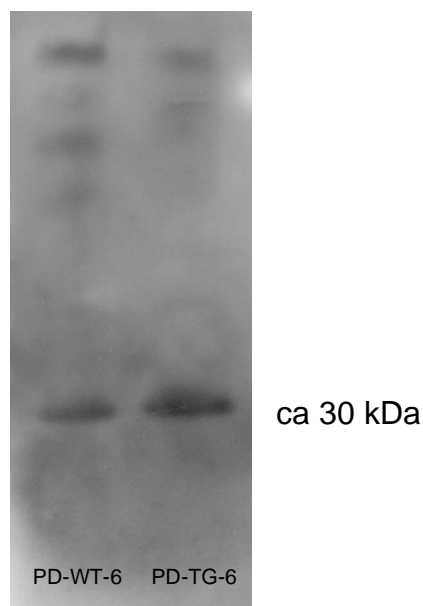


Abb. 22: PNA-Pulldown (PD) im PNA Immunoblot links Wildtyp rechts transgen der 6 Wochen alten Tiere, am prominentesten sichtbare Bande bei ca. 30 kDa.

4.6.3 Jacalin-Blot

Jacalin ist ein Lektin, welches in der Lage ist, an O-glykosylierte Proteine zu binden (Hortin 1990). Es diente somit zur weiteren Identifikation, inwieweit es sich bei Prox-1 um ein O-glykosyliertes Protein handeln könnte. Die Reaktivität für Jacalin aus Proben der Prox-1 Immunpräzipitation scheint bei der Bande über 200 kDa und der

Bande um 60 kDa geringgradig erhöht. Die Höhe der Banden korrelierte mit der Prox-1 Reaktivität der Prox-1 Immunopräzipitatproben.

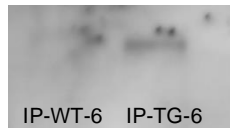


Abb. 23: Prox-1 Immunopräzipitation (IP) im Jacalin Immunoblot, links WT rechts TG der 6 Wochen alten Tiere, Banden > 250 kDa.

4.7 Shwachman-Bodian-Diamond Syndrom (SBDS)-Protein

In der Literatur zeigte sich ein Mausmodell mit einem Verlust des SBDS-Gens mit einem sehr ähnlichen Phänotyp zu unserem transgenen Modell (Tourlakis et al. 2012). Daher sollte die Expression des SBDS-Proteins bei GalNT2 Überexpression näher untersucht werden. Es fanden sich immunhistochemisch leichte Positivitäten der exokrinen Zellen beider Modelle, doch gab es insgesamt keinen Unterschied in der Intensität der Anfärbbarkeit in der Immunhistochemie mit einem Anti-SBDS-Protein-Antikörper.

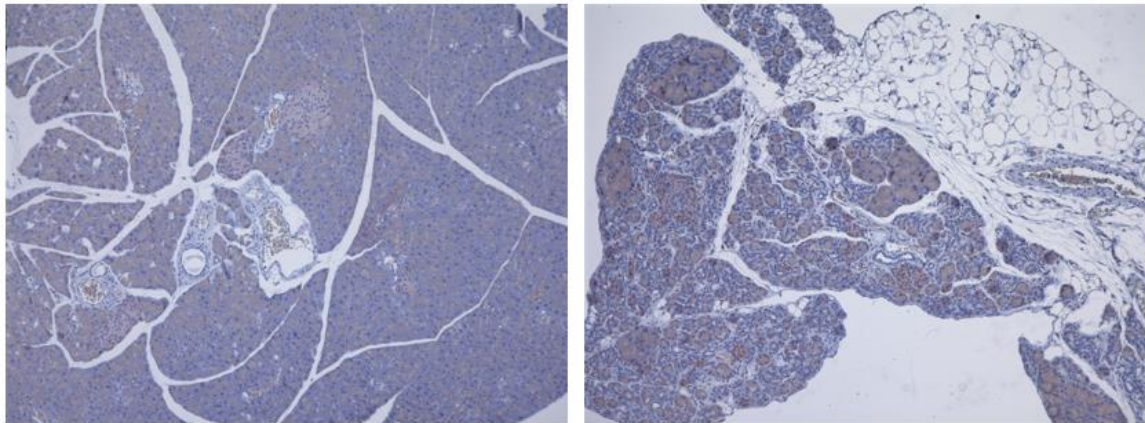


Abb. 24: Immunhistochemie mittels Anti-SBDS-Protein-Antikörper (rot), 6 Wochen alte Tiere, WT links, TG rechts.

4.8 Proteinstoffwechsel

4.8.1 Proteinprozeption

Zur Untersuchung der Homöostase der Proteinfaltung und -degradation wurden Untersuchungen mittels Western Blot-Technik durchgeführt. Es wurde zum Großteil auf Proben 6 Wochen alter Tiere zurückgegriffen, da dies der Zeitpunkt war, zudem ein deutlicher bindegewebiger Umbau zu sehen war, während man bei den älteren Tieren ein homogeneres Zellbild fand. Somit sollten die Vorgänge, zu dem vermeintlich intensivsten Zeitpunkt der Umbauprozesse, noch besser analysiert werden.

Als Indikator für die Integrität der Proteinproduktion und -faltung wurden Antikörper ausgewählt, welche das System des endoplasmatischen Retikulums und seiner mitwirkenden Komplexe, wie beispielsweise Chaperone, repräsentieren (Lin et al. 2008).

4.8.2 Ubiquitin

Bei der Proteindegradation spielt die Ubiquitylierung eine entscheidende Rolle und hat so Einfluss auf Zellzyklus, Zellwachstum, Zellkommunikation und möglicherweise Apoptose (Hershko und Ciechanover 1998). Fehlgefaltete Proteine untergehen einer Ubiquitylierung, woraufhin sie im Proteasom abgebaut werden (Adams et al. 2019).

In unserem Modell zeigten sich im Western Blot unter den transgenen Tieren eine verstärkte Detektion von ubiquitylierten Proteinen.

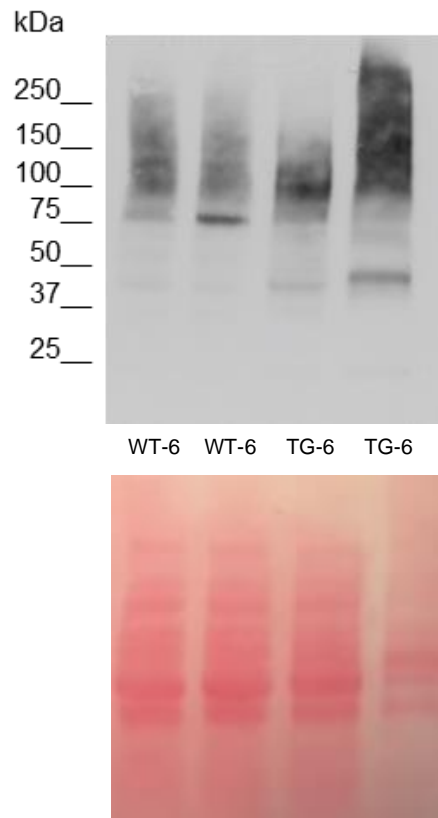


Abb. 25: oben: Ubiquitin Western Blot der Altersgruppe 6, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Beschriftung links Proteingrößen in kDa, sowie unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.3 SUMO-1

Small Ubiquitin Like Modifier 1 (SUMO-1) wird als verwandtes Protein von Ubiquitin angesehen, welches vermutlich in Proteintransportvorgänge involviert ist (Mahajan et al. 1997). In unserem Modell stellten wir ein insgesamt vermindertes Signal im Western Blot für SUMO-1 innerhalb der Gruppe der 6 Wochen alten transgenen Tiere fest. Die Hauptbanden wurden bei ca. 140, 90, 40 und 25 kDa beobachtet. Besonders im Bereich der 140 und 90 kDa Banden zeigten sich verminderte Werte.

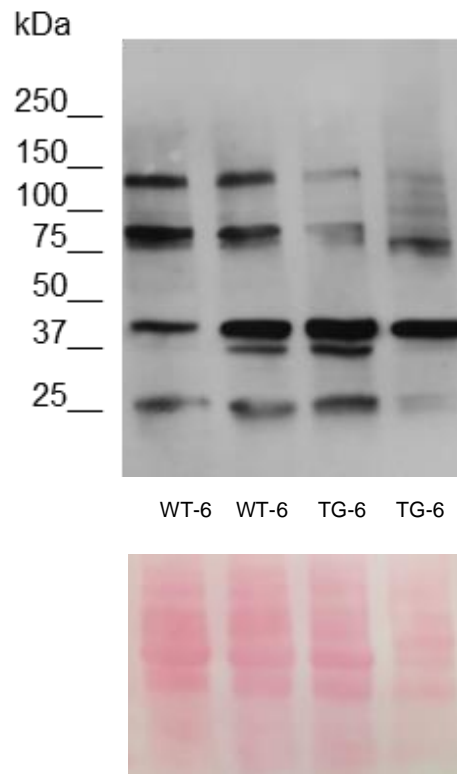


Abb. 25: oben: SUMO-1 Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Beschriftung links: Proteingrößen in kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.4 Hitzeschockprotein 70

Das Hitzeschockprotein (HSP) 70 spielt eine wichtige Rolle bei der lysosomalen Degradation (Chiang et al. 1989). Außerdem stünden erhöhte Werte an HSP70 in Verbindung mit Zellstress (Sanchez et al. 1993). Im Western Blot für HSP70 zeigten sich gleichbleibende bis leicht verminderte Mengen an HSP70 in den Proben der transgenen Tiere auf der Höhe von ca. 70 kDa.

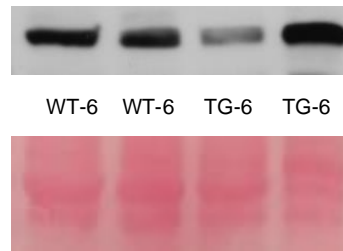


Abb. 26: oben: HSP70 Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden bei ca. 70 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.5 HSP 40

Das Hitzeschockprotein 40 arbeitet im Zusammenhang mit HSP70 als sogenanntes Cochaperon (Greene et al. 1998, Farinha et al. 2002). Außerdem wird HSP40 eine wichtige Rolle bei der Stressantwort auf Proteinaggregation zugeschrieben (Klaips et al. 2020). Es wurden erhöhte Werte der Hauptbande (bei ca. 40 kDa) von HSP40 in 6 Wochen alten transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Zudem zeigten sich sowohl im Wildtyp als auch im transgenen Modell weitere Banden im Bereich kleinerer Proteine, diese ebenfalls deutlicher im Typ transgen.

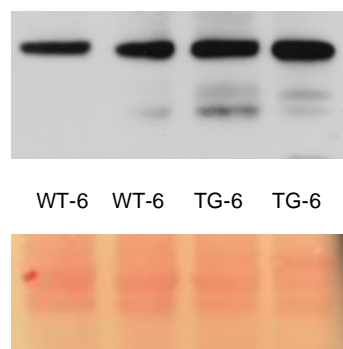


Abb. 27: oben: HSP40 Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.6 HSP 90

Das Hitzeschockprotein 90 ist ebenfalls an der Proteinfaltung beteiligt (Wiech et al. 1992). Erhöhte Level von HSP90 wurden zusammen mit einer erhöhten Apoptoserate beobachtet (Galea-Lauri et al. 1996). In unserem Modell wurden gleichwertige bis erniedrigte Werte an HSP90 festgestellt (Banden bei ca. 90 kDa detektiert).

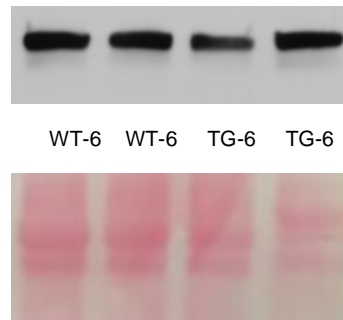


Abb. 28: oben: HSP90 Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden bei ca. 90 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

Aufgrund der beobachteten erhöhten Werte einiger Chaperone sollte der Stress auf das System des endoplasmatischen Retikulums weiter untersucht werden.

Weitere Akteure bei der zellulären Stressantwort der Proteinfaltung stellen hierbei die Proteine Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1 α) und das Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein (BIP) dar (Pincus et al. 2010).

4.8.7 Inositol Requiring Enzyme-1 (IRE 1 α)

Das Inositol Requiring Enzyme-1 (IRE1) ist eine transmembrane Kinase sowie Endoribonuklease und damit ein wichtiger Faktor der ungefalteten Proteinantwort (Sidrauski und Walter 1997; Yoshida et al. 2001).

In unseren Versuchen konnten verminderte Mengen an IRE 1 alpha festgestellt werden.

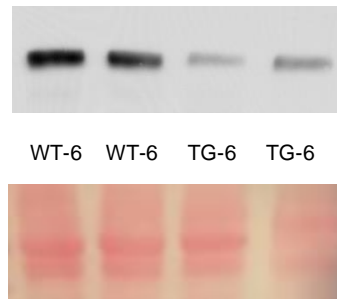


Abb. 29: oben: IRE 1 α Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden auf der Höhe von ca. 130 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.8 Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein (BiP)

Das Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein (BiP) gehört der Familie der HSP70 an und ist in der Lage durch Dissoziation von IRE1 dieses zu aktivieren (Okamura et al. 2000). Dieses Protein wurde im Vergleich zum Wildtyp zu niedrigeren Anteilen gefunden.

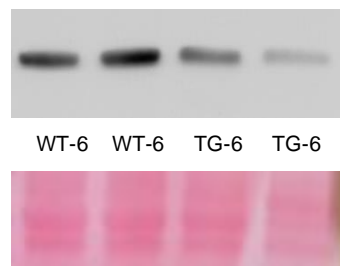


Abb. 30: oben: BiP Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden bei ca. 75 kDa beobachtet, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.9 Proteindisulfidisomerase (PDI)

Die Proteindisulfidisomerase (PDI) ist ein Enzym im endoplasmatischen Retikulum, welches durch Bildung von Disulfidbrücken die posttranslationale Modifikationen zur

Bildung von Tertiär- und Quartärstruktur unterstützt (Mazzarella et al. 1990; Zeeshan et al. 2016, Adams et al. 2019). In den Proben der transgenen Tiere wurden verminderte Mengen an PDI festgestellt.

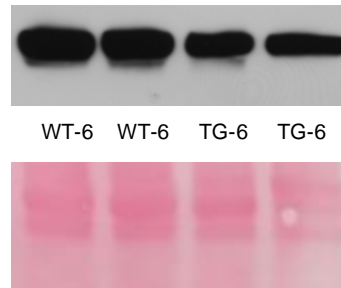


Abb. 31: oben: PDI Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden auf der Höhe von ca. 60 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.10 C/EBP Homologous Protein (CHOP)

C/EBP Homologous Protein (CHOP) ist ein bekanntes Protein, welches unter ER-Stress Apoptose induzieren kann (Hu et al. 2019). Außerdem ist es ein Inhibitor von CCAAT/enhancer-binding proteinen (C/EBP) (Ron und Habener 1992). In unseren Versuchen zeigte sich im Western Blot mit einem Mausantikörper gegen CHOP keine Bande auf der zu erwartenden Höhe, sondern zwei Banden bei 50 und 25 kDa, welche im transgenen Modell deutlich stärker waren. Zusätzlich erschienen in den transgenen Proben schwache Banden bei 60 kDa.

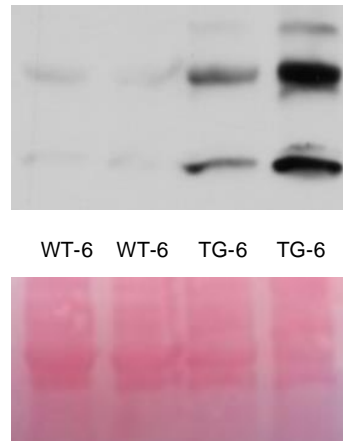


Abb. 32: oben: CHOP Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Bandengröße von oben nach unten bei 60, 50 und 25 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.8.11 Calnexin

Calnexin stellt ein lektinartiges Chaperon dar, welches in der Proteinfaltung für fehlmodifizierte Karbohydratgruppen zuständig ist (Chapman et al. 1998). Im Western Blot zeigte sich, dass es im transgenen Modell zu einem verminderten Vorkommen an Calnexin gekommen ist.

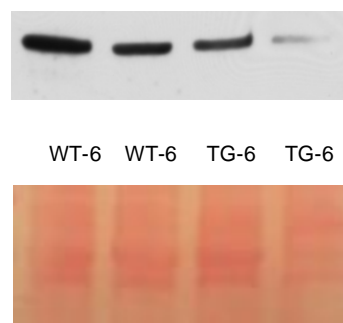


Abb. 33: Calnexin Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden auf der Höhe von ca. 90 kDa, unten: repräsentative Ladekontrolle mittels Ponceau Färbung des gleichen Untersuchungstages eines identisch beladenen Western Blots.

4.8.12 S6 ribosomales Protein

S6 ribosomales Protein (S6) ist an der Regulation von Zellgröße und Glukosestoffwechsel beteiligt (Ruvinsky et al. 2005). Es ist in pankreatischen Azinuszellen zu finden und wird über Insulin aktiviert (Sung und Williams 1989). Ruvinsky et al. konnten zeigen, dass bei fehlender Aktivität von S6 ribosomalem Protein im murinen Pankreas die Größe der Betazellen vermindert und die der Azinuszellen gleichbleibend ist (Ruvinsky et al. 2005). In unserem Modell zeigten die transgenen Tiere, wie in der Literatur beschrieben, eine gleichbleibende Größe der Azinuszellen im Vergleich zum Wildtyp bei erhöhter Intensität der Färbung im Bereich der Azinuszellen bei 8 Wochen. Die Langerhans-Inseln färbten sich in beiden Mauslinien schwach positiv.

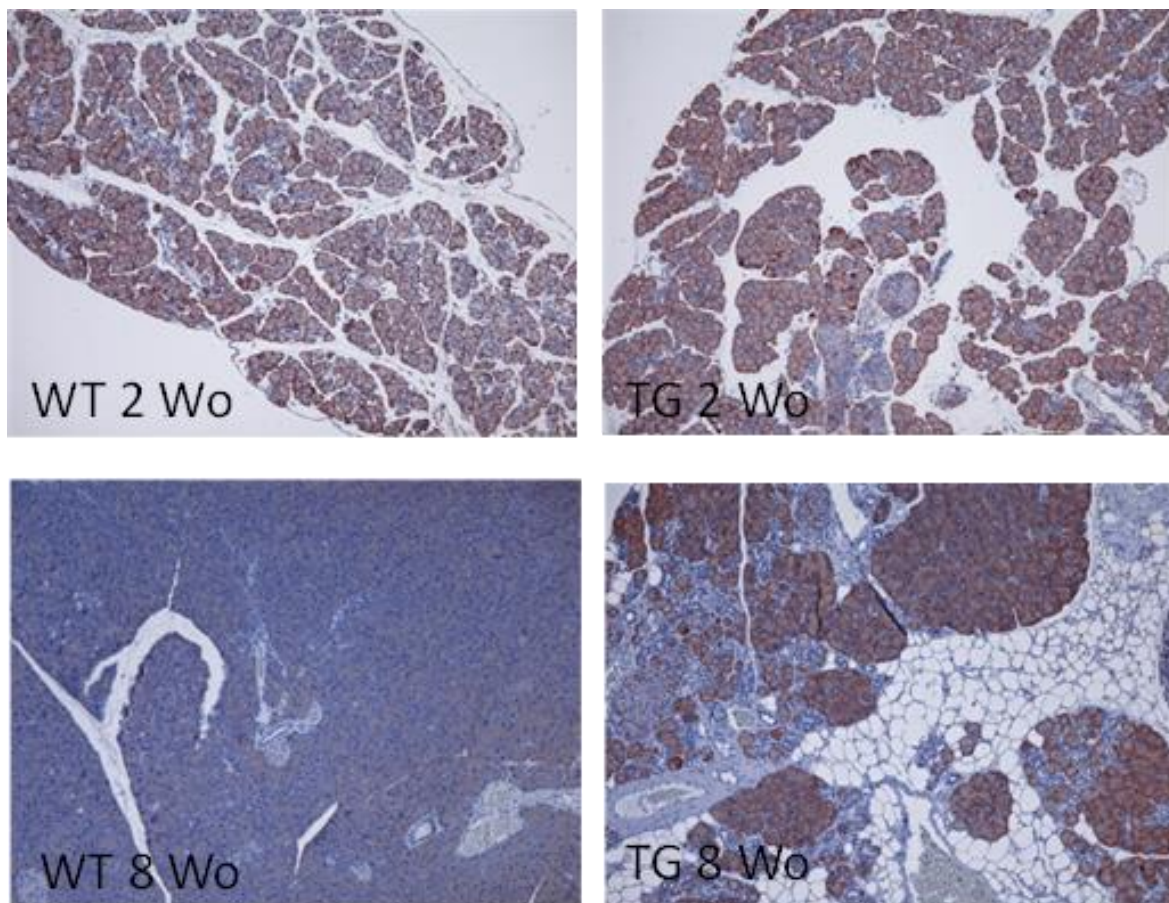


Abb. 34: Immunhistochemie mittels Anti-S6 ribosomalem Protein-Antikörper, positive Bereiche rot gefärbt, links WT, rechts TG, oben Altersstufe 2 Wochen, unten 8 Wochen.

Im Western Blot fanden sich in der Altersgruppe 4 und 12 Wochen der transgenen Tiere verminderte Werte des S6 ribosomalen Proteins, bei den älteren Tieren zeigte sich hingegen eine Vermehrung.

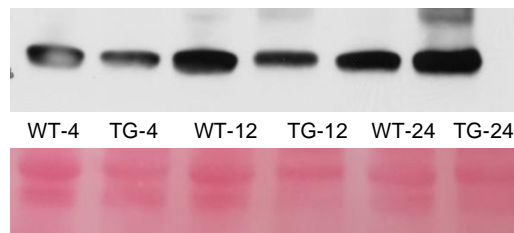


Abb. 35: oben: Western Blot mit Anti-S6 ribosomalem Protein-Antikörper von links nach rechts, WT 4 Wochen, TG 4 Wochen, WT 12 Wochen, TG 12 Wochen, WT 24 Wochen, TG 24 Wochen, Banden bei 30 kDa beobachtet, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.9 Lipidstoffwechsel

Aufgrund der erhöhten Mengen an Adipozyten im transgenen Modell, wie in zuvor genannten Versuchen gezeigt, untersuchten wir die molekularen Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel.

4.9.1 Acetyl-Coa-Carboxylase

Die Acetyl-CoA-Carboxylase dient der Malonyl-CoA-Produktion im Rahmen der Fettsäuresynthese (McCarthy und Hardie 1984). Anhand des Nachweises im Western Blot konnte eine verminderte Expression von Acetyl-CoA-Carboxylase unter den transgenen Tieren festgestellt werden.

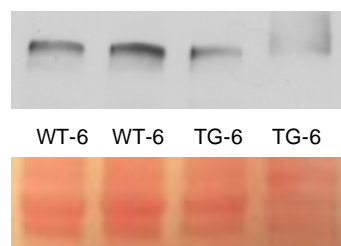


Abb. 36: oben: Acetyl-CoA-Carboxylase Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden auf der Höhe 280 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

In der immunhistochemischen Färbung wurde eine leichte Positivität der exokrinen Anteile in beiden Mauslinien festgestellt. Zudem fielen im Modell der GalNT2 Überexpression Positivitäten der Adipozyten und randbetont im Bereich der

Langerhans-Inseln auf, welche unter den Wildtypen nicht gefunden wurden. Zwischen dem exokrinen Gewebe der transgenen Tiere zeigten sich nicht angefärbte Zellen, zum einem in gangartiger Konfiguration, zum anderen bindegewebig anmutende Zellen.

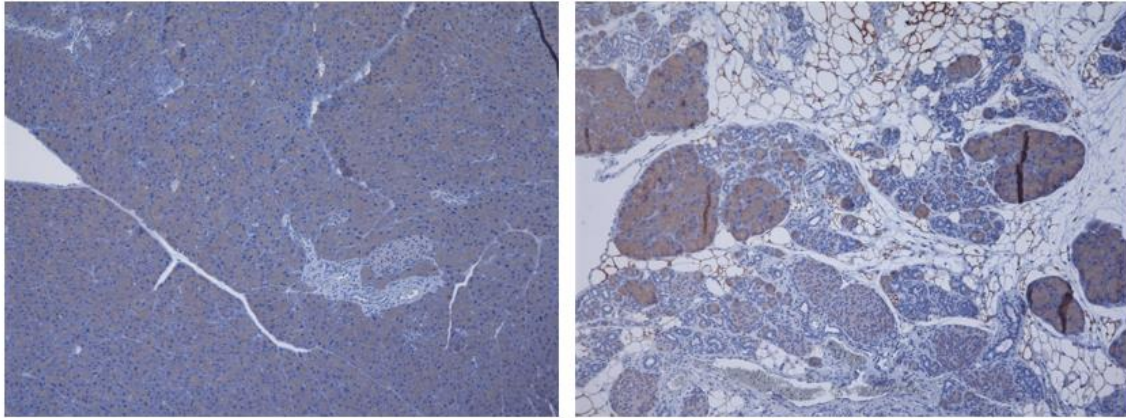


Abb. 37: Immunhistochemie mittels Anti-Acetyl-CoA-Carboxylase-Antikörper, positive Bereiche rot gefärbt, Altersstufe 7 Wochen, links WT, rechts TG.

4.9.2 Fettsäure-Synthase/ Fatty Acid Synthase (FAS)

Die Fettsäure-Synthase ist ein essenzielles Enzym der Fettsäuresynthese (McCarthy und Hardie 1984). Es wurden gleichbleibende Mengen an Fettsäure-Synthase im Vergleich zwischen Wildtyp und transgen festgestellt. Zudem zeigte sich eine zusätzliche Bande in einer der transgenen Proben.

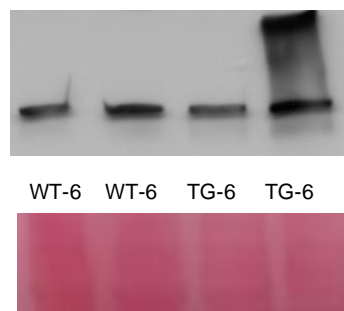


Abb. 38: oben: Fettsäure-Synthase Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden bei ca. 250 kDa beobachtet, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.9.3 CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBP α)

C/EBP α ist ein Transkriptionsfaktor welcher am Lipidmetabolismus beteiligt sein könnte (Birkenmeier et al. 1989). Außerdem wurde es als wichtiger Faktor für die Adipozytendifferenzierung identifiziert (Porse et al. 2001). Wir beobachteten im transgenen Modell von 6 Wochen verminderte Werte von C/EBP α .

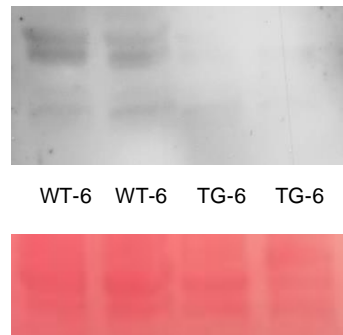


Abb. 39: oben: C/EBP α im Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, schwache Banden im Wildtyp auf den Höhen 45, 40 und 30 kDa beobachtet, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.9.4 Perilipin

Perilipin befindet sich auf den Oberflächen der lipidspeichernden Lipid Droplets, um diese vor einer Lipolyse abzusichern (Sztalryd und Brasaemle 2017). Die immunhistochemischen Ergebnisse für Perilipin wurden bereits zuvor in dieser Arbeit aufgezeigt (Abb. 40).

Im Western Blot fanden sich im transgenen Modell in einer einzelnen Probe der 6 Wochen alten transgenen Tiere bei ca. 62 kDa eine verstärkte Bande, welches die zu erwartende Bande für Perilipin darstellte.

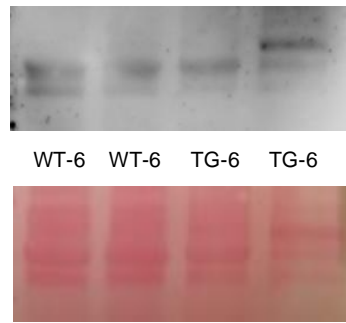


Abb. 40: oben: Perilipin im Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, prominenteste Bande (TG 6 Wochen) auf der Höhe von ca. 62 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung

4.10 Inflammation

4.10.1 Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B)

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in verschiedene Adaptationsprozesse von Zellen, wie zum Beispiel der Immunantwort oder Zelldifferenzierung, involviert ist (Hayden und Ghosh 2008; Oeckinghaus und Ghosh 2009).

Die Werte von NF- κ B der transgenen Tiere zeigten sich leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp.

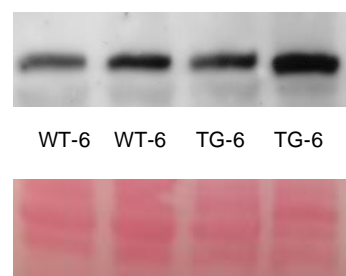


Abb. 41: oben: NF- κ B im Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden auf der Höhe von ca. 65 kDa detektiert, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.10.2 Inhibitor of NF- κ B α (I κ B α)

Das Protein I κ B α dient der Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Baeuerle und Baltimore 1988; Place et al. 2001). Bei Aktivierung von NF- κ B dissoziiert I κ B α von diesem und wird nach Ubiquitinylierung durch das Proteasom abgebaut, wodurch NF- κ B als Transkriptionsfaktor fungieren kann (Li und Verma 2002; Schulze-Luehrmann und Ghosh 2006). Im transgenen Modell wurden gleichbleibende Werte an I κ B α beobachtet.



Abb. 42: oben: I κ B α im Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden bei ca. 35 kDa detektiert, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

4.10.3 I κ B Kinase Komplex β (IKK- β)

I κ B Kinase Komplex ermöglicht die Phosphorylierung von I κ B α , wodurch NF- κ B aktiviert wird (Brockman et al. 1995; Didonato et al. 1997; Zandi et al. 1997). Wir beobachteten insgesamt erhöhte Mengen an IKK- β .



Abb. 43: oben: IKK- β im Western Blot der Altersgruppe 6 Wochen, jeweils zwei Proben WT links sowie zwei Proben TG rechts, Banden bei ca. 90 kDa, unten: Ladekontrolle mittels Ponceau-Färbung.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein weiterer Beitrag geschaffen, um die Relevanz glykobiologischer Vorgänge in Bezug auf Zelldifferenzierung, Zellintegrität und Stoffwechsel des murinen Pankreas zu verdeutlichen. Die konditionale Überexpression von GalNT2 führte zu einem komplexen Bild aus Gewebeveränderung sowie Veränderungen der GalNT2-abhängigen O-Glykosylierung und Proteinexpression auf molekularer Ebene. Wir konnten zeigen, dass es im fortlaufenden Alter der transgenen Tiere mit GalNT2 Überexpression nachweislich zu vermehrtem Aufkommen an Binde- sowie Fettgewebe kam, wobei der Anteil an Bindegewebe im Altersverlauf wieder abzunehmen schien und in den älteren Gruppen (15 Wochen) hauptsächlich Adipozyten neben dem exo- und endokrinen Gewebe verblieben. Die möglichen Zusammenhänge und Ursachen werden im Folgenden diskutiert.

5.1 Einordnung der Ergebnisse

In Bezug auf die räumliche, zeitliche, molekulare und zelltypspezifische Darstellung unseres Modells sind bei der Interpretation einige Aspekte zu berücksichtigen.

Daher soll an dieser Stelle die Probengewinnung betrachtet werden. Ein zu beachtender Faktor bei der Erstellung der Lysate war, dass makroskopisch nicht objektivierbar war, wie groß die prozentualen Anteile an exokrinem, endokrinem, lymphatischem und fetthaltigem Gewebe waren. Daher sind die Ergebnisse der Western Blots stets der Summe dieser Zellarten und nicht einem einzelnen Zelltyp zuzuordnen. Es fallen somit Gewebearten, welche zu einem großen Anteil repräsentiert sind, stärker ins Gewicht. Da beispielsweise Immunzellen im Pankreas vermutlich einen geringen Teil der gesamten Masse ausmachten, kommen diese Zellen im Western Blot möglicherweise weniger stark zum Ausdruck.

In der Literatur wird ein Anteil von ca 82% an exokrinem Gewebe im Pankreas beschrieben (Bolender 1974). Innerhalb dieser Gewebeart wird angenommen, dass 54% Zytoplasma, 22% raues endoplasmatisches Retikulum, jeweils 8% Zellkerne und Mitochondrien sowie 6,4% Zymogengranula repräsentiert sind (Bolender 1974). Das endokrine Gewebe ist entsprechend zu einem deutlich geringerem Anteil vertreten (Tsuchitani et al. 2016). Daher stellt diese Gewichtung der Zelltypen eine Orientierung für die Western Blot Beurteilung dar. Die vorherige Sortierung der Zelltypen in zukünftigen Arbeiten könnte spezifischere Ergebnisse bringen. Die

Zuordnung einzelner Proteine zu den verschiedenen Gewebearten gelang uns daher vor allem in immunhistochemischen Färbungen. Die Färbungen bildeten den jeweiligen Istzustand der entsprechenden Probe ab und es konnte eine Unterscheidung der Zellarten erfolgen. Eine Beurteilung des zeitlichen Verlaufes durch diese Methode wurde durch die Untersuchung verschiedener Altersstufen der Tiere unternommen. Um die Vorteile der Methoden zu nutzen und Schwachstellen der jeweilig anderen abzudecken, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Methoden angewandt.

5.2 Gewebezusammensetzung und Zelldifferenzierung

Für die Untersuchung der Zelltypen und derer molekularer Eigenschaften führten wir immunhistochemische und histologische Färbungen durch.

Interessanterweise stellten wir die Lokalisation der GalNT2 im transgenen Modell zu geringem Anteil im exokrinen Gewebe fest, während die Langerhans-Inseln eine kräftige Anreicherung aufwiesen. Aufgrund der genetischen Lokalisation des Zielgens, war der Anteil eher in den Azinuszellen zu erwarten (Kawaguchi et al. 2002). Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass Ptf1a nicht spezifisch für das exokrine Gewebe ist, sondern auch bei der Entwicklung von endokrinem Gewebe beteiligt sein könnte, wie es eine Studie von Nair et al. nahelegt (Nair et al. 2014). Auch Kawaguchi et al. konnten entgegen der Annahme, dass Ptf1a spezifisch für das exokrine Pankreas sei, zeigen, dass dieses auch in duktalem und endokrinen Vorläuferzellen vorkommt (Kawaguchi et al. 2002).

Für die weitere Charakterisierung des transgenen Modells wurden zunächst die physiologisch relevanten Gewebearten des Pankreas untersucht.

Da es weiterhin im transgenen Modell zu einer regelhaften Expression von Insulin in den Langerhans-Inseln in allen Altersstufen kam, gingen wir von funktionalem Gewebe aus. Auffällig unter den transgenen Tieren waren einzelne insulinnegative Zellen innerhalb der Langerhans-Inseln und in den Randbereichen. In der Literatur werden mechanistische Zusammenhänge zwischen Insulin und O-Glykosylierung beschrieben (Majumdar et al. 2004). Da GalNT2 vermehrt in den Randbereichen der Langerhans-Inseln gefunden wurde, könnte hier ein Zusammenhang bestehen.

Die Azinuszellen von Wildtyp und transgenen Tieren exprimierten an typischer Lokalisation Lipase in der Immunhistochemie. Bei der Lipase handelt es sich um ein O-glykosyliertes Enzym, wobei der Vorgang der Sekretion durch Glykosylierung gesteuert wird (Bruneau et al. 1997). Somit könnte an dieser Stelle diskutiert werden, ob durch eine mögliche O-Glykosylierung ein Einfluss der GalNT2 Überexpression auf die Lipase entstand.

Auffällig war, dass das exokrine Gewebe pro Blickfeld im transgenen Modell mit zunehmendem Alter vermindert anmutete, die Intensität der Lipase in der Immunhistochemie jedoch ausgeprägter erschien. Eine quantitative Aussage über die Menge des Enzyms ließ sich anhand der Immunhistochemie jedoch nicht treffen.

Im Westernblot zeigten sich keine Unterschiede der Lipase bei gleicher Proteinmenge. Aufgrund der Inhomogenität der Zellarten innerhalb des transgenen Modells wurde hier von einer Berechnung der Lipaseaktivität pro Gesamtorgan abgesehen. Nach derzeitigem Kenntnisstand kommt es erst bei einer Verminderung der Lipase auf unter 10% des physiologischen Wertes zu einer exokrinen Insuffizienz (DiMagno et al. 1973). Zudem komme es sehr selten zu einer manifesten exokrinen Insuffizienz bei Infiltration von Fettzellen in das Pankreas (Coulier 2016).

Da das Pankreas, wie in der Literatur beschrieben, eine sehr hohe Toleranz an Gewebeverlust bis zur Dysfunktionalität aufweist, gingen wir aufgrund des Nachweises physiologischer Lipase-exprimierender Zellen in typischer Verteilung von einer erhaltenen Organintegrität und ausreichenden exokrinen Funktion im transgenen Modell aus (DiMagno et al. 1973).

In den Voruntersuchungen durch Neuburg wurde ein signifikant vermindertes Körpergewicht der transgenen Tiere im Alter von 6 Wochen beschrieben, im Alter schien dieser Unterscheid nicht mehr signifikant (Neuburg 2021). Aufgrund der Interpretation unserer Untersuchungen, dass eine ausreichende exokrine Funktion erhalten sein müsste, ist die Gewichtsminde rung demnach nicht durch eine exokrine Pankreasinsuffizienz erklärlich.

Die S6 Kinase 1 (S6K1) ist in Zellwachstumsvorgänge im Downstream des mTor Signalweges involviert und dient der Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins (Hay und Sonenberg 2004; Pende et al. 2004). Für die Regulation von Adipozyten und somit des Körpergewichtes von Mäusen scheint die S6 Kinase 1 einen Einfluss

zu haben, wie Carnevalli et. al beschreiben (Carnevalli et al. 2010). Eine Aktivierung der S6 Kinase (S6K) wird anabolen Stoffwechselfvorgängen zugeschrieben (Pende et al. 2004). Ein Verlust der S6 Kinase 1 führte in Studien zu einem reduzierten Körpergewicht der Mäuse und Verminderung der Adipozytengröße (Carnevalli et al. 2010). In dieser Arbeit zeigte sich das S6 ribosomale Protein in den jüngeren somit den ca. 4- 12 Wochen alten transgenen Tieren vermindert. In den 24 Wochen alten Tieren eher erhöht. Die Verläufe des S6 ribosomalem Protein verlaufen daher ähnlich zu den Mausgewichten. Somit könnte die verminderte Expression des S6 durch die GalNT2 Überexpression einen ähnlichen Einfluss wie die verminderte Aktivierung des Proteins durch seine Kinase haben. Dies könnte einen Erklärungsansatz für das verminderte Körpergewicht liefern, welches durch Neuburg beschrieben wurde (Neuburg 2021).

Zudem ist eine vermehrte Aktivierung des S6 ribosomalem Proteins mit einer vermehrten Genese von pankreatischen Neoplasien assoziiert, passend hierzu fanden sich in unserem Modell kein Anhalt für pankreatische Neoplasien bei verminderten S6 Leveln (Hirashita et al. 2020). Des Weiteren wird eine Infiltration des Pankreas durch Adipozyten eher als benigne Veränderung eingestuft (Coulier 2016).

Histologisch wurde im Altersverlauf eine veränderte Zusammensetzung der Gewebeanteile im Vergleich der wildtypischen Mäuse zu den transgenen beobachtet (Neuburg 2021). Aus der HE-Färbereihe entstand der Verdacht einer Bindegewebsvermehrung neben dem vermehrten Auftreten von Adipozyten im transgenen Modell (Neuburg 2021).

Durch Pikro-Siriusrot- sowie Masson-Goldner-Färbung konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es sich bei den bindegewebig anmutenden Anteilen um kollagenes Gewebe handelte (Junqueira et al. 1979). Die Bindegewebsvermehrung konnte somit verifiziert werden. Sendler et al. nutzten ebenfalls die Masson-Goldner-Färbung, um die Fibrosierung des Pankreasgewebes anzuzeigen (Sendler et al. 2015). Da sich die histologischen Aufnahmen von Sendler et al. und die Bilder dieser Arbeit stark ähneln, kann auch hier von einer Fibrosierung des Pankreasgewebes im Alter von 4-8 Wochen der transgenen Mäuse ausgegangen werden. Bei den 15 Wochen alten transgenen Tieren sahen wir deutlich weniger Fibrose. Parallel hierzu fand sich im exokrinen

Gewebe der 15 Wochen alten transgenen Tiere kaum mehr eine Positivität für GalNT2. Diese wurde hierbei lediglich in den Langerhans-Inseln nachgewiesen. Somit könnte die Expression von GalNT2 in den exokrinen Zellen für die Umbauprozesse verantwortlich sein. Möglicherweise sind im Alter von 15 Wochen die Gewebeveränderungen durch GalNT2 Überexpression bereits abgeschlossen.

Des Weiteren sollte der Zelltyp der mutmaßlichen Fettgewebsvermehrung gesichert werden. Durch die typische Morphologie und die positive Perilipin Expression in der Immunhistochemie sahen wir das Auftreten des Zelltyps der Adipozyten im transgenen Modell als nachgewiesen an.

Insgesamt leitete sich die Frage ab, inwieweit es sich bei den Beobachtungen um eine gerichtete Gewebereaktion oder um einen unspezifischen, möglicherweise entzündlichen Prozess handelte.

5.3 Mechanismen Adipozyten versus Fibrose

Es blieb zu klären, welche Mechanismen hinter dem vermehrten Auftreten der Adipozyten und des Bindegewebes stehen.

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen beschrieben, wie es zu einer Adipozytenvermehrung und Fibrosierung im Pankreas kommen kann (Matsuda et al. 2014).

Eine Adipozytenvermehrung muriner Pankreata könnte zum einen durch altersbedingte oder gewichtsassoziierte Faktoren bedingt sein, zum anderen wird vermutet, dass dies durch einen Untergang von Azinuszellen und damit dem Ersetzen dieser durch Fettgewebe verursacht werden könnte (Nolte et al. 2016). Wie oben beschrieben, wiesen unsere Tiere ein vermindertes bis gleichbleibendes Körpergewicht auf (Neuburg 2021). Zudem wurden für histologische Untersuchungen Tiere bis maximal 15 Wochen untersucht, weshalb in unserem Modell eher ein Untergang der Azinuszellen aufgrund biochemischer Vorgänge mit einem Ersetzen durch Fettgewebe und nicht eine Alterserscheinung in Frage kommt.

Ein Faktor, welcher zu einer erhöhten Fettgewebsvermehrung in Pankreata führen kann, ist der Pigment epithelium-derived factor (PEDF) (Paul J. Grippo et al. 2012). Ein Knockout von PEDF in Zusammenhang einer KRAS Mutation führt beispielsweise zu einer Organverfettung des Pankreas (Paul J Grippo et al. 2012).

Neben der Verfettung des Pankreas, wird dem Fehlen von PEDF eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Entzündung und Fibrose zugesprochen (Grippo et al. 2012; Principe et al. 2016). Natürlicherweise würde PEDF vermehrt in Langerhans-Inseln und zentroazinären Zellen angefounden werden (Samkharadze et al. 2011). Auch in unserer Arbeit wurde GalNT2 vermehrt in den Langerhans-Inseln vorgefounden, weswegen ein möglicher Einfluss von GalNT2 auf PEDF bestehen könnte, da es sich bei PEDF um ein O-glykosyliertes Protein handelt (Phang et al. 2016). Möglicherweise könnte es durch eine vermehrte O-Glykosylierung durch GalNT2 zu einer Inaktivität von PEDF kommen.

Interessanterweise wurde durch Wu et al. keine Lipomatose der Modelle zur chronischen Pankreatitis beschrieben, es ist jedoch auf den histologischen Bildern ein vermehrtes Aufkommen von Fettgewebe zu erkennen, welche positiv für NF- κ B gefärbt waren (Wu et al. 2021). Zudem gibt es Modelle, bei denen es unter Einfluss von Ras-Onkogenen zu einer Metaplasie von Fibroblasten zu Adipozyten kommen kann (Benito et al. 1991). Des Weiteren wird vermutet, dass es einen mechanistischen Zusammenhang zwischen der Vermehrung von intrapankreatischem Fett und der Entstehung von Fibrose gibt (Matsuda et al. 2014). Somit scheinen die Mechanismen der Fibrosierung und Lipomatose nicht gänzlich voneinander abtrennbar. Insgesamt scheinen weitere Untersuchungen notwendig, um die genaue Pathogenese und die verschiedenen Ursachen hinter einer Adipozyteninfiltration im Pankreas zu verstehen (Coulter 2016). Dies gilt es in künftigen Arbeiten weiter zu untersuchen.

Mechanismen der Fibrosierung und entzündlichen Veränderungen muriner Pankreata können durch verschiedene Signalwege beeinflusst werden (Mews et al. 2002). Beispielsweise kommt es bei entzündlichen Vorgängen im Rahmen von Pankreatitiden zu einer Fibrosereaktion und einem Verlust des Drüsengewebes (Klöppel und Maillet 1993).

In diesem Rahmen spiele Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) bei der Stimulation pankreatischer Sternzellen zur Kollagensynthese und damit Fibrosereaktion bei chronischer Pankreatitis eine entscheidende Rolle (Mews et al. 2002).

Des Weiteren konnten Studien zeigen, dass der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) im pankreatischen Gewebe zu einer vermehrten Aktivierung von NF- κ B und damit

zu vermehrter Apoptose von pankreatischen Azinuszellen führen kann (Gukovskaya et al. 1997). Die Ausschüttung von TNF- α würde beispielsweise durch Makrophagen erfolgen, welche maßgeblich in die Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis involviert sind (Norman et al. 1995; Xue et al. 2015).

In unserem Modell fanden sich leicht erhöhte Werte an NF- κ B sowie I κ B Kinase Komplex β bei gleichbleibenden Werten von I κ B α , was für eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B sprechen könnte. Dies könnte somit eine Erklärung für die vermehrte Bindegewebsbildung und den Untergang von pankreatischen Azinuszellen darstellen, mit möglichem Einfluss durch TNF- α .

Auch ist der Transforming growth factor β (TGF β) bei der Aktivierung von Pankreasfibrose beteiligt (Xue et al. 2015). Es wird vermutet, dass der NF- κ B Signalweg in pankreatischen Sternzellen durch TGF β induziert wird und so ein Vorschreiten von Inflammation und Fibrose induziert wird (Wu et al. 2021). Auch in unserem Modell sahen wir, wie bereits beschrieben, leicht erhöhte Werte von NF- κ B, was die Fibrosereaktion in unserem Modell erklären könnte. Zudem scheint GalNT2 regulatorische Einflüsse auf TGF β zu nehmen (Hua et al. 2012). Zwar wird dort eine Überexpression von GalNT2 eher mit vermindertem TGF β in Zusammenhang gebracht, doch handelte es sich in der Versuchsreihe von Hua et al. um eine andere Zellentität, weswegen nicht auf gleichgerichtete Einflüsse geschlossen werden kann (Hua et al. 2012). Ferner ist es bekannt, dass Corezeptoren des TGF β Signalweges O-glykosyliert sind (Zhang et al. 2021). Somit könnte also die GalNT2 Überexpression auf diesem Wege einen weiteren möglichen Einfluss auf die Fibrosesignalkaskaden des Pankreas haben.

In der Literatur wird beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor CHOP im Rahmen der chronischen Pankreatitis vermehrt exprimiert wird (Sah et al. 2014). Da auch wir deutlich erhöhte Werte von CHOP-positiven Banden im Western Blot der transgenen Tiere feststellten, könnte dies ein Indikator für eine chronisch entzündliche Reaktion in unserem Modell sein.

Beim Verwenden von Antikörperkits mit murinem Ursprung, wie bei unserem CHOP-Antikörper, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, ob es sich bei einer Detektion durch Sekundärantikörper gegen Maus im Western Blot um das nachzuweisende Protein oder residente Antikörper im Lysat handelte, obwohl wie im Methodenteil beschrieben, Blockierschritte vorgenommen wurden, um diesen

Einflussfaktor zu vermeiden. Daher wurden nach Möglichkeit speziesfremde Antikörpersets verwendet. Durch andere Arbeitsgruppen wurde jedoch das Verwenden von murinem Lysat und speziesgleichem Primärantikörper beschrieben, und schien auch innerhalb einer Spezies zuverlässige Ergebnisse zu liefern (Upadhaya et al. 2011).

Insgesamt ist es denkbar, dass Inflammationsvorgänge in Bezug auf die pathologischen Veränderungen in unserem Modell eine Rolle spielen, da sich Ähnlichkeiten zu einer chronischen Pankreatitisreaktion zeigten (Klöppel und Mailliet 1993). Zusammenfassend entsprachen die vermehrten Adipozyten unseres Modells nicht dem klassischen klinischen Bild einer chronischen Pankreatitis und es konnten ebenfalls nicht die umfassenden histologischen Kriterien einer Pankreatitisreaktion erfüllt werden, sodass hier möglicherweise unterschiedliche Pathomechanismen vorliegen (Klöppel und Mailliet 1993; Piao et al. 2017).

5.4 Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation (ERAD) und ungefaltete Protein-Antwort / Unfolded Protein Response (UPR)

Zellulärer Stress kann zu einer erhöhten Belastung des endoplasmatischen Retikulums führen. Hierdurch kommt es beispielsweise zu vermehrtem Anfall von oxidativem Stress und zur Akkumulation von Proteinen, welche mit der Pathophysiologie von Krankheiten in Zusammenhang stehen kann (Zeeshan et al. 2016).

ERAD und UPR sind sich ergänzende Systeme des Proteinabbaus (Friedlander et al. 2000). Die ERAD ist dabei der spezifische Abbauweg fehlgefalteter Proteine des endoplasmatischen Retikulums über Ubiquitinylierung und anschließendem Abbau über das Proteasom (Meusser et al. 2005; Olzmann et al. 2013, Hwang und Qi 2018). Die ungefaltete Protein-Antwort wird bei Anfall fehlgefalteter Proteine über Activating transcription factor 6 (ATF6), RNA-like endoplasmic reticulum Kinase (PERK), oder IRE1 aktiviert, sodass es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt, mit dem Ziel, die Proteinhomöostase wiederzuerlangen (Walter und Ron 2011). Bei beiden Vorgängen spielt das Gleichgewicht von Glykoproteinen eine entscheidende Rolle (Cherepanova et al. 2016).

Eine in unseren Versuchen gezeigte Verstärkung der Ubiquitinylierung im transgenen Modell könnte für eine vermehrte Ubiquitinmarkierung von defekten Proteinen sprechen. Eine andere Möglichkeit wäre eine Akkumulation von

ubiquitinylierten Proteinen aufgrund eines verminderten Abbaus. Versuche von Wang et al. deuten eine verminderte Proteindegradation mit Anfall von ubiquitinylierten Proteinen bei erhöhtem oxidativem Zellstress an (Wang et al. 2010). Somit könnte man eine erhöhte Stressantwort der Zellen auf die GalNT2 Überexpression vermuten.

Ergänzend hierzu konnten unter den transgenen Tieren erhöhte Level von HSP40 festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HSP40 eine Proteinaggregation vermindern kann (Ye und Li 2009).

Da dieses Hitzeschockprotein bei der Reaktion auf Proteinaggregation beteiligt ist, könnte dies zusätzlich für eine Proteinakkumulation im transgenen Modell sprechen (Klaips et al. 2020).

Bei Initiierung der ungefalteten Proteinantwort spielt ebenfalls IRE1 eine wichtige Rolle, welches durch BIP inaktiviert wird (Sidrauski und Walter 1997; Okamura et al. 2000, Yoshida et al. 2001). In unseren Versuchen zeigten sich sowohl verminderte Werte von IRE1 als auch BIP.

Der Mangel an IRE1 steht hierbei der erhöhten ungefalteten Proteinantwort entgegen, da diese von IRE1 abhängig zu sein scheint (Okamura et al. 2000). Da, wie beschrieben, zur Aktivierung von IRE1 die Dissoziation von BIP benötigt wird, könnte dies bedeuten, dass durch die gleichzeitig verminderten Anteile von BIP und IRE1 die UPR verhältnismäßig unbeeinträchtigt bleibt (Okamura et al. 2000).

Bei BIP handelt es sich um ein O-glykosyliertes Protein (Barel et al. 2016).

Es wäre somit möglich, dass die Proteine IRE1 und BIP bei GalNT2 Überexpression durch Aberration der Glykosylierung vermehrt abgebaut würden.

Da in unserem Modell die IRE1 Werte vermindert und die Menge an ubiquitinylierten Proteinen erhöht waren, könnte dies für eine Akkumulation von Proteinen sprechen. Auch Tsuru et al. konnten bei einer Defizienz von IRE1 eine Anhäufung von O-glykosylierten Proteinen feststellen (Tsuru et al. 2013). Für die Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Unsere Beobachtungen zeigen, dass erhöhte Werte an GalNT2 einen Einfluss auf die Akteure der Proteinfaltung und -qualitätskontrolle haben. In unseren Versuchen konnte sowohl eine vermehrte Ubiquitinylierung als auch eine Erhöhung von Hitzeschockproteinen beobachtet werden. Dies könnte für eine Aktivierung von

beiden Abbauwegen ERAD / UPR durch einen erhöhten Anfall an missgefalteten, möglicherweise O-glykosylierten Proteinen sprechen.

Es gilt in Zukunft zu erklären, inwiefern der beobachtete ER-Stress mit der Überexpression von GalNT2 mechanistisch zusammenhängen könnte. In der Literatur wurde bereits ein Zusammenhang glykobiologischer Vorgänge in Bezug auf die Erkennung fehlgefalteter Proteine festgestellt (Ritter und Helenius 2000). Zudem ist in Versuchen beschrieben, dass eine Translokation der GalNT2 von der typischen Lokalisation des Golgi-Apparates in das endoplasmatische Retikulum beobachtet wird (Storrie et al. 1998). Daher könnte die Lokalisation dafür verantwortlich sein, warum sich die beobachteten Veränderungen besonders in diesem System abspielen. Dies könnte in künftigen Versuchen näher untersucht werden.

Insgesamt werden oxidativer Zellstress, Stress des endoplasmatischen Retikulums und Entzündungsreaktionen in der Literatur in Zusammenhang mit einer fibrotischen Gewebereaktion des Pankreas gebracht (Ren et al. 2016).

Die Zusammenschau unserer Beobachtungen aus fibrotischer Gewebereaktion, vermehrter Ubiquitylierung und veränderter Expression von Hitzeschockproteinen ergeben daher das Bild einer zellulären Stressreaktion des murinen Pankreas bei GalNT2 Überexpression.

5.5 Untergang oder Transformation der transgenen Zellen

Im Folgenden sollen verschiedene Ursachen für den Untergang des Azinuszellgewebes wie beispielsweise Apoptose, Autophagie oder Metaplasie beleuchtet werden (Longnecker 1982, Lee 2005, Bonal et al. 2009). Da bei den 15 Wochen alten Tieren in der Immunfluoreszenz eine Abschwächung des GalNT2 Signals des exokrinen Gewebes vermerkt wurde, wäre es möglich, dass im transgenen Modell die Zellen untergegangen sind, welche eine besonders hohe GalNT2 Überexpression zeigten.

Die Ubiquitylierung ist ebenfalls daran beteiligt, die NF- κ B-Signalkaskade zu aktivieren (Palombella et al. 1994). Im Rahmen der Pankreatitisforschung korrelierten eine erhöhte Expression von NF- κ B mit einer erhöhten Autophagie im Gewebe (Piao et al. 2017). Entsprechend der Literatur konnten wir leichtgradig erhöhte Werte von NF- κ B und eine Verringerung des exokrinen Pankreasgewebes bei GalNT2 Überexpression beobachten. Es ist daher denkbar, dass die NF- κ B

Signalkaskade durch vermehrte Ubiquitylierung aktiviert wurde, hierdurch die Induktion von Autophagie gefördert wurde und folglich der verminderte Anteil an Azinuszellen zustande kam. Dieser Mechanismus wird auch im Rahmen chronischer Pankreatitiden beschrieben, wobei es durch Schädigung der Azinuszellen zu einer Freisetzung proteolytischer Enzyme und dadurch zu einer Autophagie des Gewebes kommt (Longnecker 1982).

In der Literatur werden Defekte von IRE1 mit einem erhöhten programmierten Zelltod oder Autophagie assoziiert (Huang et al. 2022; Storniolo et al. 2018). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von XBP-1 im Rahmen der Antwort auf ungefaltete Proteine und ER-Stress durch IRE1 erfolgt (Yoshida et al. 2001). In der Literatur konnte ein programmierter apoptotischer Zelltod von pankreatischen Azinuszellen bei Zellstress und Fehlen von XBP-1 festgestellt werden (Lee et al. 2005). Somit könnte hier ein Zusammenhang zu den verminderten Werten von IRE1 im transgenen Modell bestehen.

In Übereinstimmung mit der Literatur beobachteten wir zudem verminderte Werte der PDI im transgenen Modell. Bei einem Fehlen an XBP-1, welches im IRE1-alpha/XBP-1 Signalweg involviert ist, konnten im murinen Pankreas verminderte Werte der PDI festgestellt werden (Lee et al. 2005).

Insofern könnte eine Verminderung von IRE1 und PDI im transgenen Modell in Zusammenhang mit einem gerichteten Untergang der Azinuszellen stehen.

Weiterhin beobachteten wir das Phänomen eines vermehrten Auftretens von SNA positivem, bindegewebig, strangartig anmutendem Gewebe zwischen 4 und 7 Wochen in der Immunhistochemie. Malagolini et al konnten eine SNA-Reaktivität als Marker für Apoptose oder Nekrose identifizieren (Malagolini et al. 2008). Das Lektin SNA ist bekannt O-Glykane zu detektieren (Poiroux et al. 2017). Auffällig war im Bereich der Langerhans-Inseln, dass es im transgenen Modell zu einer fehlenden Anfärbbarkeit von SNA im Vergleich zum Wildtyp kam.

Die 8 und 15 Wochen alten Tiere wiesen deutlich weniger SNA positives Gewebe auf, welches für einen abgeschlossenen Zelluntergang zu diesen Zeitpunkten sprechen könnte.

Zusammenfassend ist also der Zelluntergang in unserem Modell nicht sicher der Autophagie oder der Apoptose zuzuordnen. Da aus wissenschaftlicher Sicht diese

beiden Prozesse nicht gänzlich voneinander abzugrenzen sind, ist es möglich, dass es sich um ein übergreifendes Geschehen handelt (Thorburn 2008).

Neben dem Untergang der Azinuszellen durch Apoptose und dem Neuauftreten von Fettgewebe, wäre eine weitere Hypothese in unserem transgenen Modell, dass es sich um eine Metaplasie der Azinuszellen zu Fettgewebe handelt. Dies scheint nach Untersuchungen von Bonal et al. generell möglich zu sein (Bonal et al. 2009). In unserer immunhistochemischen Färbung für Lipase, welcher uns als Marker für das exokrine Gewebe diente, konnten wir zu keinem Zeitpunkt eine Positivität der Adipozyten feststellen. Auch konnten wir weder PNA noch GalNT2 auf den Oberflächen der Adipozyten im transgenen Modell feststellen, welche wir im exokrinen Gewebe anfinden konnten. Zudem konnten wir keine vermehrte Perilipin-Positivität des transgenen exokrinen Gewebes feststellen, sodass es keine Überschneidungen der typischen Antigene des jeweiligen Zelltyps gab. Ebenfalls wird in der Literatur bei einem ähnlichen pankreatischen Phänotyp das Bestehen einer Azinuszell-Adipozyten-Metaplasie als unwahrscheinlich beschrieben (Fahr et al. 2020). Daher gehen wir bei fehlendem Anhalt von exokrinen Markern der Adipozyten insgesamt nicht von einer Metaplasie des exokrinen Gewebes zu Adipozyten aus.

5.6 Lipidstoffwechsel

Da es im transgenen Modell zu einem vermehrten Auftreten von Adipozyten kam, wurden die Akteure des Lipidstoffwechsels untersucht.

Die Enzyme der Lipidsynthese wie Fettsäure-Synthase sowie Acetyl-Coa-Carboxylase sollten hypothetisch vornehmlich in Adipozyten und damit im transgenen Modell anzufinden sein (Wakil 1986, Oh et al. 2005). Diese zeigten sich entgegen der Erwartung im Western Blot des transgenen Modells eher gleichbleibend bzw. vermindert, während in der Immunhistochemie im transgenen Modell eine deutliche Anfärbbarkeit der Adipozyten für Acetyl-Coa-Carboxylase gezeigt wurde. Dies könnte dafür sprechen, dass bei der Erstellung der Lysate das Zytoplasma der Adipozyten nicht suffizient in die Lysate mit aufgenommen wurde, sondern dass diese möglicherweise im festen bzw. lipidhaltigen Anteil nach Zentrifugation verblieben. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Zytoplasma der Adipozyten auf die Gesamtmenge der Zellen im Lysat dennoch nur einen geringen Anteil ausmachte, da die histologisch sichtbare Zellgröße der Adipozyten aufgrund

des lipidspeichernden Anteils zustande kommt. Passend zu dieser Vermutung zeigte sich kein sicherer Anstieg des Perilipins im transgenen Modell der 6 Wochen alten Tiere im Western Blot. Dies würde insgesamt bedeuten, dass die Western-Blot Ergebnisse eher repräsentativ für das exo- und endokrine Gewebe sind.

Im Lipidprofil war auffällig, dass verminderte Werte von C/EBP α bei erhöhtem Anteil von Adipozyten aufgefunden wurden. Eine Erklärung könnte sein, dass sobald Adipozyten ausdifferenziert sind, diese nicht mehr von C/EBP α beeinflusst sind, wie es Versuche von Sikkeland et al. andeuten (Sikkeland et al. 2019). Dies könnte dafürsprechen, dass es bei einem Alter von 6 Wochen bereits zur vollendeten Ausdifferenzierung der Adipozyten gekommen ist. Außerdem könnte die erhöhte Expression von CHOP zu einer Verminderung von C/EBP α geführt haben, da CHOP in der Lage sein soll, dieses zu inhibieren (Ron und Habener 1992).

Interessanterweise scheint der Transkriptionsfaktor XBP-1 ebenfalls an der Lipogenese sowie an Prozessen der O-Glykosylierung beteiligt zu sein (Lee et al. 2008; Wang et al. 2014). Da XBP-1 durch IRE aktiviert wird, könnte hier der Zusammenhang für die verminderten Enzyme der Lipogenese in unserem Modell bestehen (Yoshida et al. 2001). Da wir verminderte Werte an IRE alpha feststellten, ist es möglich, dass es zu einer verminderten Expression von XBP-1 kommt. Bei einem Fehlen von XBP-1 konnten durch andere Arbeitsgruppen verminderte Werte von Acetyl-CoA-Carboxylase festgestellt werden (Lee et al. 2008). Passend hierzu zeigten sich unter den transgenen Tieren in unseren Versuchen verminderte Werte an Acetyl-CoA-Carboxylase.

Die Expression von Hitzeschockproteinen, beispielsweise HSP70, scheint außerdem mit der Expression der Enzyme der Lipogenese, wie Fettsäure-Synthase und Acetyl-Coa-Carboxylase, zu korrelieren (Zhang et al. 2018). Passend hierzu fanden sich bei uns sowohl gleichbleibende bis verminderte Werte von HSP70 sowie verminderte Werte von Acetyl-Coa-Carboxylase.

Die Fettsäure-Synthase zeigte sich insgesamt gleichbleibend in den beiden Modellen. Dies könnte daran liegen, dass die Fettsäure-Synthase vor allem in pankreatischen Beta-Zellen zu finden ist, welche bei unseren Modellen in der immunhistochemischen Analyse von Anzahl und Größe eher unbeeinflusst blieben (Tiano und Mauvais-Jarvis 2012). Fettsäure-Synthase scheint kaum in

pankreatischen Azinuszellen oder in den Pankreasgängen exprimiert zu werden (Nguyen und Lisanti 2008).

5.7 Zusammenhänge zu ähnlichen Phänotypen an den Beispielen Prox-1 und SBDS-Protein

Um mögliche Erklärungsansätze für die Verminderung des exokrinen Gewebes sowie Vermehrung von Adipozyten und Bindegewebe zu finden, verglichen wir unser Modell mit ähnlichen Phänotypen.

Hierbei zeigte sich, dass beispielsweise eine Deletion im Prox-1 Gen ebenfalls zu einer Abnahme des exokrinen Gewebes sowie zu einer vermehrten Fettgewebsakkumulation im murinen Pankreas führte (Westmoreland et al. 2012).

Prox-1 Polymorphismen wurden zudem im Zusammenhang mit einer schlechteren Verstoffwechslung von Fettsäuren untersucht (Kretowski et al. 2015). Es kommt mehr im omentalen als im subkutanen Fettgewebe vor (Procino 2014).

Interessanterweise wird in der Literatur die Lokalisation von Prox-1 eher in duktalem und endokrinem Pankreasgewebe beobachtet, während ein Prox-1 Verlust zu einem Verlust der Azinuszellen führt (Wang et al. 2005; Westmoreland et al. 2012). Dies könnte für eine interzelluläre Kommunikation zum exokrinen Gewebe sprechen. Die intrapankreatischen Vorgänge erscheinen somit als komplexes System und eine ausschließliche Betrachtung einer Zelllinie des Organs ist daher weniger sinnvoll.

Die doppelte Bande von Prox-1 im Western Blot der vier Wochen alten transgenen Tiere (Abb. 17) könnte für ein alternatives Spleißen sprechen (Zinovieva et al. 1996). Daher entstand die Vermutung, dass eine GalNT2 Überexpression die Proteinstruktur von Prox-1 beeinflussen könnte. Hierfür wäre es naheliegend, dass eine O-Glykosylierung vorliegt, welche mittels PNA und Jacalin Reaktivität von Prox-1 Immunopräzipitat untersucht werden sollte. Es konnten leicht erhöhte Werte der Banden im transgenen Modell sowohl für Jacalin als auch für PNA festgestellt werden. Hiermit handelt es sich um einen möglichen Hinweis auf eine O-Glykosylierung von Prox-1, jedoch nicht um einen eindeutigen Beweis.

Auch im Präzipitat stellten wir mehrere Banden für Prox-1 fest, wobei die niedrigeren Banden im transgenen Modell zunahmen. Dies zeigte sich passend zu den vier Wochen alten transgenen Tieren. Es konnte ebenfalls eine Bindung der Probe von

PNA beobachtet werden. Der Grund für die Detektion eines sehr großen Proteins sollte in zukünftigen Projekten untersucht werden.

Teilweise fanden sich in Western Blots Banden anderer Größe als der, die erwartet wurde, oder zusätzliche Banden.

In der Immunpräzipitation fiel beispielsweise auf, dass ein deutlich größeres Protein, als für Prox-1 erwartet, nachgewiesen wurde. Andere Forschungsgruppen beobachteten ebenfalls eine sehr hohe Bande im Western Blot für Prox-1 (Abcam plc., 2023b) Des Weiteren wurde in weiteren Blots eine kleinere Bande für Prox-1 beobachtet, als zu erwarten war. Auch dies ist bereits durch den Hersteller dokumentiert (Abcam plc., 2023b). Dies könnte zum einen durch Kreuzreaktivitäten gegenüber einem über 250 kDa großen Protein oder zum anderen durch ein alternatives Spleißen erklärlich sein.

Neben Alterationen von Prox-1 fand sich bei einem murinen Modell des Schwachman-Bodian-Diamond Syndroms (SBDS) ein ähnlicher Phänotyp zu unserem Modell der GalNT2 Überexpression (Tourlakis et al. 2012). Bei einem Knockout des SBDS-Gens zeigte sich eine Abnahme des exokrinen Gewebes und eine Zunahme der Adipozyten im Pankreas (Tourlakis et al. 2012). Auch in diesem Modell wurde, wie in unserer Interpretation, eine Transdifferenzierung des exokrinen Gewebes zu Adipozyten ausgeschlossen (Tourlakis et al. 2012).

Interessanterweise zeigten sich die Langerhans-Inseln weiterhin erhalten und es fand sich ähnlich wie in unserem Modell ein Verlust der Insulin-Positivität vereinzelter Zellen im Inneren der Langerhans-Inseln (Tourlakis et al. 2012).

Studien konnten zeigen, dass das SBDS-Protein für die Translation von C/EBP wichtig ist (In et al. 2016). Da sich auch in unserem transgenen Modell verminderte Werte von C/EBP auffanden, könnte hier ein Zusammenhang vermutet werden. Insgesamt fand sich jedoch in der Immunhistochemie unseres Modells kein Hinweis auf unterschiedliche Expression des SBDS-Proteins. Somit konnten wir keinen hinreichenden Beweis liefern, dass der Phänotyp durch eine Alteration des SBDS-Proteins bei Überexpression von GalNT2 bedingt wird.

5.8 Ausblick

Diese Arbeit schafft eine Grundlage zum Verständnis der Polypeptid-GalNAc-Transferase 2 (GalNT2) und der vermittelten O-Glykosylierung muriner pankreatischer Proteine. Diese könnte in Zukunft durch weitere Untersuchungen gestärkt werden. Da sich eine GalNT2 Überexpression in einer Vermehrung von Adipozyten und Bindegewebe widerspiegelte, wäre es möglich GalNT2 als Target bei der Entstehung von Organveränderungen, wie beispielsweise der pankreatischen Lipomatose sowie der chronischen Pankreatitis, weiter zu untersuchen. Wie in dieser Arbeit bereits beschrieben, schien ein Einfluss auf die Genese von intrapankreatischem Fettgewebe sowie Proteinstoffwechsel zu bestehen, welchen es auf biochemischer Ebene weiter zu evaluieren gilt. Um die Anwendbarkeit auf den menschlichen Organismus herzustellen, könnten Versuchsaufbauten mit humanen Pankreaszelllinien von Vorteil sein. Es wurde somit ein weiterer wissenschaftlicher Beitrag zu glykobiologischen Vorgängen im Pankreas geleistet, auf welchen künftige Untersuchungen aufbauen können.

6.1 Zusammenfassung

Die organspezifische Überexpression von GalNT2 im murinen Pankreas führte zu deutlichen morphologischen Veränderungen sowie Auffälligkeiten auf molekularer Ebene. Es zeigte sich mit dem Älterwerden der transgenen Tiere bis zu 15 Wochen das Fortbestehen physiologischer exo- und endokriner Zellreihen neben dem zunehmend größer werdenden Anteil an Fettgewebe und Fibrose. Unsere Versuche haben zudem gezeigt, dass sich die Überexpression von GalNT2 auf molekularer Ebene sowohl auf die Proteinhomöostase, Inflammation sowie den Lipidstoffwechsel auswirkt. Es fanden sich Anzeichen einer vermehrten Proteinakkumulation sowie zellulärem Stress. Die entzündlichen Reaktionen könnten in Zusammenhang zur Fibrosereaktion der Pankreata stehen. Insgesamt sprachen die Ergebnisse eher für eine Infiltration des pankreatischen Gewebes durch Adipozyten als eine Transdifferenzierung aus Azinuszellen. In Vergleichen zu ähnlichen Phänotypen konnten wir die Vermutung aufstellen, dass die feingeweblichen Veränderungen in Verbindung zu Alterationen von Prox-1 stehen könnten. Wir bewerteten die beobachteten Prozesse jedoch als Zusammenspiel multipler Faktoren, wodurch es sich empfiehlt, in künftigen Arbeiten die einzelnen Mechanismen weiter zu untersuchen. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Glykobiologie im murinen Pankreas geschaffen werden. Dies dient somit als Ausgangspunkt weiterer wissenschaftlicher Forschung in Bezug auf Pathophysiologie der pankreatischen Lipomatose, Fibrose und Proteinhomöostase.

6.2 Summary

This work demonstrates the impact of overexpression of GalNT2 in murine pancreas and outlines the importance of glycobiology for organ morphology and protein homeostasis. The mice model of overexpressed GalNT2 in pancreas could show, that throughout different stages of age a development of increased adipocytes as well as fibrotic tissue of the pancreatic organ arises. There were indications for an increased level of protein accumulation as a potential sign of an inflammatory process. So far we could not determine evidence for a transdifferentiation of pancreatic exocrine tissue into adipocytes or fibroblasts. Therefore we assume an infiltration of previously mentioned cell types into the murine pancreas of our mice model. We concluded that the investigated morphological changes underlie a multifactorial process. In summary further investigation can be performed based on the current findings to evaluate the complex influence of GalNT2 for biochemical signalling.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb	Abbildung
ATF6	Activating transcription factor 6
BIP	Heavy Chain Binding Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
C/EBP α	CCAAT enhancer-binding protein α
CHOP	C/EBP Homologous Protein
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2
Fuc	α -Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	β -N-Acetylgalactosamin, N-Acetyl-D-Galactosamin
GalNAc-Transferase	Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase
GalNT	Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase
GlcNAc	β -N-Acetylglucosamin
Glc	Glucose
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	High-Density-Lipoprotein
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	hereditäres nicht-polipöses Kolonkarzinom
HSP	Hitzeschockprotein
HSS-HRP-Lösung	Horseradishperoxidase gekoppeltes Streptavidin
IF	Immunfluoreszenz

IGF	Insulin-like growth Faktor
IHC	Immunhistochemie
IKK- β	I κ B Kinase Komplex β
IP	Immunpräzipitation
IRE1	Inositol Requiring Enzyme-1
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
kDa	Kilodalton
Man	α -Mannose
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PD	Pulldown
PDI	Proteindisulfidisomerase
PDX1	pankreatisches und duodenales Homeoboxprotein 1
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PERK	RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PNA	Peanut agglutinin
PROX 1	Prospero Homebox Protein 1
S6	S6 ribosomales Protein
S6K1	S6 ribosomale Protein Kinase 1
SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond Syndrom
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Serin
SHH	Sonic Hedgehoc Protein
SNA	Sambucus Nigra Lectin
sTN	Sialyl-Tn
SUMO-1	Small ubiquitin-related modifier-1

TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
TG	Transgene Mäuse
Tab	Tabelle
TGF β	Transforming Growth Factor β
Thr	Threonin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UDP	Uridin-Diphosphat
UPR	Antwort auf ungefaltete Proteine / unfolded protein response
VVA	Vicia Villosa Lectin
W	Woche
WB	Western Blot
WT	Wildtyp-Mäuse

8. Literaturverzeichnis

- Abcam plc., "Anti-PROX1 antibody (ab38692)" [Online im Internet.] URL: <https://www.abcam.com/prox1-antibody-ab38692.html> [Stand: 03.06.2021, 20:23]
- Abcam plc. , „Anti-PROX1 antibody [5G10] (ab33219)“ [Online im Internet.] URL: <https://www.abcam.com/products/primary-antibodies/prox1-antibody-5g10-ab33219.html>, [Stand: 29.03.23, 21:56 Uhr]
- Abremski, K., and R. Hoess. 1984. "Bacteriophage P1 Site-Specific Recombination. Purification and Properties of the Cre Recombinase Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 259(3):1509–14.
- Adams, Christopher J., Megan C. Kopp, Natacha Larburu, Piotr R. Nowak, and Maruf M. U. Ali. 2019. "Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1." *Frontiers in Molecular Biosciences* 6(MAR). doi: 10.3389/fmolb.2019.00011.
- Adamska, Aleksandra, Alice Domenichini, and Marco Falasca. 2017. "Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies." *International Journal of Molecular Sciences* 18(7). doi: 10.3390/IJMS18071338.
- Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund. 1996. "The Morphogenesis of the Pancreatic Mesenchyme Is Uncoupled from That of the Pancreatic Epithelium in IPF1/PDX1-Deficient Mice." *Development (Cambridge, England)* 122(5):1409–16.
- Altschuler, Y., C. L. Kinlough, P. A. Poland, J. B. Bruns, G. Apodaca, O. A. Weisz, and R. P. Hughey. 2000. "Clathrin-Mediated Endocytosis of MUC1 Is Modulated by Its Glycosylation State." *Molecular Biology of the Cell* 11(3):819–31. doi: 10.1091/mbc.11.3.819.
- Apelqvist, Åsa, Ulf Ahlgren, and Helena Edlund. 1997. "Sonic Hedgehog Directs Specialised Mesoderm Differentiation in the Intestine and Pancreas." *Current Biology* 7(10):801–4. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00340-X.
- Baeuerle, Patrick A., and David Baltimore. 1988. "I κ B: A Specific Inhibitor of the NF-KB Transcription Factor." *Science* 242(4878):540–46. doi: 10.1126/science.3140380.
- Barel, Monique, Anne Harduin-Lepers, Lucie Portier, Marie Christine Slomianny, and Alain Charbit. 2016. "Host Glycosylation Pathways and the Unfolded Protein Response Contribute to the Infection by Francisella." *Cellular Microbiology* 18(12):1763–81. doi: 10.1111/CMI.12614.
- Becker, Jessica L., Duy T. Tran, and Lawrence A. Tabak. 2018. "Members of the GalNAc-T Family of Enzymes Utilize Distinct Golgi Localization Mechanisms." *Glycobiology* 28(11):841–48. doi: 10.1093/glycob/cwy071.
- Benito, Manuel, Almudena Porras, Angel R. Nebreda, and Eugenio Santos. 1991. "Differentiation of 3T3-L1 Fibroblasts to Adipocytes Induced by Transfection of Ras Oncogenes." *Science* 253(5019):565–68. doi: 10.1126/science.1857988.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, Lubert Stryer, and Gregory J. Jr Gatto. 2013. *Biochemie*. 7. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bettaieb, Ahmed, Eleonora Cremonini, Heeteak Kang, Jiye Kang, Fawaz G. Haj, and Patricia I. Oteiza. 2016. "Anti-Inflammatory Actions of (-)-Epicatechin in

- the Adipose Tissue of Obese Mice.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 81:383–92. doi: 10.1016/j.biocel.2016.08.044.
- Biczó, György, Eszter T. Vegh, Natalia Shalbueva, Olga A. Mareninova, Jason Elperin, Ethan Lotshaw, Sophie Gretler, Aurelia Lugea, Sudarshan R. Malla, David Dawson, Piotr Ruchala, Julian Whitelegge, Samuel W. French, Li Wen, Sohail Z. Husain, Fred S. Gorelick, Peter Hegyi, Zoltan Rakonczay, Ilya Gukovsky, and Anna S. Gukovskaya. 2018. “Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Dereglated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models.” *Gastroenterology* 154(3):689–703. doi: 10.1053/J.GASTRO.2017.10.012.
- Birkenmeier, E. H., B. Gwynn, S. Howard, J. Jerry, J. I. Gordon, W. H. Landschulz, and S. L. McKnight. 1989. “Tissue-Specific Expression, Developmental Regulation, and Genetic Mapping of the Gene Encoding CCAAT/Enhancer Binding Protein.” *Genes & Development* 3(8):1146–56. doi: 10.1101/gad.3.8.1146.
- Birmingham, A. 1896. “The Topographical Anatomy of the Spleen, Pancreas, Duodenum, Kidneys, &c: Illustrated by a Cast of These Viscera Hardened In Situ.” *Journal of Anatomy and Physiology* 31(Pt 1):95–113.
- Bolender, Robert P. 1974. “Stereological Analysis of the Guinea Pig Pancreas: I. Analytical Model and Quantitative Description of Nonstimulated Pancreatic Exocrine Cells.” *Journal of Cell Biology* 61(2):269–87. doi: 10.1083/jcb.61.2.269.
- Bonal, C., F. Thorel, A. Ait-Lounis, W. Reith, A. Trumpp, and PI Herrera. 2009. “Pancreatic Inactivation of C-Myc Decreases Acinar Mass and Transdifferentiates Acinar Cells into Adipocytes in Mice.” *Gastroenterology* 136(1). doi: 10.1053/J.GASTRO.2008.10.015.
- Brockman, J. A., D. C. Scherer, T. A. McKinsey, S. M. Hall, X. Qi, W. Y. Lee, and D. W. Ballard. 1995. “Coupling of a Signal Response Domain in I Kappa B Alpha to Multiple Pathways for NF-Kappa B Activation.” *Molecular and Cellular Biology* 15(5):2809–18. doi: 10.1128/mcb.15.5.2809.
- Bruneau, Nadine, Alain Nganga, Edward A. Fisher, and Dominique Lombardo. 1997. “O-Glycosylation of C-Terminal Tandem-Repeated Sequences Regulates the Secretion of Rat Pancreatic Bile Salt-Dependent Lipase.” *Journal of Biological Chemistry* 272(43):27353–61. doi: 10.1074/jbc.272.43.27353.
- Burlison, Jared S., Qiaoming Long, Yoshio Fujitani, Christopher V. E. Wright, and Mark A. Magnuson. 2008. “Pdx-1 and Ptf1a Concurrently Determine Fate Specification of Pancreatic Multipotent Progenitor Cells.” *Developmental Biology* 316(1):74–86. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.011.
- Burnette, W. Neal. 1981. “‘Western Blotting’: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.” *Analytical Biochemistry* 112(2). doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
- Campbell, JA, GJ Davies, V. Bulone, Henrissat, and B. Henrissat. 1998. “A Classification of Nucleotide-Diphospho-Sugar Glycosyltransferases Based on Amino Acid Sequence Similarities.” *The Biochemical Journal* 329 (Pt 3)(Pt

3):719.

- Cao, Jing, Shuzhen Guo, Ken Arai, Eng H. Lo, and Ming Ming Ning. 2013. "Studying Extracellular Signaling Utilizing a Glycoproteomic Approach: Lectin Blot Surveys, a First and Important Step." *Methods in Molecular Biology* 1013. doi: 10.1007/978-1-62703-426-5_15.
- Carlow, D. A., S. Y. Corbel, M. J. Williams, and H. J. Ziltener. 2001. "IL-2, -4, and -15 Differentially Regulate O-Glycan Branching and P-Selectin Ligand Formation in Activated CD8 T Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167(12):6841–48.
- Carnevali, Larissa S., Kouhei Masuda, Francesca Frigerio, Olivier Le Bacquer, Sung Hee Um, Valentina Gandin, Ivan Topisirovic, Nahum Sonenberg, George Thomas, and Sara C. Kozma. 2010. "S6K1 Plays a Critical Role in Early Adipocyte Differentiation." *Developmental Cell* 18(5):763–74. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2010.02.018.
- Casola, Stefano. 2010. "Mouse Models for MiRNA Expression: The ROSA26 Locus." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 667:145–63. doi: 10.1007/978-1-60761-811-9_10/FIGURES/2.
- Chacko, Balu K., and P. S. Appukuttan. 2001. "Peanut (*Arachis Hypogaea*) Lectin Recognizes α -Linked Galactose, but Not N-Acetyl Lactosamine in N-Linked Oligosaccharide Terminals." *International Journal of Biological Macromolecules* 28(5):365–71. doi: 10.1016/S0141-8130(01)00139-8.
- Chandrasekaran, E. V., Jun Xue, Jie Xia, Siraj D. Khaja, Conrad F. Piskorz, Robert D. Locke, Sriram Neelamegham, and Khushi L. Matta. 2016. "Novel Interactions of Complex Carbohydrates with Peanut (PNA), Ricinus Communis (RCA-I), Sambucus Nigra (SNA-I) and Wheat Germ (WGA) Agglutinins as Revealed by the Binding Specificities of These Lectins towards Mucin Core-2 O-Linked and N-Linked Glycans and Related Structures." *Glycoconjugate Journal* 33(5):819–36. doi: 10.1007/s10719-016-9678-y.
- Chang, Julia Yu Fong, and Harvey P. Kessler. 2008. "Masson Trichrome Stain Helps Differentiate Myofibroma from Smooth Muscle Lesions in the Head and Neck Region." *Journal of the Formosan Medical Association* 107(10):767–73. doi: 10.1016/S0929-6646(08)60189-8.
- Chapman, Rowan, Carmela Sidrauski, and Peter Walter. 1998. "INTRACELLULAR SIGNALING FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM TO THE NUCLEUS." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14(1):459–85. doi: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.459.
- Cherepanova, Natalia, Shiteshu Shrimal, and Reid Gilmore. 2016. "N-Linked Glycosylation and Homeostasis of the Endoplasmic Reticulum." *Current Opinion in Cell Biology* 41:57. doi: 10.1016/J.CEB.2016.03.021.
- Chiang, Hui Ling, Stanley R. Terlecky, Charles P. Plant, and J. Fred Dice. 1989. "A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins." *Science* 246(4928):382–85. doi: 10.1126/science.2799391.
- Conradt, H. S., R. Geyer, J. Hoppe, L. Grotjahn, A. Plessing, and H. Mohr. 1985. "Structures of the Major Carbohydrates of Natural Human Interleukin-2." *European Journal of Biochemistry* 153(2):255–61.

- Constantine, V. S., and R. W. Mowry. 1968. "Selective Staining of Human Dermal Collagen. II. The Use of Picosirius Red F3BA with Polarization Microscopy." *The Journal of Investigative Dermatology* 50(5). doi: 10.1038/jid.1968.68.
- Coulier, Bruno. 2016. "Pancreatic Lipomatosis: An Extensive Pictorial Review." *Journal of the Belgian Society of Radiology* 100(1):39–40. doi: 10.5334/JBR-BTR.1014.
- Cummings, Richard D., and J. Michael Pierce. 2014. "The Challenge and Promise of Glycomics." *Chemistry and Biology* 21(1):1–15. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.12.010.
- Dahr, W., G. Uhlenbruck, and G. W. Bird. 1974. "Cryptic A-like Receptor Sites in Human Erythrocyte Glycoproteins: Proposed Nature of Tn-Antigen." *Vox Sanguinis* 27(1):29–42.
- Dahr, W., G. Uhlenbruck, H. H. Gunson, and M. Van Der Hart. 1975. "Molecular Basis of Tn-Polyagglutinability." *Vox Sanguinis* 29(1):36–50.
- Van Damme, Els J. M. 2011. "Lectins as Tools to Select for Glycosylated Proteins." *Methods in Molecular Biology* 753. doi: 10.1007/978-1-61779-148-2_19.
- Dassaye, Reshmi, Strini Naidoo, and Marlon E. Cerf. 2016. "Transcription Factor Regulation of Pancreatic Organogenesis, Differentiation and Maturation." *Islets* 8(1):13–34. doi: 10.1080/19382014.2015.1075687.
- DAUSSET, J., J. MOULLEC, and J. BERNARD. 1959. "Acquired Hemolytic Anemia with Polyagglutinability of Red Blood Cells Due to a New Factor Present in Normal Human Serum (Anti-Tn)." *Blood* 14:1079–93.
- DeCaprio, James, and Thomas O. Kohl. 2017. "Immunoprecipitation." *Cold Spring Harbor Protocols* 2017(12). doi: 10.1101/pdb.prot098640.
- Didonato, Joseph A., Makio Hayakawa, David M. Rothwarf, Ebrahim Zandi, and Michael Karin. 1997. "A Cytokine-Responsive IκB Kinase That Activates the Transcription Factor NF-κB." *Nature* 388(6642):548–54. doi: 10.1038/41493.
- DiMagno, Eugene P., Vay L. W. Go, and W. H. J. Summerskill. 1973. "Relations between Pancreatic Enzyme Outputs and Malabsorption in Severe Pancreatic Insufficiency." *New England Journal of Medicine* 288(16):813–15. doi: 10.1056/NEJM197304192881603.
- dos-Santos, Petra B., Juliana S. Zanetti, Gabriela S. Vieira-de-Mello, Moacyr B. M. Rêgo, Alfredo Ribeiro-Silva A, and Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão. 2014. "Lectin Histochemistry Reveals SNA as a Prognostic Carbohydrate-Dependent Probe for Invasive Ductal Carcinoma of the Breast: A Clinicopathological and Immunohistochemical Auxiliary Tool." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 7(5):2337–49.
- Drosos, Yiannis, Geoffrey Neale, Jianming Ye, Leena Paul, Emin Kuliye, Anirban Maitra, Anna L. Means, M. Kay Washington, Jerold Rehg, David B. Finkelstein, and Beatriz Sosa-Pineda. 2016. "Prox1-Heterozygosity Sensitizes the Pancreas to Oncogenic Kras-Induced Neoplastic Transformation." *Neoplasia (United States)* 18(3):172–84. doi: 10.1016/j.neo.2016.02.002.
- Dutt, Mriga, Marisa N. Duong, Scott Bringans, Renée S. Richards, Richard Lipscombe, and Michelle M. Hill. 2023. "Semi-Automated Lectin Magnetic Bead Array (LeMBA) for Translational Serum Glycoprotein Biomarker

- Discovery and Validation." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2628. doi: 10.1007/978-1-0716-2978-9_25.
- De Duve, C. 1953. "Glucagon; the Hyperglycaemic Glycogenolytic Factor of the Pancreas." *Lancet (London, England)* 265(6777):99–104.
- Elhammer, A., and S. Kornfeld. 1986. "Purification and Characterization of UDP-N-Acetylgalactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase from Bovine Colostrum and Murine Lymphoma BW5147 Cells." *Journal of Biological Chemistry* 261(12):5249–55. doi: 10.1016/s0021-9258(19)57206-4.
- Fahr, Lisa, Yoshiaki Sunami, Nadja Maeritz, Katja Steiger, Thomas G. P. Grünewald, Martin Gericke, Bo Kong, Susanne Raulefs, Julia Mayerle, Christoph W. Michalski, Ivonne Regel, and Jörg Kleeff. 2020. "Expression of the EWSR1-FLI1 Fusion Oncogene in Pancreas Cells Drives Pancreatic Atrophy and Lipomatosis." *Pancreatology* 20(8):1673–81. doi: 10.1016/J.PAN.2020.10.033.
- Farinha, Carlos M., Paulo Nogueira, Filipa Mendes, Deborah Penque, and Margarida D. Amaral. 2002. "The Human DnaJ Homologue (Hdj)-1/Heat-Shock Protein (Hsp) 40 Co-Chaperone Is Required for the in Vivo Stabilization of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Hsp70." *Biochemical Journal* 366(Pt 3):797. doi: 10.1042/BJ20011717.
- Friedlander, Ruth, Ernst Jarosch, Jörg Urban, Corinna Volkwein, and Thomas Sommer. 2000. "A Regulatory Link between ER-Associated Protein Degradation and the Unfolded-Protein Response." *Nature Cell Biology* 2(7):379–84. doi: 10.1038/35017001.
- Galea-Lauri, J., A. J. Richardson, D. S. Latchman, and D. R. Katz. 1996. "Increased Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Expression Leads to Increased Apoptosis in the Monoblastoid Cell Line U937 Following Induction with TNF-Alpha and Cycloheximide: A Possible Role in Immunopathology." *The Journal of Immunology* 157(9):4109–18.
- Gill, David J., Joanne Chia, Jamie Senewiratne, and Frederic Bard. 2010. "Regulation of O-Glycosylation through Golgi-to-ER Relocation of Initiation Enzymes." *The Journal of Cell Biology* 189(5):843–58. doi: 10.1083/jcb.201003055.
- Gill, David J., Keit Min Tham, Joanne Chia, Shyi Chyi Wang, Catharina Steentoft, Henrik Clausen, Emilie A. Bard-Chapeau, and Frederic A. Bard. 2013. "Initiation of GalNAc-Type O-Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum Promotes Cancer Cell Invasiveness." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(34):E3152-3161. doi: 10.1073/pnas.1305269110.
- Giraud, C. G., J. L. Daniotti, and H. J. Maccioni. 2001. "From the Cover: Physical and Functional Association of Glycolipid N-Acetyl-Galactosaminyl and Galactosyl Transferases in the Golgi Apparatus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(4):1625–30. doi: 10.1073/pnas.031458398.
- Giuffrè, G., E. Vitarelli, G. Tuccari, G. Barresi, and M. Ponz de Leon. 1996. "Detection of Tn, Sialosyl-Tn and T Antigens in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer." *Virchows Archiv* 429(6):344–52. doi: 10.1007/BF00198438.

- Goldner, J. 1938. "A Modification of the Masson Trichrome Technique for Routine Laboratory Purposes." *The American Journal of Pathology* 14(2).
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1991. "Perilipin, a Major Hormonally Regulated Adipocyte-Specific Phosphoprotein Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets." *The Journal of Biological Chemistry* 266(17):11341–46.
- Greene, Michael K., Karol Maskos, and Samuel J. Landry. 1998. "Role of the J-Domain in the Cooperation of Hsp40 with Hsp70." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(11):6108–13. doi: 10.1073/pnas.95.11.6108.
- Grippe, Paul J., Philip S. Fitchev, David J. Bentrem, Laleh G. Melstrom, Surabhi Dangi-Garimella, Seth B. Krantz, Michael J. Heiferman, Chuhan Chung, Kevin Adrian, Mona L. Cornwell, Jan B. Flesche, Sambasiva M. Rao, Mark S. Talamonti, Hidayatullah G. Munshi, and Susan E. Crawford. 2012. "Concurrent PEDF Deficiency and Kras Mutation Induce Invasive Pancreatic Cancer and Adipose-Rich Stroma in Mice." *Gut* 61(10):1454–64. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300821.
- Grippe, Paul J., Philip S. Fitchev, David J. Bentrem, Laleh G. Melstrom, Surabhi Dangi-Garimella, Seth B. Krantz, Michael J. Heiferman, Chuhan Chung, Kevin Adrian, Mona L. Cornwell, Jan B. Flesche, Sambasiva M. Rao, Mark S. Talamonti, Hidayatullah G. Munshi, and Susan E. Crawford. 2012. "Concurrent PEDF Deficiency and Kras Mutation Induce Invasive Pancreatic Cancer and Adipose-Rich Stroma in Mice." *Gut* 61(10):1454–64. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300821.
- Gukovskaya, Anna S., Ilya Gukovsky, Vjekoslav Zaninovic, Moon Song, Diana Sandoval, Sofiya Gukovsky, and Stephen J. Pandol. 1997. "Pancreatic Acinar Cells Produce, Release, and Respond to Tumor Necrosis Factor-Alpha. Role in Regulating Cell Death and Pancreatitis." *The Journal of Clinical Investigation* 100(7):1853–62. doi: 10.1172/JCI119714.
- Hard, W. L. 1946. "The Differentiation of Alpha and Beta Cells in the Pancreatic Islets of the Guinea Pig." *The Anatomical Record* 94:467.
- Harris, V. D., and W. J. Gow. 1893. "Note upon One or Two Points in the Comparative Histology of the Pancreas." *The Journal of Physiology* 15(4):349–60.
- Harrison, Kathleen A., Joshua Thaler, Samuel L. Pfaff, Hua Gu, and John H. Kehrl. 1999. "Pancreas Dorsal Lobe Agenesis and Abnormal Islets of Langerhans in Hlxb9-Deficient Mice." *Nature Genetics* 23(1):71–75. doi: 10.1038/12674.
- Hay, Nissim, and Nahum Sonenberg. 2004. "Upstream and Downstream of MTOR." *Genes & Development* 18(16):1926–45. doi: 10.1101/GAD.1212704.
- Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2008. "Shared Principles in NF-KB Signaling." *Cell* 132(3):344–62. doi: 10.1016/J.CELL.2008.01.020.
- Hebrok, M., S. K. Kim, and D. A. Melton. 1998. "Notochord Repression of Endodermal Sonic Hedgehog Permits Pancreas Development." *Genes & Development* 12(11):1705–13.
- Hershko, Avram, and Aaron Ciechanover. 1998. "The Ubiquitin System." *Annual*

- Review of Biochemistry* 67:425–79. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
- Hirashita, Teijiro, Yuka Hirashita, Yukio Iwashita, Yuichi Endo, Maki Kiyonaga, Shunro Matsumoto, Naoki Hijiya, Masatsugu Moriyama, Kazunari Murakami, and Masafumi Inomata. 2020. “S6 Ribosomal Protein Phosphorylation Is Associated with Malignancy of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas.” *Annals of Gastroenterological Surgery* 4(5):571. doi: 10.1002/AGS3.12367.
- Ho, Wan-Ling, Chih-Hsing Chou, Yung-Ming Jeng, Meng-Yao Lu, Yung-Li Yang, Shiann-Tarng Jou, Dong-Tsamn Lin, Hsiu-Hao Chang, Kai-Hsin Lin, Wen-Ming Hsu, and Min-Chuan Huang. 2014. “GALNT2 Suppresses Malignant Phenotypes through IGF-1 Receptor and Predicts Favorable Prognosis in Neuroblastoma.” *Oncotarget* 5(23):12247–59. doi: 10.18632/oncotarget.2627.
- Hoffmann, Marcus, Kristina Marx, Udo Reichl, Manfred Wuhrer, and Erdmann Rapp. 2016. “Site-Specific O-Glycosylation Analysis of Human Blood Plasma Proteins.” *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 15(2):624–41. doi: 10.1074/mcp.M115.053546.
- Holleboom, Adriaan G., Helen Karlsson, Ruei-Shiuan Lin, Thomas M. Beres, Jeroen A. Sierts, Daniel S. Herman, Erik S. G. Stroes, Johannes M. Aerts, John J. P. Kastelein, Mohammad M. Motazacker, Geesje M. Dallinga-Thie, Johannes H. M. Levels, Aeilko H. Zwinderman, Jonathan G. Seidman, Christine E. Seidman, Stefan Ljunggren, Dirk J. Lefeber, Eva Morava, Ron A. Wevers, Timothy A. Fritz, Lawrence A. Tabak, Mats Lindahl, G. Kees Hovingh, and Jan Albert Kuivenhoven. 2011. “Heterozygosity for a Loss-of-Function Mutation in GALNT2 Improves Plasma Triglyceride Clearance in Man.” *Cell Metabolism* 14(6):811–18. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.005.
- Hortin, Glen L. 1990. “Isolation of Glycopeptides Containing O-Linked Oligosaccharides by Lectin Affinity Chromatography on Jacalin-Agarose.” *Analytical Biochemistry* 191(2):262–67. doi: 10.1016/0003-2697(90)90217-W.
- Hu, Hai, Mingxing Tian, Chan Ding, and Shengqing Yu. 2019. “The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection.” *Frontiers in Immunology* 10(JAN):3083.
- Hua, Dong, Li Shen, Lan Xu, Zhi Jiang, Yinghui Zhou, Aihuan Yue, Shitao Zou, Zhihong Cheng, and Shiliang Wu. 2012. “Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 2 Regulates Cellular Metastasis-Associated Behavior in Gastric Cancer.” *International Journal of Molecular Medicine* 30(6):1267–74. doi: 10.3892/ijmm.2012.1130.
- Huang, Rongxiang, Zhang Hui, Sun Wei, Duan Li, Wencui Li, Wang Daping, and Murad Alahdal. 2022. “IRE1 Signaling Regulates Chondrocyte Apoptosis and Death Fate in the Osteoarthritis.” *Journal of Cellular Physiology* 237(1):118–27. doi: 10.1002/jcp.30537.
- Hwang, Jiwon, and Ling Qi. 2018. “Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR Pathways.” *Trends in Biochemical Sciences* 43(8):593. doi: 10.1016/J.TIBS.2018.06.005.
- Hyland, C., S. M. Kheir, and M. B. Kashlan. 1981. “Frozen Section Diagnosis of Pancreatic Carcinoma: A Prospective Study of 64 Biopsies.” *The American Journal of Surgical Pathology* 5(2):179–91. doi: 10.1097/00000478-

198103000-00007.

- Imberty, A., V. Piller, F. Piller, and C. Breton. 1997. "Fold Recognition and Molecular Modeling of a Lectin-like Domain in UDP-GalNac:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferases." *Protein Engineering* 10(12):1353–56.
- In, Kyungmin, Mohamad A. Zaini, Christine Müller, Alan J. Warren, Marieke Von Lindern, and Cornelis F. Calkhoven. 2016. "Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome (SBDS) Protein Deficiency Impairs Translation Re-Initiation from C/EBP α and C/EBP β MRNAs." *Nucleic Acids Research* 44(9):4134–46. doi: 10.1093/NAR/GKW005.
- Itzkowitz, S. H., E. J. Bloom, T. S. Lau, and Y. S. Kim. 1992. "Mucin Associated Tn and Sialosyl-Tn Antigen Expression in Colorectal Polyps." *Gut* 33(4):518–23.
- Itzkowitz, Steven, Thomas Kjeldsen, Annabelle Frieria, Sen-Itiroh Hakomori, Ung-Suk Yang, and Young S. Kim. 1991. "Expression of Tn, Sialosyl Tn, and T Antigens in Human Pancreas." *Gastroenterology* 100(6):1691–1700. doi: 10.1016/0016-5085(91)90671-7.
- Iwai, Toshie, Niro Inaba, Andreas Naundorf, Yan Zhang, Masanori Gotoh, Hiroko Iwasaki, Takashi Kudo, Akira Togayachi, Yasuko Ishizuka, Hiroshi Nakanishi, and Hisashi Narimatsu. 2002. "Molecular Cloning and Characterization of a Novel UDP-GlcNAc:GalNAc-Peptide B1,3- N-Acetylglucosaminyltransferase (B3Gn-T6), an Enzyme Synthesizing the Core 3 Structure of O-Glycans." *Journal of Biological Chemistry* 277(15):12802–9. doi: 10.1074/jbc.M112457200.
- Jaisser, F. 2000. "Inducible Gene Expression and Gene Modification in Transgenic Mice." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11 Suppl 16:S95–100.
- Jonsson, Jörgen, Lena Carlsson, Thomas Edlund, and Helena Edlund. 1994. "Insulin-Promoter-Factor 1 Is Required for Pancreas Development in Mice." *Nature* 371(6498):606–9. doi: 10.1038/371606a0.
- Ju, Tongzhong, Vivianne I. Otto, and Richard D. Cummings. 2011. "The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity." *Angewandte Chemie International Edition* 50(8):1770–91. doi: 10.1002/anie.201002313.
- Junqueira, L. C., G. Bignolas, and R. R. Brentani. 1979. "Picrosirius Staining plus Polarization Microscopy, a Specific Method for Collagen Detection in Tissue Sections." *The Histochemical Journal* 11(4):447–55.
- Kameda, Yoko, Chiho Hirota, and Ryosuke Miyauchi. 1993. "Staining of Pancreatic Centroacinar Cells, Liver Bile Canaliculi and Testicular Leydig Cells with a Monoclonal Antibody against Adrenocortical Cells." *Cell & Tissue Research* 272(3):407–16. doi: 10.1007/BF00318547.
- Kannel, W. B., T. R. Dawber, A. Kagan, N. Revotskie, and J. Stokes. 1961. "Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease--Six Year Follow-up Experience. The Framingham Study." *Annals of Internal Medicine* 55:33–50.
- Kathiresan, Sekar, Olle Melander, Candace Guiducci, Aarti Surti, Noël P. Burt, Mark J. Rieder, Gregory M. Cooper, Charlotta Roos, Benjamin F. Voight, Aki S. Havulinna, Björn Wahlstrand, Thomas Hedner, Dolores Corella, E. Shyong Tai, Jose M. Ordovas, Göran Berglund, Erkki Vartiainen, Pekka Jousilahti, Bo

- Hedblad, Marja-Riitta Taskinen, Christopher Newton-Cheh, Veikko Salomaa, Leena Peltonen, Leif Groop, David M. Altshuler, and Marju Orho-Melander. 2008. "Six New Loci Associated with Blood Low-Density Lipoprotein Cholesterol, High-Density Lipoprotein Cholesterol or Triglycerides in Humans." *Nature Genetics* 40(2):189–97. doi: 10.1038/ng.75.
- Kato, Kentaro, Lars Hansen, and Henrik Clausen. 2021. "Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-Associated Phenotypes in Mammals." *Molecules (Basel, Switzerland)* 26(18). doi: 10.3390/MOLECULES26185504.
- Kawaguchi, Yoshiya, Bonnie Cooper, Maureen Gannon, Michael Ray, Raymond J. MacDonald, and Christopher V. E. Wright. 2002. "The Role of the Transcriptional Regulator Ptf1a in Converting Intestinal to Pancreatic Progenitors." *Nature Genetics* 32(1):128–34. doi: 10.1038/ng959.
- Ketola, Ilkka, Timo Otonkoski, Mari-Anne Pulkkinen, Hannele Niemi, Jaan Palgi, Christina M. Jacobsen, David B. Wilson, and Markku Heikinheimo. 2004. "Transcription Factor GATA-6 Is Expressed in the Endocrine and GATA-4 in the Exocrine Pancreas." *Molecular and Cellular Endocrinology* 226(1–2):51–57. doi: 10.1016/j.mce.2004.06.007.
- Klaips, Courtney L., Michael H. M. Gropp, Mark S. Hipp, and F. Ulrich Hartl. 2020. "Sis1 Potentiates the Stress Response to Protein Aggregation and Elevated Temperature." *Nature Communications* 11(1):6271–6271. doi: 10.1038/s41467-020-20000-x.
- Klöppel, Ginter, and Bernard Maillet. 1993. "Pathology of Acute and Chronic Pancreatitis." *Pancreas* 8(6):659–70. doi: 10.1097/00006676-199311000-00001.
- Konska, G., M. Guerry, F. Caldefie-Chezet, M. De Latour, and J. Guillot. 2006. "Study of the Expression of Tn Antigen in Different Types of Human Breast Cancer Cells Using VVA-B4 Lectin." *Oncology Reports* 15(2):305–10.
- Kotera, Y., J. D. Fontenot, G. Pecher, R. S. Metzgar, and O. J. Finn. 1994. "Humoral Immunity against a Tandem Repeat Epitope of Human Mucin MUC-1 in Sera from Breast, Pancreatic, and Colon Cancer Patients." *Cancer Research* 54(11):2856–60.
- Krapp, A., M. Knöfler, B. Ledermann, K. Bürki, C. Berney, N. Zoerkler, O. Hagenbüchle, and P. K. Wellauer. 1998. "The BHLH Protein PTF1-P48 Is Essential for the Formation of the Exocrine and the Correct Spatial Organization of the Endocrine Pancreas." *Genes & Development* 12(23):3752–63.
- Kretowski, Adam, Edyta Adamska, Katarzyna Maliszewska, Natalia Wawrusiewicz-Kurylonek, Anna Citko, Joanna Goscik, Witold Bauer, Juliusz Wilk, Anna Golonko, Magdalena Waszczeniuk, Danuta Lipinska, Justyna Hryniewicka, Magdalena Niemira, Magdalena Paczkowska, Michal Ciborowski, and Maria Gorska. 2015. "The Rs340874 PROX1 Type 2 Diabetes Mellitus Risk Variant Is Associated with Visceral Fat Accumulation and Alterations in Postprandial Glucose and Lipid Metabolism." *Genes & Nutrition* 10(2):4. doi: 10.1007/S12263-015-0454-6.
- Langerhans, Paul. 1869. "Beiträge Zur Mikroskopischen Anatomie Der Bauchspeicheldrüse : Inaugural-Dissertation, Zur Erlangung Der Doctorwürde in Der Medicine Und Chirurgie Vorgelegt Der Medicinischen Facultät Der

Friedrich-Wilhelms-Universität Zu Berlin Und Öffentlich Zu Vertheid."
Friedrich-Wilhelms-Universität Berlin.

- Lattouf, Raed, Ronald Younes, Didier Lutomski, Nada Naaman, Gaston Godeau, Karim Senni, and Sylvie Changotade. 2014. "Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 62(10). doi: 10.1369/0022155414545787.
- Lee, Ann Hwee, Gerald C. Chu, Neal N. Iwakoshi, and Laurie H. Glimcher. 2005. "XBP-1 Is Required for Biogenesis of Cellular Secretory Machinery of Exocrine Glands." *EMBO Journal* 24(24):4368–80. doi: 10.1038/sj.emboj.7600903.
- Lee, Ann Hwee, Erez F. Scapa, David E. Cohen, and Laurie H. Glimcher. 2008. "Regulation of Hepatic Lipogenesis by the Transcription Factor XBP1." *Science* 320(5882):1492–96. doi: 10.1126/science.1158042.
- Lee, Dong Ki. 2005. "Natural Course and Medical Treatment of Chronic Pancreatitis." *The Korean Journal of Gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe Chi* 46(5):345–51.
- Leverly, Steven B., Catharina Steentoft, Adnan Halim, Yoshiki Narimatsu, Henrik Clausen, and Sergey Y. Vakhrushev. 2015. "Advances in Mass Spectrometry Driven O-Glycoproteomics." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850(1):33–42. doi: 10.1016/J.BBAGEN.2014.09.026.
- Li, Qiutang, and Inder M. Verma. 2002. "NF-KappaB Regulation in the Immune System." *Nature Reviews. Immunology* 2(10):725–34. doi: 10.1038/NRI910.
- Lin, Jonathan H., Peter Walter, and T. S. Benedic. Yen. 2008. "Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 3:399–425. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434.
- Lin, Mei Chun, Miao Juei Huang, Chiung Hui Liu, Tsung Lin Yang, and Min Chuan Huang. 2014. "GALNT2 Enhances Migration and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Regulating EGFR Glycosylation and Activity." *Oral Oncology* 50(5):478–84. doi: 10.1016/J.ORALONCOLOGY.2014.02.003.
- Longnecker, D. S. 1982. "Pathology and Pathogenesis of Diseases of the Pancreas." *The American Journal of Pathology* 107(1):103–21.
- Lotan, R., E. Skutelsky, D. Danon, and N. Sharon. 1975. "The Purification, Composition, and Specificity of the Anti T Lectin from Peanut (*Arachis Hypogaea*)." *Journal of Biological Chemistry* 250(21):8518–23. doi: 10.1016/s0021-9258(19)40790-4.
- Mahajan, Rohit, Christian Delphin, Tinglu Guan, Larry Gerace, and Frauke Melchior. 1997. "A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2." *Cell* 88(1):97–107. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81862-0.
- Mahmood, Tahrin, and Ping-Chang Yang. 2012. "Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting." *North American Journal of Medical Sciences* 4(9):429–34. doi: 10.4103/1947-2714.100998.
- Majumdar, Gipsy, Jeremiah Wright, Paul Markowitz, Antonio Martinez-Hernandez, Rajendra Raghov, and Solomon S. Solomon. 2004. "Insulin Stimulates and

- Diabetes Inhibits O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase and O-Glycosylation of Sp1." *Diabetes* 53(12):3184–92. doi: 10.2337/diabetes.53.12.3184.
- Malagolini, N., M. Chiricolo, M. Marini, and F. Dall'Olio. 2008. "Exposure of 2,6-Sialylated Lactosaminic Chains Marks Apoptotic and Necrotic Death in Different Cell Types." *Glycobiology* 19(2):172–81. doi: 10.1093/glycob/cwn122.
- Matsuda, Akiko, Naohiko Makino, Tomohiro Tozawa, Nakao Shirahata, Teiichiro Honda, Yushi Ikeda, Hideyuki Sato, Miho Ito, Yasuharu Kakizaki, Manabu Akamatsu, Yoshiyuki Ueno, and Sumio Kawata. 2014. "Pancreatic Fat Accumulation, Fibrosis, and Acinar Cell Injury in the Zucker Diabetic Fatty Rat Fed a Chronic High-Fat Diet." *Pancreas* 43(5):735–43. doi: 10.1097/MPA.000000000000129.
- Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes, and D. D. Wagner. 1993. "Leukocyte Rolling and Extravasation Are Severely Compromised in P Selectin-Deficient Mice." *Cell* 74(3):541–54.
- Mazzarella, R. A., M. Srinivasan, S. M. Haugejorden, and M. Green. 1990. "ERp72, an Abundant Luminal Endoplasmic Reticulum Protein, Contains Three Copies of the Active Site Sequences of Protein Disulfide Isomerase." *Journal of Biological Chemistry* 265(2):1094–1101. doi: 10.1016/s0021-9258(19)40163-4.
- McCarthy, Alun D., and D. Grahame Hardie. 1984. "Fatty Acid Synthase - an Example of Protein Evolution by Gene Fusion." *Trends in Biochemical Sciences* 9(2):60–63. doi: 10.1016/0968-0004(84)90184-1.
- McGuire, E. J., and S. Roseman. 1967. "Enzymatic Synthesis of the Protein-Hexosamine Linkage in Sheep Submaxillary Mucin." *The Journal of Biological Chemistry* 242(16):3745–47.
- Merino, Beatriz, Paloma Alonso-Magdalena, Mónica Lluesma, Patricia Ñeco, Alejandro Gonzalez, Laura Marroquí, Marta García-Arévalo, Angel Nadal, and Ivan Quesada. 2015. "Pancreatic Alpha-Cells from Female Mice Undergo Morphofunctional Changes during Compensatory Adaptations of the Endocrine Pancreas to Diet-Induced Obesity." *Scientific Reports* 5(1):11622. doi: 10.1038/srep11622.
- Meusser, Birgit, Christian Hirsch, Ernst Jarosch, and Thomas Sommer. 2005. "ERAD: The Long Road to Destruction." *Nature Cell Biology* 2005 7:8 7(8):766–72. doi: 10.1038/ncb0805-766.
- Mews, P., P. Phillips, R. Fahmy, M. Korsten, R. Pirola, J. Wilson, and M. Apte. 2002. "Pancreatic Stellate Cells Respond to Inflammatory Cytokines: Potential Role in Chronic Pancreatitis." *Gut* 50(4):535–41.
- Miller GJ, and Miller NE. 1975. "Plasma-High-Density-Lipoprotein Concentration and Development of Ischaemic Heart-Disease. - PubMed - NCBI." *The Lancet* 1(7897):16–19.
- Nair, Gopika G., Robert K. Vincent, and Jon S. Odorico. 2014. "Ectopic Ptf1a Expression in Murine ESCs Potentiates Endocrine Differentiation and Models Pancreas Development in Vitro." *Stem Cells* 32(5):1195–1207. doi: 10.1002/stem.1616.

- National Library of Medicine - National Institutes of Health. „GALNT2 polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 Homo sapiens (human)“ [Online im Internet] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2590>, [Stand: 14.01.2023, 19:00]
- Nelson, David, and Michael Cox. 2005. *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Neuburg, Elena. 2021. „Untersuchung Pankreatischer Alterationen Konditional Transgener Mausmodelle Mit Differentieller O-Glykosylierung Induziert Durch Cosmc-Knockout Und GalNT2-Überexpression.“
- Nguyen, Katherine, and Michael P. Lisanti. 2008. „Co-Expression of Fatty Acid Synthase and Caveolin-1 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Implications for Tumor Progression and Clinical Outcome Caveolin, Cholesterol and Vascular Diseases View Project Effective Immunity against Trypanosoma Cruzi by Vaccination View Project.“ *Article in Cell Cycle* 7:3021–25. doi: 10.4161/cc.7.19.6719.
- Ning, Zhang-Yong, Xin-Tao Wu, Yan-Fen Cheng, Wen-Bao Qi, Yu-Fu An, Heng Wang, Gui-Hong Zhang, and Shou-Jun Li. 2012. „Tissue Distribution of Sialic Acid-Linked Influenza Virus Receptors in Beagle Dogs.“ *Journal of Veterinary Science* 13(3):219–22.
- Nolte, Thomas, Patricia Brander-Weber, Charles Dangler, Ulrich Deschl, Michael R. Elwell, Peter Greaves, Richard Hailey, Michael W. Leach, Arun R. Pandiri, Arlin Rogers, Cynthia C. Shackelford, Andrew Spencer, Takuji Tanaka, and Jerrold M. Ward. 2016. „Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse.“ *Journal of Toxicologic Pathology* 29(1 Suppl):1S. doi: 10.1293/TOX.29.1S.
- Norman, James G., Gregory W. Fink, and Michael G. Franz. 1995. „Acute Pancreatitis Induces Intrapancreatic Tumor Necrosis Factor Gene Expression.“ *Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 130(9):966–70. doi: 10.1001/ARCHSURG.1995.01430090052018.
- Oeckinghaus, Andrea, and Sankar Ghosh. 2009. „The NF-KappaB Family of Transcription Factors and Its Regulation.“ *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(4).
- Oh, Won Keun, Lutfi Abu-Elheiga, Parichher Kordari, Zeiwei Gu, Tattym Shaikenov, Subrahmanyam S. Chirala, and Salih J. Wakil. 2005. „Glucose and Fat Metabolism in Adipose Tissue of Acetyl-CoA Carboxylase 2 Knockout Mice.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5):1384. doi: 10.1073/PNAS.0409451102.
- Okamura, Katsutomo, Yukio Kimata, Hironori Higashio, Akio Tsuru, and Kenji Kohno. 2000. „Dissociation of Kar2p/BiP from an ER Sensory Molecule, Ire1p, Triggers the Unfolded Protein Response in Yeast.“ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279(2):445–50. doi: 10.1006/bbrc.2000.3987.
- Oliver, Guillermo, Beatriz Sosa-Pineda, Sabine Geisendorf, Eric P. Spana, Chris Q. Doe, and Peter Gruss. 1993. „Prox 1, a Prospero-Related Homeobox Gene Expressed during Mouse Development.“ *Mechanisms of Development* 44(1):3–16. doi: 10.1016/0925-4773(93)90012-M.

- Olzmann, James A., Ron R. Kopito, and John C. Christianson. 2013. "The Mammalian Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation System." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(9). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A013185.
- Palade, G. 1975. "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis." *Science (New York, N. Y.)* 189(4200):347–58.
- Palombella, Vito J., Oliver J. Rando, Alfred L. Goldberg, and Tom Maniatis. 1994. "The Ubiquitinproteasome Pathway Is Required for Processing the NF-KB1 Precursor Protein and the Activation of NF-KB." *Cell* 78(5):773–85. doi: 10.1016/S0092-8674(94)90482-0.
- Pende, Mario, Sung Hee Um, Virginie Mieulet, Melanie Sticker, Valerie L. Goss, Jurgen Mestan, Matthias Mueller, Stefano Fumagalli, Sara C. Kozma, and George Thomas. 2004. "S6K1 $-/-$ / S6K2 $-/-$ Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine mRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway ." *Molecular and Cellular Biology* 24(8):3112–24. doi: 10.1128/MCB.24.8.3112-3124.2004/ASSET/0FA64BA1-1C64-463C-A47C-BF227F42BA32/ASSETS/GRAPHIC/ZMB0080410900006.JPEG.
- Phang, Wai Mei, Aik Aun Tan, Subash C. B. Gopinath, Onn H. Hashim, Lik Voon Kiew, and Yeng Chen. 2016. "Secretion of N- and O-Linked Glycoproteins from 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells." *International Journal of Medical Sciences* 13(5):330. doi: 10.7150/IJMS.14341.
- Piao, Xuehua, Baohai Liu, Lianyi Guo, Fanji Meng, and Leming Gao. 2017. "Picoside II Shows Protective Functions for Severe Acute Pancreatitis in Rats by Preventing NF- κ B-Dependent Autophagy." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. doi: 10.1155/2017/7085709.
- Piller, F., V. Piller, R. I. Fox, and M. Fukuda. 1988. "Human T-Lymphocyte Activation Is Associated with Changes in O-Glycan Biosynthesis." *The Journal of Biological Chemistry* 263(29):15146–50.
- Pincus, David, Michael W. Chevalier, Tomás Aragón, Eelco van Anken, Simon E. Vidal, Hana El-Samad, and Peter Walter. 2010. "BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response." *PLoS Biology* 8(7). doi: 10.1371/journal.pbio.1000415.
- Place, Robert F., Derek Haspeslagh, Andrea K. Hubbard, and Charles Giardina. 2001. "Cytokine-Induced Stabilization of Newly Synthesized I κ B- α ." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283(4):813–20. doi: 10.1006/bbrc.2001.4883.
- Plempner, Richard K., and Dieter H. Wolf. 1999. *Endoplasmic Reticulum Degradation. Reverse Protein Transport and Its End in the Proteasome*. Vol. 26.
- Poiroux, Guillaume, Annick Barre, Els J. M. van Damme, Hervé Benoist, and Pierre Rougé. 2017. "Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy." *International Journal of Molecular Sciences* 18(6). doi: 10.3390/IJMS18061232.
- Porse, Bo T., Thomas Å. Pedersen, Xiufeng Xu, Bo Lindberg, Ulla M. Wewer, Lennart Friis-Hansen, and Claus Nerlov. 2001. "E2F Repression by C/EBP α

- Is Required for Adipogenesis and Granulopoiesis in Vivo.” *Cell* 107(2):247–58. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00516-5.
- Principe, Daniel R., Brian DeCant, Andrew M. Diaz, Riley J. Mangan, Rosa Hwang, Andrew Lowy, Brandon B. Shetuni, Bharath K. Sreekumar, Chuhan Chung, David J. Bentrem, Hidayatullah G. Munshi, Barbara Jung, Paul J. Grippo, and Faraz Bishehsari. 2016. “PEDF Inhibits Pancreatic Tumorigenesis by Attenuating the Fibroinflammatory Reaction.” *Oncotarget* 7(19):28218–34. doi: 10.18632/oncotarget.8587.
- Procino, Alfredo. 2014. “Overexpression of Prox-1 Gene in Omental Adipose Tissue and Adipocytes Compared with Subcutaneous Adipose Tissue and Adipocytes in Healthy Patients.” *Cell Biology International* 38(7):888–91. doi: 10.1002/cbin.10273.
- Radhakrishnan, Prakash, Sally Dabelsteen, Frey Brus Madsen, Chiara Francavilla, Katharina L. Kopp, Catharina Steentoft, Sergey Y. Vakhrushev, Jesper V Olsen, Lars Hansen, Eric P. Bennett, Anders Woetmann, Guangliang Yin, Longyun Chen, Haiyan Song, Mads Bak, Ryan A. Hlady, Staci L. Peters, Rene Opavsky, Christenze Thode, Klaus Qvortrup, Katrine T. B. G. Schjoldager, Henrik Clausen, Michael A. Hollingsworth, and Hans H. Wandall. 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.
- Ramírez-Domínguez, Miriam. 2016. “Historical Background of Pancreatic Islet Isolation.” Pp. 1–9 in *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 938.
- Ren, Zhenhua, Xin Wang, Mei Xu, Fanmuyi Yang, Jacqueline A. Frank, Zun Ji Ke, and Jia Luo. 2016. “Binge Ethanol Exposure Causes Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress and Tissue Injury in the Pancreas.” *Oncotarget* 7(34):54303–16. doi: 10.18632/oncotarget.11103.
- Ritter, Christiane, and Ari Helenius. 2000. “Recognition of Local Glycoprotein Misfolding by the ER Folding Sensor UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase.” *Nature Structural Biology* 7(4):278–80. doi: 10.1038/74035.
- Romero-Calvo, Isabel, Borja Ocón, Patricia Martínez-Moya, María Dolores Suárez, Antonio Zarzuelo, Olga Martínez-Augustin, and Fermín Sánchez de Medina. 2010. “Reversible Ponceau Staining as a Loading Control Alternative to Actin in Western Blots.” *Analytical Biochemistry* 401(2):318–20. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036.
- Ron, D., and J. F. Habener. 1992. “CHOP, a Novel Developmentally Regulated Nuclear Protein That Dimerizes with Transcription Factors C/EBP and LAP and Functions as a Dominant-Negative Inhibitor of Gene Transcription.” *Genes and Development* 6(3):439–53. doi: 10.1101/gad.6.3.439.
- Röttger, S., J. White, H. H. Wandall, J. C. Olivo, A. Stark, E. P. Bennett, C. Whitehouse, E. G. Berger, H. Clausen, and T. Nilsson. 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.

- Ruvinsky, Igor, Nitzan Sharon, Tal Lerer, Hannah Cohen, Miri Stolovich-Rain, Tomer Nir, Yuval Dor, Philip Zisman, and Oded Meyuhas. 2005. "Ribosomal Protein S6 Phosphorylation Is a Determinant of Cell Size and Glucose Homeostasis." *Genes and Development* 19(18):2199–2211. doi: 10.1101/gad.351605.
- Sadler, Thomas W. 2014. *Taschenlehrbuch Embryologie : Die Normale Menschliche Entwicklung Und Ihre Fehlbildungen*. 12. Auflag. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag.
- Sah, Raghuwansh P., Sushil K. Garg, Ajay K. Dixit, Vikas Dudeja, Rajinder K. Dawra, and Ashok K. Saluja. 2014. "Endoplasmic Reticulum Stress Is Chronically Activated in Chronic Pancreatitis." *The Journal of Biological Chemistry* 289(40):27551. doi: 10.1074/JBC.M113.528174.
- Samkharadze, Tamar, Mert Erkan, Carolin Reiser-Erkan, Ihsan Ekin Demir, Bo Kong, Güralp O. Ceyhan, Christoph W. Michalski, Irene Esposito, Helmut Friess, and Jörg Kleeff. 2011. "Pigment Epithelium-Derived Factor Associates With Neuropathy and Fibrosis in Pancreatic Cancer." *American Journal of Gastroenterology* 106(5):968–80. doi: 10.1038/ajg.2010.479.
- Sanchez, Y., D. A. Parsell, J. Taulien, J. L. Vogel, E. A. Craig, and S. Lindquist. 1993. "Genetic Evidence for a Functional Relationship between Hsp104 and Hsp70." *Journal of Bacteriology* 175(20):6484–91. doi: 10.1128/jb.175.20.6484-6491.1993.
- Sander, M., A. Neubüser, J. Kalamaras, H. C. Ee, G. R. Martin, and M. S. German. 1997. "Genetic Analysis Reveals That PAX6 Is Required for Normal Transcription of Pancreatic Hormone Genes and Islet Development." *Genes & Development* 11(13):1662–73.
- Schjoldager, Katrine T. B. G., Malene B. Vester-Christensen, Eric Paul Bennett, Steven B. Levery, Tilo Schwientek, Wu Yin, Ola Blixt, and Henrik Clausen. 2010. "O-Glycosylation Modulates Proprotein Convertase Activation of Angiopoietin-like Protein 3: Possible Role of Polypeptide GalNAc-Transferase-2 in Regulation of Concentrations of Plasma Lipids." *The Journal of Biological Chemistry* 285(47):36293–303. doi: 10.1074/jbc.M110.156950.
- Schulze-Luehrmann, Jan, and Sankar Ghosh. 2006. "Antigen-Receptor Signaling to Nuclear Factor KB." *Immunity* 25(5):701–15. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2006.10.010.
- Schünke, Michael, Erik Schulte, and Udo Schumacher. 2018. *Innere Organe - PROMETHEUS LernAtlas Der Anatomie*. 5. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Sendler, Matthias, Georg Beyer, Ujjwal M. Mahajan, Vivien Kauschke, Sandrina Maertin, Claudia Schurmann, Georg Homuth, Uwe Völker, Henry Völzke, Walter Halangk, Thomas Wartmann, Frank Ulrich Weiss, Peter Hegyi, Markus M. Lerch, and Julia Mayerle. 2015. "Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis." *Gastroenterology* 149(3):765e10-776e10. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.012.
- Serafini-Cessi, F., F. Dall'Olio, M. Scannavini, F. Costanzo, and G. Campadelli-Fiume. 1983. "N-Acetylgalactosaminyltransferase Activity Involved in O-Glycosylation of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins." *Journal of*

- Virology* 48(1):325–29. doi: 10.1128/JVI.48.1.325-329.1983.
- Shi, S. R., M. E. Key, and K. L. Kalra. 1991. “Antigen Retrieval in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections.” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 39(6). doi: 10.1177/39.6.1709656.
- Shi, Shan Rong, Richard J. Cote, and Clive R. Taylor. 1997. “Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future.” *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45(3).
- Shimamura, Mitsuru, Morihiro Matsuda, Hiroaki Yasumo, Mitsuyo Okazaki, Kazunori Fujimoto, Keita Kono, Tetsuya Shimizugawa, Yosuke Ando, Ryuta Koishi, Takafumi Kohama, Naohiko Sakai, Kazuaki Kotani, Ryutaro Komuro, Tatsuo Ishida, Kenichi Hirata, Shizuya Yamashita, Hidehiko Furukawa, and Ichihiro Shimomura. 2007. “Angiopoietin-Like Protein3 Regulates Plasma HDL Cholesterol Through Suppression of Endothelial Lipase.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(2):366–72. doi: 10.1161/01.ATV.0000252827.51626.89.
- Shimizu, M., and K. Yamauchi. 1982. “Isolation and Characterization of Mucin-like Glycoprotein in Human Milk Fat Globule Membrane.” *Journal of Biochemistry* 91(2):515–24.
- Sidrauski, Carmela, and Peter Walter. 1997. “The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response.” *Cell* 90(6):1031–39. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80369-4.
- Sikkeland, Jørgen, Torstein Lindstad, Hatice Zeynep Nenseth, Xavier Dezitter, Su Qu, Ridhwan M. Muhumed, Meric Erikci Ertunc, Margaret F. Gregor, and Fahri Saatcioglu. 2019. “Inflammation and ER Stress Differentially Regulate STAMP2 Expression and Localization in Adipocytes.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 93:75–85. doi: 10.1016/j.metabol.2019.01.014.
- Sosa-Pineda, Beatriz, Kamal Chowdhury, Miguel Torres, Guillermo Oliver, and Peter Gruss. 1997. “The Pax4 Gene Is Essential for Differentiation of Insulin-Producing β Cells in the Mammalian Pancreas.” *Nature* 386(6623):399–402. doi: 10.1038/386399a0.
- Southwell, N. 1944. “The Diagnosis of Chronic Pancreatitis.” *Postgraduate Medical Journal* 20(226):250–55.
- 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, Timothy A. 1994. “Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm.” *Cell* 76(2):301–14. doi: 10.1016/0092-8674(94)90337-9.
- St-Onge, Luc, Beatriz Sosa-Pineda, Kamal Chowdhury, Ahmed Mansouri, and Peter Gruss. 1997. “Pax6 Is Required for Differentiation of Glucagon-Producing α -Cells in Mouse Pancreas.” *Nature* 387(6631):406–9. doi: 10.1038/387406a0.
- Van Den Steen, Philippe, Pauline M. Rudd, Raymond A. Dwek, and Ghislain

- Opdenakker. 1998. "Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33(3):151–208. doi: 10.1080/10409239891204198.
- Storniolo, Antonello, Vincenzo Alfano, Sabino Carbotta, Elisabetta Ferretti, and Livia Di Renzo. 2018. "IRE1 α Deficiency Promotes Tumor Cell Death and EIF2 α Degradation through PERK Dependent Autophagy." *Cell Death Discovery* 2018 4:1 4(1):1–12. doi: 10.1038/s41420-017-0002-9.
- Storrie, Brian, Jamie White, Sabine Röttger, Ernst H. K. Stelzer, Tatsuo Suganuma, and Tommy Nilsson. 1998. "Recycling of Golgi-Resident Glycosyltransferases through the ER Reveals a Novel Pathway and Provides an Explanation for Nocodazole-Induced Golgi Scattering." *Journal of Cell Biology* 143(6):1505–21. doi: 10.1083/jcb.143.6.1505.
- Strous, G. J. 1979. "Initial Glycosylation of Proteins with Acetylgalactosaminylserine Linkages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(6):2694–98.
- Sugiura, M., T. Kawasaki, and I. Yamashina. 1982. "Purification and Characterization of UDP-GalNAc:Polypeptide N-Acetylgalactosamine Transferase from an Ascites Hepatoma, AH 66." *The Journal of Biological Chemistry* 257(16):9501–7.
- Sung, C. K., and J. A. Williams. 1989. "Insulin and Ribosomal Protein S6 Kinase in Rat Pancreatic Acini." *Diabetes* 38(5):544–49. doi: 10.2337/diab.38.5.544.
- Sutherland, E. W., and C. De Duve. 1948. "Origin and Distribution of the Hyperglycemic-Glycogenolytic Factor of the Pancreas." *The Journal of Biological Chemistry* 175(2):663–74.
- Sutherland, Marie E., Isao Nishimori, Thomas Caffrey, Eric P. Bennett, Helle Hassan, Ulla Mandel, David Mack, Takeshi Iwamura, Henrik Clausen, and Michael A. Hollingsworth. 1997. "Expression of Three UDP-N-Acetyl- α -d-Galactosamine:Polypeptide GalNAc N-Acetylgalactosaminyltransferases in Adenocarcinoma Cell Lines." *Cancer Research* 57(21):4744–48.
- Sztalryd, Carole, and Dawn L. Brasaemle. 2017. "The Perilipin Family of Lipid Droplet Proteins: Gatekeepers of Intracellular Lipolysis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1862(10 Pt B):1221. doi: 10.1016/J.BBALIP.2017.07.009.
- Taboas, J. O., and R. J. Ceremsak. 1967. "A Rapid Hematoxylin and Eosin Stain." *Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists* 37(4). doi: 10.1093/ajcp/47.5_ts.689.
- Taniuchi, K., R. L. Cerny, A. Tanouchi, K. Kohno, N. Kotani, K. Honke, T. Saibara, and M. A. Hollingsworth. 2011. "Overexpression of GalNAc-Transferase GalNAc-T3 Promotes Pancreatic Cancer Cell Growth." *Oncogene* 30(49):4843–54. doi: 10.1038/onc.2011.194.
- Terada, T., and Y. Nakanuma. 1996. "Expression of Mucin Carbohydrate Antigens (T, Tn and Sialyl Tn) and MUC-1 Gene Product in Intraductal Papillary-Mucinous Neoplasm of the Pancreas." *American Journal of Clinical Pathology* 105(5):613–20.
- Teslovich, Tanya M., Kiran Musunuru, Albert V Smith, Andrew C. Edmondson, Ioannis M. Stylianou, Masahiro Koseki, James P. Pirruccello, Samuli Ripatti, Daniel I. Chasman, Cristen J. Willer, Christopher T. Johansen, Sigrid W.

Fouchier, Aaron Isaacs, Gina M. Peloso, Maja Barbalic, Sally L. Ricketts, Joshua C. Bis, Yurii S. Aulchenko, Gudmar Thorleifsson, Mary F. Feitosa, John Chambers, Marju Orho-Melander, Olle Melander, Toby Johnson, Xiaohui Li, Xiuqing Guo, Mingyao Li, Yoon Shin Cho, Min Jin Go, Young Jin Kim, Jong-Young Lee, Taesung Park, Kyunga Kim, Xueling Sim, Rick Twee-Hee Ong, Damien C. Croteau-Chonka, Leslie A. Lange, Joshua D. Smith, Kijoung Song, Jing Hua Zhao, Xin Yuan, Jian'an Luan, Claudia Lamina, Andreas Ziegler, Weihua Zhang, Robert Y. L. Zee, Alan F. Wright, Jacqueline C. M. Witteman, James F. Wilson, Gonneke Willemsen, H. Erich Wichmann, John B. Whitfield, Dawn M. Waterworth, Nicholas J. Wareham, Gérard Waeber, Peter Vollenweider, Benjamin F. Voight, Veronique Vitart, Andre G. Uitterlinden, Manuela Uda, Jaakko Tuomilehto, John R. Thompson, Toshiko Tanaka, Ida Surakka, Heather M. Stringham, Tim D. Spector, Nicole Soranzo, Johannes H. Smit, Juha Sinisalo, Kaisa Silander, Eric J. G. Sijbrands, Angelo Scuteri, James Scott, David Schlessinger, Serena Sanna, Veikko Salomaa, Juha Saharinen, Chiara Sabatti, Aimo Ruokonen, Igor Rudan, Lynda M. Rose, Robert Roberts, Mark Rieder, Bruce M. Psaty, Peter P. Pramstaller, Irene Pichler, Markus Perola, Brenda W. J. H. Penninx, Nancy L. Pedersen, Cristian Pattaro, Alex N. Parker, Guillaume Pare, Ben A. Oostra, Christopher J. O'Donnell, Markku S. Nieminen, Deborah A. Nickerson, Grant W. Montgomery, Thomas Meitinger, Ruth McPherson, Mark I. McCarthy, Wendy McArdle, David Masson, Nicholas G. Martin, Fabio Marroni, Massimo Mangino, Patrik K. E. Magnusson, Gavin Lucas, Robert Luben, Ruth J. F. Loos, Marja-Liisa Lokki, Guillaume Lettre, Claudia Langenberg, Lenore J. Launer, Edward G. Lakatta, Reijo Laaksonen, Kirsten O. Kyvik, Florian Kronenberg, Inke R. König, Kay-Tee Khaw, Jaakko Kaprio, Lee M. Kaplan, Asa Johansson, Marjo-Riitta Jarvelin, A. Cecile J. W. Janssens, Erik Ingelsson, Wilmar Igl, G. Kees Hovingh, Jouke-Jan Hottenga, Albert Hofman, Andrew A. Hicks, Christian Hengstenberg, Iris M. Heid, Caroline Hayward, Aki S. Havulinna, Nicholas D. Hastie, Tamara B. Harris, Talin Haritunians, Alistair S. Hall, Ulf Gyllensten, Candace Guiducci, Leif C. Groop, Elena Gonzalez, Christian Gieger, Nelson B. Freimer, Luigi Ferrucci, Jeanette Erdmann, Paul Elliott, Kenechi G. Ejebe, Angela Döring, Anna F. Dominiczak, Serkalem Demissie, Panagiotis Deloukas, Eco J. C. de Geus, Ulf de Faire, Gabriel Crawford, Francis S. Collins, Yii-der I. Chen, Mark J. Caulfield, Harry Campbell, Noel P. Burt, Lori L. Bonnycastle, Dorret I. Boomsma, S. Matthijs Boekholdt, Richard N. Bergman, Inês Barroso, Stefania Bandinelli, Christie M. Ballantyne, Themistocles L. Assimes, Thomas Quertermous, David Altshuler, Mark Seielstad, Tien Y. Wong, E. Shyong Tai, Alan B. Feranil, Christopher W. Kuzawa, Linda S. Adair, Herman A. Taylor, Ingrid B. Borecki, Stacey B. Gabriel, James G. Wilson, Hilma Holm, Unnur Thorsteinsdottir, Vilmundur Gudnason, Ronald M. Krauss, Karen L. Mohlke, Jose M. Ordovas, Patricia B. Munroe, Jaspal S. Kooner, Alan R. Tall, Robert A. Hegele, John J. P. Kastelein, Eric E. Schadt, Jerome I. Rotter, Eric Boerwinkle, David P. Strachan, Vincent Mooser, Kari Stefansson, Muredach P. Reilly, Nilesh J. Samani, Heribert Schunkert, L. Adrienne Cupples, Manjinder S. Sandhu, Paul M. Ridker, Daniel J. Rader, Cornelia M. van Duijn, Leena Peltonen, Gonçalo R. Abecasis, Michael Boehnke, Sekar Kathiresan, Leena Peltonen, Gonçalo R. Abecasis, Michael Boehnke, and Sekar Kathiresan. 2010. "Biological, Clinical and Population Relevance of 95 Loci for Blood Lipids." *Nature* 466(7307):707–13. doi: 10.1038/nature09270.

- Thorburn, Andrew. 2008. "Apoptosis and Autophagy: Regulatory Connections between Two Supposedly Different Processes." *Apoptosis* 13(1):1–9. doi: 10.1007/s10495-007-0154-9.
- Tian, E., and Kelly G. Ten Hagen. 2009. "Recent Insights into the Biological Roles of Mucin-Type O-Glycosylation." *Glycoconjugate Journal* 26(3):325–34. doi: 10.1007/s10719-008-9162-4.
- Tiano, Joseph P., and Franck Mauvais-Jarvis. 2012. "Molecular Mechanisms of Estrogen Receptors' Suppression of Lipogenesis in Pancreatic β -Cells." *Endocrinology* 153(7):2997. doi: 10.1210/EN.2011-1980.
- Tourlakis, Marina E., Jian Zhong, Rikesh Gandhi, Siyi Zhang, Lingling Chen, Peter R. Durie, and Johanna M. Rommens. 2012. "Deficiency of Sbds in the Mouse Pancreas Leads to Features of Shwachman-Diamond Syndrome, with Loss of Zymogen Granules." *Gastroenterology* 143(2):481–92. doi: 10.1053/j.gastro.2012.04.012.
- Tsuchitani, Minoru, Junko Sato, and Hiroko Kokoshima. 2016. "A Comparison of the Anatomical Structure of the Pancreas in Experimental." *Journal of Toxicologic Pathology* 29(3):147. doi: 10.1293/TOX.2016-0016.
- Tsuru, Akio, Naoko Fujimoto, Satsuki Takahashi, Michiko Saito, Daisuke Nakamura, Megumi Iwano, Takao Iwawaki, Hiroshi Kadokura, David Ron, and Kenji Kohno. 2013. "Negative Feedback by IRE1 β Optimizes Mucin Production in Goblet Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(8):2864–69. doi: 10.1073/PNAS.1212484110/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Uliana, Andrea S., Claudio G. Giraudo, and Hugo J. F. Maccioni. 2006. "Cytoplasmic Tails of SialT2 and GalNAcT Impose Their Respective Proximal and Distal Golgi Localization." *Traffic* 7(5):604–12. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00413.x.
- Upadhaya, Ritika, Wataru Mizunoya, and Judy E. Anderson. 2011. "Detecting Multiple Proteins by Western Blotting Using Same-Species Primary Antibodies, Precomplexed Serum, and Hydrogen Peroxide." *Analytical Biochemistry* 419(2):342–44. doi: 10.1016/j.ab.2011.08.014.
- Varki, Ajit. 2017. "Biological Roles of Glycans." *Glycobiology* 27(1). doi: 10.1093/GLYCOB/CWW086.
- Volmer, Romain, and David Ron. 2015. "Lipid-Dependent Regulation of the Unfolded Protein Response." *Current Opinion in Cell Biology* 33:67–73.
- Wakil, Salih J. 1986. "The Relationship between Structure and Function for and the Regulation of the Enzymes of Fatty Acid Synthesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 478(1):203–19. doi: 10.1111/J.1749-6632.1986.TB15532.X.
- Walter, Peter, and David Ron. 2011. "The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation." *Science* 334(6059):1081–86. doi: 10.1126/SCIENCE.1209038/ASSET/238BD530-CE66-4C19-BA32-FC13641E3646/ASSETS/GRAPHIC/334_1081_F3.JPEG.
- Wang, Junfeng, Gamze Kilic, Muge Aydin, Zoe Burke, Guillermo Oliver, and Beatriz Sosa-Pineda. 2005. "Prox1 Activity Controls Pancreas Morphogenesis and Participates in the Production of 'Secondary Transition' Pancreatic

- Endocrine Cells." *Developmental Biology* 286(1):182–94. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.07.021.
- Wang, Xiaorong, James Yen, Peter Kaiser, and Lan Huang. 2010. "Regulation of the 26S Proteasome Complex during Oxidative Stress." *Science Signaling* 3(151):ra88. doi: 10.1126/scisignal.2001232.
- Wang, Zhao V., Yingfeng Deng, Ningguo Gao, Zully Pedrozo, Dan L. Li, Cyndi R. Morales, Alfredo Criollo, Xiang Luo, Wei Tan, Nan Jiang, Mark A. Lehrman, Beverly A. Rothermel, Ann Hwee Lee, Sergio Lavandero, Pradeep P. A. Mammen, Anwarul Ferdous, Thomas G. Gillette, Philipp E. Scherer, and Joseph A. Hill. 2014. "Spliced X-Box Binding Protein 1 Couples the Unfolded Protein Response to Hexosamine Biosynthetic Pathway." *Cell* 156(6):1179. doi: 10.1016/J.CELL.2014.01.014.
- Welsch, Ulrich, Thomas Deller, and Wolfgang Kummer. 2014. *Lehrbuch Histologie*. 4. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Westmoreland, Joby J., Gamze Kilic, Caroline Sartain, Sema Sirma, Jennifer Blain, Jerold Rehg, Natasha Harvey, and Beatriz Sosa-Pineda. 2012. "Pancreas-Specific Deletion of Prox1 Affects Development and Disrupts Homeostasis of the Exocrine Pancreas." *Gastroenterology* 142(4):1009. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.007.
- Wharton, G. K. 1934. "The Clinical Aspects of the Histology and Pathology of the Pancreas." *Canadian Medical Association Journal* 30(2):148–52.
- White, T., E. P. Bennett, K. Takio, T. Sørensen, N. Bonding, and H. Clausen. 1995. "Purification and cDNA Cloning of a Human UDP-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase." *The Journal of Biological Chemistry* 270(41):24156–65.
- Wiech, Hans, Johannes Buchner, Richard Zimmermann, and Ursula Jakob. 1992. "Hsp90 Chaperones Protein Folding in Vitro." *Nature* 358(6382):169–70. doi: 10.1038/358169a0.
- Wilkins, P. P., R. P. McEver, and R. D. Cummings. 1996. "Structures of the O-Glycans on P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 from HL-60 Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 271(31):18732–42.
- Winzler, R. J., E. D. Harris, D. J. Pekas, C. A. Johnson, and P. Weber. 1967. "Studies on Glycopeptides Released by Trypsin from Intact Human Erythrocytes." *Biochemistry* 6(7):2195–2202.
- Witt, Heiko. 2013. "Physiologie Und Embryologie Des Pankreas." Pp. 547–55 in *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. Springer Berlin Heidelberg.
- Wolters-Eisfeld, Gerrit, and Udo Schumacher. 2017. "Lectin Histochemistry for Metastasizing and Non-Metastasizing Cancer Cells." Pp. 121–32 in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Vol. 1560.
- Wu, Nan, Xiao Fan Xu, Jia Qi Xin, Jian Wei Fan, Yuan Yuan Wei, Qing Xia Peng, Li Fang Duan, Wei Wang, and Hong Zhang. 2021. "The Effects of Nuclear Factor-Kappa B in Pancreatic Stellate Cells on Inflammation and Fibrosis of Chronic Pancreatitis." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25(4):2213–27. doi: 10.1111/JCMM.16213.
- Wu, Y. M., C. H. Liu, R. H. Hu, M. J. Huang, J. J. Lee, C. H. Chen, J. Huang, H. S.

- Lai, P. H. Lee, W. M. Hsu, H. C. Huang, and M. C. Huang. 2011. "Mucin Glycosylating Enzyme GALNT2 Regulates the Malignant Character of Hepatocellular Carcinoma by Modifying the EGF Receptor." *Cancer Research* 71(23):7270–79. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1161.
- Xia, Lijun, Tongzhong Ju, Andrew Westmuckett, Guangyu An, Lacramioara Ivanciu, J. Michael McDaniel, Florea Lupu, Richard D. Cummings, and Rodger P. McEver. 2004. "Defective Angiogenesis and Fatal Embryonic Hemorrhage in Mice Lacking Core 1-Derived O-Glycans." *The Journal of Cell Biology* 164(3):451–59. doi: 10.1083/jcb.200311112.
- Xue, Jing, Vishal Sharma, Michael H. Hsieh, Ajay Chawla, Ramachandran Murali, Stephen J. Pandol, and Aida Habtezion. 2015. "Alternatively Activated Macrophages Promote Pancreatic Fibrosis in Chronic Pancreatitis." *Nature Communications* 6(1):7158. doi: 10.1038/ncomms8158.
- Yang, Weiming, Minghui Ao, Yingwei Hu, Qing Kay Li, and Hui Zhang. 2018. "Mapping the O-glycoproteome Using Site-specific Extraction of O-linked Glycopeptides (EXoO)." *Molecular Systems Biology* 14(11):8486. doi: 10.15252/MSB.20188486.
- Ye, Cui Fang, and He Li. 2009. "HSP40 Ameliorates Impairment of Insulin Secretion by Inhibiting Huntingtin Aggregation in a HD Pancreatic Beta Cell Model." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(8):1787–92. doi: 10.1271/BBB.90147.
- Yeaman, C., A. H. Le Gall, A. N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. Le Bivic, and E. Rodriguez-Boulan. 1997. "The O-Glycosylated Stalk Domain Is Required for Apical Sorting of Neurotrophin Receptors in Polarized MDCK Cells." *The Journal of Cell Biology* 139(4):929–40.
- Yoshida, Hiderou, Toshie Matsui, Akira Yamamoto, Tetsuya Okada, and Kazutoshi Mori. 2001. "XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor." *Cell* 107(7):881–91. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00611-0.
- Yoshida, Hiderou, Masaya Oku, Mie Suzuki, and Kazutoshi Mori. 2006. "PXBP1(U) Encoded in XBP1 Pre-mRNA Negatively Regulates Unfolded Protein Response Activator PXBP1(S) in Mammalian ER Stress Response." *Journal of Cell Biology* 172(4):565–75. doi: 10.1083/jcb.200508145.
- Yu, Yilin, Zhiping Wang, Qunhao Zheng, and Jiancheng Li. 2021. "GALNT2/14 Overexpression Correlate with Prognosis and Methylation: Potential Therapeutic Targets for Lung Adenocarcinoma." *Gene* 790. doi: 10.1016/J.GENE.2021.145689.
- Zandi, Ebrahim, David M. Rothwarf, Mireille Delhase, Makio Hayakawa, and Michael Karin. 1997. "The I κ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK α and IKK β , Necessary for I κ B Phosphorylation and NF- κ B Activation." *Cell* 91(2):243–52. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80406-7.
- Zeeshan, Hafiz Maher Ali, Geum Hwa Lee, Hyung Ryong Kim, and Han Jung Chae. 2016. "Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS." *International Journal of Molecular Sciences* 17(3):327–327.
- Zhang, Jielei, Nengguang Fan, and Yongde Peng. 2018. "Heat Shock Protein 70 Promotes Lipogenesis in HepG2 Cells." *Lipids in Health and Disease* 17(1).

doi: 10.1186/s12944-018-0722-8.

Zhang, Jing, Peter ten Dijke, Manfred Wuhler, and Tao Zhang. 2021. "Role of Glycosylation in TGF- β Signaling and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer." *Protein & Cell* 12(2):89. doi: 10.1007/S13238-020-00741-7.

Zinovieva, Rina D., Melinda K. Duncan, Todd R. Johnson, Rosarelis Torres, Mihael H. Polymeropoulos, and Stanislav I. Tomarev. 1996. "Structure and Chromosomal Localization of the Human Homeobox Gene Prox 1." *Genomics* 35(3):517–22. doi: 10.1006/geno.1996.0392.

9. Danksagung

Besonderer Dank bei der Erarbeitung dieser Dissertation gebührt sowohl dem amtierenden Klinikdirektor Prof. Dr. med. Thilo Hackert sowie dem ehemaligen Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie und Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki sowie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Bockhorn.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Gerrit Wolters-Eisfeld für die fachlich äußerst kompetente Unterstützung bedanken. Es war mir eine große Hilfe, mit Herrn Dr. Wolters-Eisfeld bei der Betreuung sowie der Supervision des Projektes zusammenzuarbeiten. Zudem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. Baris Mercanoglu für die fachkundigen, regelmäßigen Reevaluationen der Ergebnisse bedanken. Zudem gilt der gesamten wissenschaftlichen Arbeitsgruppe der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie ein ausdrücklicher Dank, insbesondere Dr. rer. nat. Cenap Güngör (Forschungsgruppenleiter), Petra und Petra.

Ich möchte zusätzlich einen herzlichen Dank an Frau Kristin Hartmann vom Zentrum für Diagnostik und vom Institut für Neuropathologie des UKE aussprechen, welche uns methodische Unterstützung beim Anfertigen der Paraffinschnitte sowie Picro-Siriusrot-Färbung und Masson-Goldner Färbung zukommen lassen hat.

Zudem möchte ich meinen geschätzten Freunden Maya, Lelia, Hannah, Ina, Sven, Michael, Max und Ludwig für den gemeinsamen Weg während des Medizinstudiums danken.

10. Lebenslauf Sissy-Alina Waschkowski

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Tab. 16 , entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11. 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: