

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Leitung: Prof. Dr. med. Dr. h. c. J. R. Izbicki

## **Auswirkungen von differentiellen O-GalNAc-Modifikationen im Cosmc-KO-Mausmodell auf die exokrine Pankreasfunktion**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Thomas Wolpers  
aus Nürnberg

Hamburg 2018

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.11.2018**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Maximilian Bockhorn**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher**

# Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung der Arbeit .....	6
2	Einleitung.....	7
2.1	Glykopeptide.....	7
2.1.1	Überblick .....	7
2.1.2	Aufbau und Synthese .....	8
2.1.2.1	N – Glykosylierung .....	9
2.1.2.2	O – Glykosylierung .....	10
2.1.3	Funktionen von Glykanen im Organismus .....	13
2.2	Das Tn-Antigen.....	14
2.2.1	Die Entdeckung des Tn-Antigens .....	14
2.2.2	T-Synthase und sein Chaperon Cosmc .....	15
2.2.3	Die Rolle des Tn-Antigens in der Tumorbiologie .....	17
2.2.4	Das Tn-Antigen beim Pankreaskarzinom.....	20
2.3	Exokrine und endokrine Pankreasfunktion.....	21
3	Material und Methoden .....	23
3.1	Material .....	23
3.1.1	Chemikalien.....	23
3.1.2	Materialien und Geräte .....	23
3.1.3	Lösungen und Puffer .....	23
3.1.4	Antikörper und Lektine .....	25
3.1.4.1	Primäre Antikörper.....	25
3.1.4.2	Sekundäre Antikörper .....	25
3.1.4.3	Lektine.....	25
3.1.5	Entwicklung eines Cosmc-KO-Mausmodells .....	25
3.2	Methoden .....	27
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	27

3.2.1.1	Herstellung von Mauslysaten .....	27
3.2.1.2	Primäre Zellkultur und Stimulation der Sekretion .....	27
3.2.2	Biochemische Methoden .....	28
3.2.2.1	BCA.....	28
3.2.2.2	Enzym-Substrat-Assays .....	28
3.2.2.3	SDS-Page .....	30
3.2.2.4	Western Blot und Detektion.....	30
3.2.2.5	Low pressure liquid chromatography (LPLC) .....	31
3.2.2.6	VVL-Pulldown .....	31
3.2.2.7	ELISA.....	31
3.2.2.8	Massenspektrometrische Proteomanalyse .....	32
3.2.3	Histologische Methoden .....	32
3.2.3.1	Histologische Gewebefärbung .....	32
3.3	Statistik .....	33
3.4	Studienzustimmung.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Kontrolle des erfolgreichen Cosmc-Knock-Outs im Mausmodell .....	34
4.2	Vergleich der Enzymaktivitäten im Knock-out und Wildtyp .....	35
4.2.1	Überblick zytoplasmatischer Aktivitäten .....	35
4.2.2	Einfluss der aberranten O-Glykosylierungen auf die intrazelluläre Verteilung und Funktion von pankreatischen Enzymen.....	37
4.2.2.1	Überblick.....	37
4.2.2.2	Trypsin .....	38
4.2.2.3	Lipase .....	38
4.2.2.4	Elastase.....	40
4.2.2.5	Esterase.....	41
4.3	Einfluss von aberranten O-Glykosylierungen auf die Stimulierbarkeit des Pankreas.....	42

4.3.1	Lipase.....	43
4.3.2	Esterase.....	43
4.4	Identifizierung O-GalNAc-glykosylierter Proteine .....	44
4.4.1	LPLC und VVL-Pulldown.....	44
4.4.2	Massenspektrometrische Proteomanalyse .....	46
4.4.3	Verifizierung der Elastase als O-GalNAc-glykosyliertes Protein .....	49
5	Diskussion .....	51
5.1	Tn-Antigen-Expression.....	51
5.2	Auswirkung aberranter O-Glykosylierungen.....	52
5.2.1	Einfluss auf die enzymatische Aktivität .....	52
5.2.2	Einfluss auf die Zymogengranula und die Stimulierbarkeit.....	54
5.2.3	Lipase.....	57
5.2.4	Elastase .....	58
5.3	Weitere Auswirkungen aberranter O-Glykosylierungen .....	60
5.4	Ausblick.....	62
6	Zusammenfassung .....	64
6.1	Deutsch .....	64
6.2	Englisch.....	65
7	Literaturverzeichnis .....	66
8	Anhang.....	80
8.1	Abbildungen.....	80
8.2	Tabellen.....	82
9	Danksagung .....	83
10	Lebenslauf .....	84
11	Eidesstattliche Erklärung.....	85

# 1 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit steht im Kontext der verkürzten O-Glykosylierung mit Expression des Tn-Antigens, wie sie beim Adenokarzinom des Pankreas auftritt. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, welche von der Bauchspeicheldrüse exprimierten Proteine O-GalNAc modifiziert sind und wie sich die, durch das molekulare Ausschalten des Gens Cosmc, verkürzten Zuckerketten auf die Funktion des exokrinen Pankreas und die enzymatische Aktivität auswirken.

Wir haben ein Mausmodell generiert, in dem pankreas-spezifisch das Gen Cosmc abgeschaltet wird. Dies hat zur Folge, dass alle O-glykosylierten Proteine das Tn-Antigen tragen, welches zur Proteinaufreinigung oder dem Nachweis genutzt werden kann. Es soll geklärt werden, was O-Glykosylierungsveränderungen zur Folge haben, welchen Einfluss sie auf das exokrine Pankreas nehmen und wie diese ggfs. zum Pathomechanismus des Pankreaskarzinoms beitragen.

Murine Bauchspeicheldrüsen werden nach einem etablierten Protokoll subfraktioniert und die Zellfraktionen auf Tn-Antigen tragende Proteine untersucht. Diese Proteine sollen durch Lektinchromatographie und angeschlossener Massenspektrometrie-Proteomik analysiert werden und mittels Western Blot und histologischer Verfahren untersucht werden. Außerdem soll mittels biochemischer Methoden der Einfluss der O-Glykosylierungsveränderungen auf die enzymatische Aktivität des exokrinen Pankreas dargestellt werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Glykopeptide

#### 2.1.1 Überblick

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts waren die Chemie und der Metabolismus der Kohlenhydrate wichtige Forschungsschwerpunkte. Dabei wurden die Kohlenhydrate jedoch noch hauptsächlich als Energielieferanten und Baumaterial gesehen, die keine weiteren biologischen Eigenschaften haben. Dieses Bild wandelte sich jedoch im Laufe des 20. Jahrhunderts.

1953 wurde von Watson und Crick erstmals der strukturelle Aufbau der DNA beschrieben (Watson und Crick 1953). Die Forschung der folgenden Jahre konzentrierte sich auf die Synthese, den Aufbau und die Funktion von Proteinen, mit dem Verständnis, dass das Wissen hierüber den Aufbau von Zellen bis zum kompletten Organismus erklärt. Weitere Gründe, die die Forschung der Glykane behinderte, waren die strukturelle Komplexität der Kohlenhydratstrukturen, die Schwierigkeit, deren Aufbau mit den damals verfügbaren Analysetechniken zu ermitteln und die Unfähigkeit, aus der DNA-Struktur die Kohlenhydrat-Modifikationen sicher zu ermitteln (Varki und Sharon 2015-2017).

Das alleinige Wissen über das Genom kann jedoch die Vielfalt der komplexen biologischen Funktionen des Organismus nicht erklären. Bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts war bekannt, dass sich eine große Vielzahl an Kohlenhydraten auf Zelloberflächen befinden – die so genannte „Glykokalyx“. Zudem beobachtete man, dass Parasiten spezifisch anhand der Oberflächen-Glykane an Wirtszellen binden und selbst komplexe Kohlenhydratketten auf ihren Oberflächen exprimieren, die wiederum einen Einfluss auf die Funktion des Parasiten und die der Wirtszelle haben (Varki 2017). Weitere Anzeichen einer wichtigen biologischen Funktion waren u.a. die Entdeckung des AB0-Blutgruppensystems, die aufgrund unterschiedlicher Ausprägungen der Oberflächen-Glykane existieren (Watkins und Morgan 1955), sowie die Aufdeckung der pharmakologischen Wirkung des Heparins, einem Glykosaminoglykan, auf Antithrombin (Lindahl et al. 1979). Spätestens in den 1980er-Jahren wurde daher wieder ein vermehrter Fokus auf die Forschung der Kohlenhydrate und deren Interaktionen mit Proteinen und Lipiden gelegt, der Begriff der Glykobiologie entstand (Varki und Sharon 2015-2017). Während zunächst davon ausgegangen wurde, dass Glykosylierungen nur auf Zelloberflächen und sekretorischen Proteinen zu finden sind, der Zellkern und das

Zytoplasma allerdings frei von Glykanen sei, musste diese Einschätzung spätestens nach der Entdeckung von intrazellulären O-GlcNAc-Glykanen in Leberzellen von Raten revidiert werden (Holt und Hart 1986). Heute sind die Glykane die strukturell komplexeste und am schnellsten wachsende Gruppe in der Molekularbiologie (Varki 2017).

### **2.1.2 Aufbau und Synthese**

Die Komplexität und Vielseitigkeit des Proteoms wird während allen Syntheseschritten durch Modifikationen stetig erhöht, so dass aus einem relativ kleinem Genom mit ca. 25.000 Genen ein Proteom aus ca. 200.000 Proteinen entsteht, welche durch weitere posttranslationale Veränderung weiter verändert werden können (Koch et al. 2014). Erste Modifikationen des Genoms werden bereits auf DNA-Ebene durch Methylierungen (Brix et al. 2014) und auf transkriptionaler Ebene durch alternative Promotoren, alternatives Splicen oder mRNA-editing hervorgerufen, so dass das Transkriptom bereits ein Vielfaches des Genoms darstellt. Durch co- und posttranslationale Modifikationen wird das Protein weiter modifiziert (Brix et al. 2014).

Eine wichtige posttranslationale Modifikation stellt die Proteinglykosylierung dar. Bei diesem Vorgang werden (Oligo-)Saccharide mittels N- oder O-glykosidischer Bindungen mit Aminosäureresten verbunden (Müller und Graeve 2014). Typische beteiligte Monosaccharide sind Hexosen wie D-Glucose oder Hexosamine wie N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) oder N-acetylgalactosamine (GalNAc) (Varki und Sharon 2015-2017). Viele sekretorische Proteine und Zelloberflächenproteine sind stark glykosyliert. Nachdem sie cotranslational in das endoplasmatische Retikulum (ER) verbracht werden, durchlaufen sie nach Faltung und Qualitätskontrolle den Golgi-Apparat, bevor die Proteine anschließend vom trans-Golgi-Netzwerk an ihre Bestimmungsorte verteilt werden. Während die ersten Schritte der N-Glykosylierung bereits im ER durchlaufen werden, beginnt die O-Glykosylierung von sekretorischen und Membranproteinen erst im Golgi-Apparat (Stanley et al. 2015-2017). N-Glykosylierungen finden nur im ER statt und führen daher dazu, dass ausschließlich sekretorische und membrangebundene Proteine betroffen sein können. O-Glykosylierungen von nukleozytoplasmatischen Proteinen sind hingegen möglich (Stanley et al. 2015-2017; Zachara et al. 2015-2017; Steentoft et al. 2013).

Während bei N-Glykosylierungen ein „en-bloc“-Transfer eines Polysaccharids auf einen Asparaginylnrest (Asn) stattfindet, ist bei O-Glykosylierungen eine schrittweise Erweiterung des bereits gebundenen Glykans mit Monosacchariden typisch (Colley et al.



2015-2017). Um die Reaktion zur Bildung der glykosidischen Bindung zu ermöglichen, muss der Zucker zunächst energetisch aufgeladen werden. Hierfür wird eine glykosidische Bindung des Monosaccharids zu einem Nucleosiddiphosphat (Uridindiphosphat, Guanosindiphosphat oder Cytidindiphosphat) geknüpft. Möglich sind entweder die Aktivierung des Saccharids mittels einer Kinase oder der Austausch mit dem Nucleosiddiphosphat-Rests eines anderen, bereits aktivierten Monosaccharids (Freeze et al. 2015-2017).

Die Modifikation des entstehenden Oligosaccharid-Rests erfolgt durch Glykosyltransferasen und Glykosidasen. Während Pflanzen eine größere Anzahl an Glykosyltransferase-Genen besitzen, weist der Mensch eine besonders hohe Vielfalt an unterschiedlichen Glykosyltransferase-Kategorien auf (43 CAZy-Kategorien). Weiterhin existieren im humanen Genom nur an die 100 Gene, die für Glykosidasen kodieren, was, verglichen zu einigen Pflanzen, die bis zu 600 besitzen, gering ist. Zudem besteht in unterschiedlichen Geweben eine Expression von unterschiedlichen Glykosyltransferasen und Glykosidasen, so dass gewebespezifische Glykome entstehen (Henrissat et al. 2015-2017).

### **2.1.2.1 N – Glykosylierung**

Protein-Datenbanken zeigen, dass 2/3 aller Proteine potentielle N-Glykosylierungs-Sequenzen tragen und diese mit einer Häufigkeit von 3,1 potentiellen Stellen pro Protein zu finden sind. Insgesamt finden sich N-Glykosylierungen in 90% aller Glykoproteine und weisen eine Häufigkeit von 1,9 Glykosylierungen pro Protein auf (Apweiler et al. 1999). Bislang wird davon ausgegangen, dass N-Glykosylierungen ausschließlich im ER stattfinden können und daher nur sekretorische oder Membranproteine betroffen sind, letztere zudem ausschließlich mit ihren extrazellulären Anteilen.

Die meisten N-Glykosierungen finden an Asn-X-Ser/Thr-Sequenzen statt, seltener sind Sequenzen mit Cystein oder anderen Aminosäuren an der dritten Position betroffen. Die Aminosäure in der zweiten Position (X) kann die Wahrscheinlichkeit einer Glykosylierung beeinflussen: Prolin verhindert die Reaktion (Rini und Esko 2015-2017), saure Aminosäuren führen zu einer Abnahme, Phenylalanin zu einer Zunahme der Wahrscheinlichkeit. Asn-X-Ser/Thr befinden sich in 70% der Proteine und 70% dieser Sequenzen tragen ein N-Glykan. Somit können diese DNA-Sequenzen als potentielle N-Glykosierungs-Stellen angesehen werden, das tatsächliche Vorhandensein eines N-Glykans

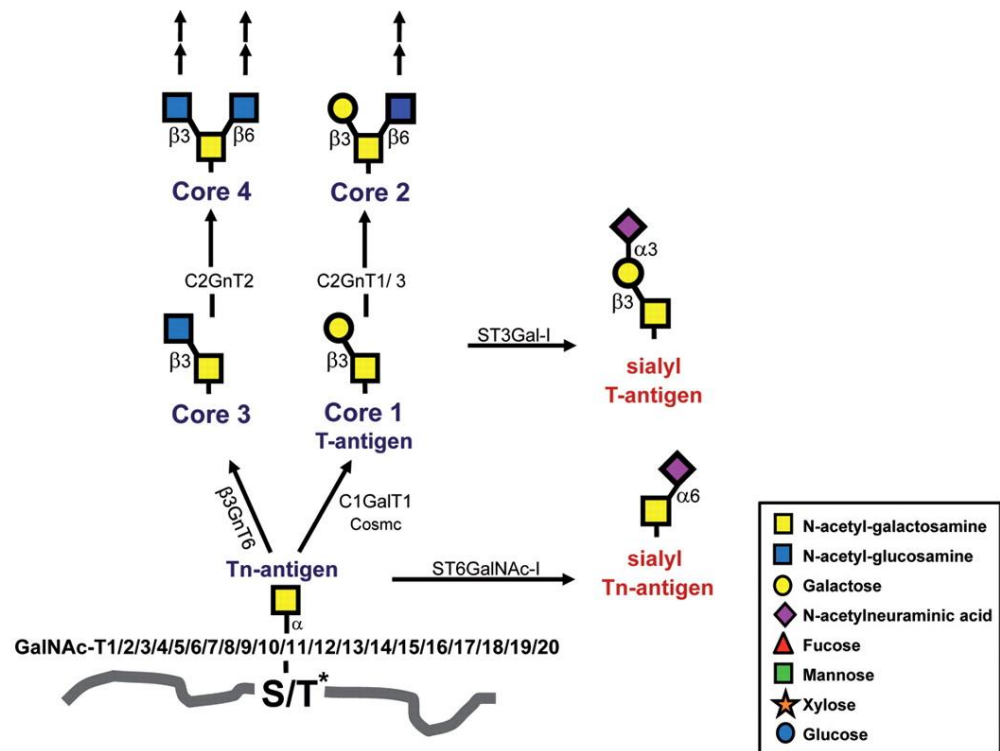
und dessen Struktur ist jedoch von weiteren Umständen abhängig, wie beispielsweise dem Gewebetyp.

Die Bindungszone eines N-Glykans besteht bei Eukaryonten immer aus der gleichen Struktur:  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ . Diese wird bereits an der Membran des ER gebunden an einem Dolichol-Phosphat-Anker (Dol-P) gebildet und im ER „en-Block“ auf das Protein übertragen. Dazu wird zunächst im Zytosol GlcNAc-1-Phosphat aus UDP-GlcNAc durch eine Phosphotransferase auf einen membranständigen Dolichol-Anker transferiert. Anschließend erfolgt die Bindung eines weiteren GlcNAcs sowie mehrerer Mannose-Monosaccharide. Das entstehende Oligosaccharid  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  wird nach Translokation in das ER und Bindung weiterer Monosaccharide in Form von Glucose und Mannose durch eine Oligosaccharyltransferase auf einen Asparaginylnrest übertragen. Anschließend erfolgt durch  $\alpha$ -Glucosidasen und  $\alpha$ -Mannosidasen die Bildung des „core“-Glykans  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2-\text{Asn}$ , der anschließend im Golgi-Apparat weiter modifiziert wird (Stanley et al. 2015-2017). Dies führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Strukturen, die protein- und zellspezifisch sein können. Eine fehlende Entfernung der Glucose-Monosaccharide führt zu einem Ausbleiben der Transportation in den Golgi-Apparat, hervorgerufen durch die Chaperone Calnexin und Calreticulin (Müller und Graeve 2014).

#### **2.1.2.2 O – Glykosylierung**

Während humane N-Glykane immer eine identische „core“-Region besitzen, über die die Bindung an den Asparaginylnrest erfolgt, ist dies bei O-Glykanen nicht der Fall. Typische an der Bindung beteiligte Monosaccharide sind N-Acetylgalactosamin (GalNAc), aber auch Fucose, Glucose oder Mannose. Die primär gebundenen Monosaccharide werden anschließend wiederum mittels Glycosyltransferasen weiter verlängert. Intrazelluläre Glykoproteine tragen oftmals O-Glykane, die aus einem N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc)-Rest bestehen.

O-Glykosylierungen erfolgen immer an Seryl-, Threonyl- oder Tyrosinylnresten. Letztere wurden als mögliche Glykosylierungsstellen erst spät entdeckt (Halim et al. 2011). Die Glykosylierungswahrscheinlichkeit an möglichen Aminosäureresten wird von der Aminosäuresequenz des Proteins beeinflusst, beispielsweise scheint ein Prolin-Rest in der +3-Position zu einer gesteigerten Aktivität der GalNAc-Transferasen zu führen. Es ist jedoch bislang keine Sequenz gefunden worden, die immer zu einer GalNAc-Glykosylierung führt (Xin et al. 2018).



**Abbildung 1: Aufbau der Core-Strukturen** (modifiziert nach (Bennett et al. 2012))

Das initial durch die ppGalNAcTs gebildete Tn-Antigen wird durch die T-Synthase (C1GalT1), β3GnT6 und ST6GalNAc-I weiter zum T-Antigen/ Core 1, Core 3 und dem sialyl Tn-Antigen (sTn-Antigen) verstoffwechselt. Es kann anschließend eine weitere Verlängerung stattfinden, wobei sialysierte Formen jedoch einen Endpunkt darstellen.

Der erste Schritt bei der Entstehung eines GalNAc-gebundenen O-Glykans stellt die Bildung der O-glykosidischen Bindung von UDP-GalNAc zu einem Aminosäurerest dar. Der entstehende GalNAc-O-Ser/Thr-Rest wird auch Tn-Antigen genannt. Diese Reaktion wird von Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs) katalysiert, von denen im humanen Genom 20 kodiert sind (Ju et al. 2011). Diese große Vielfalt stellt eine Einzigartigkeit innerhalb der Familie der Glycosyltransferasen dar, was großes Potential für unterschiedliche Aktivitäten in unterschiedlichen Zellen birgt. Zwar unterscheiden sich die einzelnen Isoenzyme in ihrer individuellen Spezifität in Bezug auf das Akzeptor-Protein, bereits bestehenden O-GalNAc-Glykosylierungen und ihren Expressionsraten in unterschiedlichen Gewebetypen, doch herrscht trotzdem eine hohe Redundanz vor (Bennett et al. 2012). So ist bislang nur bei einem Isoenzym, ppGalNAcT-3, bekannt, dass bei Ausfall eine spezifische Erkrankung auftreten kann, die durch einen Abfall der Sekretion von Fibroblast growth factor 23 (FGF23) und einer folgenden Störung der Phosphat-Hämostase zu familiärer tumorale Calcinosis führt. Die Ursache hierfür liegt darin, dass eine mangelhafte Glykosylierung von FGF23 zu einem erhöhten Abbau der Substanz führt (Topaz et al. 2004; Kato et al. 2006).

Während in gesundem Gewebe ppGalNAcTs ausschließlich im Golgi-Apparat zu finden sind, scheint es in einigen Tumoren zu einer Translokation der Enzyme in das ER zu kommen (Gill et al. 2010; Bennett et al. 2012). Ob eine durch die Wachstumsfaktoren EGF und PDGF hervorgerufene Translokation von ppGalNAcTs vom Golgi-Apparat in das ER, unter Beteiligung der Tyrosinkinase Src tatsächlich existiert, wird allerdings kontrovers diskutiert (Gill et al. 2010; Herbomel et al. 2017; Bard und Chia 2017).

Da Mucine eine besonders hohe Dichte an O-GalNAc-Glykanen aufweisen, wird in der Literatur auch der Begriff „mucin-type glykosylation“ für diesen Glykan-Typ verwendet (Xin et al. 2018). Um diese hohe Dichte zu erreichen, weisen ppGalNAcTs eine hohe Aktivität auf, was u.a. darauf zurückgeführt wird, dass die C-terminal gelegene Lektindomäne an ein zuvor gebildetes O-Glykan bindet und somit ein Entlanggleiten des Enzyms am Protein möglich ist (Ju et al. 2011). Ebenso ist über diese Lektindomäne eine Steuerung der Substratspezifität möglich, so dass Bereiche entstehen, die eine besonders hohe Dichte an O-Glykanen aufweisen (Raman et al. 2008).

Das durch die Bindung des GalNAcs an den Seryl oder Threonylrest entstandene O-GalNAc-Glykan wird im Anschluss durch Glycosyltransferasen weiter modifiziert. Die entstehenden Oligosaccharide bilden die Grundlage für weitere Modifikationen, wie beispielsweise dem ABO-Blutgruppensystem. Es werden dabei vier „core“-Komplexe unterschieden. Core 1, auch T-Antigen genannt, entsteht aus der Bindung eines Galactose-Monosaccharids an den O-GalNAc-Rest, so dass Gal-GalNAc-O-Ser/Thr entsteht. Diese Reaktion wird durch die Core-1- $\beta$ 3-Gal-Transferase, auch T-Synthase genannt, katalysiert. Core 3 entsteht durch die Bindung eines GlcNAcs an den GalNAc-O-Ser/Thr-Rest. Von diesen Komplexen ausgehend besteht die Möglichkeit, durch Bildung einer 1- $\beta$ 6-glykosidischen Bindung von GlcNAc zum GalNAc-Rest die verzweigten Core 2 bzw. Core 4-Komplexe zu bilden. Während Core 1 und Core 2 in Glykoproteinen und Mucinen vieler verschiedener Zelltypen zu finden sind, wird Core 3 und 4 vor allem von bronchialen und gastrointestinalen Geweben exprimiert (Brockhausen und Stanley 2015-2017).

Während die O-Glykosylierung mit GalNAc insbesondere auf sekretorischen und Membranproteinen zu beobachten ist, finden intrazellulär vor allem Glykosylierungsreaktionen mit GlcNAc statt. Hierbei zeigt sich die Besonderheit, dass im Gegensatz zur O-GalNAc-Glykosylierung keine weitere Verlängerung des Monosaccharid-Rests erfolgt und andererseits ein hoher Umsatz zu verzeichnen ist, der dazu führt, dass GlcNAc wiederholt gebunden und gelöst wird. Dabei kommt es zusätzlich zu einer

Konkurrenz und gegenseitigen Beeinflussung mit O-Phosphorylierungen. Beteiligte Enzyme sind die O-GlcNAc-Transferase und die O-GlcNAcase, die im Gegensatz zu den ppGalNAcTs nur auf einem einzigen Gen kodiert sind und durch alternatives Splicing in 2 bzw. 3 Isoformen vorliegen. O-GlcNAc-Glykane scheinen, auch aufgrund ihrer hohen Umsatzrate und der gegenseitigen Beeinflussung mit Phosphorylierungen, einen regulatorischen Einfluss auf Transkription, Epigenetik, sowie Translation, Stabilität und den Lebenszyklus von Proteinen zu haben (Zachara et al. 2015-2017).

Während als typische Bindungspartner von O-Glykanen Seryl- und Threonylreste fungieren, sind einige Ausnahmen bekannt. So kommt es beispielsweise bei der Glykogensynthese zur initialen Bildung einer Glucose-Tyrosin-Bindung durch das humane Glycogenin-1-Enzym (West und Hart. 2015-2017).

### **2.1.3 Funktionen von Glykanen im Organismus**

Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte aller Proteine des Menschen Glykosylierungen aufweist (Apweiler et al. 1999). Daher übernehmen Glykane im Organismus eine Vielzahl von Aufgaben. Diese lassen sich in vier große Kategorien unterteilen: Strukturelle und modulatorische Funktionen, intrinsische und extrinsische Interaktionen sowie das molekulare Mimikry, das im Rahmen der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt (Varki 2017). Dabei übernehmen die gleichen Glykane nicht immer auch die gleiche Funktion, abhängig vom gebundenen Protein können verschiedene Aufgaben übernommen werden. Die Funktionen einiger Glykane ist bislang noch unbekannt (Varki und Gagneux 2015-2017).

Auf biochemischer Ebene dient die Glykosylierung verschiedenen Zwecken: So schützt sie Proteine vor proteolytischem Verdau, verändert die Affinität einiger Rezeptoren oder deren Liganden und beeinflusst die Aktivität von Hormonen und Enzymen (Rehm und Letzel 2010).

Glykane übernehmen eine Vielzahl an protektiven, stabilisierenden, organisatorischen und Barrierefunktionen. So sorgen beispielsweise Glucose- oder GlcNAc-Seitenketten für eine enorme physische Stabilität, die auch enzymatisch nur schwer zu zerstören ist. Beispiele hierfür sind Cellulose oder Chitin.

Eine besonders hohe Konzentration an Glykoproteinen findet sich im Blut, da die hydrophile Wirkung einiger Glykane erst die hohe Löslichkeit dieser Proteine bewirkt.

Eine wichtige Rolle spielen Glykoproteine ebenfalls im Bereich der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle, aber auch als Marker im intrazellulären Transport. Weitere Funktionen liegen in der Beteiligung am interzellulären Signalaustausch, der interzellulären Zelladhäsion, der Zell-Matrix-Interaktion und in der Immunabwehr, da praktisch alle Zelloberflächen mit einer großen Vielfalt an Glykanen ausgestattet ist, die es dem Immunsystem ermöglicht, körpereigenes von fremdem Material zu unterscheiden und somit eine Immunabwehr auszulösen (Varki 2017).

Eine besonders hohe Anzahl von O-GalNAc-Glykanen befinden sich auf Mucinen, so kann mehr als 80% der Masse von Mucinen aus O-Glykanen bestehen (Arike und Hansson 2016). Mucine übernehmen sowohl sekretorisch als auch membrangebunden im Körper eine wichtige Rolle beim Schutz von Endothelien, sowohl in immunologischer und physikalischer Hinsicht, aber auch als Gleitmittel (Chia et al. 2016). Der hohe Anteil an O-GalNAc-Glykanen sorgt zudem für einen Schutz vor Proteasen, so dass ein proteolytischer Abbau einiger Mucine nicht möglich ist (Arike und Hansson 2016).

Weiterhin sind auf vielen Proteinen, die an der interzellulären Zelladhäsion beteiligt sind, O-GalNAc-Glykane zu finden. So binden einige O-GalNAc-Glykane beispielsweise an Gelectine, die wiederum an Glykoproteine auf Zelloberflächen binden und so zu einer gesteigerten Adhäsion führen können. Eine Veränderung dieser Glykane kann somit zu einem verändertem Adhäsionsverhalten und damit einer gesteigerten Metastasierungswahrscheinlichkeit führen (Chia et al. 2016).

## **2.2 Das Tn-Antigen**

### **2.2.1 Die Entdeckung des Tn-Antigens**

Das T-Antigen, auch TF-, Thomsen-Friedenreich-Antigen oder Core 1, wurde erstmals 1925 von Huebner und 1927/28 von Thomsen beschrieben, als bei einigen tiefgefrorenen Erythrozyten-Konzentraten eine Agglutinationsreaktion einsetzte. Diese wurde durch die enzymatische Freilegung des Antigens durch bakterielle Neuraminidasen hervorgerufen. Friedenreich konnte 1930 zeigen, dass das T-Antigen als Bindungsstelle für Antikörper fungieren kann (Ju et al. 2011).

Das Tn-Antigen wurde 1957 durch Mereau et al. erstmals beschrieben, da bei einem Patienten mit hämolytischer Anämie und Panzytopenie wiederholt eine Hyperagglutination auftrat, die nicht durch die Freilegung des T-Antigens durch Neuraminidasen erklärt werden konnte. Bei diesem Tn-Syndrom genannten Krankheitsbild handelt es sich um eine

erworbene loss-of-function-Mutation, die zu einer inaktiven  $\beta$ -1,3-Galactosyltransferase (auch T-Synthase) führt. Diese katalysiert die Bindung des Galactose-Monosaccharids an das O-GalNAc-Glykan und führt somit bei Inaktivität zu einer Unfähigkeit der Synthese des T-Antigens. Da diese Mutation in pluripotenten Stammzellen auftreten kann, führt dies dazu, dass alle hämatopoetischen Zelllinien betroffen sein können – eine so genannte „mixed field polyagglutination“ entsteht (Berger 1999; Rump et al. 2003).

1969 erfolgte die Beschreibung des Tn-Antigens durch das Binden an das Lectin *Helix Pomatia* Agglutinin (HPA), welches insbesondere an terminale  $\alpha$ -GalNAc bindet (Prokop und Uhlenbruck 1969). Während die Struktur des T-Antigens bereits 1960 analysiert werden konnte (Klenk und Uhlenbruck 1960), folgte der letztendliche Beweis für die Struktur des Tn-Antigens als monomer gebundenes GalNAc erst 1975 (Dahr et al. 1975). Die Rolle des Tn-Antigens als Vorläufer des T-Antigens, katalysiert durch die T-Synthase, konnte durch zelluläre Aktivitätsmessungen des Enzyms bei Tn-Syndrom-Patienten bestätigt werden (Berger 1999).

### **2.2.2 T-Synthase und sein Chaperon Cosmc**

Die häufigste posttranslationale O-Glykosylierung, vor allen in Mucinen, stellt die Bildung einer Bindung zu GalNAc dar. Dieser Schritt wird, wie bereits beschrieben, durch zahlreiche N-Acetylgalactosamin-Transferasen katalysiert. Das zunächst entstehende Tn-Antigen wird anschließend durch verschiedene Enzyme weiter modifiziert, so dass entweder Core 1, Core 3 oder eine sialysierte Form des Tn-Antigens, das sTn-Antigen, entsteht (Ju et al. 2011). Hierbei besteht eine Konkurrenz zwischen den beteiligten Enzymen, so dass geringere Aktivität einer der Enzymklassen zu einer vermehrten Expression der anderen Komplexe führt (Barrow et al. 2013).

Das sTn-Antigen entsteht durch die Bindung eines N-Acetyl-5-neuroaminsäure-Monomers an das O-GalNAc-Glykan, was weitere Modifikationen des O-Glykans verhindert. Diese Reaktion wird hauptsächlich durch die Sialyltransferase ST6GalNAc-I katalysiert. Isoenzyme dieser Transferase existieren zwar, doch zeigten Arbeiten, dass diese fast ausschließlich auf Core 1 oder eine bereits sialysierte Form des Core 1 wirken. Eine Expression von sTn-Antigen in gesundem Gewebe findet praktisch nicht statt (Marcos et al. 2004; Terada und Nakanuma 1996).

Während Core 3 hauptsächlich in Zellen des bronchial- und gastrointestinalen Trakts synthetisiert wird, wird Core 1, das T-Antigen, in allen Zellen des Körpers exprimiert. Die

Bindung des Galactose-Monosaccharids an das Tn-Antigen wird dabei durch die T-Synthase katalysiert. Diese  $\beta$ 3-Galactosyltransferase zeigt die Besonderheit, dass lediglich ein Gen und keine weiteren Isoenzyme existieren. Untersuchungen des Genoms zeigten allerdings, dass 4 Pseudogene existieren, deren cDNA unterschiedlich stark mit der T-Synthase-cDNA übereinstimmen (pC1GALT-1 zu 93% bis pC1GALT-4 zu 71%). Zwei der vier Pseudogene, pC1GALT-1 und -2, sind transkriptionell aktiv, was auf eine Regulation der Expression der T-Synthase hindeuten könnte. Während das intakte T-Synthase-Gen aus 3 Exons besteht, finden sich in den Pseudogenen nur jeweils ein Exon, was auf eine evolutionäre reverse Transkription aus T-Synthase-mRNA und Integration in das humane Genom hinweisen könnte (Ju et al. 2011).

Posttranslational durchläuft die T-Synthase einen ausgeprägten Faltungsvorgang im ER, bevor eine Translokation als membrangebundenes Homodimer in den Golgiapparat stattfindet. Diese Faltung geschieht unter Mitwirkung eines Chaperons, des Core-1- $\beta$ 3-Galactosyltransferase-spezifischem, molekularen Chaperons, kurz Cosmc, und ist in dessen Abwesenheit nicht möglich (Ju und Cummings 2002). Ein Defekt von Cosmc führt daher zu der Unfähigkeit der Zelle das T-Antigen zu produzieren (Ju und Cummings 2002; Wang et al. 2010).

Das Cosmc-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom bei Xq24. Es besteht eine Ähnlichkeit zur T-Synthase (26% identisch), so dass anfänglich irrtümlich davon ausgegangen worden ist, dass es sich um ein weiteres Isoenzym der T-Synthase handelt (Kudo et al. 2002). Inzwischen besteht die Annahme, dass sich Cosmc über Pseudogene aus dem Gen der T-Synthase entwickelt hat. Während auch wirbellose Tiere eine T-Synthase aufweisen, besitzen diese jedoch kein Cosmc-Gen. Die T-Synthase dieser Tiere weist jedoch im Gegensatz zum Menschen mehrere N-Glykosylierungen auf, von denen man vermutet, dass sie für den Faltungsvorgang in diesen Organismen essentiell sind (Ju et al. 2011).

Es zeigte sich, dass *in vitro* Cosmc nicht an native T-Synthase bindet, sondern durch Hitze oder chemische Prozesse denaturierte T-Synthase wieder korrekt faltet. Eine Ablösung der korrekt gefalteten T-Synthase geschieht aufgrund des Einflusses weiterer nativer und nicht-nativer T-Synthasen. Eine Aussage über mögliche weiter benötigte Faktoren *in vivo* kann daraus allerdings nicht gezogen werden (Aryal et al. 2012). Weitere Arbeiten zeigten das Vorhandensein einer Cosmc-Bindungszone innerhalb der T-Synthase (Cosmc binding region within T-synthase, CBRT). Diese hydrophobe Sequenz befindet sich am N-



terminalen Ende des Enzyms und ist für den Faltungsvorgang essentiell. Nach Initiierung der Faltung und Ablösung der T-Synthase von Cosmc scheint die Bindungszone stereostatisch so behindert zu sein, dass eine erneute Bindung an Cosmc verhindert wird (Aryal et al. 2014). Die Ablösung der T-Synthase von Cosmc scheint zudem davon verursacht zu werden, dass entweder eine bereits gefaltete T-Synthase ein Homodimer mit der Cosmc-gebundenen T-Synthase eingeht oder eine bislang nicht gefaltete T-Synthase die gebundene T-Synthase verdrängt (Ju et al. 2014). Während Cosmc eine ATP-Bindungsstelle besitzt (Ju et al. 2008), ist unbekannt, ob der Faltungsprozess unter ATP-Verbrauch stattfindet, da zumindest bei *in vitro*-Versuchen kein Energieverbrauch zu beobachten war (Aryal et al. 2010).

Durch die Bindung und Initiation der korrekten Faltung der T-Synthase sorgt Cosmc dafür, dass ein nachfolgender Abbau durch den ER-assoziierten Degradationsweg verhindert wird und eine korrekte Faltung eingeleitet wird. Bei fehlendem Cosmc bindet die T-Synthase an das endoplasmic reticulum chaperone Bip (Hspa5; Grp78) oder andere Chaperone, wird ins Zytosol retrotransloziert, dort polyubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom abgebaut. Zudem tauchen in Abwesenheit von Cosmc diverse Poly-T-Synthase-Komplexe auf, die über Disulfid-Brücken verknüpft sind. Eine loss-of-function Mutation im Cosmc-Gen führt daher zu einer Unfähigkeit, intakte T-Synthase zu synthetisieren und daher zur Unfähigkeit, Core 1 in den betreffenden Zellen zu bilden. Dies führt zu einer Kumulation von Tn-Antigen (Ju et al. 2011). Bisher gezeigte Mutationen im Cosmc-Gen sind Punkt-Mutationen, die zu Verschiebungen des ORF und Bildung eines Stop-Codons führen (Ju und Cummings 2002), Verluste des Gens bzw. Loss of Heterozygosity (Ju et al. 2008) oder Hypermethylierung des Cosmc-Promotors (Mi et al. 2012).

Ein Krankheitsbild, was auf diesem Pathomechanismus beruht, ist das bereits genannte Tn-Syndrom, bei dem eine Punktmutation in einzelnen Zellen zu einer loss-of-function-Mutation des Cosmc-Gens führt (Ju und Cummings 2005).

### **2.2.3 Die Rolle des Tn-Antigens in der Tumorbiologie**

1975 wurde durch Springer et al. erstmals nachgewiesen, dass das Tn-Antigen in 90% der Mammakarzinoma von Tumorzellen exprimiert wird, was einen Zusammenhang zwischen dem Tn-Antigen und Krebs nahe legte (Springer et al. 1975). In einer weiteren Arbeit wurde nachgewiesen, dass das Tn-Antigen auch bei Tumoren des Respirations- und Gastrointestinaltrakts sowie bei Zervixkarzinomen auftritt (Springer et al. 1980).

Untersuchungen auf eine Immunantwort nach T- und Tn-Antigen-Applikationen zeigten, dass 85% aller getesteten Karzinom-Patienten eine positive Reaktion auf die Applikation aufwiesen, während bei den nicht-Karzinomen die Leukämien mit einer positiven Reaktion in 25% der Fälle die höchste Rate zeigten. Patienten mit benignen Tumoren zeigten allerdings nur in 8% der Fälle und gesunde Patienten keinerlei positive Reaktion (Springer et al. 1980).

Heutzutage geht man davon aus, dass ca. 90% aller Karzinome Tn-Antigen oder sTn-Antigen exprimieren (Ju et al. 2011). Eine hohe Expression von Tn-Antigen im Gesunden wurde dagegen bislang nur in embryonalen zentral-neuronalem Gewebe gezeigt (Akita et al. 2001).

Das Auftreten von Tn-Antigen in humanen Tumorzelllinien beruhte in Untersuchungen dabei immer auf einer Mutation im Cosmc-Gen und einer folgenden Fehlfaltung der T-Synthase (Schieteringer et al. 2006; Ju et al. 2008). Viele Tumorzellen sind jedoch in der Lage, sowohl Tn- als auch T-Antigen zu exprimieren. Eine neuere Übersichtsarbeit beschreibt deshalb die Möglichkeit, basierend auf einer möglichen Translokation von ppGalNAcTs vom Golgi-Apparat in das ER (Gill et al. 2010), dass eine vermehrte Konkurrenz zu weiteren, im Golgi-Apparat vorhanden O-Glykosylierungs-Reaktionen zu einer vermehrten O-GalNAc-Glykosylierung und einer folgenden, durch die T-Synthase im ER verursachten T-Antigen-Expression führt. In dieser Arbeit wurden jedoch nur leicht erhöhte Expressionen von Tn-Antigen-tragenden Proteinen auf der Zellmembran beobachtet (Chia et al. 2016). Außerdem bleibt anzumerken, dass eine mögliche Translokation der ppGalNAcTs kontrovers diskutiert wird (Herbomel et al. 2017; Bard und Chia 2017). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine vermehrte Tn-Antigen-Expression auf eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit folgender TNF- $\alpha$  und IL-6-Freisetzung zurückzuführen sein könnte. Eine Arbeit zeigte, dass die beiden proinflammatorischen Zytokine möglicherweise zu einer Hypermethylierung des Cosmc-Promoters führen, was eine verminderte Expression von Cosmc und daher eine verminderte Aktivität der T-Synthase verursachen könnte (Ho et al. 2016).

Insgesamt bedarf die biochemische Funktion des Tn-Antigens noch weiterer Forschung. So zeigten Arbeiten, dass während die Rolle des Tn-Antigens in der Entwicklung von Tumoren unklar ist, das Antigen jedoch mit schlechter Prognose und dem Metastasierungspotential korreliert (Fu et al. 2016). So wurde gezeigt, dass die Expression des Tn-Antigens *in vitro* zu einer gesteigerten Adhäsion an endotheliale Zellschichten führt

(Bapu et al. 2016). Zudem sind im Falle von Tn-Antigen-tragendem Mucin 1 (MUC1) Selbstinteraktionen verschiedener GalNAc-Reste beobachtet worden, die ebenfalls auf einen Einfluss von Tn-Antigen auf die Zelladhäsion hinweisen (Haugstad et al. 2016). Weiter wurde gezeigt, dass in einigen Tumoren veränderte Glykosylierungen zu einer gesteigerten Expression von Galectinen führen. Insbesondere Galectin-3 bindet an das Tn-Antigen, was zu einem gesteigerten Metastasierungspotential und einer veränderten Immunantwort führen könnte (Kölbl et al. 2016).

Eine weitere mögliche Funktion des Tn-Antigens konnte bei kolorektalen Karzinomen beobachtet werden: So bindet das MUC1 gebundene-Tn-Antigen spezifisch an ein C-type macrophage galactose binding lectin (MGL), welches von dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert wird. Unveränderte Glykan-tragende MUC1 von gesunden Zellen gehen keine Bindung zu diesem Lektin ein (Saeland et al. 2007). Die Bindung an MGL führt über eine Interaktion mit T-Zell-gebundenem CD45 zu einer immunsuppressiven Wirkung, die dem Tumor möglicherweise erlaubt, eine Immunantwort zu verhindern (van Vliet et al. 2005; van Vliet et al. 2013).

Wie bereits dargelegt, kann das Tn-Antigen neben der T-Synthase durch weitere Enzyme verändert werden. Aufgrund der Konkurrenz der beteiligten Enzyme, findet sich in der Tumorbilogie bei Ausfall der T-Synthase deshalb besonders häufig die sialysierte Form des Tn-Antigens, das sTn-Antigen, wieder. Aus diesem Grund erfolgt auch eine kurze Betrachtung der Auswirkungen des sTn-Antigens.

In allen Tumoren ist eine 100%-ige Expression von sTn-Antigen aller Zellen äußerst untypisch, es herrscht vielmehr ein Mosaik. In einigen Tumoren korreliert dabei ein zunehmender Anteil mit einem zunehmenden Stadium und einer tieferen Invasion (Kakeji et al. 1995). Dabei befindet sich das sTn-Antigen bei Adenokarzinomen sowohl auf der Zelloberfläche und intrazellulär, aber aufgrund einer starken sekretorischen Funktion auch im extrazellulären Gewebe. Bei Plattenepithelkarzinomen ist dagegen eher das Zytoplasma und manchmal die Zellmembran betroffen (Julien et al. 2012).

Die Expression von sTn-Antigen korreliert mit einer Abnahme der Überlebenszeit. Eine mögliche Ursache hierfür liegt darin, dass eine sTn-Antigen-Expression zu einer Reduktion der Adhäsion und einer Zunahme der Migration von Tumorzellen führt. Außerdem scheint sTn-Antigen über eine Immunmodulation ebenfalls zu einer gesteigerten Tumoraggressivität zu führen (Julien et al. 2006). Jedoch wurde

beispielsweise in Prostatakarzinomen neben einer geringeren Zelladhäsion ein verlangsamtes Tumorwachstum und ein geringes Metastasierungspotential beobachtet (Munkley et al. 2015). Bei Hepatokarzinomen führt eine Inhibition der ST6GalNAc-I, dem Enzym, welches die Bildung von sTn-Antigen katalysiert, zu einer verringerten Proliferation, Migration und Invasivität des Tumors. Eine mögliche Ursache hierfür liegt darin, dass bei Ausschaltung des Gens eine geringere Aktivität des PI3/Akt-Signalwegs gemessen wurde, welches bei hoher Aktivität diese Funktionen fördert (Yu et al. 2016). Da Tn- und sTn-Antigen-tragende Zellen aufgrund ihrer kürzeren Glykan-Strukturen im Vergleich zu T- und sT-Antigen-tragenden Zellen jedoch anfälliger für eine Auslösung einer Immunantwort und einer folgenden Lyse sind, muss der proliferationsfördernde Effekt von Tn- und sTn-Antigen stärker ausgeprägt sein (Madsen et al. 2013).

#### **2.2.4 Das Tn-Antigen beim Pankreaskarzinom**

Sowohl das Tn-Antigen, als auch das sTn-Antigen lassen sich bei Pankreaskarzinomen finden, letzteres ausschließlich bei malignen Geschehen (Itzkowitz et al. 1991). Ersteres wird zwar auch von gesunden duktalem Zellen exprimiert, doch ist die Expression bei malignen Geschehen stark erhöht (Schluessler et al. 1991). Weitere Arbeiten widersprachen diesem und fanden keine Expression von Tn-, sTn- oder T-Antigen in gesundem Gewebe (Terada und Nakanuma 1996).

Das Auftreten von sTn-Antigen beim Pankreaskarzinom ist mit einer schlechten Prognose verbunden, da es sich hierbei um einen späten Schritt innerhalb der Entwicklungskaskade eines invasiven Adenokarzinoms handelt. Gleichzeitig findet allerdings in gut bis moderat differenzierten invasiven Adenokarzinomen eine höhere Expression statt, als in schlecht differenzierten (Kim et al. 2002).

Untersuchungen des Pankreaskarzinoms konnten teilweise trotz Tn-Antigen-Expression keine Mutationen im Transferase- oder Cosmc-Gen zeigen. Vielmehr konnte in 40% der Fälle eine Hypermethylierung des Cosmc-Promotors gefunden werden, die zu einer mangelnden Cosmc-Expression und einer folgenden T-Synthase-Inaktivität führte. Weitere Untersuchungen an Cosmc-Knockout-Zelllinien zeigten eine größere Zellheterogenität und vermehrte Entdifferenzierung, Proliferation und Invasion dieser Pankreaskarzinom-Zellen. Eine mögliche Ursache hierfür waren veränderte Aktivitätslevel von Proteinen, die in der Zelladhäsion und im RAS-Signalweg beteiligt sind. Zudem zeigte sich eine veränderte Phosphorylierung in einem Großteil der Proteine, die an der Zelladhäsion beteiligt sind,

wie beispielsweise ZO-1, Integrin  $\beta$ 1, den Hyaluron-Rezeptor CD44, Desmoglein, oder auch weitere Proteine, die an der Desmosom-Formation beteiligt sind. Desmoglein ist an der Regulation der p38-MAPK-Aktivität beteiligt, so dass ein Verlust der Funktionalität zu einer gesteigerten p38-Aktivität führt, was wiederum zu einem vermehrten Ablösen von Keratinen führt. Aber auch p38 zeigte eine vermehrte Phosphorylierung in Cosmc-Knockout-Zelllinien, so dass p38 im Pankreaskarzinom ein Schlüsselprotein bei der Störung der Zelladhäsion sein könnte (Radhakrishnan et al. 2014). Ein weiterer Hinweis, dass p38 eine wichtige Rolle im Bereich der interzellulären Bindung einnimmt, zeigt sich bei Pemphigus vulgaris, bei dem es durch Autoantikörper-Bindung zu einer Aktivierung der Kinase und einer folgenden Haut-Ablösung kommt (Spindler et al. 2013).

Veränderte O-Glykosylierungen haben neben dem Effekt auf die Proliferation ebenfalls Einfluss auf die Apoptose-Wahrscheinlichkeit einer Zelle. So wurde gezeigt, dass durch Ausschaltung der ppGalNAcT-14 in Pankreaskarzinom-Zelllinien die Sensitivität auf Apo2L/TRAIL gesenkt wurde, die normalerweise in Tumorzellen über die proapoptotischen Rezeptoren DR4 und DR5 die Apoptose initiieren (Wagner et al. 2007).

Untersuchungen an Cosmc-Knockdown-Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigten im Gegensatz zu einer höheren Proliferationsrate, die ansonsten bei Tn- und sTn-Antigen tragenden Zellen beschrieben worden ist, jedoch eine geringe Proliferation bei ebenfalls verringerter Apoptose-Rate. Zudem scheint die Ausschaltung von Cosmc ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der ppGalNAcTs zu haben (Hofmann et al. 2015).

## **2.3 Exokrine und endokrine Pankreasfunktion**

Das humane Pankreas übernimmt eine wichtige Rolle im Organismus. Es ist sowohl an der Verdauung, aber auch an endokrinen Prozessen beteiligt. Mikroskopisch besteht das Pankreas aus glandulären Lobuli, die wiederum aus vielen Azini bestehen. Letztere stellen Drüsengänge dar, die die Sekret-produzierenden Azinuszellen enthalten. Die Azini vereinigen sich über Schaltstücke zu einem gemeinsamen Ausführungsgang, die schließlich im Hauptausführungsgang des Pankreas, dem Ductus pancreaticus, enden (Reichert und Rustgi 2011). Ca. 1-4% des Pankreasgewebes besteht aus den Langerhans-Inseln, die aus  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und PP-Zellen bestehen (Rahier et al. 1981). Die Zellen der Langerhans-Inseln sind im Gegensatz zu den Azinuszellen endokrin aktiv und stellen in ihrer Gesamtheit die endokrine Funktion des Pankreas dar. Diese besteht u.a. aus der Regulation der Glucose-Hämostase über Glucagon ( $\alpha$ -Zellen) und Insulin ( $\beta$ -Zellen) sowie

indirekt über Somatostatin ( $\delta$ -Zellen). Letzteres hat ebenfalls einen Einfluss auf die exokrine Funktion des Pankreas (Sliwinska-Mosson et al. 2014). Zudem besteht ein Einfluss auf den Appetit über das pankreatische Polypeptid (PP-Zellen) und Ghrelin ( $\epsilon$ -Zellen) (Kleine und Rossmann 2014; Yildiz et al. 2004).

Der Großteil des Pankreasgewebes ist jedoch exokrin aktiv (Rahier et al. 1981). Das Pankreas stellt die wichtigste Verdauungsdrüse des Organismus dar. Die Enzyme des Sekrets sind an der Verdauung aller Stoffklassen beteiligt. Um dabei einen Selbstverdau zu verhindern, wird eine Vielzahl der Proteine in inaktiven Vorstufen sekretiert, die erst intraluminal aktiviert werden. Wichtige beteiligte Enzyme stellen Trypsin(-ogen), Chymotrypsin(-ogen), (Pro-)Carboxypeptidasen und (Pro-)Elastasen zum Spalten von Eiweißen dar,  $\alpha$ -Amylase zum Verdau von Stärke, Ribo- und Desoxyribonukleasen sowie Lipasen. Eine initiale Umwandlung von Trypsinogen zu Trypsin erfolgt dabei durch die Enteropeptidase des Bürstensaums des Duodenums. Das aktive Trypsin führt dann wiederum über limitierte Proteolyse zur Aktivierung der weiteren Proenzyme (Löffler und Mössner 2014).

Wie bereits dargelegt, befinden sich O-GalNAc-Glykosylierungen vor allem auf membrangebundenen und sekretorischen Proteinen (Steentoft et al. 2013). Es konnte bereits gezeigt werden, dass verkürzte O-Glykosylierungen, wie sie beim Pankreaskarzinom zu finden sind, einen signifikanten Einfluss auf die endokrine Pankreasfunktion ausüben (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)). Im Rahmen dieser Arbeit soll daher der Einfluss von aberranten O-Glykosylierungen auf die exokrine Pankreasfunktion weiter untersucht werden.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Chemikalien

Es wurden, solange nicht anderes genannt, Chemikalien in analysereiner Qualität folgender Hersteller bezogen:

- Bio-Rad
- Sigma Aldrich
- Carol Roth
- Merck

### 3.1.2 Materialien und Geräte

Es wurden, soweit nicht anders genannt, Materialien und Geräte folgender Hersteller verwendet:

- Greiner bio-one
- Eppendorf
- Sarstedt

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

Folgende Puffer wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die Lösungen wurden jeweils mit dH<sub>2</sub>O hergestellt.

PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH = 7,4
-----	--

---

TBS-T	50mM Tris/HCl 150mM NaCl 0,005% Tween 20 pH = 7,4
-------	--

## Mauslysate-Herstellung

Homogenisierungs-Puffer	0,3M Sucrose 2mM MES 1mM EDTA pH = 6,8
-------------------------	---

## Western Blot

SDS running buffer	25mM Tris 192mM Glycin 0,1% SDS
--------------------	---------------------------------------

---

Transferpuffer	190mM Glycin 25mM Tris 10% Methanol
----------------	---

## Chromatographie

Chromatographie-Bindungspuffer (CBB)	10mM HEPES 0,15M NaCl 0,1mM Ca <sup>2+</sup> 0,01mM Mn <sup>2+</sup> pH = 7,5
--------------------------------------	---

---

Elutionspuffer	100mM Natriumacetat 1M Galactose pH = 3,0
----------------	---

Folgende bezogene Puffer wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

*Tabelle 1: Bezogene Puffer und Lösungen*

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom	L 2035
HEPES	Sigma	H3375
DMEM	Sigma	D6429



DSMO	Sigma	D5879
MES	Sigma	M8520
RIPA	Pierce	89901
SDS-Lösung (20%)	PanReac AppliChem	A3942
Tween 20	Sigma	P1379

### 3.1.4 Antikörper und Lektine

#### 3.1.4.1 Primäre Antikörper

*Tabelle 2: Primäre Antikörper*

Bezeichnung	Klonalität	Spezies	Epitop	Herkunft
Anti-Tn IgG	monoclonal	mouse	Tn-Antigen	Thermo Scientific; MA180055
Anti-Elastase IgG	polyclonal	rabbit	Elastase	Abcam; ab21593

#### 3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

*Tabelle 3: Sekundäre, HRP-konjugierte Antikörper*

Bezeichnung	Klonalität	Spezies	Herkunft
goat anti-rabbit IgG-HRP	polyclonal	goat	Thermo Scientific; 31460
goat anti-mouse IgG-HRP	polyclonal	goat	Thermo Scientific; 32430

#### 3.1.4.3 Lektine

*Tabelle 4: Lektine*

Bezeichnung	Epitop	Herkunft
Agarose <i>Vicia villosa</i> Lektin (VVL)	Tn-Antigen	Vector Laboratories; AL-1233
Biotinyliertes <i>Vicia villosa</i> Lektin (VVL)	Tn-Antigen	Vector Laboratories; B-1235
Biotinyliertes Peanut Agglutinin (PNA)	T-Antigen	Vector Laboratories; B-1075

### 3.1.5 Entwicklung eines Cosmc-KO-Mausmodells

Zur Untersuchung des Einflusses der aberranten O-Glykosylierungen *in vivo* war die Züchtung eines Mausmodells notwendig. Aufgrund der Eigenschaft vieler Tn-Antigen-tragender Karzinome, Mutationen ausschließlich im Bereich des Cosmc-Gens zu zeigen

(Schieter et al. 2006; Ju et al. 2008), war die Zielsetzung, im Mausmodell ebenfalls eine Ausschaltung des *Cosmc*-Gens zu erreichen. Konventionelle Nullmutationen von *Cosmc* in der Keimbahn von Mäusen verlaufen embryonal letal (Wang et al. 2010). Daher erfolgte durch das Unternehmen genOway die Züchtung einer Mauslinie, bei denen das Gen Pankreas-spezifisch ausgeschaltet werden kann.

Bereits 1988 wurde das Cre/loxP-System entwickelt. Dies beruht auf einer spezifischen Cre-Rekombinase, ursprünglich entnommen der Bakteriophage P1, die zu einer von Kofaktoren unabhängigen Rekombination von Genabschnitten, die sich zwischen zwei loxP-Sequenzen befindet, führt. Dadurch ist es möglich, spezifische Genabschnitte zu entfernen und somit dysfunktionale Gene zu erzeugen (Sauer und Henderson 1988). Einige Jahre später wurde gezeigt, dass dieses Vorgehen auch *in vivo* möglich ist (Gu et al. 1994).

Das *Cosmc*-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom, ist 4,3 kb lang und besteht aus zwei Exonen, bei denen sich die ATG-Startsequenz und das Stopcodon auf dem zweiten Exon befinden. Zur Züchtung einer pankreatischen *Cosmc*-defizienten Mauslinie wurde daher das Exon 2 des *Cosmc*-Gens durch die Insertion einer loxP-Sequenz im Intron 1 und einer weiteren loxP-Sequenz, kombiniert mit einer FRT-flankierten Neomycin-Selektions-Kassette abwärts des Exons 2 umschlossen. Verwendet wurden dabei lox2272-Sequenzen, um ein Einkreuzen weiterer loxP-markierter Mauslinien zu ermöglichen. Dieses Modell wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt, mit denen männliche, heterozygote Mäuse gezüchtet worden sind. Durch weitere Kreuzung wurden heterozygote, bedingt *Cosmc*-Knock-out Mauslinien erzeugt.

Die Pankreas-spezifische Ausschaltung von *Cosmc* erfolgte durch die Kreuzung der loxP-markierten Mauslinien (*Cosmc*<sup>flox/+</sup> und *Cosmc*<sup>flox/flox</sup>) mit *Ptf1a*-Cre<sup>+/+</sup>-Mäusen. *Ptf1a* (Pancreas transcription factor 1 subunit alpha) zeigt eine ausschliche Expression im Pankreasgewebe. Somit konnten sowohl *Cosmc*-Knock-out (KO), als auch Wildtyp (WT)-Mäuse gezüchtet werden. Die Genotypisierung erfolgte mittels Kappa mouse genotyping hot start Kit (PeqLab) und den in Tabelle 5 genannten Primern.

**Tabelle 5: Zur Genotypisierung der Mäuse verwendete Primer**

Cre-F	5-ACC AGC CAG CTA TCA ACT CG-3
Cre-R	5-TTA CAT TGG TCC AGC CAC C-3
<i>Cosmc</i> -F	5-CAC AGA ACT CAC TAT CCA CTA GGC ATG AAT ACA T-3
<i>Cosmc</i> -R	5-GCT CTC CCT AAA TAT ACA ACC GAT TAA GAA AGT GT-3

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Herstellung von Mauslysaten**

Zur Herstellung der Mauslysate wurde ein modifiziertes Protokoll nach Rindler verwendet (Rindler 2006). Alle folgenden Schritte wurden entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, verwendete Puffer wurden vorgekühlt. Die Mäuse wurden zunächst mittels CO<sub>2</sub> sediert und dekapitiert. Anschließend erfolgte eine schnelle Präparation des Pankreas, Entfernung von anhängendem Gewebe, Reinigung in PBS, Zerkleinerung und Zugabe in den Homogenisierungs-Puffer. Die weitere Homogenisierung erfolgte mittels Dounce-Homogenisator, es wurde jeweils 2 µl HALT protease inhibitor mix (87785; Pierce) hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine erste Zentrifugation bei 750g für 10min. Der Überstand wurde gesichert, der Bodensatz erneut in Homogenisierungs-Puffer gelöst, homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand dem bereits vorhandenem hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Filtration durch ein Nylon-Netzfilter (NY2002500; Merck KGaA). Das entstandene Lysat wird in dieser Arbeit „Gesamtlysat“ genannt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 1750g für 20min enthält der Bodensatz nun die Zymogengranula, der Überstand zytoplasmatische Proteine und endokrine Granula (Überstand<sub>1750g</sub>).

Zur weiteren Aufreinigung der Zymogengranula und Freisetzung der Proteine wurde der Bodensatz in RIPA und Protease-Inhibitor gelöst, und zweimalig bei 20000g für 30min zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die enzymatischen Proteine, die Zymogengranula-Membranen befinden sich jeweils im Bodensatz. Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschritts wird in dieser Arbeit „Zymogengranula“ genannt.

Der Überstand<sub>1750g</sub> wurde ebenfalls zweimalig bei 20000g für 30min zentrifugiert, der Überstand enthielt jeweils die zytoplasmatischen Proteine. Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschritts wird in dieser Arbeit als „Zytosol“ tituliert.

#### **3.2.1.2 Primäre Zellkultur und Stimulation der Sekretion**

Um bestimmen zu können, inwiefern aberrante O-Glykosylierungen einen Einfluss auf die Stimulationsmöglichkeit der Pankreaszellen haben, wurde zunächst eine primäre Zellkultur angelegt, diese mittels Caerulein (C9026; Sigma-Aldrich) stimuliert und das Sekret weiter untersucht.

Zur Herstellung der Primärkultur wurde das Pankreas nach Präparation zerkleinert und in PBS gelöst. Es erfolgte die Zugabe von Collagenase IV (Sigma-Aldrich) und eine Inkubation bei 37°C für 1,5 Stunden. Anschließend wurde der Zellverband durch mehrmaliges Pipettieren durch einen 40µm-cell-strainer-Filter (08-771-1; Fisher Scientific) weiter aufgelöst. Nach Zentrifugation bei 200g für 5 Minuten wurde der Bodensatz in DMEM gelöst und Fraktionen gleicher Zellzahlen gebildet. Es erfolgte die Zugabe von Caerulein sowie die Anlage einer Kontrollfraktion ohne Stimulator und die Inkubation für 60 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 500g für 10 Minuten entfernt. Nach Proteinkonzentrationsmessungen (siehe 3.2.2.1) erfolgte die Messung der Enzymaktivitäten per Enzym-Substrat-Assays im Überstand bzw. Sekret (siehe 3.2.2.2).

## **3.2.2 Biochemische Methoden**

### **3.2.2.1 BCA**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung in Lysaten erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (23227; Pierce). Es wurde nach Anleitung vorgegangen. Dazu wurde eine Standardreihe mit dem Albumin Standard (BSA) aufgestellt und das Working-Reagenz durch 50:1-Mischung der Reagenzien A und B hergestellt. Anschließend wurden jeweils 25µl einer Probe und des Standards als Doppelbestimmung auf eine 96-well-Platte (655901; Greiner bio-one) aufgetragen. Nach Zugabe von 200µl Working-Reagenz pro Well und Durchmischung auf der Rüttelplatte (Heidolph, Rotamax 120) erfolgte die dreißigminütige Inkubation bei 37°C. Die Messung der Absorption erfolgte im FLUOstar Omega bei 562nm, die Auswertung wurde mit der MARS Data Analysis Software (Version 2.41; BMG Labtech) vorgenommen.

### **3.2.2.2 Enzym-Substrat-Assays**

Zur Messung von Enzymaktivitäten wurden 4-Methylumbelliferyl (4-MU)- bzw. 7-Amido-4-methylcumarinylamid-gekoppelte Substrate verwendet, die den Lysaten zugegeben wurden. Die enzymatische Umsetzung dieser Substrate führte zu einer Freisetzung von 4-MU-Phosphat bzw. 7-Amino-4-methylcoumarin, dessen Fluoreszenz mit dem FLUOstar Omega (BMG Labtech) gemessen wurde. Die Höhe der gemessenen Fluoreszenz korrelierte dabei mit der Höhe des umgesetzten Substrats und damit mit der Aktivität des Enzyms. Dabei wurden alle in Tabelle 6 ersichtlichen Substrate der Hersteller Sigma-Aldrich und Santa-Cruz verwendet, sie lagen gelöst in DMSO vor. Um eine identische Inkubationszeit aller Assays zu gewährleisten, wurde die Injektions-Funktion des

FLUOstar Omegas verwendet. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in schwarzen OptiPlate-96 F-Platten (PerkinElmer) bei einer Exzitation von 360nm (4-MU-gekoppelte Substrate) bzw. 365nm (7-Amino-4-methylcoumarin-gekoppelte Substrate) und einer Emission von 440nm. Die Auswertung erfolgte mit der MARS Data Analysis Software (Version 2.41; BMG Labtech). Die durchschnittlich gemessene Fluoreszenz wurde gegen die Wildtyp-Aktivität verglichen. Fehlerbalken in Diagrammen zeigen den Standardfehler.

Die Messung erfolgte mittels Dreifachbestimmung einer Probe mit jeweils 5µg Protein, aufgefüllt mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 350µl. Nach Messung eines Nullwertes (0 min), erfolgte per FLUOstar Omega-Injektion die Zugabe von 2µl 5mM Substrat (2 min). Die Messung der resultierenden Fluoreszenz erfolgte bei 4 min, eine Korrektur gegenüber einer Nullprobe erfolgte. Zur Aktivitäts-Verlaufskontrolle erfolgte die weitere Messung der Fluoreszenz alle 2 Minuten über den Zeitraum einer Stunde.

*Tabelle 6: In Enzym-Substrat-Assays verwendete Fluoreszenz-gekoppelte Substrate*

<b>Hersteller</b>	<b>Bestell-Nr.</b>	<b>Substrat</b>	<b>Enzymklasse</b>
Sigma-Aldrich	19362	Buttersäure-4-methylumbelliferylester	Lipase
Sigma-Aldrich	69585	4-Methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosamid Dihydrat	N-acetyl-β-Glucosaminidase
Sigma-Aldrich	M0883	Essigsäure-4-methylumbelliferylester	Esterase
Sigma-Aldrich	M1633	4-Methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside	β-Galactosidase
Sigma-Aldrich	M2133	4-Methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide	β-N-Acetylglucosaminidase
Sigma-Aldrich	M3633	4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside	β-Glucosidase
Sigma-Aldrich	M3657	4-Methylumbelliferyl α-D-mannopyranoside	α-Mannosidase
Sigma-Aldrich	M7133	4-Methylumbelliferyl sulfate potassium salt	Sulfatase
Sigma-Aldrich	M8527	4-Methylumbelliferyl α-L-fucopyranoside	α-L-Fucosidase
Sigma-Aldrich	M8639	2'-(4-Methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate	Neuraminidase
Sigma-Aldrich	M8883	4-Methylumbelliferyl-phosphat	Phosphatase

Sigma-Aldrich	M9659	4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosaminid	$\beta$ -Galactosaminidase
Sigma-Aldrich	M9766	4-Methylumbelliferyl $\alpha$ -D-gluco-pyranoside	$\alpha$ -Galactosidase
Sigma-Aldrich	M9771	N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-4-methylcumarinylamid	Elastase
Santa-Cruz	sc-210120	4-Methylumbelliferyl 4-guanidinobenzoate hydrochlorid	Trypsin

### 3.2.2.3 SDS-Page

Für die Durchführung einer eindimensionalen Gelelektrophorese wurden gleiche Mengen an Proteinen 1:5 mit Laemmli Sample Buffer (161-0737; Bio-Rad) vermischt und bei 98°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proteine und des Proteinmarkers Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad) auf 4-15% Mini-PROTEAN TGX Precast Gele (456-1035; Bio-Rad). Die Gelelektrophorese wurde bei 100V über eine Stunde in einer Elektrophoresekammer (Mini-Trans Blot Cell, BioRad) durchgeführt, als Pufferlösung wurde der SDS-Running-Buffer verwendet. Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran.

### 3.2.2.4 Western Blot und Detektion

Zur Detektion der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Thermo Scientific). Dieser Transfer wurde mittels Tank-Blot-System (Bio-Rad) bei geplanter Lektin-Detektion mit 30V und 4°C über Nacht, bei folgender Immunodetektion mit 100V über eine Stunde erreicht. Anschließend erfolgte die Blockierung der Membran mittels einstündiger Inkubation in Carbo-Free-Blocking Solution (SP-5040; Vector Laboratories), 1:10 gelöst in TBS-T.

Bei Lektin-Detektion erfolgte die einstündige Inkubation mit 75 $\mu$ g biotinyliertem *Vicia villosa* Lektin und 2 $\mu$ l Streptavidin-HRP (21126; Pierce), gelöst in HBSS. Anschließend wurde die Membran sechsmalig mit TBS-T gewaschen.

Bei Immunodetektion erfolgte nach Blockierung die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht und eine folgende sechsmalige Reinigung mit TBS-T. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper hinzugegeben und nicht gebundene Antikörper nach einstündiger Inkubation sechsmalig mit TBS-T ausgewaschen.

Zur Auswertung erfolgte eine zehnmünütige Inkubation in ECL Western Blotting Substrate (32106; Pierce) und die anschließende Entwicklung auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten.

### **3.2.2.5 Low pressure liquid chromatography (LPLC)**

Um eine Konzentrierung von Tn-Antigen-tragenden Proteinen zu ermöglichen, erfolgte die Durchführung einer LPLC. Es wurde das BioLogic LP System (731-8301) zur Chromatographie sowie der BioFrac Fraction Collector (741-001) zum Auffangen der Proben verwendet. Als stationäre Phase wurde Agarose *Vicia villosa* Lektin (VVL) eingesetzt.

Zunächst erfolgte der Aufbau des Systems, eine Spülung mit dem Chromatographie-Bindungspuffer (CBB) und eine Kalibrierung der UV-Lampe. Die Chromatographie erfolgte nach Zugabe der Probe in den Bindungspuffer mit einem Gesamtvolumen von 25ml und einer Laufgeschwindigkeit der mobilen Phase von 5ml/min. Der Protein-UV-Grenzwert für das Auffangen der ausgewaschenen mobilen Phase lag bei 0,0050 AU, diese ausgewaschene Fraktion wird in dieser Arbeit als „mobile Phase“ tituiert. Anschließend erfolgte die Elution mit dem Elutionspuffer, diese Fraktion wird in dieser Arbeit „Elutionsphase“ genannt. Der Protein-UV-Grenzwert dieser Phase wurde bei 0,0010 AU eingestellt. Nach Abschluss der Chromatographie erfolgte in beiden Fraktionen eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Kit (siehe 3.2.2.1).

### **3.2.2.6 VVL-Pulldown**

Eine weitere Möglichkeit, Tn-Antigen-tragende Proteine zu konzentrieren, bestand im Pulldown mit Agarose *Vicia villosa* Lektin. Es erfolgte zunächst das zweimalige Waschen der Beads in HBSS, anschließend wurde dem Agarose-Granulat 200µg Protein hinzugegeben. Nach Inkubation für eine Stunde im Rotations-Inkubator erfolgte die sechsmalige Reinigung mit HBSS für jeweils 5 Minuten. Das Agarose-Granulat wurde anschließend in PBS gelöst und es erfolgte die Durchführung einer Proteinkonzentrationsbestimmung.

### **3.2.2.7 ELISA**

Für die Bestimmung von Enzym-Mengen in Lysaten wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Verwendet wurden dabei das Mouse Pancreatic Lipase (PL) ELISA Kit (MBS262534; MyBioSource.com) sowie das Mouse Elastase 2A (ELA2A) ELISA Kit (MBS9904371; MyBioSource.com). Vorgegangen wurde jeweils nach Beschreibung. Dazu

wurde eine Standardreihe angelegt, sowie die nötigen Vorbereitungsarbeiten durchgeführt. Anschließend wurden die Standardreihe und die Proben auf eine ELISA-Platte aufgetragen, es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung. Nach Inkubation für 90 Minuten bei 37°C erfolgte ein dreimaliger manueller Waschgang. Anschließend wurde der biotinylierte Antikörper den Proben zugegeben und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Zugabe des Enzyms und eine erneute Inkubation über 30 Minuten bei 37°C. Es erfolgte ein fünfmaliger Waschgang und die Zugabe der Farb-Reagenzien sowie eine erneute Inkubation bei 30°C. Diese wurde innerhalb von 30 Minuten, nach Bildung eines Farbgradientens mittels Zugabe des Stop-Reagenz unterbrochen. Die Auswertung des ELISAs erfolgte mit dem FLUOstar Omega (BMG Labtech) und der MARS Data Analysis Software (BMG Labtech).

### **3.2.2.8 Massenspektrometrische Proteomanalyse**

Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Identifizierung aller O-GalNAc-glykosylierten Proteinen der Lysate erfolgte zunächst ein VVL-Pulldown zur Konzentrierung der Tn-Antigen-tragenden Proteine. Die Proteine wurden mittels SDS-Page von weiteren in der Lösung enthaltenden Substanzen getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Identifizierung der Proteine mittels massenspektrometrischer Proteomanalyse.

## **3.2.3 Histologische Methoden**

### **3.2.3.1 Histologische Gewebefärbung**

Zur histologischen Färbung von Geweben wurde das Pankreas in Tissue-Tek (Sakura) für das Gefrierschnittverfahren eingelegt. Die Schnitte wurden zur Färbung in PBS gewaschen und mit dem HRP-AEC System eingefärbt (CTS003; R&D Systems), es wurde den Herstellerangaben gefolgt. Dazu wurde der Gewebeschnitt zunächst mit ein bis drei Tropfen Peroxidase Blocking Reagenz bedeckt und anschließend fünfmalig in Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Serum Blocking Reagenz G für 15 Minuten. Nach Entfernen des Reagenzes wurde die Probe, jeweils mit ein bis drei Tropfen, zunächst in Avidin Blocking Reagenz und nach Reinigung mit Puffer in Biotin Blocking Reagenz inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, eine folgende dreimalige Reinigung mit Puffer und die erneute Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundär-Antikörper für 30 bis 60 Minuten. Nach erneuter dreimaliger Reinigung in Puffer wurde der Gewebeschnitt in ein bis drei Tropfen HSS-HRP für 30 Minuten inkubiert und anschließend doppelt in Puffer gewaschen. Alternativ zur



Immunodetektion wurde die Probe mit einem hergestellten Konjugat aus biotinyliertem Lektin und Streptavidin-HRP inkubiert und anschließend mit Carbo-Free-Blocking Solution blockiert sowie mit Puffer mehrmals gewaschen. Nun wurden ein bis fünf Tropfen einer frisch zubereiteten AEC Chromogen Lösung mit Hilfe einer Tropfflasche auf dem gesamten Schnitt verteilt. Nach ausreichender Färbung wurde die Probe in destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen und anschließend mit Filterpapier getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem AXIO Scope.A1 (Zeiss) Mikroskop und einem BIOREVO BZ-9000 (Keyence).

### **3.3 Statistik**

Students T-Tests wurden verwendet, um die Unterschiede in den Durchschnitten zweier Fraktionen zu vergleichen. In Diagrammen entsprechen dabei Fehlerbalken dem Standardfehler mehrerer Wiederholungen ( $n \geq 3$ ). Statistische Signifikanzen in den Unterschieden zweier Fraktionen sind in den Diagrammen mit \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

Um die Signifikanz des Unterschieds zweier Messreihen zu berechnen, wurde der Mauchly-Test auf Sphärizität angewandt. Bei einer Signifikanz unter 0,05 wurde ein Korrekturverfahren durchgeführt. Bei  $\epsilon > 0,75$  wurde die Huyn-Feldt-Korrektur angewandt, bei  $\epsilon < 0,75$  die Greenhouse-Geisser-Korrektur. Die Auswertung erfolgte mit SPSS, ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

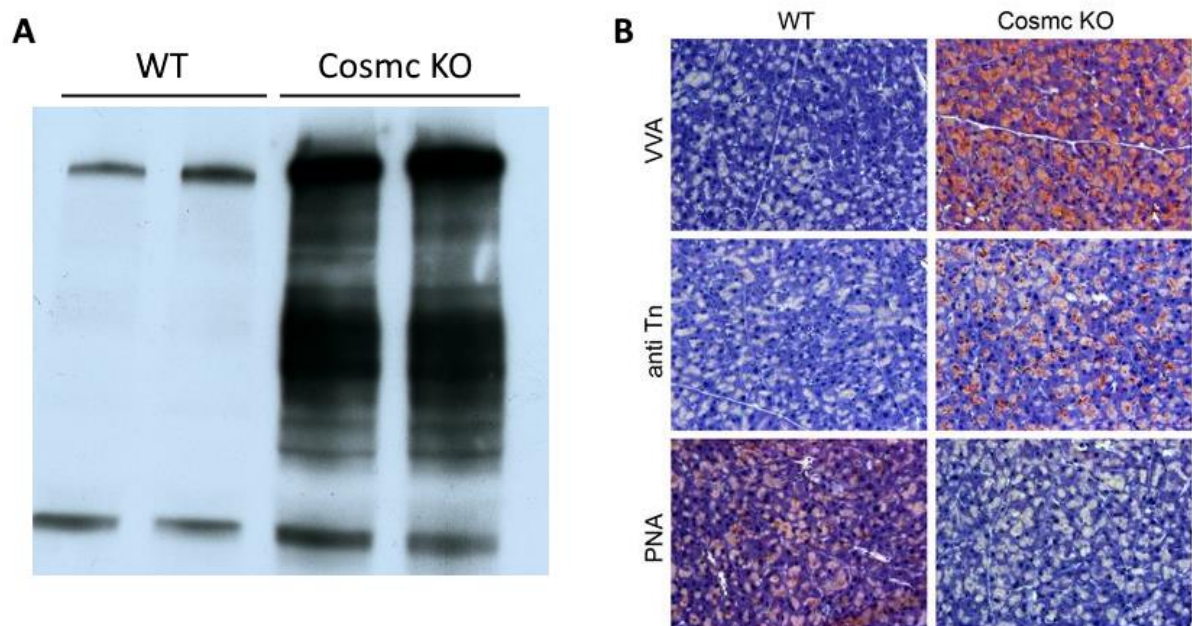
Zur Berechnung von Flächen unter Kurven (Area under curve, AUC) wurden Riemann Summen verwendet.

### **3.4 Studienzustimmung**

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit deutschen und europäischen Gesetzen zum Schutz experimenteller Tierversuche durchgeführt, es lag eine Zustimmung des verantwortlichen Gremiums der Freien und Hansestadt Hamburg vor (G4/15; ORG602; ORG616; A8/651).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kontrolle des erfolgreichen Cosmc-Knock-Outs im Mausmodell



**Abbildung 2: Nachweis des erfolgreichen Cosmc-Knock-outs im Mausmodell.**

(A) Repräsentativer Western Blot von pankreatischen Gesamtlysaten, das Tn-Antigen wurde mit VVL markiert. Eine Bandendemaskierung findet vor allem in den Cosmc-KO-Mäusen statt. (B) Repräsentative histologische Färbungen von Pankreasgewebe mit *Vicia villosa* Lektin (VVL), Peanut Lektin (PNA) und anti-Tn.

Zunächst erfolgte die Kontrolle des erfolgreichen Cosmc-Knock-outs im Pankreasgewebe. Da ein erfolgreicher Knock-out von Cosmc über eine T-Synthase-Inaktivität zu Tn-Antigen-Bildung führt, wurde dieses mittels *Vicia villosa* Lektin (VVL), einem Lektin, welches insbesondere an terminale O-GalNAc-Gruppen bindet, gezeigt. Dazu wurde das Gesamtlysat mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und eine Western Blot unter Detektion mit VVL vorgenommen (siehe Abbildung 2 A). Eine ubiquitäre Bandendemaskierung fand dabei vor allem in den Lysaten der Cosmc-KO-Mäusen statt, während im WT nur eine minimale Färbung zu beobachten ist. Dies deutet auf eine erfolgreiche Ausschaltung des Cosmc-Gens hin.

Weiter wurde der erfolgreiche Cosmc-Knock-out mittels histologischer Färbungen von pankreatischem Gewebe gezeigt. Die Färbung erfolgte mit VVL, PNA und anti-Tn (siehe Abbildung 2 B). Auch hier zeigte sich eine ausschließliche Expression von Tn-Antigen im Cosmc-KO, während eine Färbung im WT ausblieb. Die Ergebnisse von VVL und anti-Tn stimmten dabei überein. Im WT konnte dagegen nur eine Färbung des Gewebes bei PNA

beobachtet werden, welches vor allem an das T-Antigen bindet. Eine Färbung im KO blieb jedoch aus, was ebenfalls die erfolgreiche Cosmc-Ausschaltung zeigt.

## 4.2 Vergleich der Enzymaktivitäten im Knock-out und Wildtyp

### 4.2.1 Überblick zytoplasmatischer Aktivitäten

Das Pankreas weist eine ausgeprägte sekretorische Funktion auf. So wird eine Vielzahl von Enzymen exprimiert, die wichtige Rollen im Bereich der Verdauung übernehmen. Da O-Glykosylierungen einen Einfluss auf die Struktur, und damit auf die Aktivität der Enzyme haben können, wurden diese weiter untersucht (Stanley et al. 2015-2017). Zur Beurteilung, welche Enzyme durch die aberranten O-Glykosylierungen im Knock-out-Modell in ihrer Aktivität beeinflusst werden, wurden 4-Methylumbelliferyl (4-MU) bzw. 7-Amino-4-methylcumarinylamid-gekoppelte Substrate den Lysaten zugesetzt. Durch enzymatische Umsetzung des Substrats kommt es zur Freisetzung des fluoreszierenden 4-MU-Phosphats bzw. 7-Amino-5-methylcumarins, so dass die Gesamt-Fluoreszenz ein Marker für die Menge des umgesetzten Substrats und daher für die Aktivität des Enzyms ist.

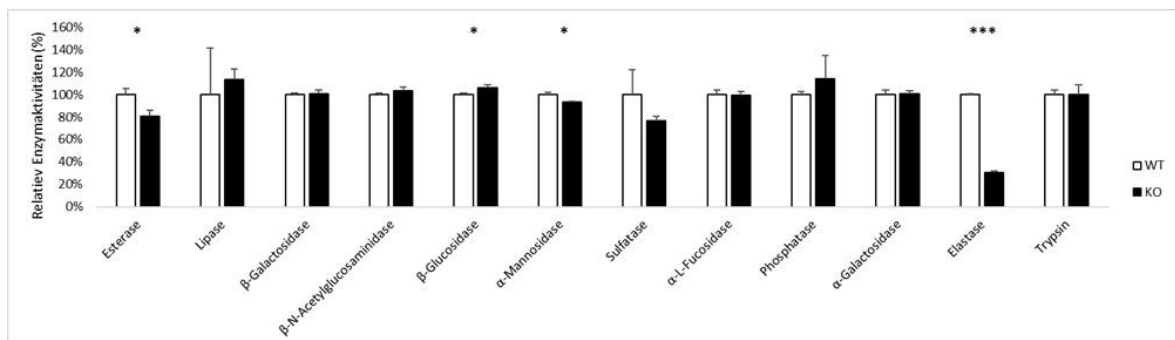


Abbildung 3: Relative Zytoplasma-Aktivitäten verschiedener Enzyme im KO im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Aktivität (n=3). Ein Unterschied der Aktivität konnte bei der Esterase ( $p=0,010$ ),  $\beta$ -Glucosidase ( $p=0,041$ ),  $\alpha$ -Mannosidase ( $p=0,009$ ) und der pankreatischen Elastase ( $p<0,001$ ) gezeigt werden.

Während bei den meisten Enzymen kein nennenswerter Unterschied in den Enzymaktivitäten beobachtet werden konnte, zeigten jedoch vier Enzyme einen signifikanten Unterschied in ihrer Aktivität im KO, verglichen zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3). Dabei war die  $\beta$ -Glucosidase das einzige getestete Enzym, dessen Aktivität im Knock-out-Modell gestiegen war, wenn der Unterschied mit  $6 \pm 3\%$  auch nur gering ausfiel ( $p=0,041$ ). Dahingegen konnte bei den Enzymen Esterase,  $\alpha$ -Mannosidase und der pankreatische Elastase ein signifikant erniedrigtes Aktivitätsniveau beobachtet werden. Dieses fiel bei der  $\alpha$ -Mannosidase mit einem Unterschied von  $6 \pm 2\%$  am geringsten aus

( $p=0,009$ ), der größte Abfall der Aktivität konnte bei der Elastase mit  $69 \pm 1\%$  ( $p<0,001$ ) gezeigt werden.

Der Aktivitätsunterschied der Esterase zwischen Knock-out-Modell und Wildtyp betrug  $19 \pm 7\%$  ( $p=0,010$ ). Eine über einen längeren Zeitraum durchgeführte Messung der Fluoreszenz und damit eine indirekte Bestimmung der umgesetzten Substratmenge über die Zeit zeigte, dass sich dieser Einfluss auch über einen längeren Zeitraum auswirkt. So hat das Vorhandensein von aberranten O-Glykosylierungen einen signifikanten Einfluss auf den Kurvenverlauf ( $p=0,017$ ; siehe Abbildung 4). Die gesamte umgesetzte Substratmenge war im KO nach 60 Minuten um  $16 \pm 8\%$  signifikant niedriger ( $p=0,025$ ; siehe Abbildung 5), was auch dem initialen Aktivitätsunterschied entspricht.

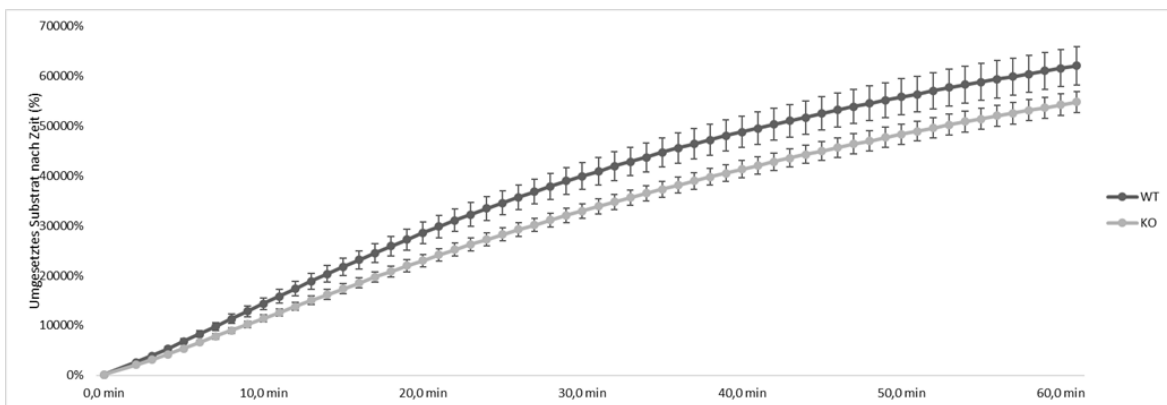


Abbildung 4: Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit verglichen zur Null-Fluoreszenz des WTs (Zugabe des Substrates bei 2,0 min;  $n=3$ ). Es besteht ein signifikante erhöhter Kurvenverlauf der WT-Kurve ( $p=0,017$ ).

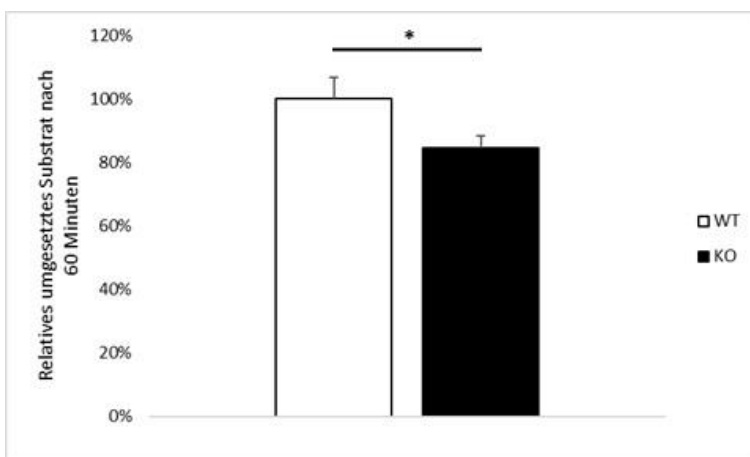


Abbildung 5: Nach 60 Minuten durch die Esterase enzymatisch umgesetztes Substrat im KO im Vergleich zum WT, gemessen an der Fläche unter der Kurve (Area under curve; AUC) ( $n=3$ ). Im Wildtyp sind  $16 \pm 8\%$  weniger Substrat umgesetzt worden ( $p=0,025$ ).

Die weiteren getesteten Enzyme zeigten keine signifikanten Unterschiede der Gesamtaktivität. Dabei lässt sich allerdings kein Rückschluss auf die Aktivität eines einzelnen Moleküls schließen. Wie die weitere Arbeit zeigen wird, kann es bei einigen Enzymen der Fall sein, dass aufgrund einer geringeren Aktivität eines einzelnen Moleküls

eine kompensatorisch erhöhte Expression vorliegt, so dass *in vivo* die zytoplasmatische Gesamtaktivität des Enzyms in beiden Modellen annähernd gleich ist.

## 4.2.2 Einfluss der aberranten O-Glykosylierungen auf die intrazelluläre Verteilung und Funktion von pankreatischen Enzymen

### 4.2.2.1 Überblick

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, haben O-Glykosylierungen einen Einfluss auf die intrazellulären Transportvorgänge (Varki 2017). Die untersuchten O-GalNAc-Glykosylierungen befinden sich vor allem auf membrangebundenen und sekretorischen Proteinen (Steentoft et al. 2013). Da insbesondere das exokrine Pankreas eine ausgeprägte Sekretion aufweist, bestand der nächste Schritt darin, die Zymogengranula der Pankreaszellen aufzureinigen und deren Enzymaktivitäten gegenüber der Kontrollgruppe und dem Zytoplasma zu vergleichen.

**Tabelle 7: Aktivitätsunterschiede im KO**

Enzymaktivität des KOs, verglichen mit der WT-Aktivität in Zytoplasma und Zymogengranula. Aktivitätszunahme von Zytoplasma zu Zymogengranula in WT und KO, sowie die Signifikanz des Unterschieds dieser Aktivitätszunahmen in WT und KO.

	Zytoplasma		Zymogengranula		Aktivitätszunahme in den Zymogengranula				
	KO-Aktivität		KO-Aktivität		WT		KO	Unterschied WT und KO	
Esterase	-19 ± 5%	p=0,010	19 ± 21%	p=0,183	323 ± 10%	p<0,001	525 ± 108%	p=0,001	p=0,032
Lipase	13 ± 10%	p=0,615	13 ± 12%	p=0,388	527 ± 129%	p=0,010	524 ± 68%	p<0,001	p=0,974
β-Galactosidase	1 ± 3%	p=0,589	-3 ± 0%	p=0,475	-1 ± 7%	p=0,868	-5 ± 3%	p=0,039	p=0,470
β-N-Acetylglucosaminidase	4 ± 3%	p=0,109	-2 ± 2%	p=0,563	0 ± 4%	p=0,991	-5 ± 3%	p=0,060	p=0,214
β-Glucosidase	6 ± 3%	p=0,041	-7 ± 1%	p=0,003	9 ± 2%	p=0,010	-4 ± 3%	p=0,083	p=0,006
α-Mannosidase	-6 ± 1%	p=0,009	-11 ± 3%	p=0,404	9 ± 22%	p=0,593	4 ± 4%	p=0,162	p=0,747
Sulfatase	-23 ± 4%	p=0,150	-51 ± 5%	p=0,232	162 ± 165%	p=0,258	68 ± 18%	p=0,003	p=0,467
α-L-Fucosidase	0 ± 3%	p=0,892	0 ± 1%	p=0,781	-8 ± 4%	p=0,057	-8 ± 3%	p=0,017	p=0,977
Phosphatase	14 ± 21%	p=0,295	-21 ± 4%	p=0,003	288 ± 16%	p<0,001	166 ± 23%	p<0,001	p=0,002
α-Galactosidase	1 ± 3%	p=0,771	-1 ± 2%	p=0,842	-3 ± 11%	p=0,667	-6 ± 3%	p=0,048	p=0,801
Elastase	-69 ± 1%	p<0,001	-69 ± 1%	p<0,001	-14 ± 4%	p=0,020	-15 ± 4%	p=0,002	p=0,831
Trypsin	0 ± 9%	p=1,000	-26 ± 9%	p=0,007	79 ± 4%	p<0,001	32 ± 18%	p=0,036	p=0,013

Bei den meisten Enzymen zeigte sich, analog zum Zytoplasma, kein Unterschied in den Gesamtaktivitäten der Zymogengranula (siehe Tabelle 7). Ausnahmen hiervon stellten die β-Glucosidase, Phosphatase, Elastase und Trypsin dar. Eine vermehrte Zunahme der Enzym-Gesamtaktivität in den Zymogengranula konnte bei der Esterase, Lipase, β-Glucosidase, Phosphatase und Trypsin gesehen werden, im KO zusätzlich bei der

Sulfatase. Abnahmen der Aktivität der Zymogengranula lagen bei der Elastase, im KO zusätzlich bei der  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase und der  $\alpha$ -L-Fucosidase vor. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Aktivitätsunterschiede teilweise, insbesondere bei Abnahme, nur gering ausfielen. Die im Knock-out verglichen zum WT zusätzlich beobachteten Unterschiede in der Aktivität waren dabei zu 80% abnehmend. Der Unterschied in den Aktivitätszunahmen zwischen Zytoplasma und Zymogengranula und damit einer veränderten Konzentrierung der Enzyme in den Zymogengranula von WT und KO waren bei der Esterase,  $\beta$ -Glucosidase, Phosphatase und Trypsin signifikant.

#### 4.2.2.2 Trypsin

Trypsin stellt eine wichtige sekretorische Protease des exokrinen Pankreas dar. Das Protein liegt in den Zymogengranula als Proenzym vor, dass erst intraluminal aktiviert wird. Daher ist eventuell eine nur um  $79 \pm 4\%$  (WT;  $p < 0,001$ ) bzw.  $32 \pm 18\%$  (KO;  $p = 0,036$ ) erhöhte Aktivität in den Zymogengranula zu erklären. Trotzdem lässt sich ein Unterschied in der Aktivität von WT und KO-Modell beobachten. So ist die Gesamtaktivität im Zytoplasma zwar annähernd gleich, in den Zymogengranula liegt jedoch eine um  $26 \pm 9\%$  geringere Aktivität vor ( $p = 0,007$ ). Die vermehrte Konzentrierung in den Zymogengranula beträgt im Wildtyp  $79 \pm 4\%$  ( $p < 0,001$ ), im Knock-out dagegen nur  $32 \pm 18\%$  ( $p = 0,036$ ), dies entspricht einer um  $46 \pm 18\%$  geringe Zunahme im KO ( $p = 0,013$ ).

#### 4.2.2.3 Lipase

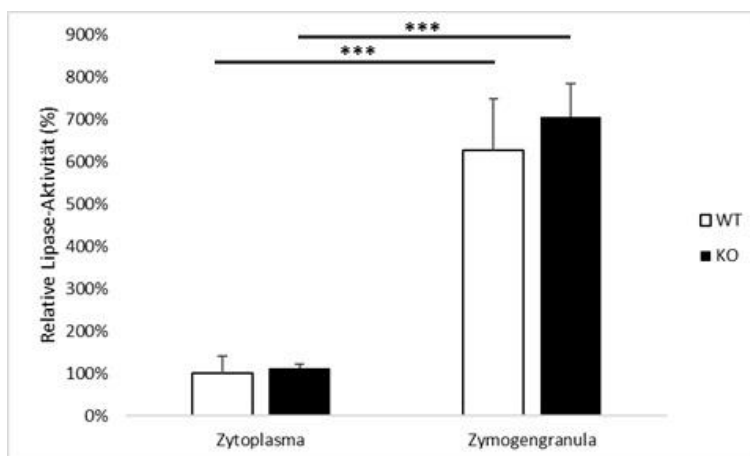


Abbildung 6: Relative Gesamtaktivität der Lipase im Zytoplasma und den Zymogengranula im WT und KO im Vergleich zur Zytoplasma-Aktivität des Wildtyps ( $n = 3$ ). Sowohl im WT, als auch im KO liegt eine deutliche erhöhte Aktivität in den Zymogengranula vor (jeweils  $p < 0,001$ ).

Die Überprüfung der erfolgreichen Zymogengranula-Aufreinigung erfolgte durch Messung und Vergleich der Lipase-Gesamtaktivität im Zytoplasma und den Zymogengranula (siehe Abbildung 6). Die Lipase sollte hierbei als sekretorisches Enzym in den Zymogengranula eine verstärkte Aktivität zeigen. Dies konnte in beiden Mausmodellen beobachtet werden. Der Unterschied betrug im Wildtyp  $527 \pm 129\%$  ( $p < 0,001$ ), im Knock-out  $524 \pm 68\%$

( $p < 0,001$ ). Dadurch konnte auf eine ausreichende Zymogengranula-Aufreinigung geschlossen werden. Es konnte zwar eine leicht höhere enzymatische Gesamtaktivität in den Zymogengranula des KOs, verglichen mit der des WTs, beobachtet werden, jedoch viel dieser nur gering aus ( $p = 0,388$ ).

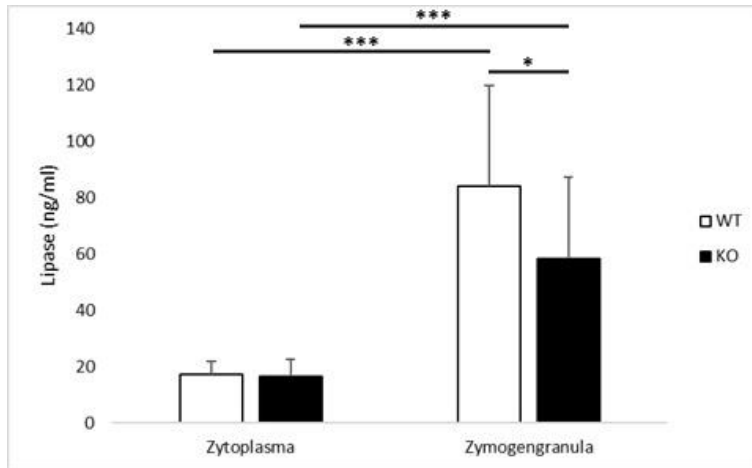


Abbildung 7: Bestimmung der Lipase-Mengen im Zytoplasma und den Zymogengranula im WT und KO ( $n = 18$ ). Es liegt in beiden Modellen eine erhöhte Konzentrierung in den Zymogengranula vor (jeweils  $p < 0,001$ ), es besteht allerdings eine signifikant erniedrigte Lipase-Menge in den Zymogengranula des KOs ( $p = 0,023$ ).

Eine weitere Erfolgskontrolle der durchgeführten Zymogengranula-Aufreinigung erfolgte durch die Bestimmung der Lipase-Mengen in den einzelnen Fraktionen mittels ELISA (siehe Abbildung 7). Aufgrund der sekretorischen Funktion der Lipase sollte eine verstärkte Konzentrierung des Enzyms in den Zymogengranula beobachtet werden können. Dies konnte in beiden Modellen gezeigt werden. Im Zytoplasma beider Modelle waren die Lipase-Mengen nahezu gleich. Dahingegen war eine um  $25,9 \pm 46,0$  ng/ml geringere Lipase-Menge in den Zymogengranula des KOs zu beobachten ( $p = 0,023$ ). Der Anstieg der Lipase-Konzentration von Zytoplasma zu Zymogengranula betrug im WT  $67,1 \pm 36,1$  ng/ml ( $p < 0,001$ ), im KO  $41,8 \pm 29,6$  ng/ml ( $p < 0,001$ ). Es ist daher in beiden Modellen eine signifikant erhöhte Konzentrierung der Lipase in den Zymogengranula zu beobachten. Allerdings viel diese Konzentrierung im KO um  $139 \pm 276\%$  geringer aus als im WT ( $p = 0,040$ ).

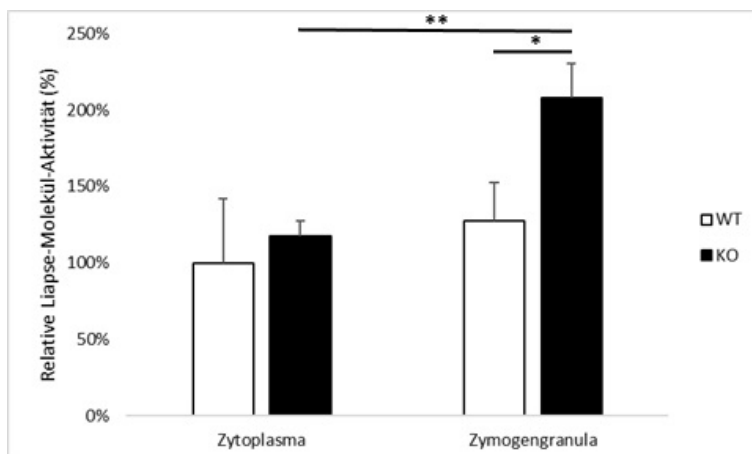


Abbildung 8: Relative Molekül-Aktivität der Lipase in Zytoplasma und den Zymogengranula von WT und KO im Vergleich zur WT-Zytoplasma-Aktivität ( $n = 3$ ). In den Zymogengranula des KOs besteht eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Zytoplasma ( $p = 0,003$ ), sowie zur WT-Aktivität ( $p = 0,014$ ).

Aufgrund der nun bekannten Gesamtaktivitäten und der Lipase-Mengen in allen Fraktionen ließ sich nun die relative Aktivität der einzelnen Lipase-Moleküle in allen Kompartimenten bestimmen (siehe Abbildung 8). Hierbei zeigte sich, dass im Wildtyp kein nennenswerter Unterschied der Molekül-Aktivitäten von Zytoplasma und den Zymogengranula bestand ( $p=0,519$ ). Auch konnte in der zytoplasmatischen Fraktion kein Unterschied von WT zu KO-Aktivität gemessen werden ( $p=0,383$ ). Dahingegen zeigte sich im KO erstaunlicherweise eine um  $77 \pm 21\%$  stark erhöhte Aktivität derjenigen Lipase-Moleküle, die sich in den Zymogengranula befanden, verglichen mit denjenigen im Zytoplasma ( $p=0,003$ ). Zudem lag die Aktivität der Lipase-Moleküle der Zymogengranula des KO um  $63 \pm 26\%$  über der des WT ( $p=0,014$ ). Dabei ist zudem zu beachten, dass die Gesamtaktivität der Lipase in den Zymogengranula des KO aufgrund einer geringeren Lipase-Menge die des WT nicht signifikant übersteigt (siehe Abbildung 6).

#### 4.2.2.4 Elastase

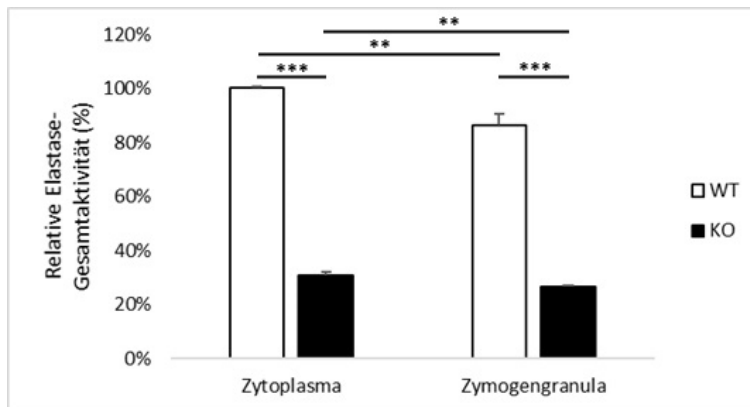


Abbildung 9: Relative Gesamtaktivität der Elastase im Zytoplasma und den Zymogengranula des KO im Vergleich zur WT-Zytoplasma-Aktivität ( $n=3$ ). Es besteht eine leicht erniedrigte Aktivität in den Zymogengranula (WT:  $p=0,005$ ; KO:  $p=0,002$ ), zudem eine stark erniedrigte Aktivität im KO (jeweils  $p<0,001$ ).

Während bei der Lipase eine Aktivitätszunahme in den Zymogengranula beobachtet werden konnte, war dies bei der Elastase nicht der Fall (siehe Abbildung 9). Hier konnte im WT vielmehr eine um  $14 \pm 4\%$  erniedrigte Gesamtaktivität in den Zymogengranula beobachtet werden ( $p=0,005$ ). Auch im KO lag eine um  $15 \pm 4\%$  leicht erniedrigte Elastase-Aktivität in den Zymogengranula vor ( $p=0,002$ ). Erstaunlicherweise zeigte sich jedoch in beiden Fraktionen eine ausgeprägt niedrigere Aktivität der Elastase im KO. Der Unterschied betrug im Zytoplasma  $69 \pm 1\%$  ( $p<0,001$ ), in den Zymogengranula  $69 \pm 5\%$  ( $p<0,001$ ).

Daraufhin wurden die Elastase-Mengen im Gesamtlysat beider Modelle mittels ELISA bestimmt (siehe Abbildung 10). Während im WT eine Konzentration von  $316,0 \pm 182,5$  ng/ml gemessen wurde, lag diese im KO bei  $1063,1 \pm 536,7$  ng/ml. Es liegt somit eine um den Faktor 3,36 erhöhte Expression von Elastase im KO vor ( $p<0,001$ ).



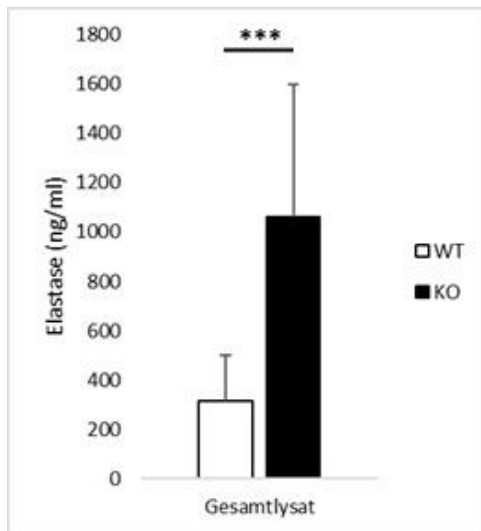


Abbildung 10: Bestimmung der Elastase-Mengen im Gesamtlysate von WT und KO (n=15). Im KO liegt eine um 3,36-fach erhöhte Menge an Elastase vor (p<0,001).

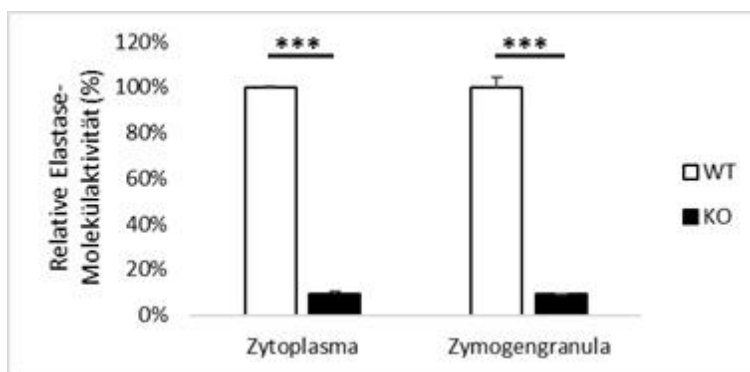


Abbildung 11: Relative Molekülaktivität der Elastase im Zytoplasma und den Zymogengranula im KO im Vergleich zur WT-Aktivität (n=3). Im KO liegt eine um 91% erniedrigte Aktivität eines Elastase-Moleküls vor (jeweils p<0,001).

Unter Betrachtung von Gesamtaktivitäten und Elastase-Mengen in beiden Modellen, lässt sich somit die relative Molekül-Aktivität berechnen (siehe Abbildung 11). Im Zytoplasma liegt diese im KO um  $91 \pm 1\%$  ( $p < 0,001$ ) unter der des WTs, in den Zymogengranula um  $91 \pm 5\%$  ( $p < 0,001$ ).

Trotz offenbar vorhandener kompensatorisch erhöhter Expression der Elastase im KO, von Nöten aufgrund einer stark erniedrigten Aktivität der Elastase in diesem Modell, kann eine normale Gesamtaktivität nicht erreicht werden. Die stark eingeschränkte Funktion der Elastase im Knock-out-Modell ist dabei möglicherweise auf vorhandene aberrante O-Glykosylierungen zurückzuführen, die einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität haben.

#### 4.2.2.5 Esterase

Da sich im Zytoplasma eine geringe Aktivität der Esterase im Knock-out-Modell gezeigt hat, erfolgte die Kontrolle der Gesamtaktivität in der Zymogengranula-Fraktion. Auch hier konnte, analog zur Lipase, eine Aktivitätssteigerung in der Zymogengranula-Fraktion

beobachtet werden (siehe Abbildung 12). Diese lag bei  $323 \pm 10\%$  im WT ( $p < 0,001$ ) und bei  $525 \pm 108\%$  im KO ( $p = 0,001$ ). Die vermehrte Zunahme der Aktivität in den Zymogengranula des KOs um  $202 \pm 108\%$ , verglichen zu der Zunahme im WT, war signifikant ( $p = 0,031$ ). Insgesamt zeigte sich hierbei, im Gegensatz zum Zytoplasma, eine leicht erhöhte Gesamtaktivität der Esterase im KO, ohne dass dieser Unterschied jedoch signifikant war ( $p = 0,183$ ).

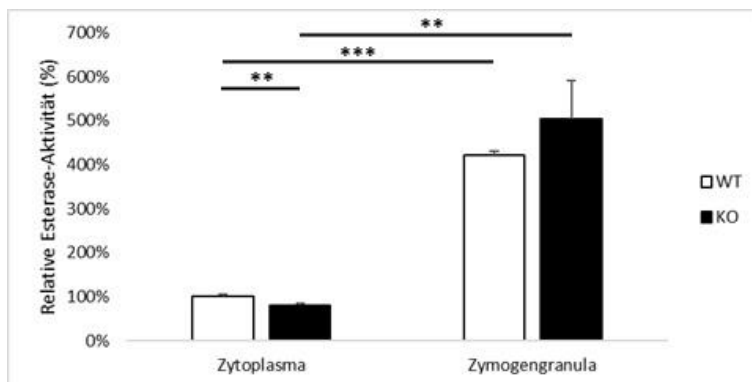


Abbildung 12: Relative Gesamtaktivität der Esterase im Zytoplasma und den Zymogengranula von WT und KO im Vergleich zur Zytoplasma-Aktivität des Wildtyps ( $n = 3$ ). Es besteht eine leicht erniedrigte Aktivität im Zytoplasma des KOs ( $p = 0,009$ ), und eine deutliche Aktivitätszunahme in den Zymogengranula (WT:  $p < 0,001$ ; KO:  $p = 0,001$ ).

Die Durchführung eines ELISAs war mangels Antikörper nicht möglich, so dass ein Rückschluss auf die Molekül-Aktivität der Esterase nicht möglich ist. Es ist aber davon auszugehen, dass aufgrund der signifikant erniedrigten Aktivität der Esterase im Zytoplasma der Knock-out-Maus eine O-Glykosylierung der Esterase vorhanden ist, deren Verkürzung einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

### 4.3 Einfluss von aberranten O-Glykosylierungen auf die Stimulierbarkeit des Pankreas

Da das Pankreas im Organismus eine ausgeprägte sekretorische Funktion übernimmt, und O-GalNAc-Glykosylierungen insbesondere auf sekretorischen Proteinen zu finden sind (Stentoft et al. 2013), stellte sich die Frage, inwiefern aberrante O-Glykosylierungen, wie sie im Cosmc-KO-Mausmodell zu finden sind, einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der exokrinen Pankreasfunktion haben. Hierfür wurden primäre Zellkulturen aus Pankreaszellen der Maus-Modelle angelegt und diese mit Caerulein inkubiert. Dieses wirkt auf CCK1-Rezeptoren, was über eine intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Steigerung zu einer Sekretion von Verdauungsenzymen führt (Bruzzone et al. 1986; Noble et al. 1999).

### 4.3.1 Lipase

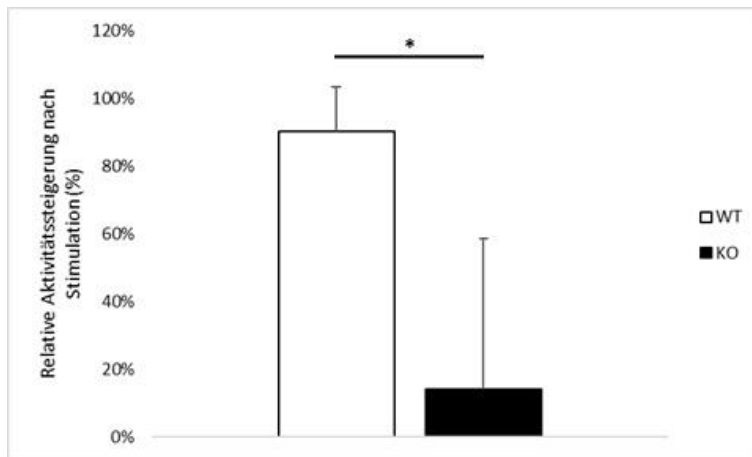


Abbildung 13: Steigerung der Lipase-Aktivität nach Caerulein-Stimulation im Sekret von WT und KO (n=3). Zunahme der Aktivität nach Stimulation im WT um  $90 \pm 23\%$  ( $p=0,031$ ), im KO um  $14 \pm 42\%$  ( $p=0,681$ ).

Nach der Inkubation in Caerulein erfolgte die Messung der Lipase-Aktivität im Sekret (siehe Abbildung 13). Hierbei zeigte sich, dass im WT durch die Stimulation eine signifikante Aktivitätssteigerung in Höhe von  $90 \pm 23\%$  gemessen worden ist ( $p=0,031$ ). Im Knock-out-Modell war allenfalls eine minimale Aktivitätssteigerung zu beobachten ( $p=0,681$ ). Bei einem direkten Vergleich der Zunahme der Aktivität nach Stimulation beider Gruppen konnte eine um  $76 \pm 48\%$  signifikant höhere Aktivitätszunahme im Wildtyp beobachtet werden ( $p=0,014$ ). Es ist daher davon auszugehen, dass die aberranten O-Glykosylierungen im Knock-out-Modell zu einer verminderten Stimulierbarkeit der Pankreaszellen führen, trotz einer bereits gezeigten erhöhten Lipase-Molekül-Aktivität in den Zymogengranula (siehe Abbildung 8).

### 4.3.2 Esterase

Auch bei der Esterase konnte eine geringe Stimulierbarkeit beobachtet werden (siehe Abbildung 14). So konnte eine um  $68 \pm 13\%$  gesteigerte Enzym-Aktivität im stimulierten Sekret des Wildtyps beobachtet werden ( $p=0,033$ ), während im Knock-out-Modell nur eine insignifikante um  $8 \pm 45\%$  erhöhte Aktivität beobachtet worden ist ( $p=0,825$ ). Zusammengefasst zeigte sich eine um  $60 \pm 46\%$  erhöhte Stimulierbarkeit des Wildtyps ( $p=0,034$ ), was den Beobachtungen der Lipase-Aktivitätssteigerung entspricht.

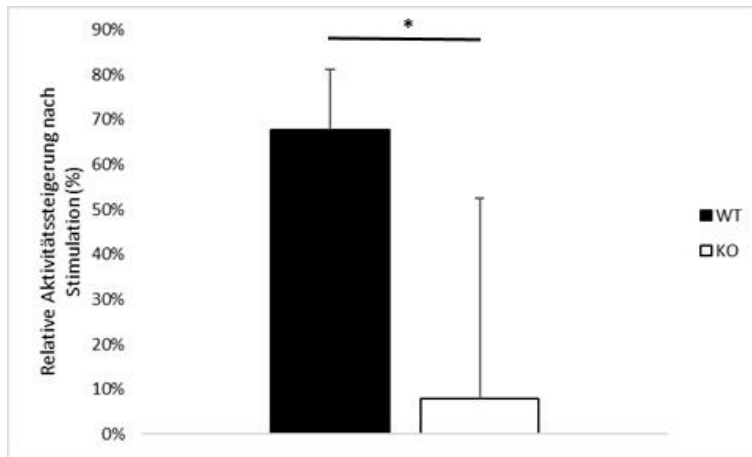


Abbildung 14: Steigerung der Esterase-Aktivität nach Caerulein-Stimulation im Sekret von WT und KO (n=3). Zunahme der Aktivität nach Stimulation im WT um  $68 \pm 13\%$  ( $p=0,033$ ), im KO um  $8 \pm 45\%$  ( $p=0,611$ ).

## 4.4 Identifizierung O-GalNAc-glykosylierter Proteine

### 4.4.1 LPLC und VVL-Pulldown

Um überprüfen zu können, ob ein möglicher Aktivitätsunterschied eines Enzyms auf aberranten O-Glykosylierungen beruhen kann (siehe Abbildung 3), wurde eine low pressure liquid chromatography (LPLC) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde dabei Agarose *Vicia villosa* Lektin (VVL) verwendet, dass insbesondere an terminale O-GalNAc-Gruppen bindet und somit eine Konzentrierung von Tn-Antigen-tragenden Proteinen in der Elutionsphase erreicht. Die Aktivität verschiedener Enzyme in dieser Phase wurde anschließend mit derjenigen in der ausgewaschenen mobilen Phase verglichen.

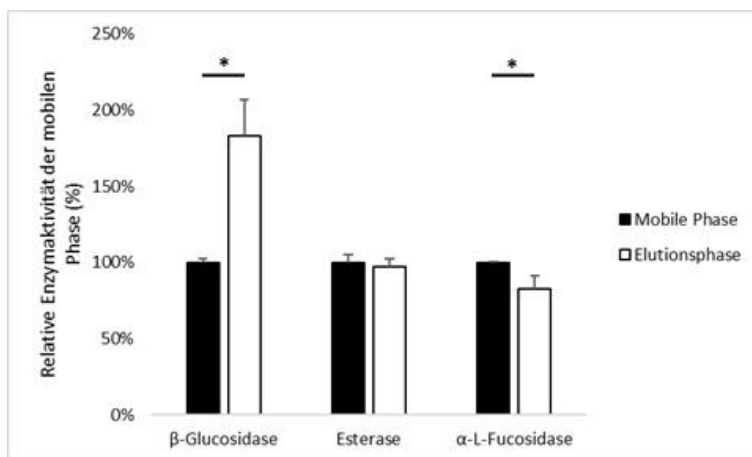


Abbildung 15: Vergleich von Enzym-Aktivität in mobiler und Elutionsphase des Knock-out-Modells nach Chromatographie verglichen zur jeweiligen WT-Aktivität (n=3). Erhöhte Aktivität der β-Glucosidase in der Elutionsphase ( $p=0,039$ ), während die α-L-Fucosidase eine erniedrigte Aktivität zeigt ( $p=0,023$ ).

Die β-Glucosidase zeigte bereits im Zytoplasma des Knock-out-Modells eine um  $6 \pm 3\%$  erhöhte Gesamtaktivität (siehe Abbildung 3). Wie die Ergebnisse der LPLC zeigten, sind aberrante O-Glykosylierungen eine wahrscheinliche Ursache für diese Beobachtung. So konnte in der Elutionsphase eine um  $83 \pm 24\%$  erhöhte Aktivität gemessen werden (siehe Abbildung 15;  $p=0,040$ ). Eine somit bestehende Konzentrierung des Enzyms in der Elutionsphase könnte daher auf ein vermehrtes Vorhandensein von O-GalNAc-

Glykosylierungen der  $\beta$ -Glucosidase zurückzuführen sein, die zu einer vermehrten Adhäsion an die stationäre Phase führten. Aberrante O-Glykosylierungen des Enzyms könnten daher zu einer leicht veränderten Struktur und einer folgenden, vermehrten Gesamtaktivität der  $\beta$ -Glucosidase im Knock-out führen.

Während die  $\alpha$ -L-Fucosidase im Zytoplasma keinen nennenswerten Unterschied in der Aktivität im WT und KO zeigte (siehe Abbildung 3), konnte dagegen bei der Auswertung der LPLC sogar eine um  $17 \pm 8\%$  geringere Aktivität in der Elutionsphase beobachtet werden ( $p=0,023$ ). Trotz dieser geringeren Aktivität des Enzyms in der Elutionsphase, und damit einer nur geringen Bindung an das Lektin, ist kein definitiver Rückschluss auf das Vorhandensein von O-Glykosylierungen möglich.

Dem gegenüber zeigte die Esterase zwar mit  $19 \pm 7\%$  große Unterschiede in ihrer Zytoplasma-Aktivität im KO (siehe Abbildung 3), doch ob der Grund hierfür in aberranten O-Glykosylierungen des Enzyms liegt, konnte mittels LPLC nicht weiter eingegrenzt werden, da die Enzym-Gesamtaktivität der Elutionsphase annähernd derjenigen der mobilen Phase entspricht ( $p=0,617$ ).

Daher erfolgte mittels VVL-Pulldown eine weitere Methode, Tn-Antigen-tragende Enzyme zu konzentrieren. Bei dieser Methode kommt es, analog zur LPLC, durch Bindung terminaler O-GalNAc-Gruppen an das Lektin zu einer Konzentrierung von Tn-Antigenen.

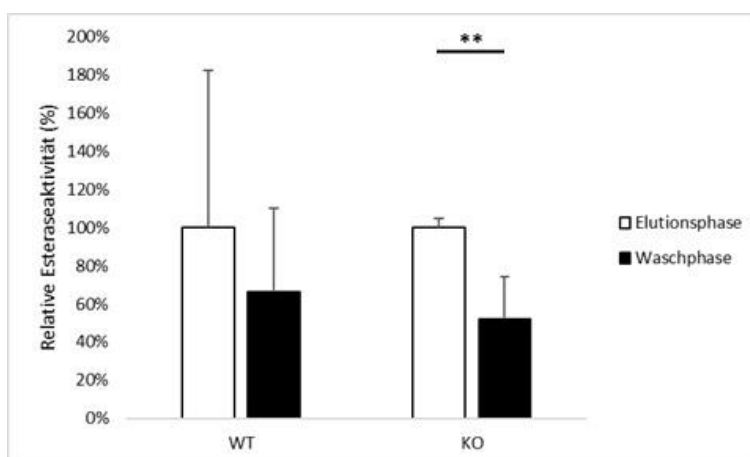


Abbildung 16: Esterase-Aktivitätsunterschiede nach VVL-Pulldown in der Elutions- und Waschphase ( $n=4$ ). Erniedrigte Aktivität der Esterase in der Waschphase des KOs ( $p=0,006$ ).

Bei einem Vergleich der Aktivitätsunterschiede der Esterase in Elutions- und Waschphase des Wildtyps war, auch aufgrund großer Standardabweichungen, kein Unterschied zu erkennen. Dies deutet auf eine eher unspezifische Bindung der Proteine hin. Dies steht im Einklang mit dem verwendeten Lektin, dass insbesondere Tn-Antigen bindet, welches in der Kontrollgruppe nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 2). Im Knock-out-Modell konnte in der Waschphase jedoch eine um  $48 \pm 23\%$  niedrigere Aktivität beobachtet werden

( $p=0,006$ ). Die bestehende Konzentrierung der Esterase in der Elutionsphase ist daher vermutlich auf aberranten O-Glykosylierungen des Enzyms zurückzuführen, was wiederum eine Erklärung für die im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Aktivität des Enzyms sein kann.

#### 4.4.2 Massenspektrometrische Proteomanalyse

Zur weiteren Identifizierung O-GalNAc-glykosylierter Proteine erfolgte die Durchführung einer massenspektrometrischen Proteomanalyse nach Konzentrierung von Tn-Antigen-tragenden Proteinen mittels VVL-Pulldown. In Tabelle 8 sind alle identifizierten Proteine aufgeführt, die an der exokrinen Funktion des Pankreas direkt oder indirekt beteiligt sind.

**Tabelle 8: Mittels LC-MS/MS identifizierte, Tn-Antigen-tragende Proteine im KO-Gesamtlysat**

Score: Maß für die Sicherheit einer korrekten Identifizierung

Molekulare Funktion: Nach UniProt (The UniProt Consortium 2018), teilweise durch weitere Publikationen weiter gesichert (siehe Text)

Anzahl Predictions: Mit NetOGlyc 4.0 Server ermittelte Anzahl an Positionen, an denen mit einer Wahrscheinlichkeit von >50% eine O-Glykosylierung vorliegt (Steentoft et al. 2013)

UniProtKB-Nr.	Protein-Name	Kürzel	Masse [kDa]	Score	Molekulare Funktion	Anzahl Predictions
Q60997	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1_MOUSE	226,7	59,05	Zymogen-Interaktion	113
Q8VDJ3	Vigilin	VIGLN_MOUSE	141,7	285,34	Lipid-Transport, Steroid-Metabolismus, RNA-Bindung	25
P97449	Aminopeptidase N	AMPN_MOUSE	109,6	42,08	Aminopeptidase	16
Q8BHN3	Neutral alpha-glucosidase AB	GANAM_MOUSE	106,8	99,43	Glucosidase der Glc2Man9GlcNAc2 Oligosaccharide	3
O35643	AP-1 complex subunit beta-1	AP1B1_MOUSE	103,9	55,44	Intrazellulärer Transport, trans-Golgi-Netzwerk/ Endosom-Sortierung	27
P08113	Endoplasmin	ENPL_MOUSE	92,4	444,59	Chaperon: Faltung und Transport von Sekretproteinen	15
Q02248	Catenin beta-1	CTNB1_MOUSE	85,4	23,07	Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg	5
Q8R146	Acylamino-acid-releasing enzyme	APEH_MOUSE	81,5	32,83	Hydrolyse N-terminaler Peptide	2
P09405	Nucleolin	NUCL_MOUSE	76,7	58,16	Transkription	28
P20029	Grp-78	GRP78_MOUSE	72,4	360,26	Chaperon im ER	3
Q64285	Bile salt-activated lipase	CEL_MOUSE	65,8	516,25	Lipase	13
P00688	Pancreatic alpha-amylase	AMYP_MOUSE	57,3	325,07	alpha-Amylase	3

Q5BKQ5	Inactive pancreatic lipase-related protein 1	LIPR1_MOUSE	52,7	152,65	Lipase	2
P17892	Pancreatic lipase-related protein 2	LIPR2_MOUSE	52,6	75,69	Lipase	1
P61620	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	S61A1_MOUSE	52,2	104,23	Benötigt für die Synthese von Membrangebundenen und sekretorischen Proteinen	1
Q6P8U6	Pancreatic triacylglycerol lipase	LIPP_MOUSE	51,4	471,75	Lipase	0
Q7TPZ8	Carboxypeptidase A1	CBPA1_MOUSE	47,4	37,17	Carboxypeptidase	6
Q9JK88	Serpin I2	SPI2_MOUSE	45,7	120,81	Protease-Inhibitor	1
Q9D154	Leukocyte elastase inhibitor A	ILEUA_MOUSE	42,5	50,19	Interaktion mit Chymotrypsin, Elastase und Proteinase-3	3
P07355	Annexin A2	ANXA2_HUMAN	38,6	34,75	Beteiligt an Exozytose	3
P97429	Annexin A4	ANXA4_MOUSE	35,9	46,89	Beteiligt an Exozytose	0
P05208	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	CEL2A_MOUSE	28,9	186,72	Elastase	0
Q91X79	Chymotrypsin-like elastase family member 1	CELA1_MOUSE	28,9	31,04	Elastase	2
Q9CR35	Chymotrypsinogen B	CTRB1_MOUSE	27,8	55,33	Peptidase	1
Q9D1D4	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMEDA_MOUSE	24,9	90,91	Intrazellulärer Transport von sekretorischen Proteinen	0
Q8K0C5	Zymogen granule membrane protein 16	ZG16_MOUSE	18,2	29,17	Protein-Transport; Zymogen-Granula-Interaktion	0
Q8VCK7	Syncollin	SYNC_MOUSE	14,6	41,15	Beteiligt an der Fusion von Zymogengranula	3

Während eine O-GalNAc-Glykosylierung vor allem an membrangebundenen und sekretorischen Proteinen beschrieben ist (Stanley et al. 2015-2017; Steentoft et al. 2013), so finden sich auch auf einigen intrazellulären Proteinen aberrante O-Glykosylierungen (Steentoft et al. 2013).

Aufteilen lassen sich die identifizierten Proteine in drei Gruppen:

- Enzyme und Inhibitoren
- Proteine, die an der Zymogengranula-Bildung oder -Exozytose beteiligt sind
- Proteine, die an der Protein-Synthese beteiligt sind

In die erste Gruppe gehören vier Lipasen (CEL, LIPP, LIPR1 und LIPR2), die pankreatische  $\alpha$ -Amylase (AMYP), zwei Elastasen (CEL2A und CELA1) sowie vier Peptidasen (Chymotrypsinogen B, Aminopeptidase N, Carboxypeptidase A1, Acylamino-acid-releasing enzyme). Weiterhin sind mit Serpin I2 und dem Leukocyte elastase inhibitor A (Serpine B1a) auch zwei Serinproteasen-Inhibitoren von aberranten O-Glykosylierungen betroffen (Benarafa et al. 2002). Diese in Zymogenen vorhandenen O-GalNAc-Glykane können aufgrund ihrer Verkürzung im Knock-out-Modell einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der betroffenen Enzyme, aber auch durch Interaktionen auf weitere Systeme haben.

Neben diesen Enzymen und Inhibitoren sind auch Proteine von aberranten O-Glykosylierungen betroffen, die an der Sekretion der Enzyme beteiligt sind. So finden sich beispielsweise mit DMBT1, Syncollin und dem Zymogen granule membrane protein 16 Proteine, die entscheidend an der Zymogengranula-Bildung und -Exozytose beteiligt sind (De Lisle 2002; Edwardson et al. 1997; Wäsle et al. 2005; Kleene et al. 1999). DMBT1 und Syncollin zeigen zudem im NetOGlyc 4.0 Server an einer Vielzahl an möglichen Positionen eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine tatsächlich vorhandene O-Glykosylierung (Steentoft et al. 2013). Zudem zeigten sich auch Proteine, die vermutlich Aufgaben im Bereich der Sortierung im trans-Golgi-Netzwerk (AP-1 complex subunit beta-1 (The UniProt Consortium 2018)) oder der Exozytose (Annexin A2 und A4 (Gabel und Chasserot-Golaz 2016; The UniProt Consortium 2018)) übernehmen. Veränderungen an den Glykosylierungen und damit an der Struktur all dieser Proteine kann daher einen entscheidenden Einfluss auf die physiologische Wirkung des exokrinen und endokrinen Pankreas haben.

Weiterhin konnten einige Proteine identifiziert werden, die Aufgaben im Bereich der Zymogen-Synthese übernehmen. So konnte beispielsweise Nucleolin nachgewiesen werden, welches an der Transkription beteiligt ist (Yang et al. 1994). Aber auch Endoplasmin und Grp-78, Chaperone im ER (Christianson et al. 2008; Cunnea et al. 2003; Meunier et al. 2002) oder das Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1,



welches für die Synthese von membrangebundenen und sekretorischen Proteinen benötigt wird (Görlich und Rapoport 1993; Lang et al. 2012), wurden identifiziert.

Das vielfältige Vorkommen von aberranten O-Glykosylierungen kann daher in allen Bereichen des Pankreas einen entscheidenden Einfluss auf verschiedene physiologische Funktionen haben.

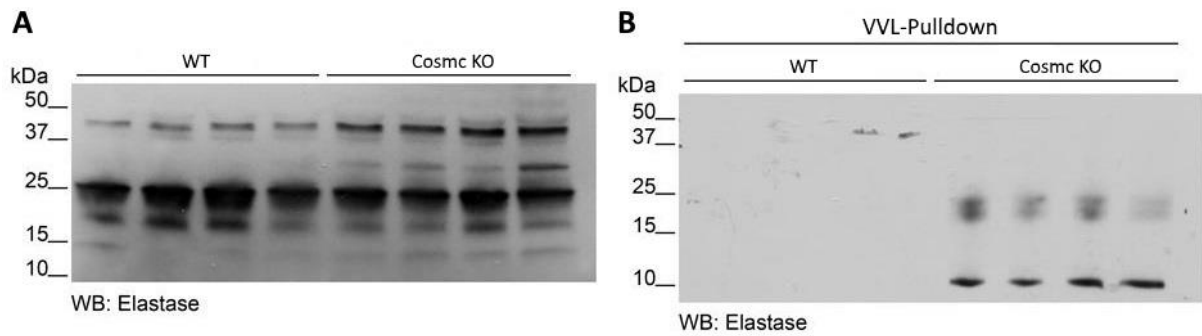
#### **4.4.3 Verifizierung der Elastase als O-GalNAc-glykosyliertes Protein**

Die Elastase wies sowohl im Zytoplasma, als auch in den Zymogengranula eine stark erniedrigte Gesamtaktivität im KO auf (siehe Abbildung 9). Ein durchgeführtes ELISA zeigte zudem eine um 3,36-fach erhöhte Expression der Elastase im Knock-out (siehe Abbildung 10), ohne dass jedoch eine normale Gesamtaktivität erreicht werden konnte. Bei Betrachtung der Elastase-Aktivität auf Molekülebene zeigte sich eine um 91% verringerte Aktivität (siehe Abbildung 11), was auf eine praktisch nicht funktionale Elastase hindeutet. Die durchgeführte massenspektrometrische Proteomanalyse von Tn-Antigen-tragenden Proteinen identifizierte zwei Elastase-Isoenzyme: Chymotrypsin-like elastase family member 2A (CEL2A\_MOUSE) und Chymotrypsin-like elastase family member 1 (CELA1\_MOUSE). Dabei ist allerdings zu beachten, dass ersteres zwar mit einer größeren Wahrscheinlichkeit identifiziert worden ist, die Wahrscheinlichkeit für tatsächlich vorhandene O-Glykosylierung laut NetOGlyc 4.0 Server (Stentoft et al. 2013) jedoch nur gering ist. Zudem wurde ein Tn-Antigen-tragender Elastase-Inhibitor identifiziert (Leukocyte elastase inhibitor A), der ebenfalls einen Einfluss auf die Elastase-Aktivität haben könnte.

Es erfolgte daher mittels Western Blot eine weitere Verifizierung, um sicher gehen zu können, dass die Elastase tatsächlich ein Tn-Antigen-tragendes Protein ist. Dafür wurden sowohl WT-, als auch KO-Lysate im Western Blot aufgetrennt und die Banden mittels Elastase-Antikörpern demaskiert (siehe Abbildung 17 A). Hier zeigte sich im KO eine zusätzliche Bande bei ca. 30 kDa. Dies entspricht ungefähr der Größe der gefundenen Elastase-Moleküle (siehe Tabelle 8).

Weiterhin erfolgte ein Western Blot nach Konzentrierung von Tn-Antigen-tragenden Proteinen im VVL-Pulldown und Immunodetektion mit Anti-Elastase. Hier zeigte sich eine ausschließliche Bandenstruktur im KO, während im WT keine Banden detektiert werden konnten. Dies zeigt eine erfolgreiche Bindung der Elastase des KOs an das Lektin, während im WT aufgrund fehlender Tn-Antigene keine Adhäsion geschieht. Dies ist

letztendlich der Beweis dafür, dass die Elastase über O-GalNAc-Glykosylierungen verfügt, die im KO dementsprechend verkürzt vorliegen.



**Abbildung 17: Western Blots mit Immunodetektion mit Anti-Elastase**

(A) Western Blot von WT und KO-Gesamtlysaten ( $n=4$ ) zeigt eine unterschiedliche Bandenverteilung. (B) Western Blot von WT und KO-Gesamtlysaten nach Durchführung eines VVL-Pulldowns ( $n=4$ ). O-GalNAc-modifizierte Elastase zeigte sich nur im KO.

## 5 Diskussion

### 5.1 Tn-Antigen-Expression

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten O-GalNAc-Glykosylierungen lassen sich insbesondere bei Adenokarzinomen des Pankreas finden (Springer et al. 1975; Ju et al. 2011). Um eine Untersuchung dieser aberranten O-Glykane *in vivo* zu ermöglichen, wurde ein Mausmodell generiert, bei dem Pankreas-spezifisch das Cosmc-Gen ausgeschaltet wurde. Somit bestand die Möglichkeit, die Auswirkungen der verkürzten O-Glykosylierungen *in vivo* zu untersuchen und möglicherweise weiter zu klären, inwiefern diese einen Einfluss auf die exokrine Pankreasfunktion haben und zudem möglicherweise zum Pathomechanismus des Pankreaskarzinoms beitragen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit als Wildtyp titulierten Mäuse ebenfalls Cre-Expression unter Kontrolle des Ptf1a-Promotors (Pancreas transcription factor 1 subunit alpha) aufweisen.

Zunächst wurde gezeigt, dass der Cosmc-Knock-out in den Pankreaszellen erfolgreich war. Dies war insbesondere auch nötig, um in weiteren Versuchen eine Gegenüberstellung von Wildtyp- und Knock-out-Lysaten zu ermöglichen. Daher wurde bei allen Mäusen eine Genotypisierung mittels PCR bezüglich des Vorhandenseins des Cosmc-Gens durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dies diente zudem dem Nachweis einer erfolgreichen Cosmc-Ausschaltung durch das Cre/loxP-System. Auch eine folgende Inaktivität der T-Synthase wurde im Rahmen der dieser Arbeit übergeordneten Publikation nachgewiesen (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)). Da eine Dysfunktion der T-Synthase zur Bildung von Tn-Antigen führt (Ju und Cummings 2002), erfolgte der weitere Nachweis des erfolgreichen Knock-outs durch das Darstellen von Tn-Antigen in den betreffenden Lysaten. Dies konnte sowohl im Western Blot, als auch mittels histologischer Färbungen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2). Auch zeigte sich hier, dass *in vivo* keine Expression von Tn-Antigen in Wildtyp-Zellen stattfindet. So wurde zwar bereits beobachtet, dass das Tn-Antigen auch von gesunden duktalem Zellen exprimiert werden kann (Schuessler et al. 1991), im Mausmodell konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden. Zudem bestätigen die Versuche, dass eine gleichzeitige Expression von T- und Tn-Antigen in Karzinomzellen bei kompletter Cosmc-Dysfunktion nicht möglich ist (Ju und Cummings 2002). Inwiefern eine eingeschränkte Funktion von Cosmc, beispielweise aufgrund einer Promotor-Hypermethylierung und einer folgenden niedrigeren Expressionsrate des

Charperons zu einem gleichzeitigen Auftreten beider Antigene führen kann (Ho et al. 2016), wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

## **5.2 Auswirkung aberranter O-Glykosylierungen**

### **5.2.1 Einfluss auf die enzymatische Aktivität**

O-GalNAc-Glykosylierungen sind vor allem auf sekretorischen und membrangebundenen Proteinen zu finden (Steentoft et al. 2013; Brockhausen und Stanley 2015-2017). Da das Pankreas eine ausgeprägte sekretorische Funktion im Organismus übernimmt, bestand die Frage, inwiefern aberrante O-Glykosylierungen einen Einfluss hierauf nehmen.

Bei der Untersuchung der zytoplasmatischen Enzymaktivitäten konnten bei den meisten Enzymen keine Aktivitätsunterschiede beobachtet werden (siehe Abbildung 2).

Ausnahmen hiervon stellten die  $\beta$ -Glucosidase mit einer Zunahme, sowie die Esterase,  $\alpha$ -Mannosidase und pankreatische Elastase mit einer Abnahme der Aktivität dar. Wie jedoch im Falle der Lipase und Elastase gezeigt, ist es möglich, dass in beiden Modellen unterschiedliche Expressionslevel vorherrschen (siehe Abbildung 7, Abbildung 10). Somit kann die Ursache eines nicht messbaren oder nur geringen Aktivitätsunterschieds in einer kompensatorisch erhöhten oder erniedrigten Synthese eines Enzyms liegen. Aufgrund nicht vorliegender ELISA-Kits konnte dieser Ansatz, mit Ausnahme der Lipase und Elastase, jedoch nicht weiterverfolgt werden.

Außerdem ist zu beachten, dass mögliche Inhibitoren ebenfalls aufgrund aberranter O-Glykosylierungen eine veränderte Interaktionsfähigkeit aufweisen können, so dass Aktivitätsunterschiede nicht zwingend ausschließlich auf die veränderte Glykan-Struktur und die folgende Konformationsänderung des Enzyms zurückzuführen sein müssen. So wurden mittels Massenspektrometrie zwei Serinprotease-Inhibitoren identifiziert, die O-GalNAc-Glykane aufweisen und einen Einfluss auf Proteasen, Chymotrypsin, Elastase und Proteinase-3 haben (siehe Tabelle 8).

Mögliche Ursachen für die beobachteten Aktivitätsunterschiede liegen darin, dass verkürzte O-Glykosylierungen zu einer veränderten Struktur des Proteins führen können und daher eine geringere Affinität zum Substrat vorliegt. Zwar konnten Arbeiten zeigen, dass die meisten Zielstellen für O-Glykosylierungen außerhalb von Domänen liegen, doch sind immerhin 20% der Glykane innerhalb wichtiger Domänen gefunden worden. Ein besonderes hohes Auftreten von O-Glykanen wurde in juxtamembranösen Regionen von transmembranösen Proteinen beobachtet, was zu einer Präsentation von wichtigen

Domänen und Schutz vor Proteasen führt. Zudem wurden O-Glykane vermehrt in der Nähe von Signalsequenzen und im Bereich zwischen zwei funktionaler Domänen gefunden, was zu einer Erweiterung der Domänen und einem Schutz führen könnte (Steentoft et al. 2013). Insgesamt zeigt sich dadurch, dass O-Glykosylierungen über direkte und indirekte Auswirkungen auf funktionelle Domänen zu einer veränderten Enzymaktivität führen können.

Einige der von den Pankreaszellen sekretierten Proteine liegen zunächst als Proenzyme vor. Intraluminal muss daher zunächst eine Aktivierung mittels Proteasen, wie beispielsweise Trypsin, erfolgen (Kriegel und Schellenberger 2014). Es wurde beobachtet, dass verkürzte O-Glykosylierung zu einer höheren Dichte an O-Glykanen auf Proteinen führen können (Bennett et al. 2012). Bei Mucinen führt eine hohe Dichte an O-Glykanen wiederum zu einem hohen Schutz vor proteolytischem Verdau (Arike und Hansson 2016). Somit ist es möglich, dass verkürzte O-Glykosylierungen zu einer erniedrigten Aktivierungswahrscheinlichkeit der Proenzyme führen. Allerdings sind trotzdem nach proteolytischem Verdau von Proteinen einige O-Glykane in direkter Nachbarschaft der Trennstellen gefunden worden (Steentoft et al. 2013). Zudem wurde bereits gezeigt, dass spezifische O-Glykosylierungen eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivierung von Pro-Proteinen einnehmen und aufgrund von Veränderungen der O-Glykane eine Reaktion der Pro-Protein-Convertasen nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Ein Krankheitsbild, was auf einer veränderten O-Glykosylierung und einer folgenden fehlenden Aktivierung eines Pro-Proteins beruht, ist die familiäre tumorale Calcinosis (Kato et al. 2006; Schjoldager et al. 2010; Schjoldager et al. 2011; Schjoldager und Clausen 2012). Zudem wurde nachgewiesen, dass sich in einigen Pro-Proteinen O-Glykane sehr nah designierter Aktivierungsstellen befinden, wodurch ein direkter Einfluss auf die Aktivierung weiter anzunehmen ist (Steentoft et al. 2013).

Insgesamt können daher im Rahmen dieser Arbeit beobachtete veränderte enzymatische Aktivitäten einerseits direkt auf Konformationsänderungen der Proteine zurückzuführen sein. Andererseits ist ebenfalls der Einfluss einer notwendigen veränderten Aktivierung vieler Proenzyme zu beachten.

Neben den gemessenen, in ihren zytoplasmatischen Aktivität veränderten Enzymen, wurden mittels Massenspektrometrie weitere von verkürzten O-Glykosylierungen betroffene Enzyme identifiziert, die ebenfalls beeinflusst sein können (siehe Tabelle 8).

Dies sind die Lipase (5.2.3), pankreatische Elastase (5.2.4), Aminopeptidase N, Acylamino-acid releasing enzyme,  $\alpha$ -Amylase, Carboxypeptidase A1 und Chymotrypsin.

### **5.2.2 Einfluss auf die Zymogengranula und die Stimulierbarkeit**

In beiden Mausmodellen war eine Anreicherung von Enzymen in der Zymogengranula-Fraktion zu beobachten (siehe Tabelle 7). Dies betraf vor allem die Esterase, Lipase, Phosphatase und Trypsin. Dabei ist zudem zu beachten, dass letzteres als Proenzym vorliegt, dass erst intraluminal aktiviert wird. Eine eventuell beobachtete eingeschränkte Aktivitätszunahme in den Zymogengranula kann daher aufgrund dieser Eigenschaft zu erklären sein. Die aberranten O-Glykosylierungen des Cosmc-KO-Mausmodells führen daher nicht dazu, dass eine Bildung der Zymogengranula und Konzentrierung der Verdauungsenzyme nicht mehr möglich sind. Ein direkter Nachweis der Zymogengranula erfolgte auch im Rahmen der dieser Arbeit übergeordneten Publikation (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)). Allerdings liegt beispielsweise bei Trypsin, dass ebenfalls an der Aktivierung der Proelastase, Chymotrypsinogen, Procarboxylase und Pro-Colipase beteiligt ist (Kriegel und Schellenberger 2014), im KO eine geringe Konzentrierung und Aktivität in den Zymogengranula vor (siehe 4.2.2.3), was dementsprechend einen weiteren Einfluss auf die weiteren Proenzyme hat. Gleiches ist bei der Phosphatase und der  $\beta$ -Glucosidase zu beobachten, während die Esterase eine größere Aktivitätszunahme in den Zymogengranula der KO-Zellen zeigt (siehe Tabelle 7). Die Lipase, ein weiteres hochangereichertes sekretorisches Enzym, zeigte jedoch kein Unterschied in den Gesamtaktivitäten von WT und KO. Insgesamt war zu beobachten, dass das Cosmc-KO-Mausmodell zu einer veränderten Konzentrierungsfähigkeit und damit Gesamtaktivität einiger Enzyme führen kann, die mutmaßlich auf verkürzten O-Glykosylierungen beruht. Dabei bestand zumeist eine geringere Aktivität der Enzyme in den Zymogengranula des KO-Modells (siehe Tabelle 7).

Da die Zymogengranula als sekretorische Vesikel bei Stimulation freigesetzt werden, stellte sich die Frage, inwiefern die aberranten O-Glykane einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit des exokrinen Pankreas haben. Eine mögliche exokrine Pankreasinsuffizienz der Cosmc-KO-Mäuse wurde bereits im Rahmen der dieser Arbeit übergeordneten Publikation beobachtet. So zeigten die betreffenden Mäuse im jungen Lebensalter ein geringeres Gewicht und vermehrte Fettstühle, was auf eine Maldigestion hindeutet (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)).

Es wurde mittels Massenspektrometrie eine Reihe von Proteinen nachgewiesen, die O-Glykosylierungen aufweisen und an der Bildung und Exozytose der Zymogengranula sowie an Transport- und Sortierungsvorgängen intrazellulär beteiligt sind (siehe Tabelle 8). Verkürzte O-Glykane können daher, neben dem direkten Einfluss auf die Enzyme, ebenfalls über eine veränderte Synthese der Zymogene und eine verschobene Zusammensetzung und geringe Exozytosewahrscheinlichkeit der sekretorischen Vesikel einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit des Pankreas haben.

Um die Antwort des Pankreas auf einen Stimulationsreiz vergleichen zu können, wurden daher Pankreaszellen mit Caerulein stimuliert. Caerulein führt über eine CCK1-Rezeptor-Aktivierung zu einer intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Steigerung und einer folgenden Exozytose der Zymogengranula (Bruzzone et al. 1986; Noble et al. 1999). Die Caerulein-Stimulation führt allerdings ebenfalls zu einer vermehrten Trypsinogen-Aktivierung (Hietaranta et al. 2001), daher erfolgte die Zugabe eines Proteaseinhibitors. Ein Vergleich der Trypsin-Aktivitäten im Sekret war dadurch leider nicht möglich.

Da sowohl die Lipase, als auch die Esterase hohe Gesamtaktivitäten innerhalb der Zymogengranula-Fractionen von WT- und KO-Lysaten gezeigt haben, erfolgte die Kontrolle der Stimulationsantwort durch die Messung der Aktivität beider Enzyme im Sekret. Hierbei zeigte sich, dass nur im Wildtyp eine signifikante Aktivitätszunahme des stimulierten Sekrets bestand, während im Knock-out-Modell eine Stimulation nicht nachweisbar war (siehe Abbildung 13, Abbildung 14). Das ein nicht-Vorhandensein von Zymogengranula für diese Beobachtung verantwortlich ist, konnte, wie bereits dargelegt, widerlegt werden. Es wurde sogar eine Verdreifachung in der Gesamtzahl der Zymogengranula in den Cosmc-KO-Zellen beobachtet (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)).

Daher muss eine mögliche Antwort auf die erniedrigte Stimulierbarkeit der Pankreaszellen in den Proteinen, die an der Bildung und Exozytose der Zymogengranula beteiligt sind, gesucht werden. In der Massenspektrometrie konnten einige dieser Proteine als O-glykosyliert identifiziert werden: Muclin/ DMBT1, Syncollin, Zymogen granule membrane proteins 16, AP-1 complex subunit beta-1 und Annexin A2 und A4 (siehe Tabelle 8).

Muclin, auch DMBT1 genannt, dient im trans-Golgi-Netzwerk des exokrinen Pankreas von Mäusen als Sortierungs-Rezeptor für sekretorische Proteine und ist damit an der Bildung der Zymogengranula beteiligt (De Lisle und Ziemer 2000; De Lisle et al. 2005). Dabei sind sulfatierte O-Glykane entscheidend für die Funktion von Muclin (De Lisle 2002). Eine

Interaktion dieser Sulfat-Gruppen mit den Zymogenen führt zu einer Aggregation der Enzyme, Bindung an die Membran des trans-Golgi-Netzwerks und schließlich zur Bildung der Zymogengranula (Boulatnikov und De Lisle 2004; De Lisle 2002). Ein Ausfall von DMBT1 führt zu einer stark verlangsamten Progression der Zymogene durch das Golgi-Netzwerk und einer eingeschränkten Bildung von Zymogengranula (De Lisle 2002). Zudem wurde bei fehlender Sulfatierung eine stark verminderte Affinität von Muclin zu den Zymogenen beobachtet (Boulatnikov und De Lisle 2004). Fehlende Sulfatierungen können auch aufgrund verkürzter O-Glykane im Rahmen der Cosmc-Ausschaltung auftreten. Damit ist es möglich, dass aberrante O-Glykane einen negativen Einfluss auf die Bildung der Zymogengranula und damit auf die exokrine Funktion des Pankreas haben. Zudem führt Muclin zu einer höheren Retention der Granula in unstimulierten Zellen und zu einer höheren Stimulationsantwort (De Lisle et al. 2005). Dies steht im Einklang mit den Daten dieser Arbeit, die einerseits eine geringe Konzentrierung von sekretorischen Proteinen in den Zymogengranula (siehe Tabelle 7) sowie andererseits eine geringere Stimulierbarkeit der Cosmc-KO-Pankreaszellen zeigen (siehe Abbildung 13, Abbildung 14). Zudem ist eine Bindung von Muclin an die Proteine Amylase, Lipase, Pro-Carboxypeptidase A1, Pro-Elastase II, Chymotrypsinogen B und Reg1 beobachtet worden (Boulatnikov und De Lisle 2004). All diese Zymogene, mit Ausnahme von Reg1, weisen ebenfalls O-Glykosylierungen auf (siehe Tabelle 8). Daher besteht die Möglichkeit weiterer veränderter Interaktionen.

Ein weiteres Protein, das mittels Massenspektrometrie als O-glykosyliert identifiziert worden ist, war Syncollin (siehe Tabelle 8). Syncollin ist an der  $Ca^{2+}$ -regulierten Exozytose der Zymogengranula beteiligt (Edwardson et al. 1997). Weiter wurde ein Einfluss auf die Bildung und innere Organisation der Zymogengranula gesehen, während eine entscheidende Regulation an der Exozytose jedoch zunächst verneint wurde (Antonin et al. 2002). Weitere Arbeiten zeigten wiederum einen durch die Bindung an Syntaxin hervorgerufenen entscheidenden Beitrag von Syncollin an der Exozytose. So wurde bei Ausfall des Proteins eine geringe Antwort auf pankreatische Stimulationen, ebenso wie eine kompensatorische Hyperplasie gesehen (Wäsle et al. 2005; Edwardson et al. 1997). Die geringe Stimulierbarkeit entspricht den Beobachtungen dieser Arbeit. Da Syncollin als O-glykosyliertes Protein identifiziert worden ist, besteht die Möglichkeit, dass durch Verkürzungen der O-Glykane eine eingeschränkte Funktion des Proteins besteht und daher eine folgende geringere Stimulationsantwort der Cosmc-KO-Zellen zu erklären wäre.



Neben Syncollin und Muclin besitzt das Zymogen granule membrane protein 16 (ZG16) ebenfalls O-Glykane und ist an der Bildung der Zymogengranula beteiligt. Es führt dabei zu einer Aggregation von sekretorischen Proteinen in den Zymogengranula (Kleene et al. 1999). Eine Stimulation des Pankreas mit Caerulein oder Dexamethason führt zu einer vermehrten Expression des Proteins (Cronshagen et al. 1994). Es ist beschrieben worden, dass eine Bindung von ZG16 vor allem mit Proteoglykanen wie Heparansulfat stattfindet. Dadurch wird eine submembranöse Matrix aufgebaut, die an der Sortierung von Enzymen beteiligt ist (Kumazawa-Inoue et al. 2012).

Zudem wurden Annexin A2 und A4 identifiziert. Ersteres wurde in der Massenspektrometrie zwar als humanes Protein aufgeführt, allerdings besteht eine 97,6%ige Übereinstimmung zum Gen der Maus (The UniProt Consortium 2018). Von Annexin A2 ist bekannt, dass es eine wichtige Rolle im Rahmen der Exozytose einnimmt (Gabel und Chasserot-Golaz 2016). Von Annexin A4 wird daher ebenfalls ausgegangen, dass es an der Exozytose beteiligt ist (The UniProt Consortium 2018). Zudem besteht eine erhöhte Expression in Pankreaskarzinomen (Wei et al. 2015). Gleiches gilt für den AP-1 Komplex (The UniProt Consortium 2018).

Insgesamt konnten damit bei einer Reihe von Proteinen aberrante O-Glykosylierungen nachgewiesen werden, die an der Bildung oder Exozytose der Zymogengranula beteiligt sind. Eine beobachtete erniedrigte Stimulierbarkeit der Cosmc-KO-Zellen könnte daher aus diesen Überlegungen folgen. Auch eine bei der Esterase,  $\beta$ -Glucosidase, Phosphatase, Elastase und Trypsin beobachteten erniedrigten Gesamtaktivität bzw. verringerten Konzentrierung in den Zymogengranula ließe sich hiermit erklären.

### **5.2.3 Lipase**

Während die Gallenblase während der Verdauung für die Emulgierung von Fetten zuständig ist, übernehmen Magen und Pankreas über Lipase-Sekretion den enzymatischen Verdau von Triglyceriden. Daher erfolgt in den Zymogengranula des Pankreas eine Konzentrierung der pankreatischen Lipase. Während die Daten dieser Arbeit zeigten, dass sich die Gesamtaktivität der Lipase in den Cosmc-KO-Zellen weder im Zytoplasma, noch in den Zymogengranula von der im WT unterscheidet, so zeigte sich dennoch eine erniedrigte Expression der Lipase in den Zymogengranula der KO-Zellen (siehe Abbildung 6, Abbildung 7). Daher muss eine erhöhte durchschnittliche Molekülaktivität der Lipase-Moleküle in den Zymogengranula der KO-Zellen folgen (siehe Abbildung 8).

Die Massenspektrometrie zeigte vier O-glykosylierte Lipasen (CEL, LIPP, LIPR1, LIPR2; siehe Tabelle 8), im Falle der CEL war eine O-Glykosylierung bereits bekannt (Wang et al. 1995). Bei Lipase und Esterase ist zudem zu beachten, dass beide Enzyme Esterbindungen mit unterschiedlicher Affinität spalten. Damit ist es nicht möglich, ausschließlich die Aktivität eines Enzyms bzw. einer Enzymklasse zu testen. Es wurde aber darauf geachtet, dass bei den verwendeten Substraten eine jeweils höhere Affinität des zu testenden Enzyms für das jeweilige Substrat vorliegt (Chahinian et al. 2000).

Da das zur Messung der Lipase-Aktivität eingesetzte Substrat daher mit unterschiedlicher Affinität von mehreren Enzymen umgesetzt wird, ist es möglich, dass verschiedene Enzyme unterschiedlich stark von den aberranten O-Glykosylierungen betroffen sind und die Aktivität eines Enzyms durch mögliche verursachte Konformationsänderungen nicht oder positiv beeinflusst worden ist. Zudem ist es möglich, dass zwar das im ELISA getestete Lipase-Isoenzym eine verringerte Menge in den Zymogengranula des Knock-out-Modells aufweist, andere Isoenzyme dagegen keine oder eine vermehrte Konzentrierung zeigen.

Dass die Lipase-Aktivität im Pankreassekret bei Ausschaltung von Cosmc verringert sein muss, zeigten Beobachtung der dieser Arbeit übergeordneten Publikation. So konnte im verwendeten Mausmodell beobachtet werden, dass im Falle der Cosmc-Ausschaltung eine vermehrte Tendenz zu weicherem Stuhl mit helleren Farben bestand. Dies deutet auf eine Malabsorption mit Entstehung von Fettstühlen hin. Zudem wurden im Blut geringere Cholesterin-, Triglycerid- und HDL-Werte gemessen. Auch zeigten junge Cosmc-KO-Mäuse ein niedrigeres Gewicht, dieser Rückstand konnte jedoch mit 8 Lebenswochen wieder aufgeholt werden (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)). Mögliche Ursachen hierfür könnten daher sowohl eine geringen Lipase-Aktivität im Pankreassekret, als auch eine geringere Stimulierbarkeit der Pankreaszellen darstellen, wie es im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 13).

#### **5.2.4 Elastase**

Die Elastase zeigte im Zytoplasma eine um  $69 \pm 1\%$  erniedrigte Gesamtaktivität, in den Zymogengranula betrug der Unterschied  $69 \pm 5\%$ . Gleichzeitig lag allerdings eine um den Faktor 3,36 erhöhte Expression der Elastase in den Cosmc-KO-Zellen vor. Unter Berücksichtigung von Gesamtaktivität und Elastase-Mengen betrug die relative Aktivität

der Elastase eines Moleküls im KO-Modell nur 91% derjenigen der Kontrollgruppe. Dies entspricht einer quasi nicht funktionalen Elastase.

Als mögliche Ursache für diese stark-erniedrigte Aktivität konnte in drei unterschiedlichen Verfahren eine vorhandene O-Glykosylierung des Enzyms gezeigt werden. So konnten in der Massenspektrometrie zwei Isoenzyme identifiziert werden, die nach Aufreinigung von Tn-Antigen-tragenden Proteinen vermehrt zu finden waren (CEL2A und CELA1; siehe Tabelle 8). Bei CELA1 ist allerdings zu beachten, dass während im humanen Pankreasgewebe keine Expression stattfindet, bei Ratten und Schweinen jedoch große Mengen dieses Enzyms zu finden sind. Die Maus-Expressions-Raten sind nicht bekannt (Tani et al. 1987). Weiter konnte im Western Blot mittels Immunodetektion mit Anti-Elastase eine veränderte Bandenstruktur in den KO-Lysaten gezeigt werden (siehe Abbildung 17 A). Nach VVL-Pulldown und folgendem Western Blot konnte eine ausschließliche Bandendemaskierung in den KO-Lysaten beobachtet werden, während im Wildtyp bei Anti-Elastase-Immunodetektion keine Proteine sichtbar wurden (siehe Abbildung 17 B). Dies zeigt, dass die Elastase der KO-Zellen aufgrund von vorhandenen Tn-Antigenen an VVL bindet, während im WT keine Interaktion mit dem Lektin stattfand.

Die Elastase liegt in den Zymogengranula als Proenzym vor, dass durch Trypsin erst intraluminal aktiviert wird (Grant und Robbins 1955; Gertler und Birk 1970). Eine mögliche geringere Aktivität dieses Enzyms kann daher auch auf einer, im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen, geringeren Aktivität von Trypsin (siehe Tabelle 7), sowie einer geringeren Interaktion von Trypsin mit der Proelastase zurückzuführen sein.

Es stellt sich die weitere Frage, worauf die kompensatorisch erhöhten Expressions-Level der Elastase zurückzuführen sein können. Eine Hochregulation der Elastase-Transkription wurde ebenfalls in Mausmodellen gefunden, bei denen der Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg ausgeschaltet wurde. Dieser Signalweg ist im Mausmodell entscheidend für die Entwicklung des exokrinen Pankreas und zeigt beim Pankreaskarzinom ebenfalls oft Dysregulationen. Allerdings bleibt zu beachten, dass im entsprechendem Mausmodell trotz einer erhöhten mRNA-Transkription keine vermehrten Mengen an funktionalen Enzymen gefunden werden konnte (Wells et al. 2007). Ein eventueller Einfluss von aberranten O-Glykosylierungen auf diesen Signalweg wäre daher eine mögliche Erklärung der erhöhten Elastase-Expression. In der massenspektrometrischen Proteomanalyse der Tn-Antigen-konzentrierten Proteine konnte  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden (siehe Tabelle 8). Zudem wurde in der Arbeitsgruppe gezeigt, dass im Western Blot bei  $\beta$ -Catenin-Detektion in den

Cosmc-KO-Zellen keine Bandendemaskierung auftritt, während dies in den WT-Zellen der Fall ist (Daten nicht veröffentlicht). Eine aufgrund der aberranten O-Glykosylierungen veränderte Expression oder Interaktion von  $\beta$ -Catenin und eine folgende veränderte Regulation des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs sind daher möglich. Dies könnte wiederum zu den beobachteten erhöhten Elastase-Expressionen führen.

In der Diagnostik wird die Elastase im Stuhl als Marker für die Pankreasfunktion eingesetzt (Löser et al. 1996). Eine Möglichkeit, das Ausmaß der Pankreasinsuffizienz der Cosmc-KO-Mäuse weiter zu quantifizieren, bestände also in der Durchführung dieses Diagnostikums. Dabei ist allerdings zu beachten, dass zwar die beobachtete Symptomatik für eine Pankreasinsuffizienz spricht, diese aber vermutlich auf eine verringerte Stimulierbarkeit des Pankreas zurückzuführen ist, da eine verminderte Gesamtaktivität der Lipase nicht beobachtet worden ist. Bei der Bestimmung der Elastase im Stuhl ist zudem zu beachten, dass in den Zellen eine kompensatorisch erhöhte Expression vorliegt. Es ist daher möglich, dass die Elastase-Bestimmung unauffällig verläuft und erst ein Test auf die Enzymaktivität ein pathologisches Ergebnis erzielen würde. Ein solcher Test würde daher eventuell eher positive Werte zeigen, als ein im Rahmen des Pankreaskarzinoms aufgrund einer exokrinen Pankreasinsuffizienz durchgeführter Elastase-Stuhltest.

### **5.3 Weitere Auswirkungen aberranter O-Glykosylierungen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Methoden eingesetzt, um Tn-Antigen-tragende Proteine identifizieren zu können. So erfolgte die Enzymaktivitäts-Messung nach Konzentrierung mittels LPLC und VVL-Pulldown, sowie der MS-Analytik.

Die  $\beta$ -Glucosidase zeigte eine vermehrte Aktivität im Zytoplasma des KOs, sowie eine verminderte Aktivität in den Zymogengranula der Cosmc-KO-Zellen. Dementsprechend lag eine verminderte Aktivitätszunahme in den Zymogengranula der KO-Zellen vor. Es wurde daher nach LPLC-bedingter Protein-Konzentrierung ein Vergleich der Enzymaktivitäten von Wildtyp und Knock-out-Lysaten durchgeführt. Aufgrund der um 83% erhöhten Aktivität in der Elutionsphase kann auf vorhandene O-Glykosylierungen geschlossen werden. Die im KO gemessenen Aktivitätsänderungen können daher möglicherweise aufgrund der verkürzten O-Glykane zu beobachten sein.

Während die Esterase im Zytoplasma eine um 19% geringere Aktivität zeigte, war in den Zymogengranula kein signifikanter Unterschied zu messen. Allerdings lag im KO eine um 200% erhöhte Konzentrierung in den Zymogengranula vor (siehe Tabelle 7). Es stellte sich

daher die Frage, inwiefern der Grund hierfür in aberranten O-Glykosylierungen liegen kann. Während in der LPLC keine sichere Aussage getroffen werden konnte (siehe Abbildung 15), zeigten die Messungen nach einem VVL-Pulldown eine höhere Aktivität in der Elutionsphase (siehe Abbildung 16). Eine bestehende O-Glykosylierung ist daher anzunehmen und kann ein Grund für die verschobenen Aktivitäten darstellen. Allerdings ist zu beachten, dass das zur Messung der Aktivität der Esterase eingesetzte Substrat ebenfalls zu einem geringen Maße von Lipasen umgesetzt wird (Chahinian et al. 2000). Daher kann die beobachtete erhöhte Molekülaktivität der Lipasen in den Zymogengranula der Cosmc-KO-Zellen ebenfalls einen Einfluss auf die beobachtete vermehrte Aktivitätszunahme der Esterase in den Zymogengranula der Cosmc-KO-Zellen haben.

Zur Identifizierung weiterer Tn-Antigen-tragender Proteine erfolgte die Durchführung einer Massenspektrometrie nach VVL-Pulldown von Tn-Antigen-tragenden Proteinen in den Cosmc-KO-Zellen (siehe Tabelle 8). Es besteht dabei eine große Übereinstimmung der identifizierten Proteine mit Proteinen, die ebenfalls per Massenspektrometrie in humanen Cosmc-KO-Zelllinien gefunden worden sind (Hofmann et al. 2015).

Bei Cosmc-KO-Mäusen, insbesondere bei zusätzlicher Hochregulation von ppGalNAcT-2, wurde in der Arbeitsgruppe ein vermehrtes Auftreten von Pankreatitis beobachtet (Daten nicht veröffentlicht). In der Proteomanalyse wurden unter anderem Serpin I2 und der Leukocyte elastase inhibitor A (Serpine B1a) identifiziert. Beide gehören zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren (Benarafa et al. 2002). Serpin I2 führt zu einer Inhibition von Chymotrypsin und der Elastase, während Trypsin nicht beeinflusst wird. Dies geschieht durch Suizidhemmung der betroffenen Proteasen (Benarafa et al. 2002; Higgins et al. 2017). Zudem ist an der Apoptose von Azinuszellen und der Pankreasinsuffizienz beteiligt und zeigt bei Pankreaskarzinomen eine geringere Expression (Ozaki et al. 1998). Es besteht die Hypothese, dass Serpin I2 pankreatische Zellen vor frühzeitiger Aktivierung von Zymogenen schützt (Higgins et al. 2017). Aberrante O-Glykosylierungen können daher über eine mangelnde Funktion von Serpin I2 zu den im Mausmodell beobachteten vermehrten Pankreatitis-Fällen führen.

Neben Proteinen, die an der Zymogengranula-Bildung und Exozytose beteiligt sind (5.2.2), sind weitere Proteine identifiziert worden, die an der Protein-Synthese beteiligt sind. So wurde Endoplasmic/ Grp-94 gefunden, dass als Chaperon im ER an der Synthese von sekretorischen Proteinen sowie der Erkennung von missgefalteten Proteinen (ER-associated degradation, ERAD) beteiligt ist (Christianson et al. 2008). Es übernimmt

außerdem eine wichtige Rolle im Bereich der  $\beta$ -Zell-Entwicklung und kann im Rahmen von Tumoren eine vermehrte Expression zeigen (Wu et al. 2016; Kim et al. 2018). Auch Nucleolin und Grp-78, beide bereits vorbeschrieben als O-glykosyliert (Carpentier et al. 2005; Steentoft et al. 2011; Hofmann et al. 2015), wurden in der Massenspektrometrie gefunden. Für Nucleolin werden Beteiligungen an Translation und Transkription beschrieben (Yang et al. 1994), Grp-78 ist als Chaperon an der Faltung und Qualitätskontrolle von Proteinen im ER beteiligt (Cunnea et al. 2003; Meunier et al. 2002). Beide Proteine zeigen bei Karzinomen eine veränderte Expression und Lokalisation (Peng et al. 2010; Rauschert et al. 2008; Hofmann et al. 2015). Ebenso wurde Sec61 $\alpha$ , ein Proteinkanal, der an der Ribosomenbindung an das ER beteiligt ist (Görlich und Rapoport 1993; Lang et al. 2012), als O-glykosyliert identifiziert.

Insgesamt zeigt die massenspektrometrische Proteomanalyse daher die Vielfältigkeit von vorhandenen O-GalNAc-Glykosylierungen. So sind ebenfalls zytoplasmatische Proteine betroffen (Steentoft et al. 2013). Dabei muss allerdings beachtet werden, dass O-GalNAc-Glykosylierung klassischerweise im Golgi-Apparat geschieht und eine Inaktivität der T-Synthase aufgrund der Cosmc-Ausschaltung daher vor allem sekretorische und membrangebundene Proteine betrifft (Ju und Cummings 2002). Trotzdem zeigt diese Arbeit, dass durch vielfältige aberrante O-Glykosylierungen auch auf vielen Proteinen, die an wichtigen Funktionen des Zellzykluses beteiligt sind, weitere veränderte Interaktionen hervorgerufen werden können, die sich auf die exokrine Pankreasfunktion und den Pathomechanismus des Pankreaskarzinoms auswirken.

## **5.4 Ausblick**

Aberrante O-Glykosylierungen lassen sich in einer Vielzahl von Karzinomen, insbesondere auch dem Pankreaskarzinom nachweisen. Wie diese Arbeit gezeigt hat, haben verkürzte O-Glykane einen negativen Einfluss auf die exokrine Funktion des Pankreas. Außerdem kann man weiter spekulieren, dass aufgrund der Vielzahl an betroffenen Proteinen, die an wichtigen Funktionen des Zellzykluses beteiligt sind, weitere große Einflussmöglichkeiten bestehen.

Wie die Arbeit gezeigt hat, wurde eine Vielzahl von Enzymen in ihrer Aktivität beeinflusst, meist im negativen Sinne. Dies ist aufgrund von direkten Konformationsänderungen der Proteine möglich, aber auch aufgrund von veränderten Regulationen und Interaktionen der Pro-Protein-Convertasen. Zudem weißten weitere

Proteine O-Glykosylierungen auf, die an der Synthese der Zymogene sowie der Bildung und der Exozytose der Zymogengranula beteiligt sind. Daher ist neben der veränderten enzymatischen Aktivität ebenfalls eine geringere Stimulierbarkeit der Pankreaszellen in dieser Arbeit zu beobachten. Dies deckt sich mit den beobachteten Symptomen einer exokrinen Pankreasinsuffizienz beim Cosmc-KO-Mausmodell (Wolters-Eisfeld et al. (in Review)).

Es stellt sich daher die Frage, inwiefern aberrante O-Glykosylierungen auch in weiteren Drüsengeweben einen negativen Einfluss auf die Funktion dieser haben können. So konnten bereits weitere Daten dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass eine Ausschaltung des Cosmc-Gens in Darm-Epithelien zu einer geringeren Mucin-Produktion und einer folgenden Colitis führen (Daten nicht veröffentlicht). Es lässt sich daher spekulieren, dass O-Glykosylierungen einen entscheidenden Einfluss auf die sekretorische Funktion verschiedener Gewebetypen des Organismus haben. Weitere Arbeiten, die diese Auswirkungen auch in weiteren Gewebetypen untersuchen, sind daher indiziert.

Ein möglicher Nutzen der eingeschränkten Enzymaktivität beim Pankreaskarzinom kann man in der Elastase sehen. So führt das Pankreaskarzinom zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz mit erniedrigten Elastase-Mengen im Stuhl. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten erhöhten Expression der Elastase bei erniedrigter Aktivität und Sekretion besteht die Möglichkeit, dass ein Elastase-Funktionstest früher pathologische Werte einer exokrinen Pankreasinsuffizienz beim Pankreaskarzinom aufweist, als ein Test auf Elastase-Mengen im Stuhl dies zeigen würde.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Deutsch

Eine Vielzahl von Pankreaskarzinomen zeigen eine Expression von Tn-Antigen. Dies beruht auf einer Ausschaltung von Cosmc und einer folgenden Inaktivität der T-Synthase. Im Rahmen dieser Arbeit lag ein Mausmodell vor, bei dem Pankreas-spezifische der Knock-out von Cosmc erfolgte. Aufgrund des Einflusses von O-Glykanen auf viele wichtige Zellfunktionen und der Eigenschaft vieler sekretorischer Proteine, O-Glykosylierungen aufzuweisen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung des Einflusses aberranter O-Glykosylierungen auf die exokrine Pankreasfunktion.

Es konnte gezeigt werden, dass einige Pankreasenzyme bei Ausschaltung von Cosmc eine veränderte Aktivität zeigen. Ein direkter Einfluss der aberranten O-Glykosylierungen konnte teilweise nachgewiesen werden. Insgesamt konnte ein negativer Einfluss der aberranten O-Glykosylierungen auf das exokrine Pankreas beobachtet werden. Neben einer geringeren Konzentrierung einiger Zymogene in den Zymogengranula der Cosmc-KO-Zellen konnte eine verminderte Stimulierbarkeit der Pankreaszellen gezeigt werden. Mögliche Ursachen hierfür konnten in einer vorhandenen O-Glykosylierung von Muclin und Syncollin ausgemacht werden. Dies steht im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp des Cosmc-KO-Mausmodells. Weitere Daten deuten auf einen generellen negativen Einfluss verkürzter O-Glykane auf die sekretorische Funktion von Drüsengewebe hin.

Die Elastase zeigte zudem im Cosmc-KO-Mausmodell eine nahezu vollständige Inaktivität bei gleichzeitig erhöhter Expression. Vorhandene O-Glykosylierungen konnten nachgewiesen werden und stellen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für die beobachtete Inaktivität dar. Im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg konnte eine mögliche Ursache für die erhöhte Expression ausgemacht werden.



## 6.2 English

A variety of pancreatic carcinoma display Tn antigen expression. Mechanistically, nonsense-mutations in the gene *Cosmc* leads to inactivity of the T-synthase. For this work I had access to a mouse model, in which the *Cosmc* gene was conditionally knocked out in the exocrine pancreas. Since O-glycosylation is involved in many cellular processes and a variety of secretory proteins are O-glycosylated, I wanted to examine the influence of differentially expressed O-glycans on exocrine pancreatic function.

I was able to show that the activity of a number of pancreatic enzymes in the *Cosmc*-knock out cells differ from those in wildtype cells. Furthermore, in some cases a direct impact of aberrant O-glycosylation on the enzyme activity was detected. Overall, a negative impact of aberrant O-glycosylation on the exocrine pancreas function could be demonstrated. Furthermore, I found a decreased concentration of some zymogens in the zymogen granula of the *Cosmc* knock out cells and a reduced stimulability was observed. Muclin and Syncollin were identified as O-glycosylated and therefore might be causal for this observation. The reduced exocrine pancreas function is in accordance with the observed phenotype of the *Cosmc* knock out mouse model. Further data indicates a general negative impact of shortened O-glycans on the secretory functions of gland tissues.

While the elastase produced by the *Cosmc* knock out pancreatic acinar cells was catalytically nearly inactive, the cells displayed a higher elastase protein expression level. I have also shown that elastase is O-glycosylated and that alterations of the latter may lead to decreased enzymatic activity. A potential reason for the compensatory, elevated expression level could be explained by activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin signalling pathway.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Inoue M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H (2001) Developmental expression of a unique carbohydrate antigen, Tn antigen, in mouse central nervous tissues. *J Neurosci Res*, 65(6), pp. 595-603.
- Antonin W, Wagner M, Riedel D, Brose N, Jahn R (2002) Loss of the zymogen granule protein syncollin affects pancreatic protein synthesis and transport but not secretion. *Mol Cell Biol*, 22(5), pp. 1545-1554.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1473(1), pp. 4-8.
- Arike L, Hansson GC (2016) The Densely O-glycosylated MUC2 Mucin Protects the Intestine and Provides Food for the Commensal Bacteria. *J Mol Biol*, 428(16), pp. 3221-3229.
- Aryal RP, Ju T, Cummings RD (2010) The Endoplasmic Reticulum Chaperone Cosmc Directly Promotes in Vitro Folding of T-synthase. *J Biol Chem*, 285(4), pp. 2456-2462.
- Aryal RP, Ju T, Cummings RD (2012) Tight Complex Formation between Cosmc Chaperone and Its Specific Client Non-native T-synthase Leads to Enzyme Activity and Client-driven Dissociation. *J Biol Chem*, 287(19), pp. 15317-15329.
- Aryal RP, Ju T, Cummings RD (2014) Identification of a Novel Protein Binding Motif within the T-synthase for the Molecular Chaperone Cosmc. *J Biol Chem*, 289(17), pp. 11630-11641.
- Bapu D, Runions J, Kadhim M, Brooks SA (2016) N-acetylgalactosamine glycans function in cancer cell adhesion to endothelial cells: A role for truncated O-glycans in metastatic mechanisms. *Cancer Lett*, 375(2), pp. 367-374.
- Bard F, Chia J (2017) Comment on “The GalNAc-T Activation Pathway (GALA) is not a general mechanism for regulating mucin-type O-glycosylation”. *PLoS ONE*, 12(7).

- Barrow H, Tam B, Duckworth CA, Rhodes JM, Yu L-G (2013) Suppression of Core 1 Gal-Transferase Is Associated with Reduction of TF and Reciprocal Increase of Tn, sialyl-Tn and Core 3 Glycans in Human Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(3).
- Benarafa C, Cooley J, Zeng W, Bird P, Remold-O'Donnell E (2002) Characterization of four murine homologs of the human ov-serpin monocyte neutrophil elastase inhibitor MNEI (SERPINB1). *J Biol Chem*, 277(44), pp. 42028-42033.
- Bennett E, Mandel U, Clausen H, Gerken T, Fritz T, Tabak L (2012) Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22(6), pp. 736-756.
- Berger E (1999) Tn-syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 1455(2-3), pp. 255-268.
- Boulatnikov I, De Lisle RC (2004) Binding of the Golgi Sorting Receptor Muclin to Pancreatic Zymogens through Sulfated O-linked Oligosaccharides. *J Biol Chem*, 279(39), pp. 40918-40926.
- Brix J, Koch H-G, Heinrich PC (2014) Regulation der Transkription – Aktivierung und Inaktivierung der Genexpression. In: P C Heinrich, M Müller & L Graeve, Hrsg. *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 588-599.
- Brix J, Koch H-G, Heinrich PC (2014) Transkription und Prozessierung der RNA. In: P C Heinrich, M Müller & L Graeve, Hrsg. *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 567-587.
- Brockhausen I, Stanley P (2015-2017) O-GalNAc Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bruzzone R, Pozzan T, Wollheim C (1986) Caerulein and carbamoylcholine stimulate pancreatic amylase release at resting cytosolic free Ca<sup>2+</sup>. *Biochem J*, 235(1), pp. 139-143.
- Carpentier M, Morelle W, Coddeville B, Pons A, Masson M, Mazurier J, Legrand D (2005) Nucleolin undergoes partial N- and O-glycosylations in the extranuclear cell compartment. *Biochemistry*, 44(15), pp. 5804-5815.

- Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubès J, Comeau L, Sarda L (2000) Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids*, 37(7), pp. 653-662.
- Chia J, Goh G, Bard F (2016) Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1860(8), pp. 1623-1639.
- Christianson J, Shaler T, Tyler R, Kopito R (2008) OS-9 and GRP94 deliver mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin to the Hrd1–SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol*, 10(3), pp. 272-282.
- Colley KJ, Varki A, Kinoshita. T (2015-2017) Cellular Organization of Glycosylation. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cronshagen U, Voland P, Kern H (1994) cDNA cloning and characterization of a novel 16 kDa protein located in zymogen granules of rat pancreas and goblet cells of the gut. *Eur J Cell Biol*, 65(2), pp. 366-377.
- Cunnea P, Miranda-Vizueté A, Bertoli G, Simmen T, Damdimopoulos A, Hermann S, Leinonen S, Huikko M, Gustafsson J, Sitia R, Spyrou G (2003) ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *J Biol Chem*, 278(2), pp. 1059-1066.
- Dahr W, Uhlenbruck G, Gunson H, Hart Mvd (1975) Molecular basis of Tn-polyagglutinability. *Vox Sang.*, 29(1), pp. 36-50.
- De Lisle RC (2002) Role of sulfated O-linked glycoproteins in zymogen granule formation. *J Cell Sci*, 115(14), pp. 2941-2952.
- De Lisle RC, Norkina O, Roach E, Ziemer D (2005) Expression of pro-Muclin in pancreatic AR42J cells induces functional regulated secretory granules. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(5), pp. C1169-1178.
- De Lisle R, Ziemer D (2000) Processing of pro-Muclin and divergent trafficking of its products to zymogen granules and the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells. *Eur J Cell Biol*, 79(12), pp. 892-904.

- Edwardson J, An S, Jahn R (1997) The secretory granule protein syncollin binds to syntaxin in a Ca<sup>2+</sup>(+)-sensitive manner. *Cell*, 90(2), pp. 325-333.
- Freeze HH, Hart GW, Schnaar RL (2015-2017) Glycosylation Precursors. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Fu C, Zhao H, Wang Y, Cai H, Xiao Y, Zeng Y, Chen H (2016) Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA*, 88(6), pp. 275-286.
- Gabel M, Chasserot-Golaz S (2016) Annexin A2, an essential partner of the exocytotic process in chromaffin cells. *J Neurochem*, 137(6), pp. 890-896.
- Gertler A, Birk Y (1970) Isolation and Characterization of Procinc Proelastase. *Eur. J. Biochem*, 12(1), pp. 170-176.
- Gill D, Chia J, Senewiratne J, Bard F (2010) Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of. *The Journal of cell biology*, 189(34), pp. 843-58.
- Görllich D, Rapoport T (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75(4), pp. 615-630.
- Grant N, Robbins K (1955) Occurrence and activation of an elastase precursor in pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med*, 90(1), pp. 264-265.
- Gu H, Marth J, Orban P, Mossmann H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265(5168), pp. 103-106.
- Halim A, Brinkmalm G, Rüetschi U, Westmann-Brinkmalm A, Portelius E, Zetterberg H, Blennow K, Larson G, Nilsson J (2011) Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(29), pp. 11848-11853.
- Haugstad K, Hadjilirezaei S, Stokke B, Brewer C, Gerken T, Burchell J, Picco G, Sletmoen M (2016) Interactions of mucins with the Tn or Sialyl Tn cancer antigens including MUC1 are due to GalNAc-GalNAc interactions. *Glycobiology*, 26(12), pp. 1338-1350.

- Henrissat B, Surolia A, Stanley P (2015-2017) A Genomic View of Glycobiology. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Herbomel GG, Rojas RE, Tran DT, Ajinkya M, Beck L, Tabak LA (2017) The GalNAc-T Activation Pathway (GALA) is not a general mechanism for regulating mucin-type O-glycosylation. *PLoS One*, 12(7).
- Hietaranta A, Saluja A, Bhagat L, Singh V, Song A, Steer M (2001) Relationship between NF-kappaB and trypsinogen activation in rat pancreas after supramaximal caerulein stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1), pp. 388-395.
- Higgins W, Grehan G, Wynne K, Worrall D (2017) SerpinI2 (pancpin) is an inhibitory serpin targeting pancreatic elastase and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*, 1865(2), pp. 195-200.
- Ho C-W, Lin C-Y, Liaw Y-W, Chiang H-L, Chin Y-T, Huang R-L, Lai H-C, Hsu Y-W, Kuo P-J, Chen C-E, Lin H-Y, Whang-Peng J, Nieh S, Fu E, Liu LF, Hwang J (2016) The cytokine-cosmc signaling axis upregulates the tumor-associated carbohydrate antigen Tn. *Oncotarget*, 7(38), pp. 61930-61944.
- Hofmann BT, Schlüter L, Lange P, Mercanoglu B, Ewald F, Fölster A, Picksack S, Harder S, El Gammal AT, Grupp K, Güngör C, Drenckhan A, Schlüter H, Wagener C, Izbicki JR, Jücker M, Bockhorn M, Wolters-Eisfeld G (2015) COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, Band 14, p. 109.
- Holt G, Hart G (1986) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*, 261(17), pp. 8049-8057.
- Itzkowitz S, Kjeldsen T, Frieria A, Hakomori S, Yang U, Kim Y (1991) Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas. *Gastroenterology*, 100(6), pp. 1691-1700.

- Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart A, Hanisch F, Delannoy P, Le Bourhis X (2006) ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity. *Glycobiology*, 16(1), pp. 54-64.
- Julien S, Videira PA, Delannoy P (2012) Sialyl-Tn in Cancer: (How) Did We Miss the Target?. *Biomolecules*, Band 2, pp. 435-466.
- Ju T, Aryal RP, Kudelka MR, Wang Y, Cummings RD (2014) The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomark*, 14(1), pp. 63-81.
- Ju T, Aryal RP, Stowell CJ, Cummings RD (2008) Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *J Cell Biol*, 182(3), pp. 531-542.
- Ju T, Cummings RD (2002) A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$ 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26), p. 16613-16618.
- Ju T, Cummings RD (2005) Chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature*, 437(7063), p. 1252.
- Ju T, Lanneau G, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell S, Willard M, Wang W, Xia J, Zuna R, Laszik Z, Benbrook D, Hanigan M, Cummings R (2008) Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res*, 68(6), pp. 1636-1646.
- Ju T, Otto VI, Cummings RD (2011) The Tn-Antigen - Structural Simplicity and Biological Complexity. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 50(8), pp. 1770-1791.
- Takeji Y, Maehara Y, Morita M, Matsukuma A, Furusawa M, Takahashi I, Kusumoto T, Ohno S, Sugimachi K (1995) Correlation between sialyl Tn antigen and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma. *Br J Cancer*, 71(1), pp. 191-195.
- Kato K, Jeanneau C, Tarp MA, Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Bennett EP, Mandel U, Strom TM, Clausen H (2006) Polypeptide GalNAc-transferase T3 and Familial Tumoral Calcinosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(27), pp. 18370-18377.

- Kim D, Song L, Wang J, Wu H, Gu G, Sugi Y, Li Z, Wang H (2018) GRP94 Is an Essential Regulator of Pancreatic  $\beta$ -Cell Development, Mass, and Function in Male Mice. *Endocrinology*, 159(2), pp. 1062-1073.
- Kim G, Bae H, Park H, Kuan S, Crawley S, Ho J, Kim Y (2002) Aberrant Expression of MUC5AC and MUC6 Gastric Mucins and Sialyl Tn Antigen in Intraepithelial Neoplasms of the Pancreas. *Gastroenterology*, 123(4), pp. 1052-1060.
- Kleene R, Dartsch H, Kern H (1999) The secretory lectin ZG16p mediates sorting of enzyme proteins to the zymogen granule membrane in pancreatic acinar cell. *Eur J Cell Biol*, 78(2), pp. 79-90.
- Kleine B, Rossmannith W (2014) *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie*. 3 Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Klenk E, Uhlenbruck G (1960) On the isolation of mucoids containing neuraminic acid from human erythrocyte stroma, a contribution to the chemistry of agglutinogens. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem*, Band 319, pp. 151-160.
- Koch H-G, Brix J, Heinrich PC (2014) Nucleinsäuren - Struktur und Funktion. In: P C Heinrich, M Müller & L Graeve, Hrsg. *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 130-148.
- Kölbl A, Jeschke U, Friese K, Andergassen U (2016) The role of TF- and Tn-antigens in breast cancer metastasis. *Histol Histopathol*, Band 31, pp. 613-621.
- Kriegel T, Schellenberger W (2014) Regulation der Enzymaktivität. In: P C Heinrich, M Müller & L Graeve, Hrsg. *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 115-124.
- Kudo T, Iwai T, Kubota T, Iwasaki H, Takayma Y, Hiruma T, Inaba N, Zhang Y, Gotoh M, Togayachi A, Narimatsu H (2002) Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc( $\alpha$ ) peptide beta 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O-glycan. *J Biol Chem*, 277(49), pp. 47724-47731.



- Kumazawa-Inoue K, Mimura T, Hosokawa-Tamiya S, Nakano Y, Dohmae N, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Kojima-Aikawa K (2012) ZG16p, an animal homolog of  $\beta$ -prism fold plant lectins, interacts with heparan sulfate proteoglycans in pancreatic zymogen granules. *Glycobiology*, 22(2), pp. 258-266.
- Lang S, Benedix J, Fedeles S, Schorr S, Schirra C, Schäuble N, Jalal C, Greiner M, Hassdenteufel S, Tatzelt J, Kreutzer B, Edelmann L, Krause E, Rettig J, Somlo S, Zimmermann R, Dudek J (2012) Different effects of Sec61 $\alpha$ , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci*, 125(Pt 8), pp. 1958-1969.
- Lindahl U, Backstrom G, Hook M, Thunberg L, Fransson L, Linker A (1979) Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc Natl Acad Sci*, 76(7), pp. 3198-3202.
- Löffler G, Mössner J (2014) Gastrointestinaltrakt. In: P C Heinrich, M Müller & L Graeve, Hrsg. *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 745-769.
- Löser C, Möllgaard A, Fölsch U (1996) Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test. *Gut*, 39(4), pp. 580-586.
- Madsen CB, Lavrsen K, Steentoft C, Vester-Christensen MB, Clausen H, Wandall HH, Pedersen AE (2013) Glycan Elongation Beyond the Mucin Associated Tn Antigen Protects Tumor Cells from Immune-Mediated Killing. *PLOS ONE*, 8(10).
- Marcos NT, Pinho S, Grandela C, Cruz A, Samyn-Petit B, Harduin-Lepers A, Almeida R, Silva F, Morais V, Costa J, Kihlberg J, Clausen H, Reis CA (2004) Role of the Human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the Synthesis of the Cancer-Associated Sialyl-Tn Antigen. *Cancer Res*, 64(19), pp. 7050-7057.
- Meunier L, Usherwood Y, Chung K, Hendershot L (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell*, 13(12), pp. 4456-4469.
- Mi R, Song L, Wang Y, Ding X, Zeng J, Lehoux S, Aryal R, Wang J, Crew V, van Die I, Chapman A, Cummings R, Ju T (2012) Epigenetic silencing of the chaperone Cosmc in human leukocytes expressing tn antigen. *J Biol Chem*, 287(49), pp. 41523-41533.

- Müller M, Graeve L (2014) Proteine – Transport, Modifikation und Faltung. In: P C Heinrich, M Müller & L Graeve, Hrsg. *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 Hrsg. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 615-628.
- Munkley J, Oltean S, Vodák D, Wilson B, Livermore K, Zhou Y, Star E, Floros V, Johannessen B, Knight B, McCullagh P, McGrath J, Crundwell M, Skotheim R, Robson C, Leung H, Harries L, Rajan P, Mills I, Elliott D (2015) The androgen receptor controls expression of the cancer-associated sTn antigen and cell adhesion through induction of ST6GalNAc1 in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(33), pp. 34358-34374.
- Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP (1999) International Union of Pharmacology. XXI. Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors. *Pharmacol Rev*, 51(4), pp. 745-781.
- Ozaki K, Nagata M, Suzuki M, Fujiwara T, Miyoshi Y, Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Takahashi E, Nakamura Y (1998) Isolation and characterization of a novel human pancreas-specific gene, pancpin, that is down-regulated in pancreatic cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 22(3), pp. 179-185.
- Peng L, Liang J, Wang H, Song X, Rashid A, Gomez H, Corley L, Abbruzzese J, Fleming J, Evans D, Wang H (2010) High levels of nucleolar expression of nucleolin are associated with better prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 16(14), pp. 3734-3742.
- Prokop O, Uhlenbruck G (1969) N-acetyl-D-galactosamine in tumor cell membranes: demonstration by means of Helix agglutinins. *Med Welt*, Band 46, pp. 2515-2519.
- Radhakrishnan P, Dabelsteen S, Madsen F, Francavilla C, Kopp K, Steentoft C, Vakhrushev S, Olsen J, Hansen L, Bennett E, Woetmann A, Yin G, Chen L, Song H, Bak M, Hlady R, Peters S, Opavsky R, Thode C, Qvortrup K, Schjoldager K, Clausen H, Clausen H, Hollingsworth M, Wandall H (2014) Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(39), pp. 4066-4075.
- Rahier J, Wallon J, Henquin J (1981) Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia*, 20(5), pp. 540-546.

- Raman J, Fritz TA, Gerken TA, Jamison O, Live D, Liu M, Tabak LA (2008) The Catalytic and Lectin Domains of UDP-GalNAc:Polypeptide a-N-Acetylgalactosaminyltransferase Function in Concert to Direct Glycosylation Site Selection. *J Biol Chem*, 283(34), pp. 22942-22951.
- Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink H, Vollmers H (2008) A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest*, 88(4), pp. 375-386.
- Rehm H, Letzel T (2010) Glykoproteine. In: *Der Experimentator*. 6 Hrsg. s.l.:Spektrum, p. 340.
- Reichert M, Rustgi AK (2011) Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest*, 121(12), pp. 4572-4578.
- Rindler MJ (2006) Isolation of zymogen granules from rat pancreas.. *Current Protocols in Cell Biology*, 29(3), p. 3.18.1–3.18.16.
- Rini J, Esko J (2015-2017) Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes. In: *Essentials of Glycobiology*. 3 Hrsg. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rump G, Braun R, Jahn U-R, Krakowitzky P, Sibrowski W, Aken HV (2003) *Transfusionsmedizin compact*. 1 Hrsg. s.l.:Georg Thieme Verlag.
- Saeland E, Vliet Sv, Bäckström M, van den Ber V, Geijtenbeek T, Meijer G, Y vK (2007) The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 56(8), pp. 1225-1236.
- Sauer B, Henderson H (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Band 85, pp. 5166-5170.
- Schietinger A, Philip M, Yoshida BA, Azadi P, Liu H, Meredith SC, Schreiber H (2006) A Mutant Chaperone Converts a Wild-Type Protein into a Tumor-Specific Antigen. *Science*, 314(5797), pp. 304-308.

- Schjoldager K, Clausen H (2012) Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Biochim Biophys Acta*, 1820(12), pp. 2079-2094.
- Schjoldager K, Vester-Christensen M, Bennett E, Lavery S, Schwientek T, Yin W, Blixt O, Clausen H (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. *J Biol Chem*, 285(47), pp. 36293-36303.
- Schjoldager K, Vester-Christensen M, Goth C, Petersen T, Brunak S, Bennett E, Lavery S, Clausen H (2011) A systematic study of site-specific GalNAc-type O-glycosylation modulating proprotein convertase processing. *J Biol Chem*, 286(46), pp. 40122-40132.
- Schluessler M, Pintado S, Welt S, Real F, Xu M, Melamed M, Lloyd K, Oettgen H (1991) Blood group and blood-group-related antigens in normal pancreas and pancreas cancer: enhanced expression of precursor type 1, Tn and sialyl-Tn in pancreas cancer. *Int J Cancer*, 47(2), pp. 180-187.
- Sliwinska-Mosson M, Vesely M, Milnerowicz H (2014) The clinical significance of somatostatin in pancreatic diseases. *Ann Endocrinol (Paris)*, 75(4), pp. 232-240.
- Spindler V, Rötzer V, Dehner C, Kempf B, Gliem M, Radeva M, Hertlieb E, Harms GS, Schmidt E, Waschke J (2013) Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering. *J Clin Invest*, 123(2), pp. 800-811.
- Springer G, Desai P, Banatwala I (1975) Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue. *J Natl Cancer Inst.*, 54(2), pp. 335-339.
- Springer G, Murthy M, Desai P, Scanlon E (1980) Breast cancer patient's cell-mediated immune response to Thomsen-Friedenreich (T) antigen.. *Cancer*, 45(12), pp. 2949-2954.
- Stanley P, Taniguchi N, Aebi M (2015-2017) N-Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Steentoft C, Vakhrushev S, Joshi H, Kong Y, Vester-Christensen M, Schjoldager K, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen N, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett E, Mandel U, Brunak S, Wandall H, Lavery S, Clausen H (2013) Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32(10), pp. 1478-1488.
- Steentoft C, Vakhrushev S, Vester-Christensen M, Schjoldager K, Kong Y, Bennett E, Mandel U, Wandall H, Lavery S, Clausen H (2011) Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines. *Nat Methods*, 8(11), pp. 977-982.
- Tani T, Kawashima I, Furukawa H, Ohmine T, Takiuchi Y (1987) Characterization of a silent gene for human pancreatic elastase I: structure of the 5'-flanking region. *J Biochem*, 101(3), pp. 591-599.
- Terada T, Nakanuma Y (1996) Expression of mucin carbohydrate antigens (T, Tn and sialyl Tn) and MUC-1 gene product in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Am J Clin Pathol*, 105(5), pp. 613-620.
- The UniProt Consortium, (2018) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*.
- Topaz O, Shurman DL, Bergman R, Indelman M, Ratajczak P, Mizrachi M, Khamaysi Z, Behar D, Petronius D, Friedman V, Zelikovic I, Raimer S, Metzker A, Richard G, Sprecher E (2004) Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nature Genetics*, 36(6), pp. 579-581.
- van Vliet SJ, Vuist IM, Lenos K, Tefsen B, Kalay H, García-Vallejo JJ, Kooyk Yv (2013) Human T Cell Activation Results in Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)-Calcineurin-dependent Exposure of Tn Antigen on the Cell Surface and Binding of the Macrophage Galactose-type Lectin (MGL). *J Biol Chem*, 288(38), pp. 27519-27532.
- van Vliet S, van Liempt E, Saeland E, Aarnoudse C, Appelmelk B, Irimura T, Geijtenbeek T, Blixt O, Alvarez R, van Die I, van Kooyk Y (2005) Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *Int Immunol*, 17(5), pp. 661-669.

- Varki A (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27(1), pp. 3-49.
- Varki A, Gagneux P (2015-2017) Biological Functions of Glycans. In: *Essentials of Glycobiology*. 3 Hrsg. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varki A, Sharon N (2015-2017) Historical Background and Overview. In: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Fong Yee S, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L, Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature MEDicin*, 13(9), pp. 1070-1077.
- Wang C, Dashti A, Jackson K, Yeh J, Cummings R, Tang J (1995) Isolation and characterization of human milk bile salt-activated lipase C-tail fragment. *Biochemistry*, 34(33), pp. 10639-10644.
- Wang Y, Ju T, Ding X, Xia B, Wang W, Xia L, He M, Chummings RD (2010) Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(20), pp. 9228-9233.
- Wäsle B, Turvey M, Larina O, Thorn P, Skepper J, Morton A, Edwardson J (2005) Syncollin is required for efficient zymogen granule exocytosis. *Biochem J*, 385(Pt 3), pp. 721-727.
- Watkins W, Morgan W (1955) Inhibition by simple sugars of enzymes which decompose the blood-group substances. *Nature*, 175(4459), pp. 676-677.
- Watson J, Crick F (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356), pp. 737-738.
- Wei B, Guo C, Liu S, Sun M-Z (2015) Annexin A4 and cancer. *Clin Chim Acta*, Band 447, pp. 72-78.
- Wells JM, Esni F, Boivin GP, Aronow BJ, Stuart W, Combs C, Sklenka A, Leach SD, Lowy AM (2007) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. *BMC Dev Biol*, Band 7, p. 4.

- West CM, Hart. GW (2015-2017) Nucleocytoplasmic Glycosylation. In: *Essentials of Glycobiology*. 3 Hrsg. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wolters-Eisfeld G, Mercanoglu B, Hofmann BT, Wolpers T, Güngör C, Schnabel C, Harder S, Buck F, Schlüter H, Bachmann K, Schrader J, Izbicki JR, Wagener C, Bockhorn M (in Review) Loss of complex O-glycosylation impairs exocrine pancreatic function and induces MODY8-like diabetes in mice. *Experimental & Molecular Medicine*.
- Wu B, Hong F, Zhang Y, Ansa-Addo E, Li Z (2016) GRP94/gp96 in Cancer: Biology, Structure, Immunology, and Drug Development. *Adv Cancer Res*, Band 129, pp. 165-190.
- Xin Y, Hongqiang Q, Mingliang Y (2018) Recent advances in methods for the analysis of protein o-glycosylation at proteome level. *J Sep Sci*, 41(1), pp. 248-261.
- Yang T, Tsai W, Lee Y, Lei H, Lai M, Chen D, Yeh N, Lee S (1994) Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor. *Mol Cell Biol*, 14(9), pp. 6068-6074.
- Yildiz BO, Suchard MA, Wong M-L, McCann SM, Licinio J (2004) Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(28), pp. 10434-10439.
- Yu X, Wu Q, Wang L, Zhao Y, Zhang Q, Meng Q, Pawan, Wang S (2016) Silencing of ST6GalNAc I suppresses the proliferation, migration and invasion of hepatocarcinoma cells through PI3K/AKT/NF-kB pathway. *Tumor Biology*, 37(9), pp. 12213-12221.
- Zachara N, Akimoto Y, Hart GW (2015-2017) The O-GlcNAc Modifikation. In: *Essentials of Glycobiology*. 3 Hrsg. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# 8 Anhang

## 8.1 Abbildungen

- Abbildung 1:** Aufbau der Core-Strukturen (modifiziert nach (Bennett et al. 2012)) Das initial durch die ppGalNAcTs gebildete Tn-Antigen wird durch die T-Synthase (C1GalT1),  $\beta$ 3GnT6 und ST6GalNAc-I weiter zum T-Antigen/ Core 1, Core 3 und dem sialyl Tn-Antigen (sTn-Antigen) verstoffwechselt. Es kann anschließend eine weitere Verlängerung stattfinden, wobei sialysierte Formen jedoch einen Endpunkt darstellen. 11
- Abbildung 2:** Nachweis des erfolgreichen Cosmc-Knock-outs im Mausmodell. (A) Repräsentativer Western Blot von pankreatischen Gesamtllysaten, das Tn-Antigen wurde mit VVL markiert. Eine Bandendemaskierung findet vor allem in den Cosmc-KO-Mäusen statt. (B) Repräsentative histologische Färbungen von Pankreasgewebe mit Vicia Villosa Lektin (VVL), Peanut Lektin (PNA) und anti-Tn. 34
- Abbildung 3:** Relative Zytoplasma-Aktivitäten verschiedener Enzyme im KO im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Aktivität (n=3). Ein Unterschied der Aktivität konnte bei der Esterase ( $p=0,010$ ),  $\beta$ -Glucosidase ( $p=0,041$ ),  $\alpha$ -Mannosidase ( $p=0,009$ ) und der pankreatischen Elastase ( $p<0,001$ ) gezeigt werden. 35
- Abbildung 4:** Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit verglichen zur Null-Fluoreszenz des WT (Zugabe des Substrates bei 2,0 min; n=3). Es besteht ein signifikante erhöhter Kurvenverlauf der WT-Kurve ( $p=0,017$ ). 36
- Abbildung 5:** Nach 60 Minuten durch die Esterase enzymatisch umgesetzt Substrat im KO im Vergleich zum WT, gemessen an der Fläche unter der Kurve (Area under curve; AUC) (n=3). Im Wildtyp sind  $16 \pm 8\%$  weniger Substrat umgesetzt worden ( $p=0,025$ ). 36
- Abbildung 6:** Relative Gesamtaktivität der Lipase im Zytoplasma und den Zymogengranula im WT und KO im Vergleich zur Zytoplasma-Aktivität des Wildtyps (n=3). Sowohl im WT, als auch im KO liegt eine deutliche erhöhte Aktivität in den Zymogengranula vor (jeweils  $p<0,001$ ). 38
- Abbildung 7:** Bestimmung der Lipase-Mengen im Zytoplasma und den Zymogengranula im WT und KO (n=18). Es liegt in beiden Modellen eine erhöhte Konzentrierung in den Zymogengranula vor (jeweils  $p<0,001$ ), es besteht allerdings eine signifikant erniedrigte Lipase-Menge in den Zymogengranula des KOs ( $p=0,023$ ). 39
- Abbildung 8:** Relative Molekül-Aktivität der Lipase in Zytoplasma und den Zymogengranula von WT und KO im Vergleich zur WT-Zytoplasma-Aktivität (n=3). In den Zymogengranula des KOs besteht eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Zytoplasma ( $p=0,003$ ), sowie zur WT-Aktivität ( $p=0,014$ ). 39
- Abbildung 9:** Relative Gesamtaktivität der Elastase im Zytoplasma und den Zymogengranula des KOs im Vergleich zur WT-Zytoplasma-Aktivität (n=3). Es besteht eine leicht erniedrigte Aktivität in den Zymogengranula (WT:  $p=0,005$ ; KO:  $p=0,002$ ), zudem eine stark erniedrigte Aktivität im KO (jeweils  $p<0,001$ ). 40



- Abbildung 10: Bestimmung der Elastase-Mengen im Gesamtlysat von WT und KO (n=15). Im KO liegt eine um 3,36-fach erhöhte Menge an Elastase vor (p<0,001). 41**
- Abbildung 11: Relative Molekülaktivität der Elastase im Zytoplasma und den Zymogengranula im KO im Vergleich zur WT-Aktivität (n=3). Im KO liegt eine um 91% erniedrigte Aktivität eines Elastase-Moleküls vor (jeweils p<0,001). 41**
- Abbildung 12: Relative Gesamtaktivität der Esterase im Zytoplasma und den Zymogengranula von WT und KO im Vergleich zur Zytoplasma-Aktivität des Wildtyps (n=3). Es besteht eine leicht erniedrigte Aktivität im Zytoplasma des KOs (p=0,009), und eine deutliche Aktivitätszunahme in den Zymogengranula (WT: p<0,001; KO: p=0,001). 42**
- Abbildung 13: Steigerung der Lipase-Aktivität nach Caerulein-Stimulation im Sekret von WT und KO (n=3). Zunahme der Aktivität nach Stimulation im WT um 90 ± 23% (p=0,031), im KO um 14 ± 42% (p=0,681). 43**
- Abbildung 14: Steigerung der Esterase-Aktivität nach Caerulein-Stimulation im Sekret von WT und KO (n=3). Zunahme der Aktivität nach Stimulation im WT um 68 ± 13% (p=0,033), im KO um 8 ± 45% (p=0,611). 44**
- Abbildung 15: Vergleich von Enzym-Aktivität in mobiler und Elutionsphase des Knock-out-Modells nach Chromatographie verglichen zur jeweiligen WT-Aktivität (n=3). Erhöhte Aktivität der β-Glucosidase in der Elutionsphase (p=0,039), während die α-L-Fucosidase eine erniedrigte Aktivität zeigt (p=0,023). 44**
- Abbildung 16: Esterase-Aktivitätsunterschiede nach VVL-Pulldown in der Elutions- und Waschphase (n=4). Erniedrigte Aktivität der Esterase in der Waschphase des KOs (p=0,006). 45**
- Abbildung 17: Western Blots mit Immunodetektion mit Anti-Elastase (A) Western Blot von WT und KO-Gesamtlysaten (n=4) zeigt eine unterschiedliche Bandenverteilung. (B) Western Blot von WT und KO-Gesamtlysaten nach Durchführung eines VVL-Pulldowns (n=4). O-GalNAc-modifizierte Elastase zeigte sich nur im KO. 50**

## 8.2 Tabellen

<b>Tabelle 1: Bezogene Puffer und Lösungen</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 2: Primäre Antikörper</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 3: Sekundäre, HRP-konjugierte Antikörper</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 4: Lektine</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 5: Zur Genotypisierung der Mäuse verwendete Primer</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 6: In Enzym-Substrat-Assays verwendete Fluoreszenz-gekoppelte Substrate</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle 7: Aktivitätsunterschiede im KO</b> Enzymaktivität des KOs, verglichen mit der WT-Aktivität in Zytoplasma und Zymogengranula. Aktivitätszunahme von Zytoplasma zu Zymogengranula in WT und KO, sowie die Signifikanz des Unterschieds dieser Aktivitätszunahmen in WT und KO.	<b>37</b>
<b>Tabelle 8: Mittels LC-MS/MS identifizierte, Tn-Antigen-tragende Proteine im KO-Gesamtlysat</b> Score: Maß für die Sicherheit einer korrekten Identifizierung Molekulare Funktion: Nach UniProt (The UniProt Consortium 2018), teilweise durch weitere Publikationen weiter gesichert (siehe Text) Anzahl Predictions: Mit NetOGlyc 4.0 Server ermittelte Anzahl an Positionen, an denen mit einer Wahrscheinlich von >50% eine O-Glykosylierung vorliegt (Steentoft et al. 2013)	<b>46</b>

## 9 Danksagung

An dem Gelingen dieser Arbeit waren eine Reihe an Personen beteiligt, denen ich herzlich danken möchte.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Bockhorn für die Überlassung des Themas danken. Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Izbicki dafür, dass ich diese Arbeit im Forschungslabor seiner Klinik durchführen durfte.

Mein größter Dank gilt Dr. Gerrit Wolters-Eisfeld für die intensive Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank für ein immer offenes Ohr, das Beantworten vieler Fragen, eine helfende Hand, viele hilfreiche Tipps, anregende Diskussionen und Verbesserungsvorschläge. Ohne dich wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und eure immerwährende Hilfsbereitschaft. Ich habe meine Arbeit sehr gerne bei euch geschrieben.

Vielen Dank an Steffen Picksack für viele Diskussionen im Labor und den gelegentlichen Motivationsschub. Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden für das Verständnis bedanken, wenn ich den ELISA-Reader mal wieder für längere Zeit blockiert habe.

Außerdem gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Opa für die ständige Motivationsarbeit beim Schreiben dieser Arbeit.

# 10 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

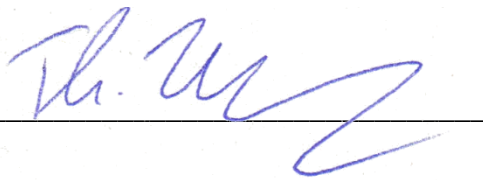
## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: \_\_\_\_\_

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname, written over a horizontal line.