

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, FACS,
FRCS Ed. Hon.

Modulation des PI3K/AKT/mTOR-, Ras/Raf/MAPK-Signalweges und der epithelial-mesenchymalen Transition durch aberrante O- GalNAc-Glykosylierung im Pankreaskarzinom

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Aeint-Steffen Picksak
aus Celle

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.07.2019**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Aymelt Itzen

Inhaltsverzeichnis

I Abbildungsverzeichnis.....	VI
II Tabellenverzeichnis.....	VII
III Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	3
2.1 Pankreaskarzinom.....	3
2.1.1 Einteilung.....	3
2.1.2 Risikofaktoren.....	4
2.1.3 Pathogenese	5
2.1.4 Epidemiologie	7
2.2 O-GalNAc-Glykosylierung im Pankreaskarzinom.....	8
2.2.1 Biosynthese der O-GalNAc-Glykosylierung im Tumorkontext	8
2.2.2 Chaperon COSMC	11
2.2.3 Glykosyltransferasen (GALNT)	12
2.3 PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg im Pankreaskarzinom	12
2.3.1 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg.....	13
2.3.2 Phosphorylierung und Regulation der AKT-Kinase durch den Rictor-mTOR-Komplex	17
2.3.3 Ras/Raf/MAPK-Signalweg.....	17
2.4 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) im Pankreaskarzinom.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Geräte, Materialien und Chemikalien.....	20
3.1.1 Geräte	20
3.1.2 Materialien.....	21
3.1.3 Chemikalien.....	22
3.1.4 Antikörper	23
3.1.5 Primer.....	25
3.1.6 Puffer und Lösungen	25
3.1.7 Herstellerkits.....	26
3.1.8 Glykosidasen.....	26
3.2 Zelllinien.....	27
3.3 Molekularbiologische Methoden	28
3.3.1 Lentiviral-vermittelter <i>COSMC-Knockdown</i> in Panc-1 und L3.6pl-Zelllinie ...	28
3.3.2 CRISPR/CAS9-vermittelter <i>COSMC-Knockout</i> in der HEK-Zelllinie.....	28
3.3.3 SILAC-Markierung und Massenspektrometrie.....	29

3.3.4 RNA-Extraktion.....	31
3.3.5 cDNA Synthese	31
3.3.6 RT-qPCR.....	32
3.3.7 delta-delta C _T Quantifizierung	33
3.4 Zellkultur.....	34
3.4.1 Kultivierung.....	34
3.4.2 Subkultivierung	34
3.4.3 Kryokonservierung.....	35
3.4.3 Behandlung mit AZD8055.....	35
3.4.4 IGF-1 und EGF-Stimulation	35
3.5 Proteinbiochemische Methoden.....	36
3.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus adhärenen Zellen	36
3.5.2 BCA-Proteinassay	36
3.5.3 Immunpräzipitation	37
3.5.4 SDS-PAGE	38
3.5.5 Western Blot.....	38
3.5.5.1 Proteintransfer	38
3.5.5.2 Proteinfärbung	39
3.5.5.3 Blocken.....	39
3.5.5.4 Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper	39
3.5.5.5 Immundetektion	39
3.5.5.6 Densitometrie und Quantifizierung	40
3.5.6 Zellfraktionierung	40
3.5.7 Protein Deglykosylierung	41
3.5.8 AKT-Kinase assay	42
3.6 Statistische Analyse	43
4 Ergebnisse	44
4.1 Massenspektrometrie-basierte Proteomik in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg.....	44
4.2 Bestimmung der mRNA Expression von COSMC und AKT-Isoformen durch RT-qPCR	46
4.3 Nachweis von GALNTs im Zytosol in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen....	46
4.4 Verstärkte AKT-Phosphorylierung durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung und Nachweis aberranter O-GalNAc-Glykosylierung an AKT	48
4.5 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung verringert die AKT-Kinase-Aktivität	51
4.6 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung erhöht die S6- und GSK-3-β-Phosphorylierung	52
4.7 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung verringert MAPK-Phosphorylierung.....	53

4.8	Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung erhöht die Phosphorylierung am IGF-I-Rezeptor und die mTORC2-Aktivierung.....	55
4.9	IGF-1- und EGF-Stimulationen verursachen unterschiedliche Veränderungen in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen.....	57
4.10	Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung vermittelt AZD8055-Resistenz von mTORC1 in <i>L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen</i>	61
4.11	Verbesserte Expression von EMT-Markern in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen	65
5	Diskussion.....	66
5.1	Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung im PI3K/AKT/mTOR-, Ras/Raf/MAPK-Signalweg und EMT im Pankreaskarzinom	66
5.2	Wie und wo könnte AKT O-GalNAc glykosyliert werden?	67
5.3	Einfluss aberranter O-GalNAc-Glykosylierung auf die AKT Kinaseaktivität.....	69
5.4	O-GalNAc-Modifikationen am EGF- und IGF-1-Rezeptor	71
5.6	O-GalNAc vermittelte Arzneimittelresistenz	72
5.7	Gesteigerte Expression von EMT-Markern im Kontext von O-GalNAc-Modifikationen	73
5.8	Prognostische, diagnostische und therapeutische Anwendungsmöglichkeiten durch O-GalNAc-Modifikationen im Pankreaskarzinom.....	75
6	Zusammenfassung.....	78
7	Literaturverzeichnis	79
8	Danksagung	92
9	Curriculum Vitae.....	93
10	Eidesstaatliche Versicherung	94

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreas.....	6
Abbildung 2: Expression von aberranter O-GalNAc Glykosylierung im PDAC.....	10
Abbildung 3: Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/RafMAPK-Signalweges über extrazelluläre Signale.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweges.....	16
Abbildung 5: Nachweis von GALNTs im Zytosol von aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen.....	47
Abbildung 6: AKT Western Blot Analyse.....	48
Abbildung 7: Relative Quantifizierung der p-AKT S473-Expression.....	49
Abbildung 8: Immunpräzipitation mit VVL Lektin mit anschließender Western-Blot-Analyse mit AKT 1- und AKT 2-Antikörpern.....	50
Abbildung 9: Immunpräzipitation mit panAKT magnetic-beads mit anschließender Western Blot-Analyse mit VVL nach enzymatischer Deglykosylierung.....	51
Abbildung 10: AKT-Kinase-Aktivität.....	52
Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von <i>AKT-Downstream-Substraten</i> S6 und GSK3- β -Protein.....	53
Abbildung 12: Western-Blot-Analyse von <i>Ras-Downstream-Substraten</i>	54
Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von <i>AKT-Upstream-Signalmolekülen</i>	57
Abbildung 14: Western Blot Analyse von <i>Panc-1-</i> und <i>L3.6pl-COSMC-Knockdown</i> und Kontrollen mit (+) und ohne (-) EGF-Stimulation.....	58
Abbildung 15: Western Blot Analyse von <i>Panc-1-</i> und <i>L3.6pl-COSMC-Knockdown</i> und Kontrollen mit (+) und ohne (-) IGF-1-Stimulation.....	60
Abbildung 16: Western Blot-Analyse von p-mTOR S2448 nach AZD8055-Behandlung in <i>L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen</i>	61
Abbildung 17: AZD8055 inhibiert mTOR und vermindert Aktivierung von mTOR <i>downstream-Substraten</i> in <i>Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen</i> und Kontrollen.....	62
Abbildung 18: Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung modifiziert die mTOR S2448 Phosphorylierung in <i>L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen</i> nach Behandlung mit mTOR-Inhibitor AZD8055.....	63
Abbildung 19: Western Blot-Analyse nach Behandlung mit AZD8055 in <i>Panc-1-</i> und <i>L3.6pl-Zelllinie</i>	64

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pankreaskarzinom: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland	7
Tabelle 2: Auflistung verwendeter Gerät	20
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Materialien.....	21
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Chemikalien	22
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Antikörper	23
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Primer	25
Tabelle 7: Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen	25
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Herstellerkits	26
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Glykosidasen.....	26
Tabelle 10: SILAC-Markierung und Massenspektrometrie identifizierter COSMC-Knockdown-regulierte Proteine	44
Tabelle 11: Bestimmung der mRNA Expression von COSMC und AKT-Isoformen durch RT-qPCR	46
Tabelle 12: <i>Panc-1-</i> und <i>L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen</i> und Kontrollen nach Behandlung mit IGF-1 und EGF	58
Tabelle 13: Darstellung von relativen mRNA-Expressionsniveaus von EMT-assoziierten Transkripten für Panc-1- und L3.6pl-Zelllinie in COSMC und Kontrollen.....	65

III Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
AKT	RAC-alpha-Serin/Threonin-Proteinkinase
ATRX	ATP-dependent helicase
B3GNT6	β1-3 N-acetylglucosaminyltransferase
BCA	Bicinchoninic acid
BMI	Body-Mass-Index
BRCA	BReast CAncer
C1GalT1	Core-1-T-Synthase
C1GALT1	β3-galaktosyltransferase
CA125	Cancer-Antigen 125
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CAS9	CRISPR-associated 9
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
C _T	Threshold cycle
DAXX	Death-associated protein 6
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPC4	Deleted in Pancreatic Cancer-4
DR4	Death receptor 4
DR5	Death receptor 5
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymaler-Transition
ER	Endoplasmatischen Reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
FoxO	Forkhead Box O
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GALNT	N-Acetylgalaktosaminyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GNB1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3β	Glycogen-Synthase-Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Human Embryonic Kidney
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HRP	Horseradish peroxidase
HSC70	70 kilodalton heat shock proteins
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-IR	Insulin-like growth factor 1 Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
ILK	Integrin-Linked Kinase
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
IRS1	Insulin-Rezeptor-Substrat-1

KD	Knockdown
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Man	Mannose
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCN	Mucinous cystic neoplasm
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEN1	Multiple Endokrine Neoplasie Typ1
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MNK	MAPK-Interacting Protein Kinases
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1/2	Mechanistic Target of Rapamycin complex 1/2
N-CAD	N-Cadherin
NeuAc	N-Acetyl-Neuraminic Acid/Sialinsäure
ng	Nanogramm
O-GalNAc	O-N-acetylgalactosamin
P/S	Penicillin/Streptomycin
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasm
PanNETs	Pancreatic neuroendocrine tumors
PANTHER	Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDK1/2	Phosphoinositide-dependent kinase 1/2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PI4,5P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PRAS40	Proline-rich AKT1 substrate 40
p-S6Kb1	Ribosomale Protein-S6-Kinase
PTM	Posttranslationalen Modifikationen
PTRHD1	Putative peptidyl-tRNA hydrolase
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RHOC	Ras homolog gene family, member C
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Revolutions per minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
rt-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
S100A4	Calcium-binding protein A4
SCR	Scrambled
SD	Standard deviation
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	Serin
shRNA	Small hairpin RNA
SILAC	Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SNAIL2	Snail Family Transcriptional Repressor 2
SOS	Son of Sevenless
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
sTn	Neu5Ac(a2-6)GalNAc
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
T Antigen	Galbeta1-3GalNAcalpha1-Ser/Thr
TBST	Tris-buffered saline with Tween20

TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
Thr	Threonin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
TWIST1	Twist-related protein 1
UDP	Uridindiphosphat
V	Volt
VEGFR-2	Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
VVL	Vicia villosa lectin
WT	Wild type
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box-binding homeobox 2

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) geht als bösartige Neoplasie aus dem exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse vom Epithel der Pankreasgänge aus. Im frühen Stadium verursachen die bösartigen Neubildungen des Pankreas keine oder nur sehr wenige Symptome, sodass die Tumorerkrankung häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium mit bereits lymphogener, perineuraler und hämatogener Metastasierung entdeckt wird. Das Pankreaskarzinom weist dabei die schlechteste 5-Jahres Überlebensrate aller Formen von Krebs auf und ist die vierthäufigste durch Krebs bedingte Todesursache in Deutschland (Robert Koch Institut, 2015).

Die genetischen und histologischen Hintergründe der Karzinogenese vom PDAC sind in der Vergangenheit bereits eingehend untersucht worden (Gaiario *et al.*, 2017). Die genauen molekularen Mechanismen für den aggressiven migrativen und invasiven Charakter im PDAC sind jedoch weitestgehend unklar und werden vielfach mit epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) (Ying *et al.*, 2016) als auch mit Veränderungen in der co- oder posttranslationalen Prozessierung von Glykanen assoziiert (Ju *et al.*, 2011). Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang des aggressiven und invasiven Charakters, ausgelöst durch eine veränderte O-N-Acetylgalactosamin-Glykosylierung (O-GalNAc-Glykosylierung) im PDAC.

In Vorarbeiten wurde bereits in aberranten O-GalNAc glykosylierten PDAC eine verbesserte Migration beschrieben, die durch EMT als molekularen Mechanismus ausgelöst werden kann (Hofmann *et al.*, 2015). Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit Marker, die auf EMT hindeuten, in O-GalNAc-glykosylierten überexprimierenden PDAC-Zellen untersucht. Zudem wurden im Kontext aberranter O-GalNAc-Glykosylierung im PDAC unterschiedliche exprimierte Proteine, welche mit dem PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg assoziiert sind, durch die Verwendung von quantitativer Proteomik identifiziert. Zu diesen identifizierten Proteinen zählt unter anderen die Proteinkinase AKT. Im PDAC ist AKT als ein wichtiges Schlüsselmolekül zellulärer Signaltransduktion bekannt und soll hier im Kontext der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung neben anderen Molekülen im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg, welche zudem auch einen zentralen Bestandteil von EMT darstellen (Larue und Bellacosa, 2005), untersucht werden.

Die identifizierten Proteine im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg sind überwiegend zytosolische Signaltransduktoren (Fujioka *et al.*, 2006, Hemmings und Restuccia, 2012). Da N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (GALNTs) als Schlüsselenzyme den ersten Schritt der O-GalNAc Glykosylierung normalerweise nur an sekretorischen

Proteinen und Zelloberflächenproteinen katalysieren (Chia *et al.*, 2016), ist es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob GALNTs im PDAC zusätzlich zu den sekretorischen Proteinen und Oberflächenproteinen auch zytosolische Signalmolekülen im PI3K/AKT/mTOR- und im Ras/Raf/MAPK-Signalweg glykosylieren.

Zusammenfassend sollen die Erkenntnisse dieser Arbeit helfen, molekulare Mechanismen für die ausgeprägte kanzerogene Aktivität des PDAC im Kontext veränderter Glykosylierung zu verstehen und neue Therapieansätze gegen das duktales Adenokarzinom des Pankreas zu identifizieren.

2 Einleitung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas soll im Kontext aberranter O-GalNAc-Glykosylierung und EMT mit Bezug auf den PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

2.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist die sechsthäufigste durch Krebs verursachte Todesursache in Europa und die vierthäufigste in den USA. Zum Zeitpunkt der Diagnose befinden sich bereits 90 % der Pankreaskarzinome in einem metastasierten oder inoperablen Stadium, welche mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind. Im frühen Stadium verursachen bösartige Neubildungen des Pankreas keine oder lediglich wenige Symptome, so dass eine Tumorerkrankung häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium mit bereits stattgehabter lymphogener und hämatogenen Metastasierung entdeckt wird. Über alle Stadien gemittelt beträgt das 5-Jahres Überleben lediglich 6 % (Jemal *et al.*, 2010). Im Folgenden soll auf die Einteilung, Risikofaktoren, Pathogenese und Epidemiologie des Pankreaskarzinoms eingegangen werden.

2.1.1 Einteilung

Die genaue Ursacheneinstellung und auslösende Faktoren des Pankreaskarzinoms sind bislang nicht gänzlich geklärt (Yadav und Lowenfels, 2013). Das Pankreaskarzinom manifestiert sich in unterschiedlichen Subtypen. Zumeist handelt es sich um duktale Adenokarzinome, die aus dem exokrinen Anteil des Pankreas vom Epithel der Pankreasgänge ausgehen (PDAC). Diese bösartige Neoplasie stammt mit rund 90 % aus dem Epithel der Pankreasgänge, welches die Ausführungsgänge für Verdauungsenzyme und Bikarbonat auskleidet. In 65 % der Fälle ist hierbei ein PDAC im Pankreaskopf lokalisiert. Rund 15 % der PDACs befinden sich im Corpus oder Pankreasschwanz (Artinyan *et al.*, 2008). Der zweithäufigste Subtyp der Pankreaskarzinome ist mit rund 10 % das azinäre Adenokarzinom. Dieses geht aus dem Azinusepithel hervor, welches für die Verdauungsenzym- und Bikarbonat-Produktion im Pankreas verantwortlich ist. Zu weiteren exokrinen, malignen Subtypen von Pankreastumoren zählen das intraduktales papillär-muzinöses Adenokarzinom (2 %) und das muzinöse Zystadenokarzinom (1 %) (Ryan *et al.*, 2014). In 2 % der Fälle sind Pankreastumore neuroendokrine Tumore (PanNETs), die von den Hormon produzierenden

Zellen des Pankreas ausgehen. Diese PanNETs werden jeweils in eine nicht-funktionale und eine funktionale Gruppe eingeordnet, abhängig davon, ob diese endokrin aktiv sind. In der funktionalen Gruppierung der PanNETs befinden sich das VIPom, Insulinom, Somatostatinom und Glukagonom (Klimstra *et al.*, 2010). Weitere, eher seltene Tumore des Pankreas (<1 %), gehen vom Bindegewebe aus oder sind nicht weiter zu klassifizieren. Als benigne, gutartige Pankreastumoren sind das muzinöse und seröse Zystadenom (jeweils 1 %) zu verzeichnen (King *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Pankreaskarzinomzelllinien aus duktalem Adenokarzinomen des Pankreas untersucht.

2.1.2 Risikofaktoren

Die genauen Ursachen für die Entstehung von Pankreaskarzinomen sind unbekannt. Als Risikofaktoren werden genetische Prädisposition, Alkoholkonsum, Adipositas, chronische Pankreatitis, zystische Neoplasien und vor allem das Rauchen von Tabak gezählt (Lowenfels und Maisonneuve, 2006).

Rauchen von Tabak könnte die Ursache von bis zu 20-25 % aller Pankreaskarzinome sein und gilt damit als größter Umweltrisikofaktor für diese Erkrankung (Levi *et al.*, 2003). Raucher haben statistisch gesehen ein zweifach höheres Risiko, am PDAC zu erkranken als Nicht-Raucher. Wie beim Bronchialkarzinom steigt das Risiko proportional zur Intensität und Dauer des Nikotinabusus (Lin *et al.*, 2002). Karzinogene im Zigarettenrauch gehören zu verschiedensten chemischen Substanzen, wie beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Aldehyde, aromatische Amine, flüchtige organische Kohlenwasserstoffe oder N-Nitrosamine. Diese Karzinogene können kovalent an die DNA binden und zu DNA-Addukten führen, die wiederum zu somatischen Mutationen mit einem Verlust der normalen Zellwachstumsfunktion, zu einer enthemmten Proliferation und somit zu Krebs führen können (Centers for Disease Control and Prevention, 2010, Lin *et al.*, 2014).

Weitere Risikofaktoren für die Genese eines Pankreaskarzinoms stellen eine Reihe von hereditären Syndromen dar. Tumorprädispositionssyndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis, das Familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom und Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom sowie das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom spielen hierbei eine Rolle. Das Lebenszeitrisiko für ein Pankreaskarzinom beträgt abhängig vom Syndrom 10 bis 35 %. Durch eine familiäre Prädisposition kann ebenfalls ein erhöhtes Risiko bestehen (Grover und Syngal, 2010).

Langjähriger Diabetes mellitus Typ 2 wird ebenfalls als Risikofaktor gesehen. Durch Hyperinsulinämie und Entzündung wird eine hypertrophe Wirkung auf Azinuszellen des

Pankreas ausgeübt, die längerfristig durch bislang nicht gänzlich verstandene komplexe Vorgänge zu PDAC führen können (Andersen *et al.*, 2017). Grundsätzlich wird Diabetes mellitus als Risikofaktor für PDAC kontrovers diskutiert. So könnte Diabetes mellitus auch assoziativ zum Pankreaskarzinom auftreten und somit keinen Risikofaktor darstellen (Huxley *et al.*, 2005). Als weitere Risikofaktoren gelten Adipositas (BMI >30 kg/m²), ABO-Blutgruppenstatus sowie chronische Pankreatitis und zystische Neoplasien des Pankreas (Becker *et al.*, 2014). Übermäßiger Alkoholkonsum scheint kein direkter Risikofaktor zu sein, kann jedoch als indirekter Risikofaktor durch die Induktion einer chronischen Pankreatitis zur Bildung eines PDAC beitragen (Malka *et al.*, 2002). Bestimmte Syndrome, wie das MEN1-Syndrom, mit der gleichnamigen Genmutation MEN1, sind zudem häufiger mit PanNETs assoziiert (Marini *et al.*, 2009). Letztendlich sind zahlreiche Risikofaktoren, die eine Entstehung eines Pankreaskarzinoms bedingen, bekannt und Gegenstand aktueller Forschung.

2.1.3 Pathogenese

Exokrine Pankreaskarzinome gehen wahrscheinlich von verschiedenen präkanzerogenen Vorläuferläsionen aus. Neben dem pankreatischen serösen Zystadenom sind unterschiedliche präkanzerogene Vorläuferläsionen, wie die intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN), die pankreatische muzinöse zystische Neoplasie (MCN) und die intraduktale tubulopapilläre Neoplasie, bekannt (Sarkar *et al.*, 2007). Die präkanzerogenen Läsionen müssen nicht zwingendermaßen zum Pankreaskarzinom führen. Sie haben damit eine primär benigne Dignität und werden in Autopsien oft als mikroskopisch oder makroskopisch sichtbare Neoplasien gefunden (Buchler *et al.*, 2015).

Nach dem Tumorprogressionsmodell von Hruban, Goggins, Parsons & al. (Hruban *et al.*, 2000) gehen die Neoplasien von einer *low grade* Neoplasie, mit gut differenzierten Zellen, in eine *high grade* Neoplasie, mit schlecht differenzierten Zellen, über. Aus einer *high grade* Neoplasie kann sich ein *carcinoma in situ* anschließend zum invasiven Pankreaskarzinom ausbilden. Die *gradings* werden von PanIN1A, mit hyperplastischen muzinösen Veränderung, PanIN1B, mit hyperplastischen papilläre Veränderungen, über *low grade* Dysplasie PanIN2 zu *high grade* Dysplasie PanIN3 unterschieden (siehe Abbildung 1). Nach diesem Modell sind Genmutationen für die dysplastischen Zellveränderungen bis hin zum invasiven Karzinom verantwortlich (Hruban *et al.*, 2000, Cicas *et al.*, 2017). In über 90 % der Fälle wird eine Mutation des Onkogen KRAS in PanIN unabhängig vom Grading gefunden (Bryant *et al.*, 2014). KRAS rekrutiert und aktiviert Moleküle, die zur Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren notwendig sind. Dazu zählen Signaltransduktionsmoleküle wie c-Raf und PI3-Kinase im AKT- beziehungsweise MAPK-Kinase-Signalweg. Als G-Protein bindet KRAS

GTP im aktivierten Zustand. Durch intrinsische GTP-Hydrolyse sowie Interaktion mit GTPase-aktivierenden Proteinen wird der aktivierte Zustand beendet. Durch Mutationen von KRAS kann die Hydrolyse vermindert und KRAS beständig im aktivierten Zustand verbleiben. Dadurch werden Signale zur Proliferation dauerhaft weitervermittelt (Zeitouni *et al.*, 2016). In 50 % der IPMNs wird ebenfalls die Genmutation KRAS gefunden (Lee *et al.*, 2016a). Neben der KRAS Mutation werden in Grad 2 und Grad 3 Dysplasien bei PanIN weitere Genmutationen in Tumorsuppressorgenen beobachtet. Dazu zählen Tumorsuppressorgene, welche Zellzyklusregulatoren wie p16, p53 und CDKN2A, den DNA-Reparaturproteinkomplex BRCA2 und das Signaltransduktionsprotein SMAD4/DPC4 beeinflussen und somit eine unkontrollierte Proliferation ermöglichen (Sarkar *et al.*, 2007). Auch eine Mutation im Onkogen Her-2/Neu wird zusammen mit KRAS als frühes Ereignis im Tumorprogressionsmodell gesehen (Safran *et al.*, 2001). Die MCN, IPMN und die intraduktale tubulopapilläre Neoplasie haben hohe Lebenszeitprävalenzen in ein invasives Pankreaskarzinom überzugehen (Machado *et al.*, 2015, Tanaka *et al.*, 2012).

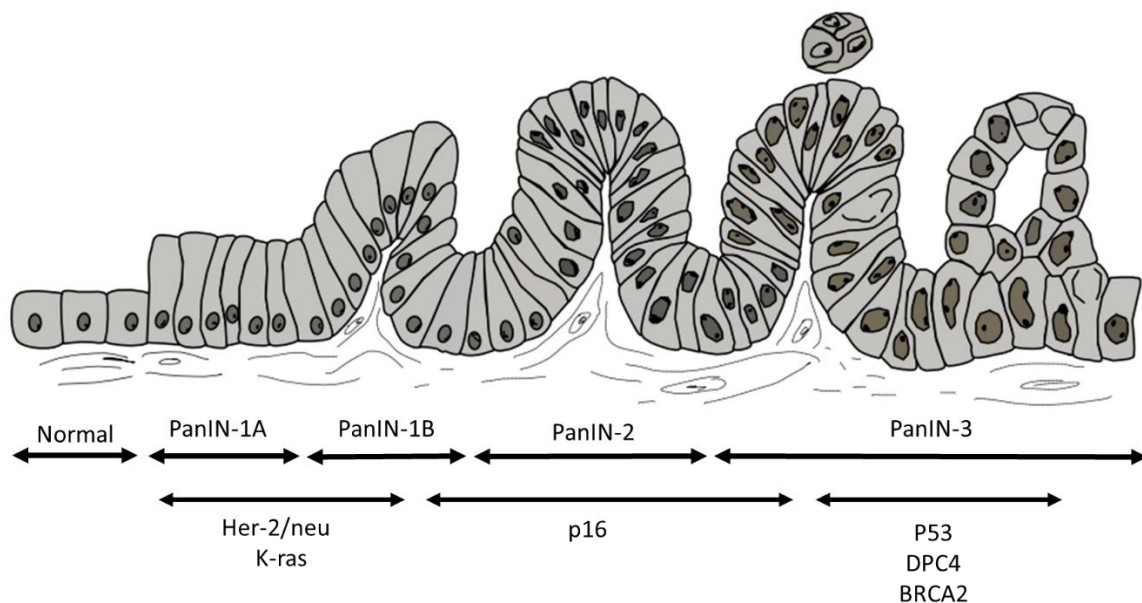


Abbildung 1: **Tumorprogressionsmodell des Pankreas:** Nach dem Tumorprogressionsmodell kann sich aus normalem Pankreasgewebe durch Genmutationen über *low grade* Dysplasien, weiter über *high grade* Dysplasien und schließlich über *carcinoma in situ* ein invasives Pankreaskarzinom entwickeln. *Gradings* werden von PanIN1A, mit hyperplastischen muzinösen Veränderung, PanIN1B, mit hyperplastischen papillären Veränderungen, über *low grade* Dysplasie PanIN2 zu *high grade* Dysplasie PanIN3 unterschieden. Genmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen werden mit unterschiedlichen Dysplasie *gradings* assoziiert (nach Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000).

Letztendlich werden in einem invasiven exokrinen Adenokarzinom des Pankreas zahlreiche Genmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wie KRAS (95 %), BRCA2 (14 %), CDKN2A (95 %), SMAD4/DPC4 (55 %), SWI/SNF (10 %), Her-2/neu (20 %) und TP53 (75 %) gefunden (Greer und Whitcomb, 2007, Shugang *et al.*, 2016, Bryant *et al.*, 2014, Cicas *et al.*, 2014).

al., 2017). Insbesondere die Genmutation im Tumorsuppressorgen SMAD4/DPC4 ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Shugang *et al.*, 2016).

Bei PanNETs hingegen werden in den meisten Fällen keine KRAS-Genmutation gefunden, sondern eher Mutationen in DAXX, mTOR und ATRX (Lewis und Yao, 2014). In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich das PDAC, als häufigste Neoplasie des Pankreas, in den Fokus gerückt.

2.1.4 Epidemiologie

In Deutschland versterben jährlich mehr als 17.000, weltweit gemittelt 280.000 Menschen am Pankreaskarzinom (Shibuya *et al.*, 2002, McGuire, 2016, RKI, 2015). Mit einer Inzidenz von 22/100.000 Einwohnern, welche sich seit 1990 stabil hält, ist das Pankreaskarzinom der dritthäufigste Tumor des Gastrointestinaltrakts.

Tabelle 1: **Pankreaskarzinom: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland:** In Anlehnung an das Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland 2013/2014, 11. Ausgabe, Tab. 3.8.1, Seite 48

Inzidenz	Prognose für 2018	
	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	9.500	9.500
Erkrankungsrate ¹	23,5	22,9
Mittleres Erkrankungsalter ²	72	75

Mortalität	Jahr 2015	
	Männer	Frauen
Sterbefälle	8.497	8.659
Sterberate ¹	21,2	20,9
Mittleres Sterbealter ²	73	77

Prävalenz und Überleben	5 Jahre	
	Männer	Frauen
Prävalenz	8.900	8.800
Relative Überlebensrate ³	8	9

¹ je 100.000 Einwohner ² in Jahren, Median ³ in Prozent, Jahreszeitraum 2013-2014

In den Industrienationen tritt das Pankreaskarzinom im weltweiten Vergleich gehäuft auf (Ryan *et al.*, 2014). Die relative 1-Jahres Überlebensrate beträgt in Deutschland gemittelt für beide Geschlechter 20 %, die 5-Jahres Überlebensrate bei Männer 8 % und bei Frauen 9 %, auch wenn PanNETs eine deutlich bessere Prognose aufweisen (Ramage *et al.*, 2012, Siegel *et al.*, 2017). Das mediane Alter beträgt in Deutschland bei Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms bei Männern 71 Jahre, bei Frauen 75 Jahre (Seufferlein *et al.*, 2014). Das mittlere Lebenszeitrisko, am Pankreaskarzinom zu erkranken, beträgt in Deutschland 1,6 %

(Robert Koch Institut, 2015). Trotz medizinischen Fortschritts und neuen Erkenntnissen in molekularen Abläufen hat sich die Überlebensrate des Pankreaskarzinoms in den letzten vier Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert (Siegel *et al.*, 2017).

2.2 O-GalNAc-Glykosylierung im Pankreaskarzinom

O-N-Acetylgalactosamin (O-GalNAc)-Glykosylierung wird als co- oder posttranslationale Modifikation an Proteinen in allen eukaryotischen Zellen durchgeführt. Im Pankreaskarzinom wird dabei häufig eine Veränderung der O-GalNAc-Glykosylierung festgestellt (Chia *et al.*, 2016). In den folgenden Abschnitten soll diese veränderte, als aberrant bezeichnete, O-GalNAc-Prozessierung im PDAC erläutert werden.

2.2.1 Biosynthese der O-GalNAc-Glykosylierung im Tumorkontext

Glykosylierung ist ein enzymatischer Prozess, bei dem Kohlenstoffketten oder Glykane an Proteine oder Fette gebunden werden. Der Prozess der Glykosylierung findet in einer Reihe komplizierter Schritte im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat statt (Moremen *et al.*, 2012). Dabei werden Glykoproteine als co- oder posttranslationale Modifikation an Proteine gebunden. Im Genom ist die Prozessierung der Glykosylierung nicht direkt kodiert, was wiederum erklärt, warum dieser komplizierte Prozess bis heute noch nicht tiefgreifend erforscht ist. Oberflächenproteine von Pankreaskarzinomzellen weisen oftmals eine Veränderung ihrer Glykosylierung, insbesondere ihrer O-Glykosylierung auf (Fuster und Esko, 2005). Die Glykane werden bei der Glykosylierung aus Monosacchariden zusammengesetzt. Eine sehr große Vielfalt wird durch verschiedene Bindungen (1-3 gegen 1-4, etc.), unterschiedliche anomere Zustände (α gegen β), Länge, Verzweigungen und Komponenten (Sulfat, Phosphat etc.) geschaffen (Chia *et al.*, 2016). Bei der Glykosylierung sind N-Glykane, gebunden an Asparagin, und O-Glykane, gebunden an Serin/Threonin, die häufigste Form (Yan und Lennarz, 2005). Die O-Glykosylierung findet dabei hauptsächlich im Golgi-Apparat statt und die O-GlcNAc-Prozessierung stellt den häufigsten O-Glykan-Typ dar (Ohtsubo und Marth, 2006). Die Glykosylierung erfolgt im Regelfall nicht zufällig, sondern an spezifischen Stellen eines Proteins mit einer begrenzten Anzahl an Glykanen. Diese Mikroheterogenität deutet auf sehr genaue Regulationsmechanismen im ER und Golgi-Apparat hin (Hanisch und Breloy, 2009, Stanley, 2011).

Bei der O-Glykosylierung wird an die Hydroxygruppe eines Serins oder Threonins ein Sachcharid wie Fucose, Mannose (Man), Glucose (Glc), N-Acetylglucosamin (GlcNAc) oder ein N-Acetylgalactosamin (GalNAc) gebunden. Eine der häufigsten Prozessierung, die O-GalNAc-Glykosylierung, wird durch das Enzym N-Acetylgalaktosaminyltransferase (GalNTs) begonnen und es entsteht das Tn-Antigen (siehe Abbildung 2). Das Tn-Antigen besteht somit aus einer Monosaccharid-Struktur, die glykosidisch an Serin/Threonin gebunden ist (GalNAc- α 1-Ser/Thr). Die weitere Verarbeitung vom Tn-Antigen erfolgt durch drei unterschiedliche Enzyme (Schachter, 2000) (siehe Abbildung 2). Der eine Weg wird durch die core-1-Synthase (β 3-galaktosyltransferase/C1GALT1 oder T-Synthase) ermöglicht. Hierbei wird an das Tn-Antigen Galaktose an GalNAc-Serin/Threonin gebunden und es entsteht das T-Antigen (core1). Die T-Synthase benötigt dafür das molekulare Chaperon COSMC. COSMC ist essentiell für die funktionelle Bildung der Glykane, um sie über die ursprüngliche Monosaccharid-Struktur hinaus zu verlängern (Ju und Cummings, 2002). Die T-Synthase ist somit ein Schlüsselenzym, um Tn-Antigen zum T-Antigen zu verarbeiten und weitere Modifikationen zu ermöglichen. Die T-Synthase kommt in allen Zellen des Menschen vor. Das Tn-Antigen kann zum anderen auch durch Anhängen von Sialinsäure an Kohlenstoff 6 in seiner sialysierten Form (STn-Antigen oder Neu5Ac(α 2-6)GalNAc) vorliegen. STn wird nicht weiter von Glykosyltransferasen verändert und kommt wie das Tn-Antigen im normalen Gewebe des Menschen nicht vor. Der dritte Weg geht über die Prozessierung durch die core 3-Synthase (β 1-3 N-acetylglucosaminyltransferase/B3GNT6), in welcher an das Tn-Antigen GlcNAc an GalNAc-Serin/Threonin gebunden wird (Schachter, 2000).

Eine hohe Expression von Tn-Antigen kann in zahlreichen soliden Tumorentitäten wie Kopf-Hals, Mamma, Urothel, Ösophagus, Prostata, Endometrium, Zervix, Kolon, Lunge und eben auch im Pankreas beobachtet werden (Desai, 2000, Munkley, 2016), wohingegen im normalen Gewebe keine Überexpression von Tn-Antigen festzustellen ist (Ju *et al.*, 2011). Im PDAC wird eine vermehrte Expression von Tn-Antigen an der Zelloberfläche in 75-95 % (Itzkowitz *et al.*, 1991, Motoo *et al.*, 1991) und in bis zu 67 % der Vorläuferläsionen gefunden (Kim *et al.*, 2002). Als Grund hierfür wird eine Dysfunktion der *downstream-Synthesen* β 3-galaktosyltransferase/C1GALT1/T-Synthase oder auch core 3-Synthase/ β 1-3 N-acetylglucosaminyltransferase/B3GNT6, neben einem möglichen Funktionsverlust des Chaperon COSMC angenommen (Ju *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 1994). COSMC ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und damit besonders für Auswirkungen von Genmutationen, chromosomale Deletionen und epigenetische Veränderungen prädestiniert (Radhakrishnan *et al.*, 2014).

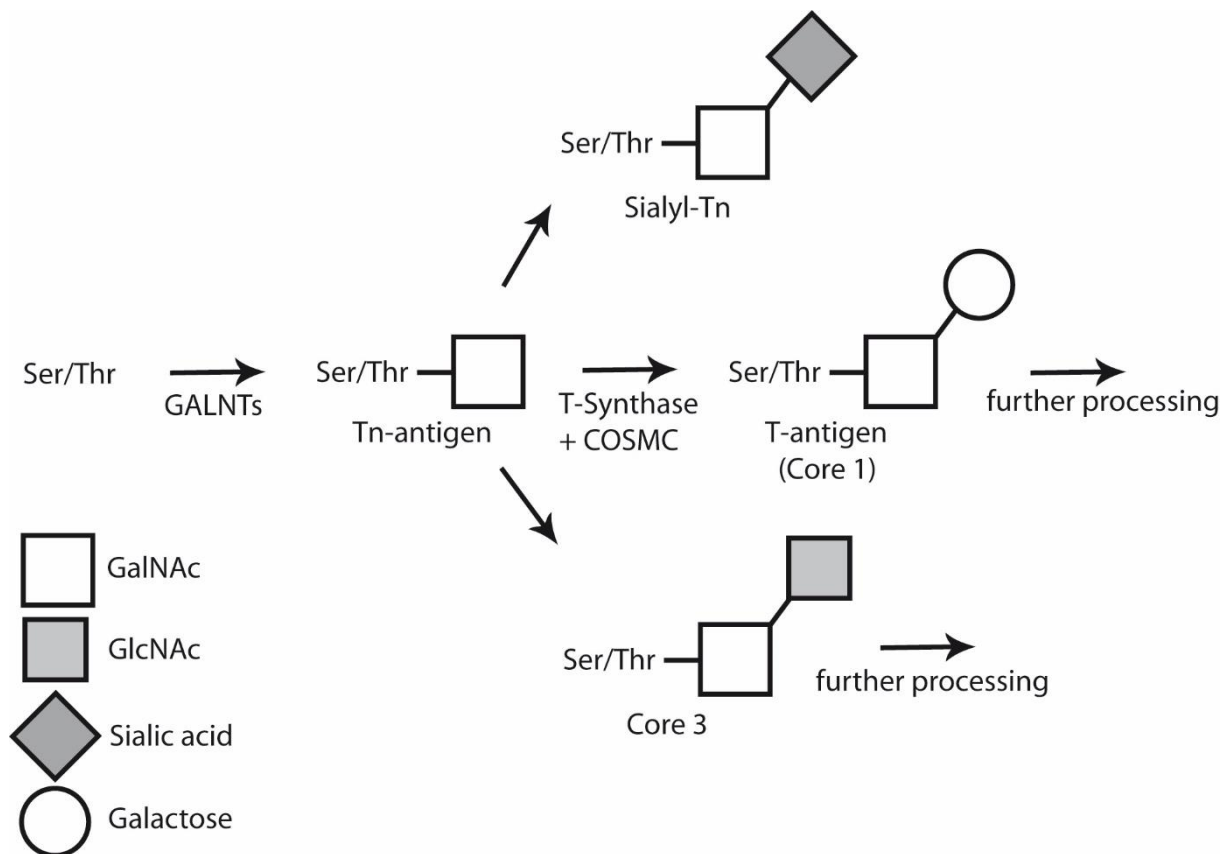


Abbildung 2: **Expression von aberranter O-GalNAc Glykosylierung im PDAC:** Biosynthese von Tn-Antigen, STn-Antigen, Core 1- und Core 3-Strukturen. Tn-Antigen besteht aus einer O-glykosidisch verknüpften N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und Serin/Threonin. Tn-Antigen wird durch Core-1-T-Synthase (C1GalT1) und sein Chaperon (COSMC) prozessiert, das Galactose (Gal) an GalNAc-Serin/Threonin überträgt. Um die Core 3 Struktur zu bilden, wird ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) an GalNAc-Serin/Threonin gebunden. Tn-Antigen kann auch durch Zugabe einer Sialinsäure (NeuAc) zu STn modifiziert werden (nach Chia *et al.*, 2016).

Glykane spielen bei vielen biologischen Funktionen im Organismus eine wichtige Rolle. O-glykosylierte Proteine finden sich über sekretorische Zellwege auf der Zelloberfläche wieder und sind dort unter anderem für Zell-Zell-Kommunikation, Zell-Adhäsion, Migration, Signaltransduktion und Immunvermittlung notwendig (Ohtsubo und Marth, 2006, Varki, 1993). Im frühen sekretorischen Zellweg ist O-GalNAc-Glykosylierung zudem für Proteinstabilität, Zielsetzung der Proteine und Qualitätskontrolle im ER essentiell (Hoseki *et al.*, 2010, Kollmann *et al.*, 2010). Letztendlich sind nahezu alle sekretierten Proteine und Proteine an der Zelloberfläche glykosyliert (Slade *et al.*, 2012) und O-Glykosylierung findet sich in zumindest einem Ser/Thr-Rest in mehr als 85 % der sekretierten Proteine (Steentoft *et al.*, 2013).

Eine unreife Prozessierung der O-GalNAc-Glykosylierung spielt eine Schlüsselrolle bei der malignen Transformation von epithelialen Zellen (Varki *et al.*, 2009, Radhakrishnan *et al.*, 2014) und erscheint oft im PDAC (Itzkowitz *et al.*, 1991). Aberrante O-GalNAc-Glykane treten als wichtige Regulatoren vieler zellulärer Prozesse einschließlich der Proteinreifung (Itzkowitz *et al.*, 1991), bei der Prozessierung von Wachstumsfaktoren (Kato *et al.*, 2006), der

Ligandenempfindlichkeit von DR4/DR5-Todesrezeptoren (Wagner *et al.*, 2007) und im β -Integrin-Signalweg auf (Clement *et al.*, 2004). In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Tn-Antigen auf wichtige Zellsignalwege im PDAC untersucht.

2.2.2 Chaperon COSMC

Das Chaperon COSMC ist notwendig für die korrekte Faltung und Stabilisierung der Proteinkonformation einer funktionellen T-Synthase. Die T-Synthase galaktosyliert das Tn-Antigen (GalNAc- α 1-Ser/Thr) zum T-Antigen (core 1/Galbeta1-3GalNAcalpha1-Ser/Thr). COSMC ist das Chaperon der T-Synthase und notwendig für die Bindung von Galaktose an GalNAc-Serin/Threonin. Sie zeigt in fast 40 % der PDACs eine Hypermethylierung, die einen Verlust der T-Synthase-Aktivität und die Expression von verkürzten O-Glykanen zur Folge hat (Radhakrishnan *et al.*, 2014). Zusätzlich wird eine aberrante, verkürzte O-GalNAc-Glykosylierung durch GALNT-Expression, zellulärer Lokalisierung und differenter Substraterkennung herbeigeführt. Daher zeigt O-GalNAc-Glykosylierung eine hohe Heterogenität auch innerhalb einer Zelllinie (Gill *et al.*, 2011). Diese heterogene O-GalNAc-Glykosylierung kann tumorspezifisch sein und unter anderem einen Tumor vom umgebenden Normalgewebe identifizieren (Steentoft *et al.*, 2013).

Ein *COSMC-Knockdown* fördert onkogene Eigenschaften in PDAC Zellen durch Verringerung der Apoptose und Verbesserung des Migrationsverhaltens (Hofmann *et al.*, 2015). Auch wurde in Pankreas *T3M4-COSMC-Knockout-Zellen* eine Hochregulierung von p-AKT1 (RAC-alpha-Serin/Threonin-Proteinkinase), p-GSK3 β (Glycogen-Synthase-Kinase-3) und p-S6Kb1 (Ribosomale Protein-S6-Kinase) gefunden (Radhakrishnan *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurden in anderen Tumorentitäten gezeigt, dass aberrante O-GalNAc-Glykosylierung eine wichtige Rolle bei der Modulation von PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol-3-kinase/RAC, Serin/Threonin-Protein-Kinase) spielt. Im oralen Plattenepithelkarzinom wurde ein aberrant O-GalNAc-glykosylierter epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gefunden, der eine vermehrte AKT-Phosphorylierung induziert (Lin *et al.*, 2014). Zudem war die aberrante O-GalNAc-Glykosylierung in der Lage, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGFR-2) und die AKT-Phosphorylierung in proliferierenden infantilen Hämangiomzellen zu beeinflussen (Lee *et al.*, 2013). Durch ein *COSMC-Knockdown* wird in dieser Arbeit in PDAC-Zelllinien eine Überexpression von Tn-Antigen und die Auswirkungen auf bestimmte Zellsignalwege untersucht.

2.2.3 Glykosyltransferasen (GALNT)

Der erste Schritt der O-GalNAc-Glykosylierung zum Tn-Antigen wird mit einer Gruppe Enzyme, den N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (GALNT), im Golgi-Apparat katalysiert. GALNTs katalysieren den Transfer von dem Zucker GalNAc von UDP-GalNAc zu der Hydroxy-Gruppe des Ser/Thr mit einer alpha-glykosidischen Bindung (Ju und Cummings, 2002). Im Menschen sind über 20 GALNT-Isoformen bekannt (Gill *et al.*, 2011, Bennett *et al.*, 2012). Die hohe Anzahl der Isoformen ist ein Unterschied zu anderen Glykosylierungsprozessen (beispielsweise N-Glykosylierung), bei denen meist nur ein bis zwei Isoformen beteiligt sind (Chia *et al.*, 2016). Bei GALNTs findet sich ein kurzer N-terminaler zytoplasmatischer Anteil und ein C-terminaler Anteil, der sich transmembranär und in das Lumen des Golgi-Apparats erstreckt. Die katalytische Domäne befindet sich hierbei im Lumen des Golgi-Apparats (Schachter, 2000). Die Isoenzyme der GALNTs zeigen unterschiedliche, sich teilweise überlappende Substrate, ohne Isoform spezifische Motive (Bennett *et al.*, 2012). Die hohe Anzahl an unterschiedlichen Isoformen der GALNT ermöglicht eine differenzierte Regulation der O-GalNAc-Glykosylierung und somit eine hohe Anzahl an Zell- und Protein-spezifischen Regulationen der O-GalNAc-Glykosylierung. Sowohl die stattgehabte O-Glykosylierung als auch die fehlende O-Glykosylierung kann dabei regulatorische und biologische Effekte auf Zielproteinen haben (Chia *et al.*, 2016). Fehlerhafte Regulation der GALNT-Enzyme wird in vielen Tumoren beschrieben (Shibao *et al.*, 2002, He *et al.*, 2014, Park *et al.*, 2010), insbesondere auch im PDAC (Tarhan *et al.*, 2016).

In dieser Arbeit wird in PDAC Zellen untersucht, ob nicht nur sekretorische Proteine und Oberflächenproteine, sondern auch zytosolische Proteine des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK Signalweges durch GALNTs glykosyliert werden.

2.3 PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg im Pankreaskarzinom

Da der PI3K/AKT/mTOR und der Ras/Raf/MAPK überlebenswichtige Signalwege des PDAC darstellen (Altomare *et al.*, 2002, Yamamoto *et al.*, 2004b, Giehl *et al.*, 2000), werden diese Signalwege auf Einflüsse durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung in *COSMC-Knockdown* und *CRISPR/Cas9-COSMC-Knockout* Zelllinien untersucht.

2.3.1 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kommt in allen Zellen von Eukaryoten vor, ist genetisch stark konserviert (Manning und Cantley, 2007) und hat großen Einfluss auf verstärktes Zellüberleben, Zellwachstum, Zellproliferation, Angiogenese und Zellmigration (Fresno Vara *et al.*, 2004). Von der AKT-Kinase sind drei Isoformen, nämlich AKT1, AKT2 und AKT3, bekannt. Die AKT Isoformen haben Zell- und Gewebespezifische Funktionen (Gonzalez und McGraw, 2009), weswegen die AKT-Isoform-Expression in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR untersucht wird.

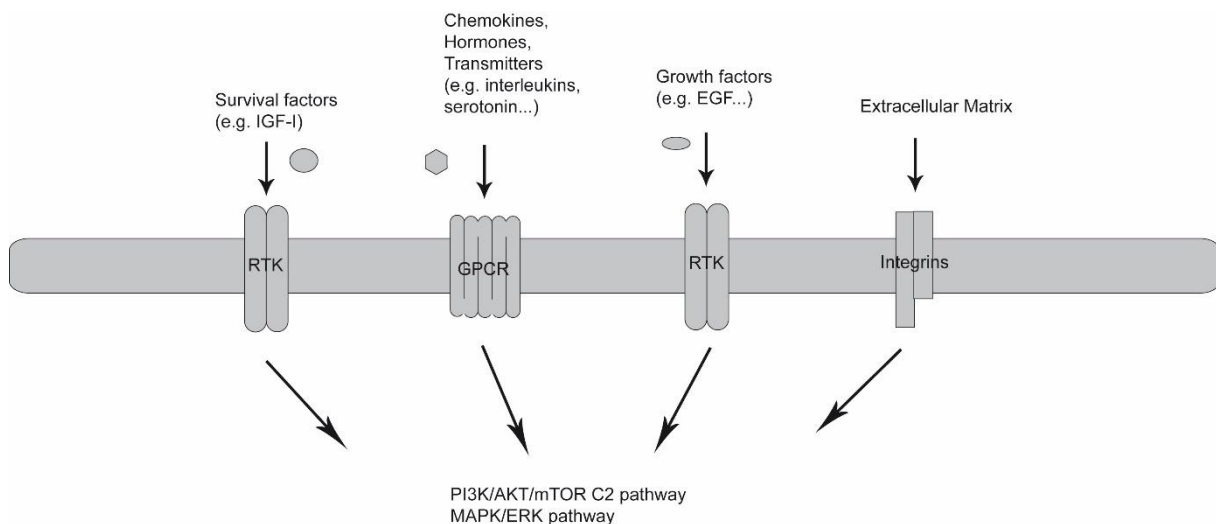


Abbildung 3: **Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweges über extrazelluläre Signale:** Die Aktivierung der Signalwege kann über Wachstumsfaktoren, Transmitter, Chemokine, Hormone und Extrazelluläre Matrix erfolgen. Die transmembranäre Signalübertragung wird über Rezeptor-Tyrosin-Kinase Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Integrine ermöglicht (nach Nicholson und Anderson, 2002).

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kann durch unterschiedliche extrazelluläre Signale aktiviert werden (siehe Abbildung 3). Dazu zählen Wachstumsfaktoren, Hormone, Chemokine, Transmitter und auch Komponenten der extrazellulären Matrix (Nicholson und Anderson, 2002). Die Initiierung der AKT-Aktivierung ist durch die Stimulation von Rezeptor Tyrosin Kinasen, Integrinen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren möglich. Durch eine entsprechende Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors und Cross-Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosin-Komponenten (Lemmon und Schlessinger, 2010).

Die regulatorische Untereinheit p85 bindet an die phosphorylierten Thyrosin-Komponenten und rekrutiert daraufhin p110, das wiederum die Phosphorylierung der PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) bewirkt. p110 kann ebenfalls durch die regulatorische Untereinheit IRS1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1) unabhängig von p85 (Luo *et al.*, 2005) aktiviert werden. Aktivierte PI3K phosphorylieren daraufhin membranständige Kinasen, die

den second messenger PIP2 und dieser wiederum PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) phosphoryliert und aktiviert. PI3K kann auch durch RAS-GTP aktiviert werden (Rodriguez-Viciana *et al.*, 1994).

PIP3 bindet AKT und membranständige PDK-1 und PDK-2 (Phosphoinositide-dependent kinase 1/2), so dass AKT in der Nähe der Zellmembran akkumuliert und durch PDK aktiviert werden kann (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000, Hemmings und Restuccia, 2012, Castellano und Downward, 2011). AKT liegt im Zytosol sonst in seiner inaktivierten Form vor. Interaktion mit PIP3 führt zu Änderungen der Konformation von AKT. Diese führt dazu, dass AKT durch PDK-1 an Thr308, in der Kinase Domäne, und durch PDK-2 an Ser473, im C-terminalen Anteil von AKT, phosphoryliert wird (Bayascas und Alessi, 2005). Phosphorylierung von Thr308 und Ser473 ist für die Aktivierung von AKT notwendig (Alessi *et al.*, 1996). Eine maximale Aktivierung von AKT erfordert insbesondere die Phosphorylierung Ser473 im C-terminalen Anteil von AKT. Am AKT sind neben Thr308 und S473 noch zahlreiche weitere Phosphorylierungsstellen bekannt (Manning und Toker, 2017). Die Katalysierung der Phosphorylierung Ser473 ist neben PDK-2 durch die DNA-abhängige Protein-Kinase (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000), Integrin-gekoppelte Kinase (Osaki *et al.*, 2004) und auch dem mTORC2-Komplex (Huang und Manning, 2009) möglich. Die AKT Inaktivierung erfolgt schließlich über Dephosphorylierung der Thr308 und Ser473 durch Serin/Threonin-Phosphatasen. Aktiviertes AKT, insbesondere durch die Phosphorylierung von Ser473, phosphoryliert und aktiviert weitere *downstream* Substrate wie *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK), ribosomales S6, *Forkhead Box O* (FoxO), *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC) und *mechanistic Target of Rapamycin complex 1* (mTORC1) (Manning und Toker, 2017).

In dieser Arbeit werden unter anderem die *downstream* Substrate ribosomales S6, GSK-3 β und der mTORC1 Komplex auf eine Phosphorylierung und damit eine Aktivierung untersucht (siehe Abbildung 4).

GSK3 wird durch aktiviertes AKT am Serin 9 im Amino-terminalen Anteil phosphoryliert. Dadurch wird die inhibierende Funktion von GSK3 auf Zellüberleben, Proliferation und gesteigerten Metabolismus aufgehoben (Kaidanovich-Beilin und Woodgett, 2011). Die Phosphorylierung von mTORC1 an S2448 kann durch AKT-Substrate erfolgen (Sekulic *et al.*, 2000, Holz und Blenis, 2005). Dabei sind durch das AKT-Substrat PRAS40 sowohl inhibitorische Effekte (Sancak *et al.*, 2007) als auch durch RHEB aktivierende Effekte beschrieben (Saxton und Sabatini, 2017). Die Phosphorylierung an S2448 ist neben dem mTORC1- auch auf dem mTORC2-Komplex zu finden (Rosner *et al.*, 2010), die genaue Funktion jedoch nicht gänzlich geklärt (Manning und Toker, 2017). Die mTORC1-Aktivierung führt zu anabolischen Prozessen, wie Nucleotid-, Protein-, Lipid-Synthese, während die Autophagie unterbunden wird (Manning und Toker, 2017). Der mTORC1-Komplex kann durch

Rapamycin (Copp *et al.*, 2009) und durch AZD8055 inhibiert werden (Chresta *et al.*, 2010). Wichtige Phosphorylierungsstellen am ribosomalen Protein S6 sind Ser240 und Ser244. Die Phosphorylierung erfolgt durch die p70 S6 Kinase, die wiederum durch den mTORC1-Komplex aktiviert werden kann (Magnuson *et al.*, 2012). Eine andere Möglichkeit ist eine Aktivierung durch den Ras/Raf/MAPK-Signalweg (Roux *et al.*, 2007). Aktiviertes S6 ist in der Zell-Zyklus-Progression, dem Zellwachstum und als Elongationsfaktoren bei der Translation beteiligt (Ruvinsky und Meyuhas, 2006). *Feedback-Mechanismen* im AKT-Signalweg und *cross-talk* zu anderen Signalwegen spielen eine ebenso große Rolle wie die Signalweg Aktivierung (Manning und Toker, 2017). In dieser Arbeit wird der *cross-talk* zwischen PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg mittels der Kinase c-Raf untersucht. c-Raf initiiert die Ras/Raf/MAPK-Signalweg-Kaskade. Aktiviertes AKT kann c-Raf an S259 phosphorylieren und damit die Signalkaskade im Ras/Raf/MAPK -Signalweg inhibieren (Zimmermann und Moelling, 1999).

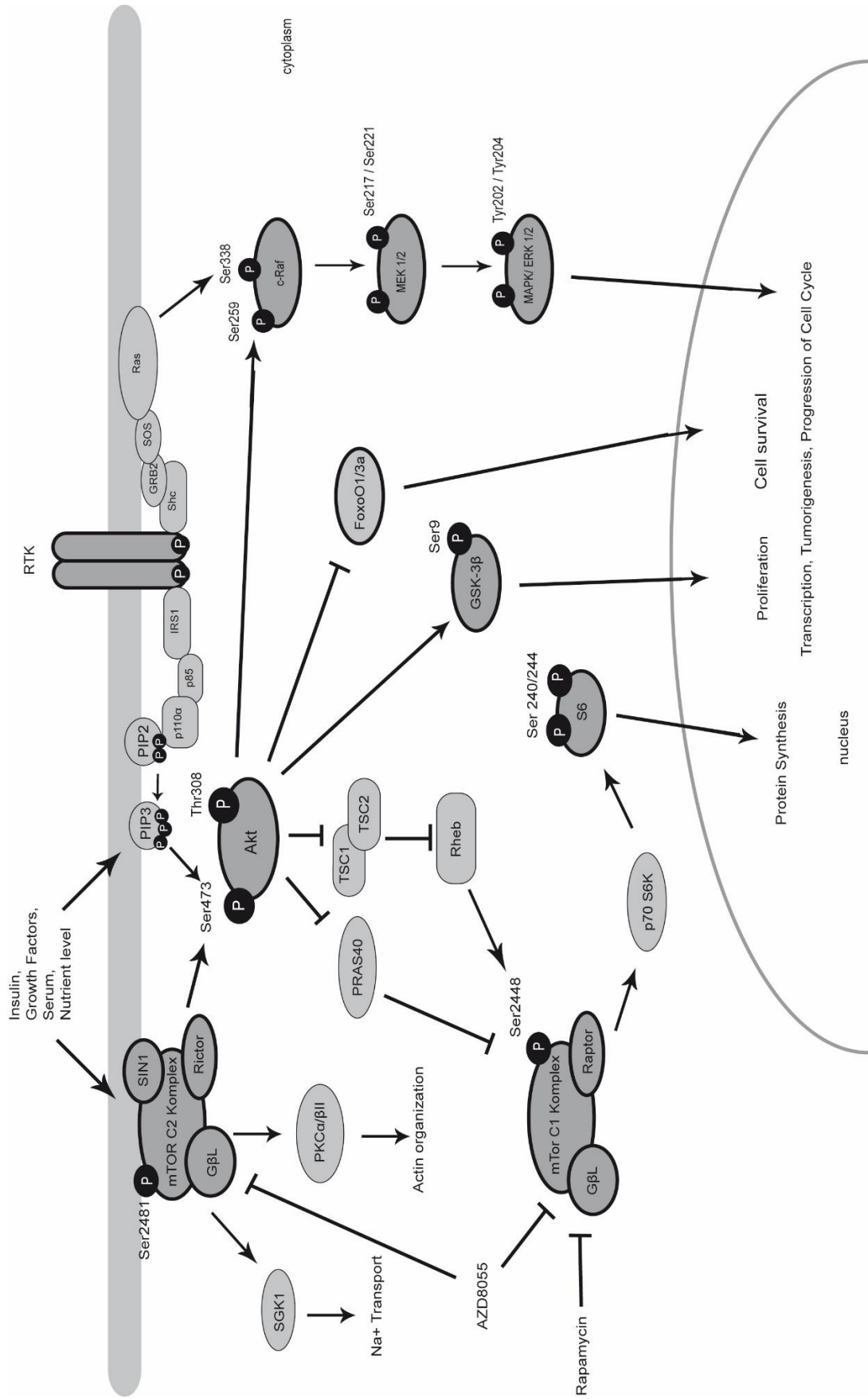


Abbildung 4: **Schematische Darstellung des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweges:** In dunkelgrauer Markierung Proteine, die in dieser Arbeit durch molekulargenetische Methoden untersucht werden (nach Manning & Toker, 2017).

2.3.2 Phosphorylierung und Regulation der AKT-Kinase durch den Rictor-mTOR-Komplex

Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) ist eine große Protein-Kinase mit 290kDa, die in zwei Komplexen vorliegen kann. mTORC1 enthält mTOR, GbL, und raptor, mTORC2 wiederum mTOR, GbL, und Rictor (Sarbasov *et al.*, 2005). mTOR-Deregulation kann in Tumoren, Adipositas, Typ 2 Diabetes und Neurodegeneration gefunden werden (Laplane und Sabatini, 2012). Im PDAC tritt mTOR mit hoher Expression oder Phosphorylierung auf und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Zhou *et al.*, 2017). Der mTORC1-Komplex kann durch Rapamycin (Copp *et al.*, 2009), mTORC1- als auch mTORC2-Komplex durch AZD8055 inhibiert werden (Chresta *et al.*, 2010).

Die Aktivität des mTOR-Rictor-Komplexes wird durch Insulin und Wachstumsfaktoren reguliert (Frias *et al.*, 2006) und hat Auswirkungen auf die Zellproliferation, den AKT-Signalweg, Metabolismus und die Organisation des Zytoskelettes (Sarbasov *et al.*, 2005). AKT kann durch den mTOR-Rictor-Komplex an Ser473 phosphoryliert werden. Maximale Aktivierung von AKT erfordert insbesondere die Phosphorylierung von Ser473 im C-terminalen Anteil von AKT. Durch die Phosphorylierung an Ser473 wird die Phosphorylierung an Thr308 am AKT durch PDK1 erleichtert und die gänzliche Aktivität von AKT herbeigeführt (Alessi *et al.*, 1996). Durch Regulation am Insulin-like growth factor 1 Rezeptor (IGF-IR), an Serin/Threonin-Protein-Kinasen und am Insulin-Rezeptor sind zudem Einflüsse auf den Zellmetabolismus möglich (Stephens *et al.*, 1998). Die Lokalisation vom mTOR-Rictor Komplex ist zumeist in der Nähe der Zellmembran (Zoncu *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wird der mTOR/Rictor-Komplex und dessen Einfluss auf die AKT-Aktivierung untersucht.

2.3.3 Ras/Raf/MAPK-Signalweg

Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg ist ebenfalls überlebenswichtig im PDAC (Giehl *et al.*, 2000), weshalb auch dieser Signalweg auf den Einfluss der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung, durch *COSMC-Knockdown* und *CRISPR/Cas9-COSMC-Knockout*, hin untersucht wird. Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg reguliert Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellüberleben und Zellmotilität (Cargnello und Roux, 2011). Eine KRAS-Mutation findet sich in über 95 % aller PDAC, wodurch die Signalkaskade dauerhaft Aktivitätssignale weitervermittelt (Zeitouni *et al.*, 2016).

Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg kann genau wie der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg durch unterschiedliche extrazelluläre Signale nämlich Wachstumsfaktoren, Hormone, Chemokine, Transmitter und auch Komponenten der extrazellulären Matrix (siehe Abbildung 3) aktiviert werden (Nicholson und Anderson, 2002). Die Aktivierung der Ras/Raf/MAPK-Signalkaskade ist vergleichbar mit der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg-Aktivierung und wird durch die Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Integrinen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gestartet. Durch eine entsprechenden Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors und eine Cross-Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosin-Komponenten (Lemmon und Schlessinger, 2010). An die phosphorylierten, intrazellulär gelegenen Tyrosin-Residuen des RTK kann das *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) über eine SH2-Domäne binden. Der GDP-GTP-Austauschfaktor *Son of Sevenless* (SOS) wird, im Komplex durch Bindung an SH3 Domänen vom GRB2, von den phosphorylierten Tyrosin-Residuen aktiviert. SOS im aktiven Zustand tauscht GDP gegen GTP im RAS-Protein aus, welches dadurch in den aktiven Zustand versetzt wird (Li *et al.*, 2016). Die onkogenen RAS-Formen umfassen N-RAS, K-RAS und H-RAS (Molina und Adjei, 2006). RAS wechselt vom inaktiven GDP-gebundenen zu aktiven GTP-gebundenen Status. Der Übergang vom aktiven zum inaktiven Status von RAS wird über GTPase aktivierende Proteine, welche die Hydrolyse von GTP einleiten, vermittelt. Mutationen im KRAS-Gen, welche in über 95 % der PDAC vorkommen (Zeitouni *et al.*, 2016), beeinträchtigen die intrinsische GTPase-Aktivität und die Interaktion zwischen GTPase aktivierenden Proteinen und RAS (Eser *et al.*, 2014). Als Folge wird über die Signalkaskade ein ständiges Aktivierungssignal durch RAF weitervermittelt, das wiederum *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), eine Serin/Thyrosin/Threonin-Phosphatase, aktiviert. MEK aktiviert anschließend *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), eine Serin/Threonin Phosphatase. In der Signalkaskade kann MAPK daraufhin Transkriptionsfaktoren wie MYC oder S6 aktivieren (Burotto *et al.*, 2014). Aktiviertes S6 ist an der Zell-Zyklus-Progression, dem Zellwachstum und als Elongationsfaktor bei der Translation beteiligt (Ruvinsky und Meyuhas, 2006). Das MYC-Protein fungiert als Signalübermittler für Zellproliferation und Zellwachstum. In Zellen mit deregulierten MYC-Gen ist Proliferation oftmals ohne externe Stimuli möglich (Bernard und Eilers, 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten Aktivierungs- und Phosphorylierungstellen sind an RAF-Kinase Ser338, an MEK Ser217/Ser221 und an MAPK Tyr202/204.

2.4 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) im Pankreaskarzinom

Durch den Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) bekommen epitheliale Zellen die Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen. Epitheliale und mesenchymale Zellen unterscheiden sich sonst bezüglich ihres Phänotyps und ihrer Funktion. EMT ist in der Embryogenese, Wundheilung, Fibrose und insbesondere bei der Metastasierung von Tumoren bekannt (Hanahan und Weinberg, 2011). Zu dem Prozess von EMT in Tumoren zählen der Verlust der Zellpolarität, Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, Verhinderung von Apoptose sowie ein invasiver und migrativer Wachstumscharakter (Brabletz *et al.*, 2018). Epitheliale Zellen sind durch *gap junctions*, *tight junctions* und *adherens junctions* miteinander verbunden, zeigen eine apiko-basale Polarität auf und sind fest an die extrazelluläre Basalmembran gebunden (Thiery und Sleeman, 2006). Mesenchymale Zellen hingegen zeigen keine Zellpolarität. Sie können als multipotente Zellen in verschiedene Zelltypen differenzieren, haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind über fokale Adhäsion verbunden (Docheva *et al.*, 2007).

Metastasierung ist ein früher Prozess im PDAC. In aberrant O-GalNAC-glykosylierten PDAC Zellen wurde bereits eine gesteigerte Migration beschrieben (Hofmann *et al.*, 2015), die mit EMT als möglichem molekularem Mechanismus erklärt werden könnte. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit EMT-Marker bestimmt. Als Biomarker für EMT sind Zelloberflächen-Proteine, zytoskelettale Proteine, Transkriptionsfaktoren, extrazelluläre Proteine und *microRNA* bekannt (Zeisberg und Neilson, 2009). In die Untersuchungen werden die Expression des Zelloberflächenproteines *N-Cadherin* (N-CAD), des zytoskelettalen Proteins *S100 calcium-binding protein A4* (S100A4) und die Expression der Transkriptionsfaktoren *Snail Family Transcriptional Repressor 2* (SNAI2), *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* (ZEB1), *Zinc finger E-box-binding homeobox 2* (ZEB2) und *Twist-related protein 1* (Twist1) eingeschlossen. Ebenfalls wird eine Expressionsanalyse des *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (p27) eingeschlossen, weil zytoplasmatisches p27 durch Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges EMT fördert (Zhao *et al.*, 2015).

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Gerät

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank 37 °C, 5 % CO ₂		Heraeus Instruments, Hanau
ELISA Reader	FluostarOmega	BMG Labtech, Ortenberg
Gefrierschrank -20 °C		Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C		Kryotec, Hamburg
Heizblock	Thermo Shaker TS-100	Peqlab, Erlangen
ImageQuant LAS 3000		GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
ImageQuant LAS 4000		GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Inkubator		Heraeus Instruments, Hanau
Kühlschrank +4 °C		Linde, Dublin, Irland
Laufkammer		Bio-Rad, München
Magnetrührer	Ikamag RH	Jemke&Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Microplate Reader	MR 5000	DYNATECH, Rückersdorf
Mikrozentrifuge mini spin		Eppendorf, Hamburg
Multichannel-Pipette	Finnpipette	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
PCR Gerät	T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Photometer	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen
Pipetten	1000/200/100/20µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	pipetus®	Hirschmann, Eberstadt
Real-Time PCR Cycler	LS 480	Roche, Basel, Schweiz
Rüttler	KS 15 Control	Edmund Bühler, Tübingen
SDS-Laufkammer	Mini Protean II	Bio-Rad, München
SDS-Page Power Supply	PowerPac Universal	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau
Vacuum-Pumpsystem		Vacuubrand, Wertheim
Vortexer	Certomat MV	B. Braun Biotech International, Melsungen
Waage TE153S		Sartorius, Göttingen
Wärmebad	W6	Labortechnik Medingen, Arnsdorf
Wärmeschrank Zellkultur		Heraeus Instruments, Hanau
Zellzähler (Automated cell counter) TC20™		BioRad, Hercules, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Rotina 35 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.2 Materialien

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Materialien

Material	Modell	Hersteller
24-Well Platte		Thermo scientific, Waltham, USA
6-Well-Platte	Nuncleon Delta Surface 6 Well Plate	Thermo Scientific, Waltham, USA
96-Well-Platte	Microplate F-Bottom	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Platte	Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche, Basel, Schweiz
96-Well-Platte	OptiPlate-96 F HB, Black 96-well Microplate	PerkinElmer, Waltham, USA
96-Well-Zellkultur-Platte	Cellstar 96 Well Culture Plate	Greiner, Frickenhausen
Falcon (15ml-50ml)		Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Filterpapier	extra thick blot paper	Bio-Rad, München
Glas Pasteur Pipetten		VWR, Radnor, USA
Kryovials		Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mini Protean® TGX, 10 % 10-well comb, 30µl		BioRad, Hercules, USA
Mini Protean® TGX, 4-20 % 12-well comb, 20µl		BioRad, Hercules, USA
Nitrozellulose Blotting Membran		GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Pipettenspitzen, versch. Größen		Falcon, Eppendorf, Biosphere, Sarstedt
Protino Ni-NTA Säulen		Machery Nagel, Düren
Reaktionsgefäße	15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, safe lock	0,1ml, 0,5 ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Whatman Paper™		GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	TC Flasche T75, T25	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen, versch. Größen	nuncleon surface	nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Produkt	Hersteller
Acrylamid	30 % Acrylamid	Bio-Rad, München
Antikörperlösung	Antibody Diluent	Dako Deutschland, Hamburg
Aqua dest.		Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BCA- Reagenz	Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit. Reducing Agent Compatible	Thermo Scientific, Rockford, USA
Biotinylated Vicia Villosa Lectin		Vector Laboratories, Burlingame, USA
Blot Entwickler Substrat	Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Blot Entwickler Substrat	Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Carbo-Free Blocking Solution (10x Concentrate)	SP-5040	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Chloroform		VWR, Radnor, USA
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Calcium Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Eindeck-Medium mit DAPI	Mounting Medium with DAPI	Invitrogen, Carlsbad, USA
Einfriermedium	Recovery	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Endoglycosidase Buffer Pack	B0701S	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Epidermaler Wachstumsfaktor	Animal-free Recombinant human EGF AF-11-15	Pepro Tech, London, UK
FCS (Fetal calf serum)	10 %	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Fibroblasten-Wachstumsfaktor	Recombinant Human FGF-Basic	Pepro Tech, London, UK
Formaldehyd	Formaldehyde Solution 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Gentamicin	10mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Glycin	Glycine Reagent Plus	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Insulinähnliche Wachstumsfaktoren	Recombinant Human IGF-I	Peprtech, Rocky Hill, USA
Kaliumhydrogen-phosphat	KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Ladepuffer	Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, München
Lysis Puffer	RIPA-Buffer	PIERCE, Waltham, USA
mTOR Inhibitor	AZD 8055	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
PBS-T	Dulbecco's phosphate buffered saline+ Tween	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	200 IU/ml	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Ponceau S Lösung		Serva
Protease Inhibitor	Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (100X)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Trizma base	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Blue Stain 0,4 %	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Trypsin	0,25 % EDTA	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Tween 20		Serva, Heidelberg
Zellkulturmedium	RPMI 1640 Medium	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA
Zellkulturmedium	DMEM	GIBCO life technologies, Carlsbad, USA

3.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Antikörper

Antikörper	MWG	Source	Supplier	Code	Dilution
HSC 70 (B-6)	70 kDa	Mouse	Santa Cruz	sc-7298	1:1000
MAPK / ERK 1 (K-23)	42, 44 kDa	Rabbit	Santa Cruz	sc-94	1:1000
Akt (pan) (11E7) Rabbit mAb	60 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#4685	1:1000
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb (Magnetic Bead Conjugate)	60 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#11848	1:1000
Akt1 (2H10) Mouse mAb	60 kDa	Mouse	cell signaling	#2967	1:1000
Akt1 (C73H10) Rabbit mAb	60 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#2938	1:1000
Akt2 (5B5) Rabbit mAb	60 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#2964	1:1000
Akt2 (L79B2) Mouse mAb	60 kDa	Mouse	cell signaling	#5239	1:1000
Anti-Akt3/PKBy	60 kDa	Mouse	millipore	#05-780	1:1000
Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb	17, 19, 35 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#9665	1:1000
EGF Receptor Antibody	175 kDa	Rabbit	cell signaling	#2232	1:1000

GSK-3 β (27C10) Rabbit mAb	46 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#9315	1:1000
HER2/ErbB2 (29D8) Rabbit mAb	185 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#2165	1:1000
IGF-I Receptor β Antibody	95 kDa	Rabbit	cell signaling	#3027	1:1000
mTOR Antibody	289 kDa	Rabbit	cell signaling	#2972	1:1000
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) Rabbit mAb	60 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#4058	1:1000
Phospho-Akt (Thr308) Antibody	60 kDa	Rabbit	cell signaling	#9275	1:1000
Phospho-c-Raf (Ser259) Antibody	74 kDa	Rabbit	cell signaling	#9421	1:1000
Phospho-c-Raf (Ser338) (56A6) Rabbit mAb	74 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#9427	1:1000
Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5) XP $\text{\textcircled{R}}$ Rabbit mAb	175 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#3777	1:1000
Phospho-FoxO1 (Thr24)/FoxO3a (Thr32) Antibody	78 to 82, 95 kDa	Rabbit	cell signaling	#9464	1:1000
Phospho-GSK-3 β (Ser9) (5B3) Rabbit mAb	46 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#9323	1:1000
Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1248) Antibody	185 kDa	Rabbit	cell signaling	#2247	1:1000
Phospho-IGF-I Receptor β (Tyr1135/1136)/Insulin Receptor (Tyr1150/1151) (19H7) Rabbit mAb	95 kDa	Rabbit	cell signaling	#3024	1:1000
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) Antibody	45 kDa	Rabbit	cell signaling	#9121	1:1000
Phospho-mTOR (Ser2448)	289 kDa	Rabbit	cell signaling	#2971	1:1000
Phospho-mTOR (Ser2481) Antibody	289 kDa	Rabbit	cell signaling	#2974	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb	42, 44 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#4377	1:1000
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) Antibody	32 kDa	Rabbit	cell signaling	#2215	1:1000
Rictor (53A2) Rabbit mAb	200 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#2114	1:1000
S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb	32 kDa	Rabbit IgG	cell signaling	#2217	1:1000
goat anti-mouse IgG-HRP			Santa Cruz	sc-2055	1:2000
goat anti-rabbit IgG-HRP			Santa Cruz	sc-2004	1:2000

3.1.5 Primer

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Primer

Gene	Left Primer	Right Primer
Akt1	5'-acctgcccgaagtgccctt-3'	5'-gctgacggcctcaagaagca-3'
Akt2	5'-ccgctgtgctttgtgatgg-3'	5'-ttccagcttgatgtcgcg-3'
Akt3	5'-acagatggctcattcatagg-3'	5'-cccttctctggagatct-3'
COSMC	5'-gaaatagaatgcaccacat-3'	5'-cacatgtcatttggatccat-3'
GAPDH	5'-ccactcctccaccttgac-3'	5'-accctgtgctgtagcca-3'
NCAD	5'-ccatccagaccgacccaac-3'	5'-gactgaggcgggtgctgaat-3'
p27	5'-agatctggatctccaagctatc-3'	5'-ggagtgtaccattctgctgagta-3'
S100A4	5'-catcaagcacgtgtctgaag-3'	5'-ctgatgagcaactggacag-3'
SNAI2	5'-tgtctctcctgcacaaacat-3'	5'-tggtcagcacaggagaaaat-3'
TWIST1	5'-ctcggctggaggatggag-3'	5'-ccacgccctgttctttaa-3'
ZEB1	5'-ctactcaactacggcagcc-3'	5'-gctgtgtagaatcagagtca-3'
ZEB2	5'-tccagaaaagcagttccctt-3'	5'-cgctgccacattatcaca-3'

3.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen: Die Herstellung der Puffer und Lösungen erfolgt in *stock solution* (5-10x) mit einer entsprechenden Verdünnung mit destilliertem Wasser vor Verwendung. Zum Einstellen und Ausgleichen des pH-Wertes wurde Natriumhydroxid (NaOH), Kaliumhydroxid (KOH) oder Kaliumchlorid (KCl) verwendet.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x SDS-PAGE-Laufpuffer (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS und 1l Aqua dest. (pH 8,3; gelagert bei 4°C)
10x TBS-T (Tris buffered saline-Tween)	50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl und 1l Aqua dest. (pH 7,6)
10x Western Blot Transfer-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0); 380 mM Glycin; 0,1% SDS, 20 % Methanol und 2l Aqua dest.
5x Laemmli Probenpuffer	60mM Tris/HCl (pH 6,8), 2,5g SDS (5 %), 2ml β-Mercaptoethanol (40 %), 10ml Glycerin (20 %), 1,5% Bromphenolblau und 50ml Aqua dest.
Blockierlösung (für Western Blot)	5g Blotting Grade Blocker und 100 ml TBS-T (gelagert bei 4 °C)
PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	0,14 M NaCl; 2,7mM KCl; 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T (phosphate buffered saline-Tween)	PBS und 0,1 % Tween 20

3.1.7 Herstellerkits

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Herstellerkits

Kit	Produktname	Hersteller
Akt Kinase assay	Akt Kinase Activity Assay Kit, ab139436	Abcam, Cambridge, UK
Akt Kinase assay	Akt Kinase Assay Kit (Nonradioactive)	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
BCA Protein assay	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
c-DNA Synthese	Transcripor First Strand c-DNA Synthesis Kit	Roche, Basel, Schweiz
Deglykosylierung	O-GlcNAc (specific) Deglycosylation Kit	Prozomix Limited, Northumberland, UK
Deglykosylierung	Protein Deglycosylation Mix (P6039)	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
RNA Extraktion	RNeasy Plus Mini Kits	Qiagen, Venlo, Niederlande

3.1.8 Glykosidasen

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Glykosidasen

Glykosidase	Bestellnummer	Hersteller
α -N-Acetylgalactosaminidase	P0734S	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
O-Glycosidase	P0733S	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
O-GlcNAcase	Cat. No. PRO-K0001	Prozomix Limited, Northumberland, UK
PNGase	P0704S	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
α -2-3,6,8 Neuraminidase	P0720	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
β 1-4 Galactosidase S	P0745	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
β -N-Acetylhexosaminidase	P0721	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA

3.2 Zelllinien

In dieser Arbeit werden die Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, L3.6pl sowie die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) für die molekularbiologischen Untersuchungen verwendet.

Die Panc-1 Pankreaskarzinomzelllinie wurde von ATCC 2012 erworben (ATCC, Bestellnummer: CRL-1469). Die Zellen wurden 1975 von einem 56-jährigen Mann aus duktalem malignen Zellen eines Pankreaskarzinoms gewonnen und kultiviert (Lieber *et al.*, 1975). Panc-1 zeigt in der Zellkultur eine Verdopplungszeit der Zellen von 52 Stunden und wächst in Zellkulturflaschen mit epithelialer Morphologie adhärent (Deer *et al.*, 2010). Die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 wird in der vorliegenden Arbeit in der Zellkultur mit dem Zellkulturmedium DMEM mit den Zusätzen von 10 % FCS und 200 IU/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Des Weiteren wird die Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl verwendet. Im Jahr 1999 wurde Versuchsmäusen für die Gewinnung der Pankreaszelllinie L3.6pl mehrfach die humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 in das Pankreas injiziert und die im Verlauf entstandenen Lebermetastasen entnommen. Die Zellen aus den Lebermetastasen wurden erneut in das Pankreas von Versuchsmäusen injiziert und der gesamte Vorgang wiederholt. Durch Kultivierung, nach mehrfachen Wiederholungen der Injektion in das Pankreas und Entnahme der Zellen aus Lebermetastasen, entstand letztendlich die Zelllinie L3.6pl (*pancreas to liver*) mit entsprechend hohem Metastasierungspotenzial (Bruns *et al.*, 1999). Die Zelllinie L3.6pl wird in der vorliegenden Arbeit in der Zellkultur mit dem Zellkulturmedium RPMI mit den Zusätzen von 10 % FCS und 200 IU/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Eine weitere Zelllinie, die in dieser Arbeit verwendet wird, ist die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293). HEK293 wurde 1973 durch Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit DNA-Anteilen des Adenovirus 5 kultiviert und dadurch immortalisiert (Graham *et al.*, 1977). Durch eine schnelle Verdopplungszeit und verhältnismäßig einfacher Kultivierung wurde diese Zelllinie zur Untersuchung molekularer Mechanismen in dieser Arbeit neben Panc-1 und L3.6pl herangezogen. Die HEK Zelllinie wird in der Zellkultur mit dem Zellkulturmedium RPMI mit den Zusätzen von 10 % FCS und 200 IU/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Lentiviral-vermittelter *COSMC-Knockdown* in Panc-1 und L3.6pl-Zelllinie

Um eine Modulation vom PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg sowie von EMT durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung zu untersuchen, werden in dieser Arbeit die Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und L3.6pl mit einer Überexpression von Tn-Antigen mit der entsprechenden Kontrollzelllinie verglichen.

In den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 und L3.6pl wurde eine Überexpression von Tn-Antigen in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Hofmann durch lentiviral-vermittelten *knockdown* vom COSMC-Chaperon erreicht (Hofmann *et al.*, 2015). Das Chaperon COSMC ist notwendig für die korrekte Faltung der aktiven T-Synthase und führt bei lentiviral-vermitteltem *knockdown* zu vermehrter Überexpression von Tn-Antigen und O-GalNAc-Glykosylierung (Hofmann *et al.*, 2015, Chia *et al.*, 2016). Durch die Integration einer Vektor-DNA in das Genom der Zelllinien kann eine Gen-spezifische *small hairpin RNA* (shRNA) exprimiert werden. Durch Hybridisierung der Komplementärsequenz der shRNA mit der exprimierten mRNA des Zielgens wird das entsprechende Genprodukt still gelegt (Rubinson *et al.*, 2003, Manjunath *et al.*, 2009).

Für den lentiviral-vermittelten COSMC *knockdown* in der vorliegenden Arbeit wurden pLKO.1-puro-Vektoren von sigma-Aldrich erworben. Hierbei können zum einen in den *Knockdown-Zellen* (COSMC KD) durch Transfektion des einen Vektors die COSMC-Gen Aktivität durch RNA-Interferenz (RNAi) mittels shRNA (small hairpin RNA) stillgelegt werden. Zum anderen kann als Kontrolle ein anderer nicht-spezifischer, nicht-zielgerichteter Vektor mit sogenannter *scrambled* (SCR) shRNA eingebracht werden. Die Vektoren beinhalten zudem als Selektionsmarker ein Puromycin-Resistenzgen. Durch die Zugabe von Puromycin über eine Woche können die transfizierten Zellen mit einer finalen Konzentration von 2,0 µg/l im Zellkulturmedium selektiert werden (Hofmann *et al.*, 2015).

3.3.2 CRISPR/CAS9-vermittelter *COSMC-Knockout* in der HEK-Zelllinie

Eine Überexpression von Tn Antigen an O-GalNAc-glykosylierten Proteinen konnte in der humane embryonal Nierenzelllinie (HEK293) durch die CRISPR/CAS9 (*Clustered Regularly*

Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) Methode mittels *COSMC-Knockouts* erreicht werden. Weiterführend wurden die Auswirkungen der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung auf den PI3K/AKT/mTOR- und RAS/Raf/MAPK-Signalweg sowie auf die EMT untersucht.

Die Funktionen von CRISPR und CAS9 wurden in Bakterien und Archaea entdeckt (Horvath und Barrangou, 2010) und sind essentiell im Immunsystem von diesen Prokaryoten. Durch CRISPR/CAS9 sind die Organismen in der Lage, gezielte Genabschnitte aus dem Genom zu schneiden und zu eliminieren, die beispielsweise durch invadierende Viren eingebracht werden (Barrangou, 2015). Die Bakterien oder Archaea erfassen kurze DNA-Abschnitte der invadierenden Viren und erstellen daraus sogenannte CRISPR-Segmente. CRISPR-Segmente enthalten kurze, sich wiederholende Abschnitte aus beispielsweise der Virus-DNA mit palindromischer Wiederholung. Bei erneutem Viruskontakt kann mit Hilfe der CRISPR-Segmente der Virus erkannt werden und RNA-Abschnitte hergestellt werden, die die Virus-DNA im Genom markieren. CAS9 kann durch diese Markierung die Virus-DNA aus dem Genom ausschneiden und die Zelle vor weiterer Virusinfektion schützen.

Diese Methode wird bei Eukaryoten in der Forschung genutzt, um Genabschnitte im Genom hinzuzufügen, zu entfernen oder an anderer Stelle im Genom wieder einzufügen (Gupta und Musunuru, 2014). Zum *Gen-Knockout* mit CRISPR/CAS9 in Eukaryoten wird eine kurze RNA-Sequenz, die an eine spezifische DNA-Sequenz im Genom bindet, durch Phagen in die Zielzellen eingebracht. Diese RNA-Sequenz kann auch das Enzym CAS9 binden. CAS9 kann folglich den von der RNA-Sequenz markierten Genabschnitt aus der DNA ausschneiden. Reparaturmechanismen der Zielzelle reparieren daraufhin den herausgeschnittenen DNA-Abschnitt (Gupta und Musunuru, 2014, Hsu et al., 2014, Komor et al., 2017, Lander, 2016). Dieser Mechanismus wird in der vorliegenden Arbeit in HEK293 genutzt, um ein *COSMC-Knockout* zu erreichen. *HEK COSMC-Knockout-Zellen*, hier auch als *HEK simple cell* (HEK SC, CVCL_S025) bezeichnet, werden in dieser Arbeit mit *HEK wild type* (HEK WT) verglichen.

3.3.3 SILAC-Markierung und Massenspektrometrie

Um den Einfluss der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung auf unterschiedliche Protein-Expressionen zu untersuchen, werden in der vorliegenden Arbeit *SCR-* und *COSMC-Knockdown-Zellen* verwendet, die mittels SILAC (*Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture*) kultiviert und anschließender Massenspektrometrie untersucht werden.

Zur Herstellung von SILAC-Zellen werden zwei Zellkulturreihen geschaffen, die ursprünglich aus einer Population stammen (Lanucara und Eysers, 2011). Die eine Zellreihe wird mit

Nährmedien aus normalen Aminosäuren, die andere Zellreihe mit einem Nährmedium, welches Aminosäuren aus stabilen, nicht radioaktiven Isotopen enthält, kultiviert. Durch Zellwachstum und Zellproliferation nehmen die Zellen im Verlauf die Aminosäuren in ihre Proteine auf. Wenn die beiden Proteine der jeweiligen Zellreihen kombiniert werden, kann nach entsprechender Aufbereitung eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden. Identische Proteine aus der einen Zellreihe ohne Isotopenmarkierung, sowie aus der anderen mit Isotopenmarkierung, können in der Massenspektrometrie durch ihre unterschiedlichen Massen unterschieden werden (Ong *et al.*, 2003). Die Massenspektrometrie ermöglicht dadurch eine relative Quantifizierung der Proteine (Zhu *et al.*, 2002, Kwiatkowski *et al.*, 2016).

In der vorliegenden Arbeit wird dem Isotopen enthaltenen Nährmedium der *COSMC-Knockdown-Zellen* die Aminosäure Arginin mit 6 Kohlenstoff-13 (¹³C) anstatt Kohlenstoff-12 (¹²C) versehen. Ein einzelne Aminosäure Arginin mit Kohlenstoff-13 präsentiert sich dadurch in der Massenspektrometrie 6 Dalton schwerer als Arginin mit Kohlenstoff-12 (Zhang und Neubert, 2009). Die Aminosäure Arginin zeigt in der Zellkultur eine Prozessierung zur Aminosäure Prolin. Aus diesem Grund wurde Prolin zusätzlich ins Nährmedium hinzugeführt, um eine Arginin-Prolin-Konversion zu vermeiden. Die *SCR-* und *COSMC-Knockdown-Zellen* werden vor der massenspektrometrischen Aufbereitung für mindestens eine Woche mit den entsprechenden Nährmedien passagiert und kultiviert. Die zu analysierenden Proteine werden durch SDS-PAGE nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt und durch In-Gel-Verdau für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Der In-Gel-Verdau umfasst die wesentlichen Schritte Entfärbung, Reduktion, Alkylierung, proteolytische Spaltung der Proteine und Extraktion der Peptide (Shevchenko *et al.*, 2006). Nach dem In-Gel-Verdau werden die Proben verdampft und in 0,1 % Ameisensäure vermischt mit aufgereinigtem Wasser gelöst. Anschließend wird eine Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) durch das Hybrid-Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer (Orbitrap QExactive, Thermo Scientific, Deutschland) durchgeführt (Zheng *et al.*, 2015, Kwiatkowski *et al.*, 2016). Die Datenerhebung aus LC-MS/MS wird freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mass Spectrometric Proteomics von Prof. Schlüter, UKE, Hamburg durchgeführt. Eine relative Quantifizierung von einzelnen *SILAC-markierten-COSMC-Knockdown-Proteinen* im Vergleich mit Kontrollproteinen wird anschließend durch die MaxQuant-Software (Version 1.6.3.3, Max Planck Institute of Biochemistry, München) berechnet (Cox *et al.*, 2009). Eine Gen-Analyse mit der PANTHER 10.0 (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships) Datenbank (Mi *et al.*, 2016) zeigt schließlich Proteine, die im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg vorkommen. Der Nachweis einer möglichen O-GalNAc-Glykosylierung von den durch Panther 10.0 angezeigten Proteinen wird unter Verwendung des Vorhersage-Tools NetOGlyc 4.0 berechnet (Steentoft *et al.*, 2013).

3.3.4 RNA-Extraktion

Durch das molekularbiologische Verfahren der RNA-Extraktion soll aus Zellen RNA isoliert werden (Chomczynski und Sacchi, 2006). Für die RNA-Extraktion werden trypsinisierte Zellen aus 10cm² Zellkulturschalen in Medium resuspendiert und in 50 ml Falcon bei 4000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des überständigen Mediums wird das Zellpellet mit 1ml TRI-Reagenz versetzt, mehrfach durch eine Pipette vorsichtig vermengt und für 5 Minuten inkubiert. Nach Inkubation wird 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamyl hinzugegeben und für 15 Sekunden die Probe stark geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation von 2-15 Minuten wird das Gemisch bei 12.000 rpm für 15 Minuten bei 2-8 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sind drei Phasen zu erkennen sein. Die rote, im Gefäß untere organische Phase enthält Proteine, die mittlere Interphase DNA und die obere, farblose Phase RNA. Die obere Phase wird in ein neues Gefäß überführt und die RNA-Extraktion mit dem RNeasy Plus Mini-Kit von Quiagen fortgesetzt. Zu der RNA im neuen Gefäß wird 70 % Alkohol hinzugesetzt, durch eine Pipette vermengt und auf ein Volumen von 700 µl gebracht. Die Probe wird in eine RNeasy-Spinsäule in einem 2ml Sammelgefäß gebracht und bei 8000 g für mindestens 15 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand im Sammelgefäß wird anschließend verworfen und 700 µl vom Puffer RW1 zu der RNeasy-Spinsäule gegeben. Die RNeasy-Spinsäule wird wiederum in ein 2 ml Sammelgefäß gestellt bei 8000 g für mindestens 15 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen, 500 µl RPE zur Spinsäule gegeben und bei 8000 g für mindestens 15 Sekunden zentrifugiert. Der letzte Schritt wird wiederholt und die RNeasy-Spinsäule in ein neues Sammelgefäß gestellt und bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und die Spinsäulen in neuen 1,5 ml Sammelgefäßen platziert. Auf die Spinsäulen wird 30-50 µl RNase-freies Wasser gegeben und bei 8000 g für 1 Minute zentrifugiert und damit letztendlich die RNA eluiert. Die gewonnene RNA kann direkt weiterverarbeitet werden oder bei -80 °C zwischengelagert werden.

3.3.5 cDNA Synthese

cDNA (*complementary DNA*) beschreibt eine komplementäre DNA von einem RNA-Strang, hergestellt durch das Enzym Reverse Transkriptase (Adams *et al.*, 1991). Für die Herstellung von cDNA wird in dieser Arbeit das Transcriptor First Strand c-DNA Synthesis-Kit von Roche verwendet. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und hinzugefügten Deoxynukleotide wird die RNA in cDNA transkribiert. Zunächst wurde die RNA mit dem Nanodrop Spektrophotometer auf die Konzentration von 1 µg/µl mit RNase-freien Wasser verdünnt. Für den *Template-Primer-Mix* wird 1 µg der RNA mit 1 µl Oligo[dT]₁₈ Primer und 11 µl *PCR-grade*

Wasser versetzt. Zur Denaturierung wird der *Template-Primer-Mix* für 10 Minuten auf 65 °C in einem Thermalcyclerblock erhitzt und anschließend zügig auf Eis gekühlt. Durch Zugabe von 4 µl reverser Transkriptase-Puffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl Desoxynukleotid-Mix und 0,5 µl Reverse-Transkriptase kann die RNA 30 Minuten bei 55 °C im Thermalcyclerblock in cDNA umgeschrieben werden. Durch Aufheizen auf 85 °C für 5 Minuten kann nach dem Umschreiben das Enzym Reverse Transkriptase inaktiviert werden und die Reaktion durch Kühlung auf Eis gestoppt werden. Die gewonnene cDNA kann direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C zwischengelagert werden.

3.3.6 RT-qPCR

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene cDNA kann daraufhin als Vorlage für die RT-qPCR (*Quantitative reverse transcription PCR*)-Reaktion dienen. Die RT-qPCR basiert auf dem Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion. Durch die genaue Abfolge und Wiederholung von Temperaturzyklen wird ermöglicht, dass Temperatur-abhängige Reaktionen ablaufen können. Zu diesen Reaktionen zählen das Denaturieren der DNA (Denaturierung), Bindung von Primern an die DNA (Primerhybridisierung) und die DNA-Replikation durch die DNA-Polymerase (Elongation) (Schochetman *et al.*, 1988). Primer enthalten eine Startsequenz für die DNA-Polymerase und binden als Oligonukleotid spezifisch in der Nähe vom einem Ziel-Gen an die DNA. Eingesetzt werden dabei *forward* und *reverse* Primer, die komplementär in Laufrichtung der DNA-Polymerase vor das jeweilige Ziel-Gen an die Einzelstrang-DNA binden (VanDevanter *et al.*, 1996). Bei der RT-qPCR erfolgt die Erfassung der Amplifikation über ein Reporter-Molekül in Echtzeit. Als Reporter-Molekül wird in dieser Arbeit *SYBR-Green* verwendet. *SYBR-Green* kann an doppelsträngige DNA binden und fluoresziert im DNA-*SYBR-Green-Komplex* bei 521 nm (Giglio *et al.*, 2003). Die Fluoreszenz wird nach jedem Temperaturzyklus mitgemessen und ist proportional zu den erfolgten Amplifikationen. Durch den Light Cycler LS 480 wird nach jedem Zyklus der Grenzyklus (Ibrahim *et al.*) bestimmt. Der Grenzyklus (*threshold cycle*, C_T) gibt an, wie viele Temperaturzyklen notwendig sind, bis eine exponentielle Steigerung der Amplifikate über den Hintergrundwert eintritt (Brankatschk *et al.*, 2012). Durch den C_T -Wert ist ein relativer Vergleich der RNA-Expression von unterschiedlichen Zellpopulationen möglich.

Für RT-qPCR werden ein *Primer-Mix* aus *forward* und *reverse* Primer benötigt. Hierfür werden die Primer auf eine Konzentration von 100 pmol/l gebracht und die beiden Primer-Ansätze mit 10 µl Primer sowie 80 µl sterilen Wasser versetzt. Von beiden Primer-Ansätzen werden jeweils 1 µl zusammen mit 12,5 µl *SYBR-Green* (enthält Desoxynukleotide, DNA Polymerase und fluoreszierenden Farbstoff), 9,5 µl destillierten Wasser und 2 µl cDNA auf Eis auf eine 96-well

Platte in Doppelbestimmung pipettiert. Anschließend wird die 96-well Platte mit einer Klarsichtfolie verschlossen, auf einem *Swing-out-Rotor* bei 1000 g für 1 Minute zentrifugiert und in den Light Cycler LS 480 für die RT-qPCR gegeben. Im Light Cycler LS 480 wird bei der RT-qPCR im ersten Schritt DNA-Helix bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt können durch Abkühlen auf 60 °C für 1 Minute Primer an die spezifische komplementäre DNA-Sequenz binden. Im nächsten Schritt kann die DNA-Polymerase bei 72 °C für 30 Sekunden durch vorherige Hinzugabe von Nukleotiden einen neuen DNA-Strang synthetisieren. Durch Erhitzen auf 95 °C für 15 Sekunden wird die DNA wieder denaturiert. Mit Hilfe von 45 Wiederholungen dieser Zyklen kann die DNA letztendlich exponentiell amplifiziert werden und der C_T -Wert durch den Light Cycler LS 480 berechnet werden. Die Reaktion wird durch Abkühlung auf 2-15 °C gestoppt.

3.3.7 delta-delta C_T Quantifizierung

Bei der RT-qPCR werden durch den Light Cycler LS 480 C_T -Werte berechnet. Der Grenzyklus (*threshold cycle*, C_T) gibt an, wie viele Temperaturzyklen notwendig sind, bis eine exponentielle Steigerung der Amplifikate über den Hintergrundwert eintritt (Brankatschk *et al.*, 2012). Der Hintergrundwert wird durch sogenannte *housekeeping-Genes* bestimmt. Von *housekeeping-Genes* wird eine sehr konstante und stabile Expression angenommen (Silver *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wird in der RT-qPCR das *housekeeping-Gen* GAPDH (Barber *et al.*, 2005), verwendet. Zur Quantifizierung werden die berechneten C_T -Werte der jeweiligen Zielgene mit den C_T -Werten von *housekeeping-Genes* verglichen. Geringste Schwankungen vom Ziel-Gen zum *housekeeping-Gen* können bei relativer Quantifizierung der C_T -Werte zu gewaltigen Unterschieden führen (Pfaffl, 2001). Deswegen wurde für die Berechnung des Expressionsunterschied das effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell delta-delta C_T entwickelt (Scheffe *et al.*, 2006), welches in der vorliegenden Arbeit ebenfalls verwendet wird. Zur Berechnung mit dem delta-delta C_T -Quantifizierungsmodell wird folgende Formel verwendet (Livak und Schmittgen, 2001):

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Die aus der Formel berechnete Ratio gibt den relativen Expressionsunterschied des Zielgens wieder.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung

Die Zelllinien werden bis zur Kultivierung bei -183 °C in Stickstofftanks gelagert. Die Zellen befinden sich dabei in DMSO und Frostmedium gelöst in Kryovials. Vor der Kultivierung der Zelllinien werden gefrorenes 50ml *fetal bovine serum* (FBS), 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S), 500 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 20 min im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt und gründlich zur Herstellung einer Nährmedium *stock solution* durchmischt. Für die Zelllinien L3.6pl und HEK293 wird anstatt des Mediums DMEM RPMI 1640 Medium verwendet. In neue 75 cm² Zellkulturflaschen wird 20 ml vom vorbereiteten DMEM (+FBS,+P/S) oder entsprechend mit RPMI 1640 (+FBS,+P/S) pipettiert. Eingefrorene Zellen in *Kryovials* werden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt bis keine Eisbildung mehr festzustellen ist, in die vorbereiteten Zellkulturflaschen überführt und bei 37 °C , 5 %, CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag sind die Zellen adhärent am Boden der Zellkulturflaschen festgewachsen, sodass ein Nährmediumwechsel erfolgen kann. Dafür wird aus den Zellkulturflaschen das Nährmedium abgesaugt und 20 ml neues Nährmedium aus der Stocksolution hinzugeben. Ein Nährmediumwechsel wird unabhängig der Konfluenz alle 2-3 Tage durchgeführt.

3.4.2 Subkultivierung

Die Zellkulturflaschen werden täglich unter dem Mikroskop auf mögliche Kontamination und Konfluenz beurteilt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert und subkultiviert, um eine Wachstumshemmung zu verhindern. Dafür wird das Nährmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, welches wiederum abgesaugt wird. Auf die Zellen wird 1-2 ml Trypsin pipettiert, für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert und durch vorsichtiges Klopfen und Schwenken der Zellkulturflasche werden die Zellen mobilisiert. Nach Hinzugabe von 9 ml frischem Nährmedium zu dem Trypsin werden 2ml der Zell-Trypsin-Nährmediumlösung in eine neue Zellkulturflasche überführt und bis zu einem Volumen von 20 ml mit Nährmedium aufgefüllt. Die Zellen werden, wie bereits oben genannt, bei 37 °C , 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

3.4.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung der Zellen wird durchgeführt, um die Zelllinien für einen längeren Zeitraum bei -183 °C in Stickstofftanks zu lagern. Zellkulturflaschen, die zum Einfrieren bestimmt sind, sollten bestmöglich eine Konfluenz von 80-90 % vorweisen. Bei den einzufrierenden Zellen wird zunächst das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und das PBS wiederum abgesaugt. Auf die Zellen wird 1-2 ml Trypsin pipettiert, für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert und durch vorsichtiges Klopfen und Schwenken der Zellkulturflasche werden die Zellen mobilisiert. Nach Hinzugabe von 9 ml frischen Nährmedium zu dem Trypsin wird das gesamte Volumen in ein 50ml Falcon überführt und bei 2 °C für 7 Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert. Anschließend wird aus dem Falcon das Nährmedium vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1800 μl Frostmedium suspendiert. 900 μl dieser Suspension werden in *Kryovials* pipettiert, 100 μl DMSO je *Kryovial* hinzugegeben und durch invertieren gemischt. Die *Kryovials* werden hiernach schnellstmöglich bei -80 °C eingefroren und im Verlauf in Stickstofftanks mit -183 °C umgelagert.

3.4.3 Behandlung mit AZD8055

Der mTORC1 und mTORC2 kann durch AZD8055 inhibiert werden (Chresta *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wird der Einfluss des Inhibitors AZD8055 auf den PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg im Kontext aberranter O-GalNAc-Glykosylierung untersucht. Die Zelllinien werden dafür in ein 6-well mit 3 ml Nährmedium ausgebracht und kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen jeweils mit einer Konzentration von 0, 20, 40, 60, 80 und 100 nmol/l AZD8055 für 18 Stunden behandelt und anschließend für proteinbiochemische Methoden lysiert.

3.4.4 IGF-1 und EGF-Stimulation

In dieser Arbeit wird auch der Einfluss von IGF-1- und EGF-Stimulation auf den PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg im Kontext aberranten O-GalNAc-Glykosylierung untersucht. Die Bindung von IGF-1 an den IGF-I-Rezeptor und Insulinrezeptor aktiviert den PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg (Appleman *et al.*, 2012). Der PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg kann auch durch den Wachstumsfaktor EGF durch Bindung an den EGF-Rezeptor aktiviert werden (Hackel *et al.*, 1999). Die Zelllinien wurden dafür in ein 10 cm^2 Zellkulturschale mit 10 ml Nährmedium ausgebracht und kultiviert.

Bei der IGF-1 Stimulation werden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % für 2 Stunden in einem Serum-freien Medium kultiviert, mit einer IGF-1-Konzentration von 20 ng/ml für 10 Minuten inkubiert und anschließend für proteinbiochemische Methoden lysiert. Entsprechend werden bei der EGF-Stimulation die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % für 2 Stunden in einem Serum-freien Medium kultiviert, mit einer EGF-Konzentration von 100 ng/ml für 30 Minuten inkubiert und anschließend ebenfalls für proteinbiochemische Methoden lysiert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus adhärennten Zellen

Die Herstellung von Proteinlysaten aus der Zellkultur ist ein wichtiger Schritt für biochemische und analytische Techniken wie Western Blot und Massenspektrometrie. Die Zellkulturflaschen, aus denen Proteinlysate gewonnen werden können, sollten bestmöglich eine Konfluenz von 70-80 % vorweisen. Bei den Zellen wird zunächst das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und das PBS wiederrum abgesaugt. Auf die Zellen wird 1-2 ml Trypsin pipettiert, für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert und durch vorsichtiges Klopfen und Schwenken der Zellkulturflasche werden die Zellen mobilisiert. Die weiteren Schritte werden auf Eis vollzogen, um eine Proteolyse zu minimieren. Nach Hinzugabe von 9 ml, 2 °C kalten, frischen Nährmedium zu dem Trypsin wird das gesamte Volumen in ein 50 ml Falcon überführt und bei 2 °C für 7 Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert. Anschließend wird aus dem Falcon das Nährmedium vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 350 µl 2 °C kalten RIPA sowie 4 µl kombinierten Phosphatase- und Protease-Inhibitor suspendiert und in ein Eppendorf-Tube überführt. Die Proteinlysate können direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.5.2 BCA-Proteinassay

Der BCA-Proteinassay (*bicinchoninic acid*) wird zur quantitativen und photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen verwendet (Smith *et al.*, 1985). Diese wird mit dem Kits Pierce® Microplate BCA Protein Assay durchgeführt. Bicinchonsäure lagert sich quantitativ an Proteine und bildet dabei einen violetten Farbstoff, der bei 562 nm sein Absorptionsmaximum hat. Die Absorption kann mit einem Photometer quantitativ erfasst werden (Wiechelman *et al.*, 1988). Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen aus den gemessenen Extinktionen wird eine Eichgerade aus einem Protein Standard benötigt. Dieser Protein-Standard wird mit Albumin mit einer aufsteigenden Konzentration von 0, 25, 125, 250,

500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml erstellt und daraus nach Messung der Extinktion eine Eichgerade berechnet. Wenn die berechneten Extinktionen der Proteinkonzentration von den Proben über 2000 µg/ml liegen, erfolgte eine erneute Messung mit verdünnter Proteinkonzentration. Für die Durchführung der Messung werden die *BCA-Working-Reagenzien* A und B in einem Verhältnis 1:50 vermischt, 200 µl der vermischten *Working-Reagenzien* A und B in eine 96-well Platte zusammen mit 5 µl jeweils des Protein Standards oder 10 µl der Proteinproben in Doppelbestimmung pipettiert, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und schließlich die Extinktion im Photometer bestimmt.

3.5.3 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation können Protein-Antigene aus einer Lösung mit einer spezifischen Antikörperbindung präzipitiert werden. Der Prozess kann dafür genutzt werden, bestimmte Proteine aus einer größeren Menge zu isolieren und zu konzentrieren (Dickson, 2008). Für die Durchführung müssen die Antikörper am selben Substrat binden können (Kaboord und Perr, 2008). Für die Immunpräzipitation werden 500 µg Proteinlysate mit RIPA auf 500 µl aufgefüllt. Zum *Preclearing* werden 40 µl *Agarose-beads* und 2,5 µl Maus-IgG hinzugegeben, 4 Stunden bei 4 °C langsam rotiert und bei 250 g die *Agarose-beads* wieder abzentrifugiert. Mit diesem Schritt sollen unspezifische Proteinbindungen an dem eingesetzten primären Antikörper oder der Agarose verhindert werden. Der Überstand wird in ein neues Tube überführt sowie 4 µg primärer Antikörper und erneut 40 µl *Agarose-beads* hinzugegeben. Daraufhin erfolgt eine langsame Rotation der *Tubes* über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei 4 °C. Die *Tubes* werden anschließend bei 1000 g für 1 Minute bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abpipettiert und kann an diesem Punkt für proteinbiochemische Methoden bei -80 °C eingefroren und gelagert werden. Die Agarosepellets werden in *Hank's Solution* gewaschen und bei 1000 g bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt. Die Agarosepellets werden anschließend mit 30 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert und 1 Minute bei 1000 g zentrifugiert. Die flüssige Phase kann nun für weitere proteinbiochemische Methoden wie SDS-PAGE und Western Blot verwendet werden.

3.5.4 SDS-PAGE

Durch *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Bei der Elektrophorese kommen Gele auf Polyacrylamidbasis zum Einsatz. Durch den Einsatz von SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und durch den Lauf-Puffer positive Ladungen der Proteine vernachlässigbar. Die Proteine weisen dadurch eine konstante negative Ladung auf und werden bei der Elektrophorese, nach erfolgter Denaturierung, in Richtung Anode durch das Gel mobilisiert (Smith, 1997). Durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeit, abhängig von der Molekülmasse, werden Proteine von 5 KDa bis 250 KDa im Gel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Für die Gelelektrophorese nach Laemmli werden in dieser Arbeit Mini Protean® TGX, 10 % 10-well comb, 30 µl und Mini Protean® TGX, 4-20 % 12-well comb, 20µl von der Firma Biorad verwendet. Vor Füllung der Geltaschen werden 20µg Protein mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt, 5 µl Laemmli Probenpuffer hinzugesetzt und das Proteingemisch für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert und denaturiert. Anschließend wird das Proteingemisch in die Geltaschen pipettiert. In eine Geltasche wird zusätzlich ein Proteinmarker überführt, um eine Molekülmassenzuordnung der Proteine zu ermöglichen. Der Proteinmarker zeigt sichtbare spezifische Banden an bestimmten Molekülmassen an. Die Laufkammern werden bis zur vollständigen Benetzung der Gele mit Lauf-Puffer befüllt und die Elektrophorese für 60-90 Minuten bei 100 V durchgeführt. Das Gel kann nach der Elektrophorese für proteinbiochemische Methoden wie beispielsweise Western Blot weiterverwendet werden.

3.5.5 Western Blot

Durch Western Blot können spezifische Proteine detektiert und quantifiziert werden, die zuvor durch SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Trägermembran übertragen wurden. Die Übertragung von SDS-PAGE auf die Nitrozellulose-Trägermembran erfolgt durch eine Elektrophorese und die Detektion der Proteine durch einen primären und HRP-gekoppelte sekundären Antikörper (Mahmood und Yang, 2012).

3.5.5.1 Proteintransfer

Für den Proteintransfer wird die SDS-Page auf einer Nitrozellulose-Trägermembran platziert und von beiden Seiten mit zwei *Whatman-Papieren* eingebettet. Durch Benetzen mit Transferpuffer und vorsichtigen Ausrollen der aufeinander geschichteten Papiere und Membran durch einen Glasstab sollen Luftblasen vermieden werden. Das entstandene Konstrukt wird in eine Laufkammer gestellt, die Laufkammer wiederum mit Transferpuffer,

einem Kühlelement und einem Rührfisch versehen und die SDS-PAGE für 60 Minuten, bei 4 °C, auf einem Magnetrührer, bei 100 V auf die Nitrozellulose-Trägermembran geblottet.

3.5.5.2 Proteinfärbung

Durch Färbung der Proteinbanden mit dem Azofarbstoff Ponceau S kann die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran überprüft werden (Romero-Calvo *et al.*, 2010). Der Azofarbstoff Ponceau S färbt die Proteinbanden reversibel rot an. Durch mehrmaliges Waschen der Membran mit einer Lösung aus PBS und 0,1 % Tween kann der Farbstoff wieder ausgewaschen werden.

3.5.5.3 Blocken

Darauffolgend wird die Nitrozellulosemembran für mindestens 60 Minuten durch langsames Schwenken in TBST mit 10 % *Carbo-Free Blocking Solution* blockiert. Durch das Blockieren sollen restliche, freie Proteinbindungsstellen blockiert werden, um Bindung von weiteren, unspezifischen Proteinen an die Membran zu verhindern. Die Bindung des primären Antikörpers wird durch die Blockierung nicht beeinträchtigt.

3.5.5.4 Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper

Als nächsten Schritt kann die Nitrozellulosemembran mit einem primären Antikörper inkubiert werden. Dafür wird die Membran mit einer Suspension aus TBST mit 5 % Milchpulver und entsprechend verdünnten Antikörper (siehe Tabelle 5) durch langsames Schwenken bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wird durch Waschen mit TBST in 10-minütigen Intervallen über 60 Minuten die Nitrozellulosemembran gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Um die Detektion des primären Antikörpers zu ermöglichen, wird eine Suspension aus entsprechend verdünnten sekundären HRP-gekoppelten-Antikörper (siehe Tabelle 5) in einer Suspension aus TBST mit 10 % *Carbo-Free-Blocking-Solution* zur Membran gegeben und für 60 Minuten bei langsamen Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Waschen mit TBST in 10-minütigen Intervallen über 60 Minuten wird die Nitrozellulosemembran erneut gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach diesem Schritt kann die Detektion des Antikörpers erfolgen.

3.5.5.5 Immundetektion

An den sekundären Antikörper ist das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt, mit dem durch Bindung eines Chromogens eine Chemilumineszenz durch die Peroxidase katalysiert wird. Die Nitrozellulosemembran wird nach den letzten Waschschritten mit Pierce® ECL Western Blotting Substrat oder dem Chromogenen Super Signal® West Dura Extended Duration Substrat mit für eine Minute gänzlich benetzt und die Chemilumineszenz mittels Image Reader (LAS-4000) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten erfasst und aufgenommen.

3.5.5.6 Densitometrie und Quantifizierung

Durch die Software ImageQuant™ LAS 4000 von GE Healthcare können die digitalen Aufnahmen quantifiziert werden. Dafür wird die Bandenintensität mit den zugehörigen Banden eines *housekeeping-Gens* ins Verhältnis gesetzt und unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors vergleichbar gemacht. Von *housekeeping-Genen* wird eine sehr konstante und stabile Expression angenommen (Silver *et al.*, 2006). Daher sind diese für die Vergleichbarkeit der relativen Quantifizierung essentiell. In dieser Arbeit werden in der Quantifizierung der Western Blots als *housekeeping-Gen* zumeist HSC70 und GAPDH herangezogen. ImageQuant™ LAS 4000 zieht letztendlich zur Quantifizierung die Hintergrundhelligkeit der Membran, Signalintensität der Bande des *housekeeping-Gens* und die Signalintensität der Bande des Ziel-Proteins heran.

3.5.6 Zellfraktionierung

Durch Zellfraktionierung können zelluläre Komponenten nach Zellaufschluss, wie Zellmembran und Zytosol, aufgetrennt werden (Graham, 2002). Die Zellfraktionierung wird nach entsprechender Aufarbeitung der Zellen durch Ultrazentrifugation erreicht. Durch wiederholende Zentrifugation von niedriger zu hoher Rotationsgeschwindigkeit unter Abschöpfung des Zellüberstandes kann ein Zellhomogenisat in seine einzelnen Zellkomponenten fraktioniert werden. Die Zellen aus der Zellkultur werden zu Beginn lysiert und in einer isotonischen Pufferlösung suspendiert, um osmotischen Zellschäden zu verhindern. Als nächsten Schritt werden die Zellen auf Eis homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Die Zentrifugation wird zunächst bei niedriger Rotationsgeschwindigkeit durchgeführt und der Überstand abgenommen. Mit dem Überstand wird daraufhin eine erneute Zentrifugation mit höherer Rotationsgeschwindigkeit vorgenommen. Dieser Vorgang wird mehrmals mit immer höherer Rotationsgeschwindigkeit wiederholt. Durch zusätzlichen Einsatz eines Dichtegradienten können Fraktionen mit vergleichbarer Größe und Dichte aufgetrennt werden (Simpson und Sonne, 1982). Letztendlich können die unterschiedlichen Zellfraktionen als Pellet für weitere proteinbiochemische Methoden verwendet werden.

3.5.7 Protein Deglykosylierung

Von zellulären Proteinen können durch enzymatische Deglykosylierung spezifische Glykosylierungsketten abgespalten werden. In dieser Arbeit soll durch Deglykosylierung untersucht werden, ob *vicia villosa lectin* (VVL) spezifisch an α -N-Acetylgalactosamine gebunden an Serin oder Threonin (Tn-Antigen) bindet. VVL wird in der vorliegenden Arbeit wegen seiner spezifischen Bindung an Tn-Antigen in mehreren molekularbiologischen Methoden verwendet. Durch die α -N-Acetylgalactosaminidase kann Tn-Antigen spezifisch abgespalten werden. Nach Verwendung anderer Glykosidasen wie O-Glycosidase, O-GlcNAcase, PNGase, α -2-3,6,8 Neuraminidase, β 1-4 Galactosidase und β -N-Acetylhexosaminidase (siehe Tabelle 9) soll VVL weiterhin Tn-Antigen binden und dadurch detektieren können. Die Glykosidasen werden nach Herstellerprotokollen vorbereitet und entsprechend an den Proteinlysaten der enzymatischer Verdau vorgenommen. Nach Inkubation mit der jeweiligen Glykosidase können die Reaktionsansätze für weitere molekularbiologische Versuche verwendet werden.

Bei der α -N-Acetylgalactosaminidase wird 1 μ g des Glykoproteins mit Wasser auf ein Volumen von 8 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 μ l des 10X GlycoBuffer wurde 1-2 μ l α -N-Acetylgalactosaminidase hinzugeben und der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für den enzymatischen Verdau mit O-Glycosidase wird 10-20 μ g Glykoprotein mit 1 μ l des 10X GlycoBuffer und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l zusammengeführt. Der Reaktionsansatz wird bei 100 °C 10 Minuten denaturiert und ein Gesamtvolumen von 20 μ l durch Hinzugabe von 2 μ l 10X GlycoBuffer 2, 2 μ l 10 % NP40, 2 μ l Neuraminidase, Wasser und 1–5 μ l O-Glycosidase erreicht. Nach Inkubation bei 37 °C für 1-4 Stunden ist der enzymatische Verdau mit O-Glycosidase abgeschlossen. Der Reaktionsansatz für den enzymatischen Verdau mit O-GlcNAcase besteht aus 35 μ l Proteinlysate mit 2 mg/ml Konzentration, 5 μ l Bottle 1 (Glyko-Puffer) und 10 μ l Bottle 3 (O-GlcNAcase). Der Enzymverdau wird bei O-GlcNAcase bei 37 °C für 48 Stunden durchgeführt. Für den enzymatischen Verdau mit PNGase wird als Reaktionsansatz 1-2 μ g Protein, 1 μ l Glycoprotein Denaturing Buffer (10x) und Wasser für ein Gesamtvolumen von 10 μ l benötigt. Der Reaktionsansatz anschließend wird bei 100 °C für 10 Minuten denaturiert, auf Eis gekühlt und für 10 Sekunden zentrifugiert. Durch Hinzugabe von 2 μ l Glyco-Puffer 2 (10x), 2 μ l 10 % NP-40 und 6 μ l Wasser wird der Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l gebracht. Nach Hinzugabe von 1 μ l PNGase zum Reaktionsansatz und vorsichtigen Vermischen, wird der Reaktionsansatz bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Der Reaktionsansatz mit α -2-3,6,8 Neuraminidase, β 1-4 Galactosidase S und β -N-Acetylhexosaminidase wird durch 1 μ g des Glykoproteins mit Wasser auf ein Volumen von 9 μ l und durch 1 μ l Zugabe des jeweiligen Enzyms erstellt und letztendlich bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

3.5.8 AKT-Kinase assay

AKT ist eine 57 kDa große Serin/Threonin-Kinase und als ein Schlüsselenzym im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg bekannt (Nicholson und Anderson, 2002). AKT wird durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 aktiviert (Song *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit soll die AKT-Kinase-Aktivität im Kontext aberranter O-GalNAc-Glykosylierung untersucht werden. Für die Bestimmung der AKT-Kinase-Aktivität wurde das AKT Kinase Activity Assay-Kit der Firma Abcam verwendet.

Zelllysate aus Zellkultur und Geweben werden vor Anwendung des *Kits* nach Herstellerprotokoll hergestellt. Zur Bestimmung der AKT-Kinase-Aktivität wird eine 96-well mit 50 µL des *Kinase Assay Dilution-Puffers* bei Raumtemperatur (22 °C) für 10 Minuten inkubiert und der Puffer anschließend vorsichtig entfernt. In die *96-well* wurde daraufhin in Doppelbestimmung 30 µl aufgereinigtes, aktives AKT als Kontrolle, die Proben, ein Leerwert (*Kinase Assay Dilution Buffer* ohne Kinase) und eine negativ-Kontrolle (Inhibitor Flüssigkeit ohne Inhibitor) pipettiert. Durch Hinzugabe von 10 µl aufgereinigtes AKT, außer beim Leerwert, wird die AKT-Kinase-Reaktion gestartet. Nach Abdichten der *96-well* mit Klarsichtfolie wird die Platte bei 30 °C 90 Minuten lang inkubiert. Alle 20 Minuten erfolgt ein vorsichtiges Schwenken der *96-well* Platten zur Durchmischung. Die Kinase-Reaktion wird nach 90 Minuten durch Entleeren der *96-well* beendet. In die Kavitäten der *96-well* wird darauffolgend 40 µL des *Phosphospecific Substrate Antibody* pipettiert und bei 30 °C 60 Minuten lang inkubiert. Wiederrum erfolgt alle 20 Minuten ein vorsichtiges Schwenken der *96-well-Platten* zur Durchmischung. Als nächsten Schritt wird die *96-well* entleert und viermalig durch Gabe von 100 µl Waschpuffer in jede Kavität gewaschen. Nach Entfernung des Waschpuffers wird 40 µl *Anti-Rabbit-IgG-HRP-Conjugate* in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Alle 10 Minuten wird die *96-well* vorsichtig geschwenkt. Danach erfolgt nochmals viermaliges Waschen mit 100 µl Waschpuffer in jeder Kavität. Nach den Waschdurchgängen wird 60 µL von TMB-Substrat in jede Kavität hinzugegeben und die *96-well* 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Gabe von 20 µl *Stop-Solution* zu dem TMB-Substrat wird die Reaktion gestoppt und die Absorption kann schließlich bei 450 nm durch den ELISA-Reader gemessen werden.

Im AKT-Kinase assay wird auch aufgereinigtes AKT mit normaler Glykosylierung gegen Tn-Antigen-typischer Glykosylierung verglichen. Für die Aufreinigung wird AKT in HEK WT und HEK SC Zellen mit einem *Polyhistidin-Tag* (pcDNA3.1+C-6His NM_005163.2) versehen, mit dem eine Aufreinigung durch Verwendung von Protino Ni-NTA-Säulen (Macherey-Nagel) ermöglicht wird.

3.6 Statistische Analyse

Zur Validierung der erhobenen Daten wird jedes Experiment mindestens dreimalig unabhängig voneinander wiederholt. Die Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung [SD] des Mittelwertes von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Um den Mittelwert zweier unabhängiger Stichproben zu vergleichen wird in der vorliegenden Arbeit der Zweistichproben-t-Test/Student's t-Test verwendet. Die Ergebnisse werden als signifikant bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angesehen. Alle Fehlerbalken, falls nicht anders angegeben, geben die Standardabweichung an. Eine Bonferroni Korrektur, sofern anwendbar, wird bei multiplen Testen durchgeführt, wodurch eine Alphafehler-Kumulierung neutralisiert wird. Die statistische Auswertung wird durch die Programme Excel (Office 2013, Microsoft) und SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 22, IBM) vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Massenspektrometrie-basierte Proteomik in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg

Da Veränderungen der O-GalNAc-Glykosylierung auch Auswirkung auf die Protein-Expression haben kann (Steentoft *et al.*, 2013), wurden *COSMC-Knockdown-Zellen* kombiniert mit stabiler Isotopenmarkierung durch Aminosäuren in der Zellkultur (*stable isotope-labeling by amino-acids in cell-culture/SILAC*) zur Proteommarkierung kultiviert und nachfolgend in einer Massenspektrometrie-basierte Proteomik untersucht. Ein Verhältnis von SILAC-markierten *COSMC-Knockdown-Proteinen* im Vergleich mit Kontrollproteinen wurde für 1943 Proteine im ersten und 917 Proteinen im zweiten Experiment berechnet. Eine Gen-Analyse mit der PANTHER 10.0 Datenbank zeigte Proteine, die im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalwegen vorkommen. In dieser Analyse sind 11 Proteine enthalten, die ein SILAC-Verhältnis von $< 0,75$ und $> 1,25$ haben und damit sehr wahrscheinlich unterschiedlich reguliert sind (siehe Tabelle 10). Interessanterweise wurde unter anderem AKT2 zusammen mit EGFR, IGF2R, MAPK1, MAPK2, 14-3-3 Protein gamma, STAT1, PAK2, PTRHD1, GNB1 und RHOC unter den regulierten Proteinen gefunden. AKT2 wurde mit einem SILAC-Verhältnis von 0,69 gefunden. Ob die AKT-Isoformen direkt oder indirekt durch die veränderte O-GalNAc-Glykosylierung reguliert werden, ist bisher noch Gegenstand aktueller Forschung. Eine mögliche direkte O-GalNAc-Glykosylierung von AKT wurde unter Verwendung des Vorhersage-Tools NetOGlyc 4.0 berechnet (Steentoft *et al.*, 2013) und ergab, dass 20 von 55 (36,6 %) Serin/Threonin-Reste von AKT2 potentiell O-GalNAc glykosyliert sind (siehe Tabelle 10). Zusammenfassend werden 8 von den 11 identifizierten Proteinen als potentiell O-GalNAc-glykosyliert vorhergesagt.

Tabelle 10: SILAC-Markierung und Massenspektrometrie identifizierter *COSMC-Knockdown-regulierte Proteine:* Panther 10.0 Datenbank weist Proteine den jeweiligen Signalwegen zu. Panther-Datenbanknummern werden neben dem Zellsignalwegnamen präsentiert. Proteinname, Gen und Uniprot Nummer sind aufgelistet. Das O-GalNAc Vorhersage-Tool (NetOGlyc 4.0) wurde verwendet, um die Möglichkeit der O-GalNAc-Glykosylierung zu beurteilen. Ergebnis zeigt den Prozentsatz von möglicherweise O-GalNAc-modifizierten Serin/Threonin-Resten (+ <10 %, ++ <20 %, +++ > 20 %). Potenzielle O-GalNAc-modifizierte Serin/Threonin-Reste und die Gesamtzahl der Serin/Threonin-Reste werden neben den relativen Zahlen in Klammern gezeigt. Normalisierte Verhältnisse von SILAC markierten *COSMC-Knockdown* und *Scrambled-Kontrolle* werden für 2 unabhängige Experimente nebeneinander dargestellt. Referenzen werden für zuvor identifizierte O-GalNAc-Glykane gezeigt. Proteine, die in verschiedenen Zellsignalwegen auftreten, sind in blauen Buchstaben markiert.

Table 10 Mass spectrometry identified COSMC knockdown regulated proteins

Protein	Gene	Uniprot. acc. No.	NetOGlyc 4.0	potential O-GalNAc modified Ser/Thr residues	SILAC ratio normalized experiment 1	SILAC ratio normalized experiment 2
EGF receptor signaling pathway (P00018)						
Epidermal growth factor receptor	EGFR	P00533	+++	48/148 (32.43%)	1,3656	1,262
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	P36507	+++	12/39 (30.77%)		1,257
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	P40763	++	11/98 (11.22%)	1,1503	1,313
Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Q16539	++	4/39 (10.26%)		1,156
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1	P63000	+	1/20 (5%)		1,104
39S ribosomal protein L38, mitochondrial	MRPL38	Q96DV4	++	4/36 (11.11%)		1,076
14-3-3 protein sigma	SFN	P31947	+	1/29 (3.45%)	1,0133	1,084
14-3-3 protein eta	YWHAH	Q04917	+	1/25 (4%)	1,1104	0,965
Ras-related protein R-Ras	RRAS	P10301	+++	6/24 (25%)	1,0374	
14-3-3 protein beta/alpha	YWHAH	P31946	++	5/31 (16.13%)	1,0333	0,979
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PPP2CB	P62714	+	2/31 (6.45%)		1,000
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit epsilon isoform	PPP2R5E	Q16537	+++	16/56 (28.57%)		0,984
Ras-related protein R-Ras2	RRAS2	P62070	++	2/18 (11.11%)		0,982
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	P28482	-	0/30 (0%)		0,925
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	P46734	+++	13/44 (29.55%)		0,904
14-3-3 protein theta	YWHAQ	P27348	+	3/32 (9.38%)	0,93825	0,850
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	P31751	+++	20/55 (36.36%)	1,0707	0,689
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	PEBP1	P30086	++	4/24 (16.67%)	0,8943	0,814
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	P63104	++	4/29 (13.79%)	0,89933	0,801
14-3-3 protein epsilon	YWHAH	P62258	-	0/24 (0%)	0,84869	0,784
GTPase NRas	NRAS	P01111	+	1/23 (4.35%)		0,813
Ras-related protein Rap-1b	RAP1B	P61224	+	1/19 (5.26%)	0,82	0,731
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit delta isoform	PPP2R5D	Q14738	+++	28/64 (43.75%)		0,772
14-3-3 protein gamma	YWHAH	P61981	++	4/29 (13.79%)	0,77253	0,719
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1	Q02750	+++	13/42 (30.95%)		0,583
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	STAT1	P42224	+	6/86 (6.97%)	0,68124	0,463
Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1	PTRHD1	Q6GMV3	++	1/10 (10%)		0,440
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade (P00032)						
Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	P11717	+	11/396 (2.78%)	1,7985	1,330
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	P36507	+++	12/39 (30.77%)		1,257
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	P28482	-	0/30 (0%)		0,925
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	P46734	+++	13/44 (29.55%)		0,904
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1	Q02750	+++	13/42 (30.95%)		0,583
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade (P00033)						
Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	P11717	+	11/396 (2.78%)	1,7985	1,330
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	P31751	+++	20/55 (36.36%)	1,0707	0,689
PI3 kinase pathway (P00048)						
Ras-related protein R-Ras2	RRAS2	P62070	++	2/18 (11.11%)		0,982
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	P31751	+++	20/55 (36.36%)	1,0707	0,689
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	P63104	++	4/29 (13.79%)	0,89933	0,801
GTPase NRas	NRAS	P01111	+	1/23 (4.35%)		0,813
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit bet:	GNB1	P62873	-	0/56 (0%)		0,700
Ras Pathway (P04393)						
Rho-related GTP-binding protein RhoC	RHOC	P08134	-	0/16 (0%)	1,4781	
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	P36507	+++	12/39 (30.77%)		1,257
Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	P40763	++	11/98 (11.22%)	1,1503	1,313
Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Q16539	++	4/39 (10.26%)		1,156
Cell division control protein 42 homolog	CDC42	P60953	-	0/26 (0%)	1,1545	1,146
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	RAC1	P63000	+	1/20 (5%)		1,104
Ras-related protein Ral-A	RALA	P11233	++	2/19 (10.53%)	1,0977	0,931
Transforming protein RhoA	RHOA	P61586	+	1/15 (6.67%)		0,993
Ras-related protein R-Ras2	RRAS2	P62070	++	2/18 (11.11%)		0,982
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	P28482	-	0/30 (0%)		0,925
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	P46734	+++	13/44 (29.55%)		0,904
GTPase NRas	NRAS	P01111	+	1/23 (4.35%)		0,813
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2	Q13177	+++	34/68 (50.00%)	0,74465	0,626
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1	Q02750	+++	13/42 (30.95%)		0,583
Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	STAT1	P42224	+	6/86 (6.97%)	0,68124	0,463

4.2 Bestimmung der mRNA Expression von COSMC und AKT-Isoformen durch RT-qPCR

Um den lentiviralen *COSMC-Knockdown* zu beurteilen, wurde eine RT-qPCR mit dem *COSMC-Primer* durchgeführt (siehe Tabelle 11). In Panc-1 *COSMC-Knockdown-Zellen* konnte durch die $\Delta\Delta C_T$ Methode ein Verhältnis von 0,16 zu Panc-1 *Scrambled-Zellen* berechnet werden ($p < 0,016$). Entsprechend konnte in L3.6pl *COSMC-Knockdown-Zellen* ein Verhältnis von 0,19 zu L3.6pl *Scrambled-Zellen* festgestellt werden ($p < 0,012$). In Panc-1 *Scrambled-Zellen* zeigte sich zudem eine Überexpression von AKT1 im relativen Verhältnis von 1,51 zu Panc-1 *COSMC-Knockdown-Zellen* ($p < 0.015$).

Tabelle 11: **Bestimmung der mRNA Expression von COSMC und AKT-Isoformen durch RT-qPCR:** Die mRNA-Expressionen von COSMC und AKT-Isoformen werden mittels RT-qPCR durch die $\Delta\Delta C_T$ Methode in COSMC KD und SCR Zellen verglichen. Bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ werden die Ergebnisse markiert hervorgehoben. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

Panc-1								
Gene transcript	SCR			COSMC KD			$\Delta\Delta C_T$ COSMC KD/SCR	p-value
	Mean C_t	ΔC_t	SD	Mean C_t	ΔC_t	SD		
COSMC	22,07	5,62	0,05	24,75	8,27	0,14	0,16	0.016
Akt1	27,71	7,44	0,04	26,04	6,85	0,08	1,51	0.015
Akt2	25,11	4,84	0,13	23,80	4,61	0,08	1,17	0.251
Akt3	35,34	15,07	0,54	33,03	13,84	0,12	2,35	0.074
L3.6pl								
COSMC	24,13	8,59	0,13	26,55	10,95	0,01	0,19	0.012
Akt1	26,88	8,34	0,24	26,98	7,97	0,05	1,29	0.234
Akt2	29,13	10,59	0,07	29,13	10,12	0,19	1,39	0.116
Akt3	40,00	21,46	0,00	38,53	19,52	2,09	3,84	0.194

4.3 Nachweis von GALNTs im Zytosol in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen

Es ist bisher lediglich bekannt, dass sekretorische Proteine und Oberflächenproteine von den GALNTs O-GalNAc-glykosyliert werden. Da es sich bei den meisten Proteinen des PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg um zytosolische Proteine handelt, wurde untersucht, ob GALNTs auch in einer zytosolischen Fraktion nachweisbar sind und somit auch zytosolische Proteine O-GalNAc glykosylieren können. Dafür wurden Zelllysate der Panc-1-, L3.6p- und HEK-Zelllinie durch Zellfraktionierung in ihre Zellkomponenten aufgeteilt. Die Membran- und Zytosol-Fraktion wurden mittels Western Blot aufgetrennt, durch Antikörper von GALNT2, GALNT 4, GALNT9 und GALNT12 inkubiert und detektiert (siehe Abbildung 5).

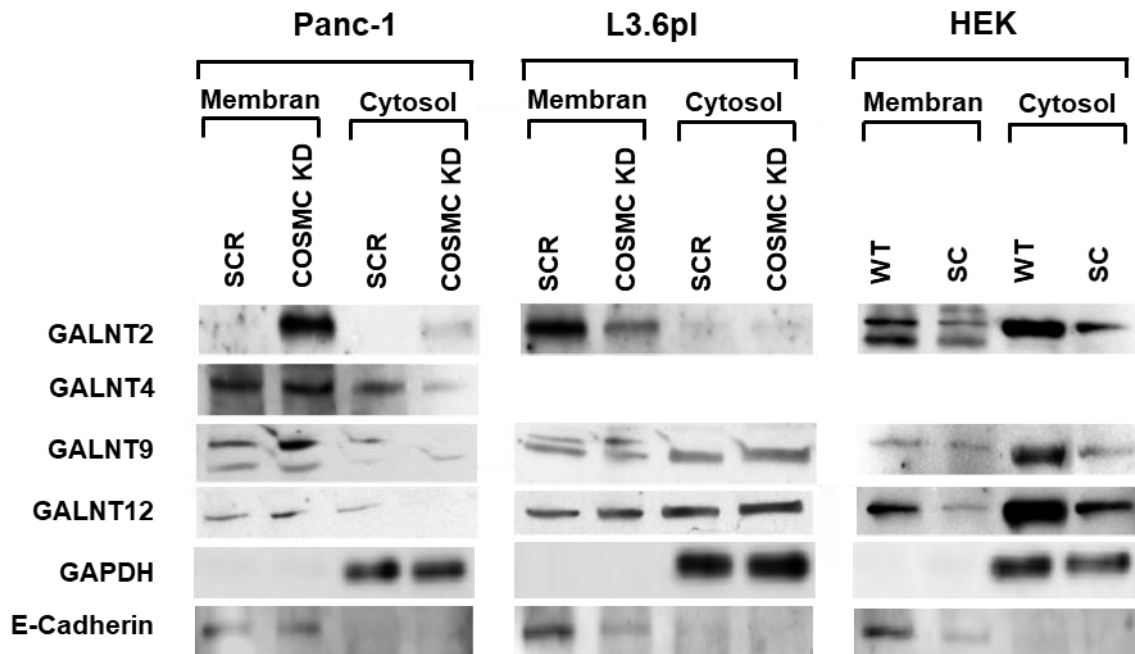


Abbildung 5: **Nachweis von GALNTs im Zytosol von aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen:** Durch Zellfraktionierung konnten Zellen der Panc-1-, L3.6pl- und HEK-Zelllinie in die Zellkompartimente Zytosol und Membran aufgetrennt werden. Durch die Western Blot-Methode wurden die Enzyme GALNT2, GALNT4, GALNT9 und GALNT12 inkubiert und anschließend detektiert. Die verwendeten GALNTs ließen sich überwiegend in der Membran und Zytosol nachweisen. GAPDH diente als Positivkontrolle in der Zytosolfraktion, E-Cadherin entsprechend als Positivkontrolle in der Membranfraktion.

GAPDH und E-Cadherin dienten als Negativ- beziehungsweise Positivkontrolle als spezifische Moleküle in der Zytosol- und Membranfraktion. GALNT2 konnte in allen Zellfraktionen nachgewiesen werden. Nur in Panc-1 SCR kann weder in der Membranfraktion noch in der Zytosolfraktion GALNT2 detektiert werden. GALNT4 ließ sich in Panc-1 SCR- und COSMC KD-Zellen in beiden Kompartimenten beobachten. GALNT9 und GALNT12 konnte ebenfalls in allen Zellfraktionen nachgewiesen werden. Nur in in der Zytosolfraktion der Panc-1 COSMC KD konnte kein GALNT12 detektiert werden. GAPDH diente als Positivkontrolle der Zytosolfraktion und ließ sich in der Zellmembranfraktion nicht zeigen. Entsprechend wurde E-Cadherin als Positivmarker der Membranfraktion verwendet. In der Zytosolfraktion konnte E-Cadherin nicht detektiert werden.

4.4 Verstärkte AKT-Phosphorylierung durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung und Nachweis aberranter O-GalNAc-Glykosylierung an AKT

Um eine mögliche Hochregulation der Serin/Threonin-Kinase AKT und damit einhergender Verstärkung onkogener Eigenschaften zu untersuchen, wurden in *COSMC-Knockdown-Zellen* von Panc-1 und L3.6pl (Hofmann *et al.*, 2015) und *COSMC-Knockout* HEK-Zellen auf ihre AKT-Expression hin untersucht.

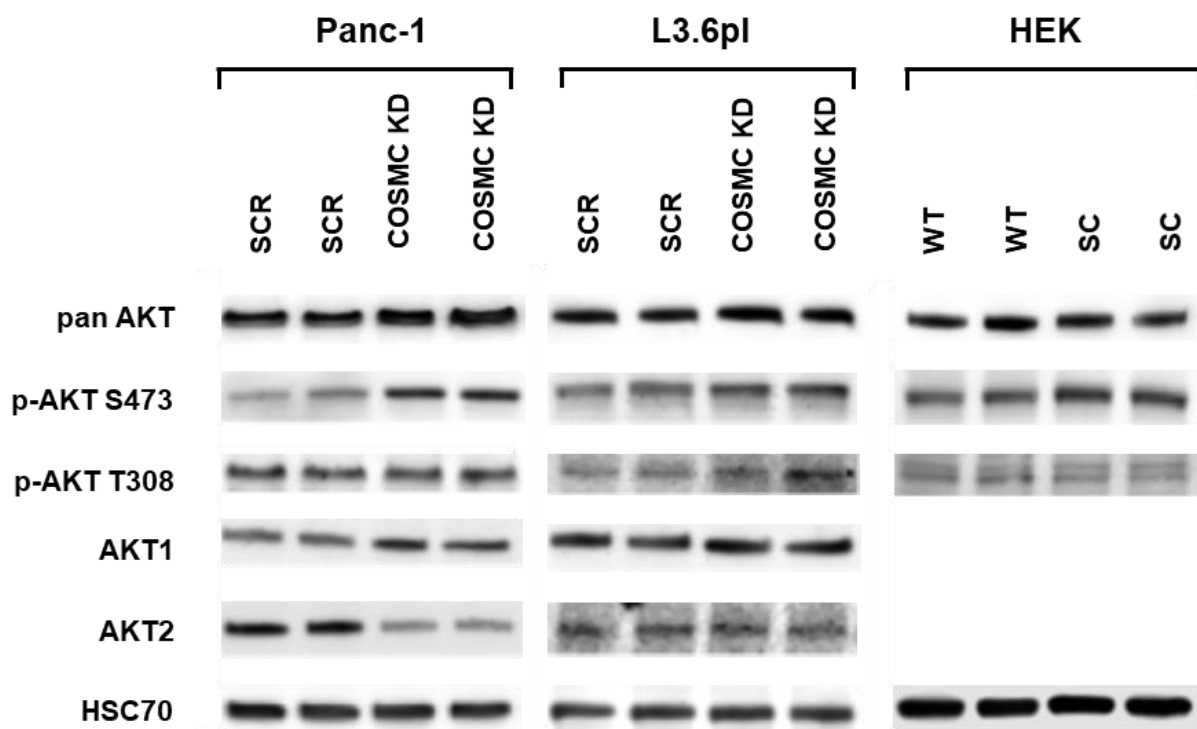


Abbildung 6: **AKT Western Blot Analyse:** In Panc-1- und L3.6pl-Zelllinie werden COSMC KD und SCR, in der HEK-Zelllinie SC und WT gegeneinander verglichen. Verschiedene AKT-Antikörper wurden wie angegeben verwendet. Insbesondere in pAKT S473, AKT1 und AKT2 zeigen sich im Vergleich Expressionsunterschiede. HSC70 diente als Ladekontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

Dies ergab interessanterweise, dass die mRNA und Proteine von Pan-AKT- und AKT-Isoformen in *COSMC-Knockdown-Zellen* verändert sind (siehe Abbildung 6). Darüber hinaus zeigten Panc-1 *COSMC-Knockdown-Zellen* eine Zunahme von AKT S473 Phosphorylierung um 498 %, verglichen mit SCR-Kontrollen ($p < 0,001$). P-AKT S473 wurde erhöht bis zu 186 % in L3.6pl *COSMC-Knockdown-Zellen* ($p < 0,001$) gefunden, während in der HEK SC die Phosphorylierung von AKT S473 um 150 % erhöht ist ($p = 0,008$) (siehe Abbildung 7) ist. Insgesamt ist eine stärkere AKT-Phosphorylierung bei S473 in aberrant O-GalNAc-glykosylierten Zellen zu beobachten. Ob AKT eine O-GalNAc-Glykosylierung hat, ist bislang noch unbekannt und Gegenstand aktueller Untersuchungen.

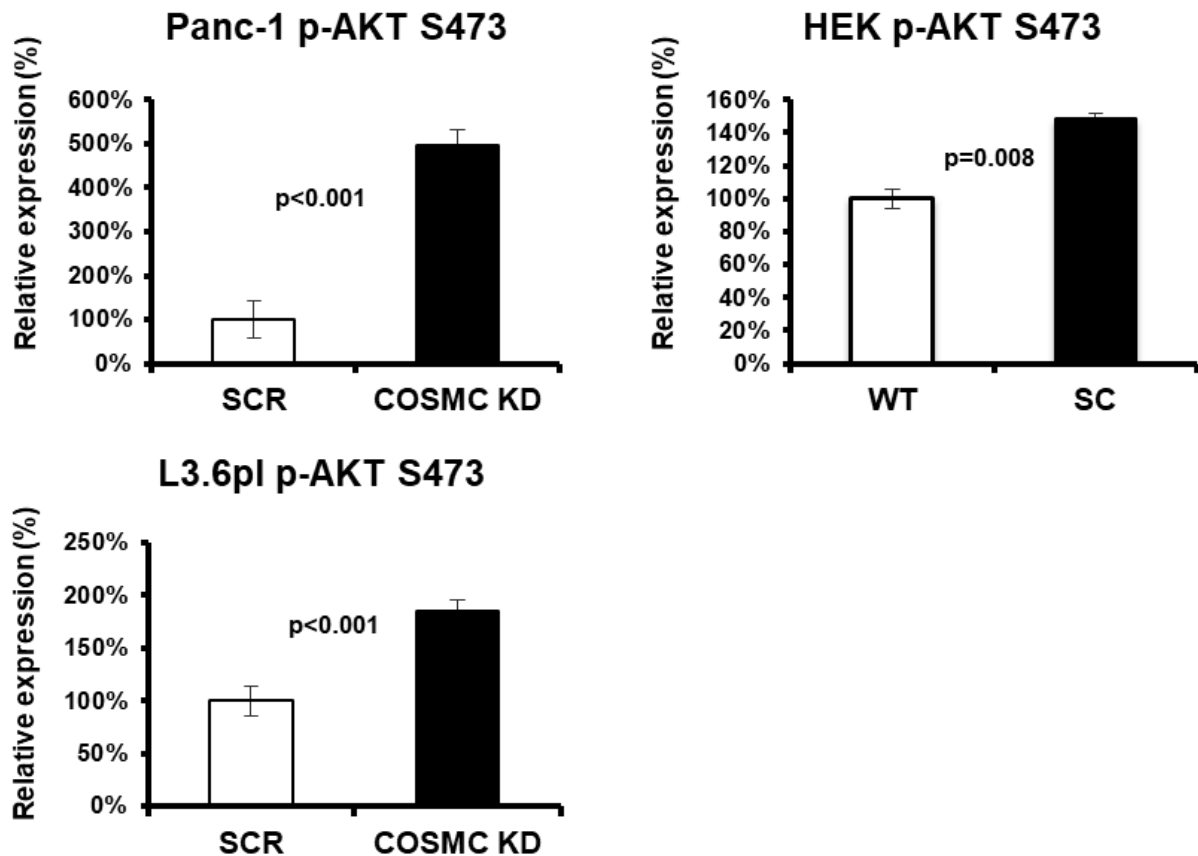


Abbildung 7: **Relative Quantifizierung der p-AKT S473-Expression:** In Panc-1- und L3.6pl-Zelllinie werden COSMC KD- und SCR-Zellen ($p < 0,001$), in HEK-Zelllinie SC) und WT ($p = 0,008$) gegeneinander verglichen. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

Zum Nachweis einer AKT O-GalNAc-Glykosylierung wurde eine Lektin-Präzipitation und Western-Blot-Analyse verwendet. Ein Pflanzen-Lektin aus *vicia villosa lectin* (VVL), das an *Agarose-Beads* gebunden ist, wurde zum Präzipitieren von α -O-GalNAc-Residuen auf AKT verwendet. Die Präzipitation von AKT1 und AKT2 wurde in *COSMC-Knockdown-Zellen* und Kontrollen erreicht. AKT1- und AKT2-Erkennung wurde durch Neuraminidase-Behandlung verbessert, die somit auf einen hohen Grad an S-Tn auf AKT-Proteinen in PDAC-Zellen hinweist. Darüber hinaus waren auch AKT-Isoformen in präzipitierten Überständen nachweisbar, also auch auf AKT-Isoformen ohne O-GalNAc-Modifikation. AKT3 war in Präzipitaten mit VVL nicht zu detektieren. Caspase-3 wurde als Negativkontrolle verwendet (siehe Abbildung 8). Umgekehrt wurde mit AKT-Präzipitation und VVL-Nachweis ein starker Nachweis von O-GalNAc glykosylierten AKT in der Western-Blot-Analyse gezeigt.

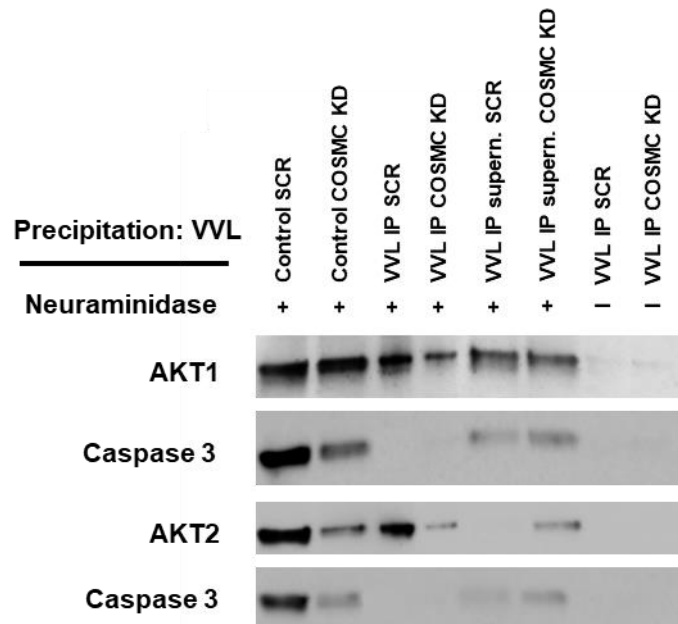


Abbildung 8: **Immunpräzipitation mit VVL Lektin mit anschließender Western-Blot-Analyse mit AKT 1- und AKT 2-Antikörpern:** Im Vorfeld erfolgte eine Neuraminidase-Verdau zur Entfernung von Sialinsäuren wie angegeben (+ behandelt; - unbehandelt). Caspase-3 diente als Negativkontrolle und wurde nicht von VVL präzipitiert. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

Die AKT-Detektion wurde durch die Behandlung von Neuraminidase und GalNAcase, die terminalen GalNAc- und α -O-GalNAc-Residuen spaltet (Smith *et al.*), deutlich reduziert, während die Behandlung mit PNGase, O-GlcNAcase und O-Glykosidase kombiniert mit Neuraminidase, die AKT-Signaldetektion mit VVL-Lektin nicht veränderte (siehe Abbildung 9). Diese Daten zeigen, dass AKT O-GalNAc-Glykosylierung enthält.

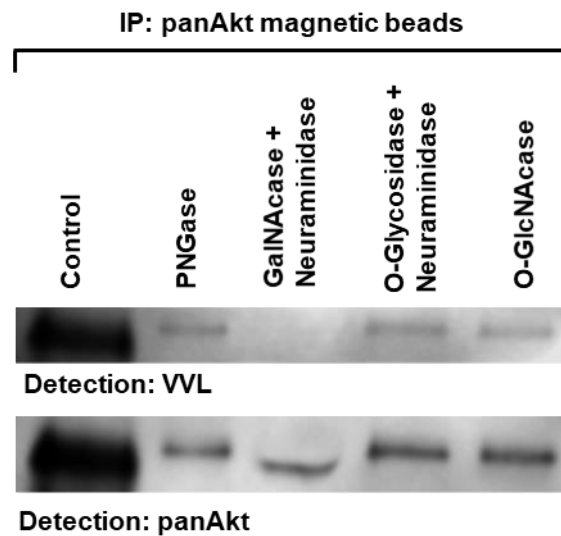


Abbildung 9: Immunpräzipitation mit *panAkt magnetic-beads* mit anschließender Western Blot-Analyse mit VVL nach enzymatischer Deglykosylierung: Oben Immunpräzipitation mit *panAkt magnetic-beads*, gefolgt von der Entfernung von Glykanen durch das angegebene Enzym und anschließendem Nachweis mit VVL. Unten Immunpräzipitation mit *panAkt magnetic-beads*, gefolgt von der Detektion mit panAkt-Antikörper. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente

4.5 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung verringert die AKT-Kinase-Aktivität

Nachfolgend wurde die AKT-Kinase-Aktivität untersucht, weil im PDAC der AKT Phosphorylierungsstatus S473 und Thr308 an AKT mit der AKT-Kinase-Aktivität korrelieren kann (Yamamoto *et al.*, 2004b), jedoch auch, trotz hoher Phosphorylierung an S473 und Thr308 an AKT, hemmende Einflüsse auf die Kinase-Aktivität durch Glykosylierungen bereits beschrieben sind (Risso *et al.*, 2015). Mit 94 % ($p = 0.1218$) in der Panc-1-Zelllinie und 71 % ($p < 0.001$) in der L3.6pl-Zelllinie ist die AKT-Kinase-Aktivität im relativen Vergleich im *COSMC-Knockdown* gegenüber SCR herabgesetzt. In der HEK SC-Zelllinie zeigte sich mit 75 % ($p = 0.002$) gegenüber dem WT die AKT-Kinase-Aktivität vermindert. Im rekombinanten-AKT präsentierte sich der Tn-Antigen-Glykotyp gegenüber dem WT mit normalen Glykotyp mit 91 % ($p = 0.0408$) und im PDAC gegenüber nicht tumorösen Pankreasgewebe mit 46 % ($p = 0.0476$) ebenfalls in AKT-Kinase-Aktivität verringert (siehe Abbildung 10).

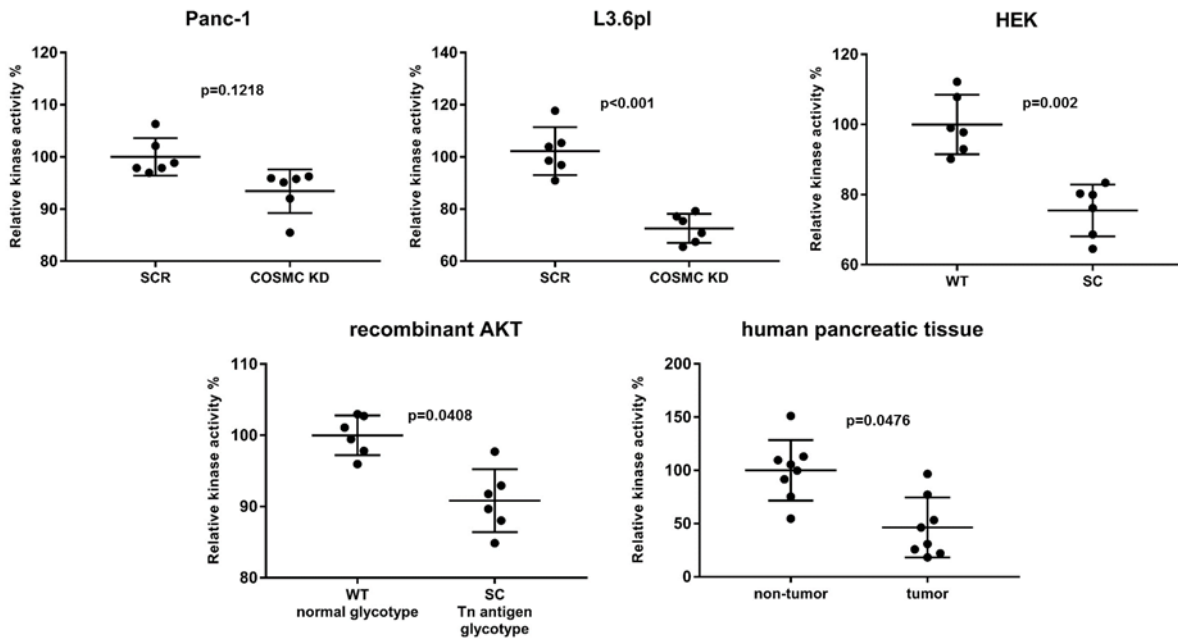


Abbildung 10: **AKT-Kinase-Aktivität:** Im relativen Vergleich AKT-Isoform-Kinase-Aktivität in Panc-1- ($p = 0.1218$) und L3.6pl-Zelllinie ($p < 0,001$) COSMC KD und SCR, in HEK-Zelllinie SC und WT ($p = 0.002$), in aufgereinigten rekombinanten-AKT mit normalen Glykotyp und Tn-Antigen-Glykotyp ($p < 0,0408$), in nicht tumorösen humanen Pankreasgewebe und nachgewiesenen humanen PDAC ($p < 0,0476$). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

4.6 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung erhöht die S6- und GSK-3- β -Phosphorylierung

Das p-S6-Protein (S240 / 244) ist ein wichtiger *downstream* Regulator von AKT und dessen Aktivierung ist mit einer erhöhten mRNA-Translation von Proteinen assoziiert, die an der Zellzyklus-Progression beteiligt sind (Fingar *et al.*, 2004). p-S6 wurde in Panc-1 (198 %, $p = 0,043$) und L3.6pl (168 %; $p = 0,02$) *COSMC-Knockdown-Zellen* deutlich erhöht nachgewiesen, die im Einklang mit einer erhöhten *upstream* p-AKT-Aktivierung steht (siehe Abbildung 7). HEK SC zeigte gegenüber dem WT eine leicht verminderte Expression (66 %; $p = 0.152$).

GSK-3 β ist ein weiteres *downstream* Substrat von AKT. In PDAC ist eine erhöhte GSK-3 β -Phosphorylierung und Aktivierung mit einem längeren Krebszell-Überleben und einer verstärkten Proliferation assoziiert (Ougolkov *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung von GSK-3 β war in *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* (154 %; $p = 0,046$) im Vergleich zu SCR Kontrollen erhöht. *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* wurden im Vergleich zu SCR nicht reguliert (105 %; $p = 0,901$). In HEK SC präsentierte sich eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich zum WT (33 %; $p = 0.024$) (siehe Abbildung 11).

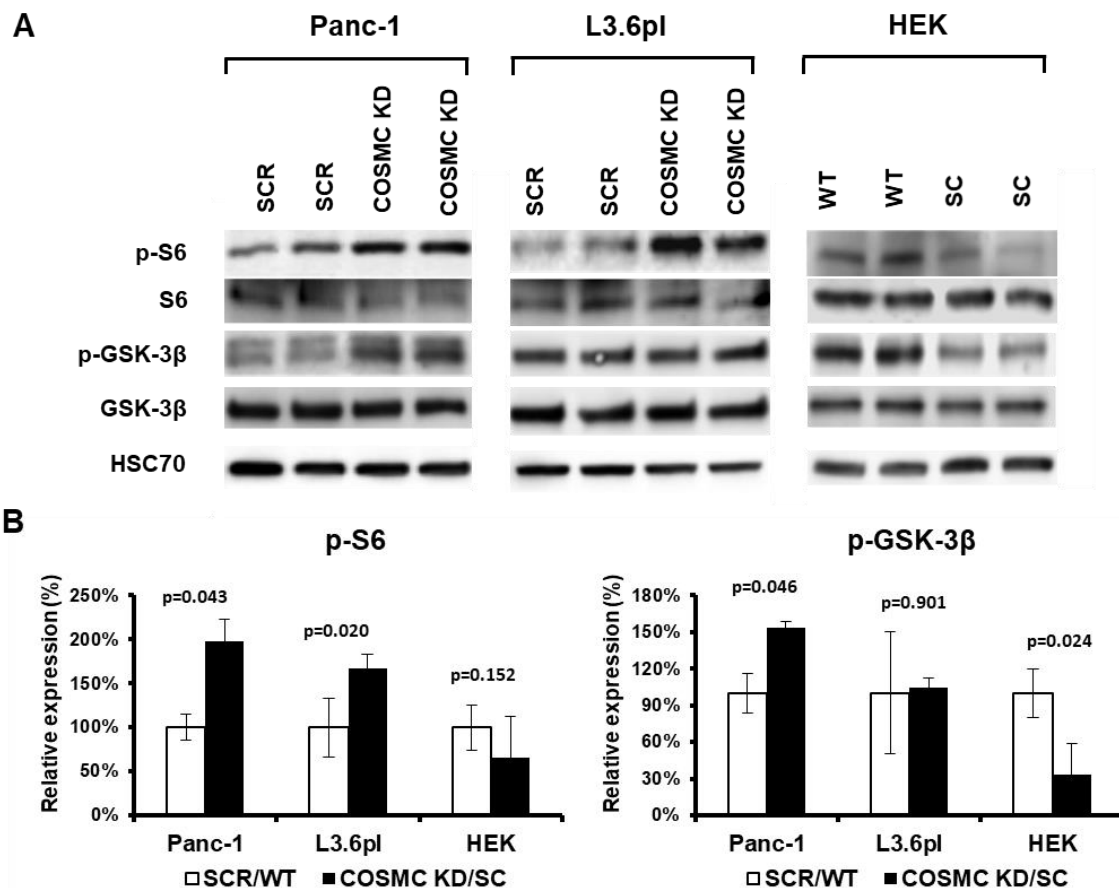


Abbildung 11: **Western-Blot-Analyse von AKT-Downstream-Substraten S6 und GSK3-β-Protein:** Panc-1- und teilweise in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* (COSMC KD) zeigt sich eine verbesserte Phosphorylierung im Vergleich zu Kontrollen (SCR). In HEK ist teilweise eine verminderte Phosphorylierung von SC im Vergleich zur Kontrolle WT festzustellen. HSC70 als Ladekontrolle. In Abb. 11 B die relative Quantifizierung von p-S6 und p-GSK-3β-Expression in *Panc-1*- und *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* und HEK SC verglichen mit Kontrollen (p-Werte wie angegeben). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

4.7 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung verringert MAPK-Phosphorylierung

Die PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalwege haben zahlreiche gegenseitige Regulations- und Interaktionsmöglichkeiten (Aksamitiene *et al.*, 2012). Deswegen wurde der Ras/Raf/MAPK-Signalweg in *COSMC-Knockdown-Zellen* und *COSMC-Knockout-Zellen* untersucht. P-MAPK zeigte eine Signalabnahme 19 % (p = 0,045) in Panc-1, 34 % (p = 0,02) in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* im Vergleich zu den Kontrollen. In HEK SC konnte auch eine starke Reduktion mit 20 % (p < 0.001) gegenüber dem WT gezeigt werden. Die MAPK-Werte blieben in der Panc-1, L3.6pl und HEK nahezu unverändert (siehe Abbildung 11).

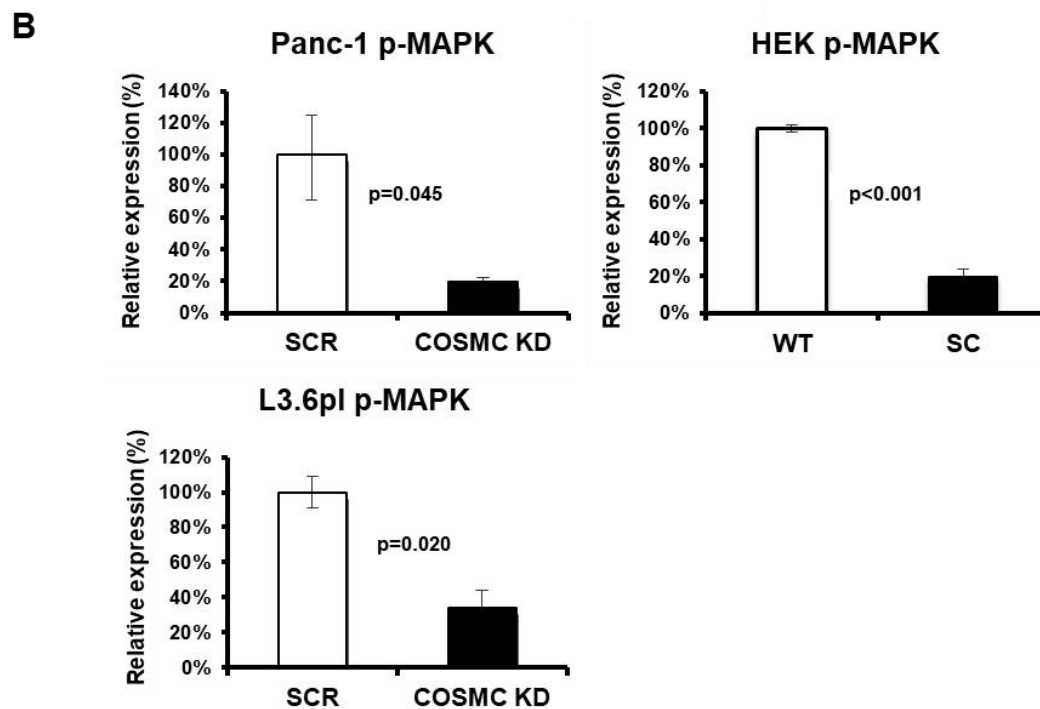
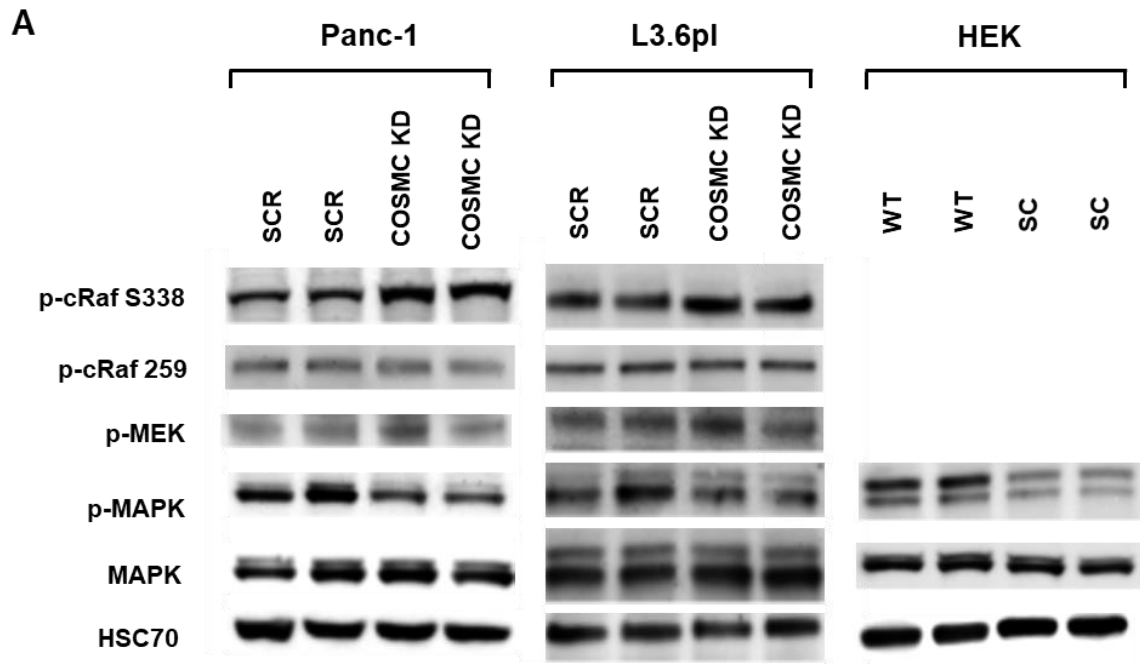


Abbildung 12: **Western-Blot-Analyse von Ras-Downstream-Substraten:** In Abb. 12 A werden Substrate mit den gezeigten Antikörpern in COSMC KD und SCR in Panc-1, L3.6pl und in SC und WT in HEK gezeigt. Abb. 12 B zeigt die relative Quantifizierung der p-MAPK-Expression. In Panc-1 und L3.6pl im *COSMC-Knockdown*, im HEK SC zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung verglichen zu den Kontrollen (p-Werte wie angegeben). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

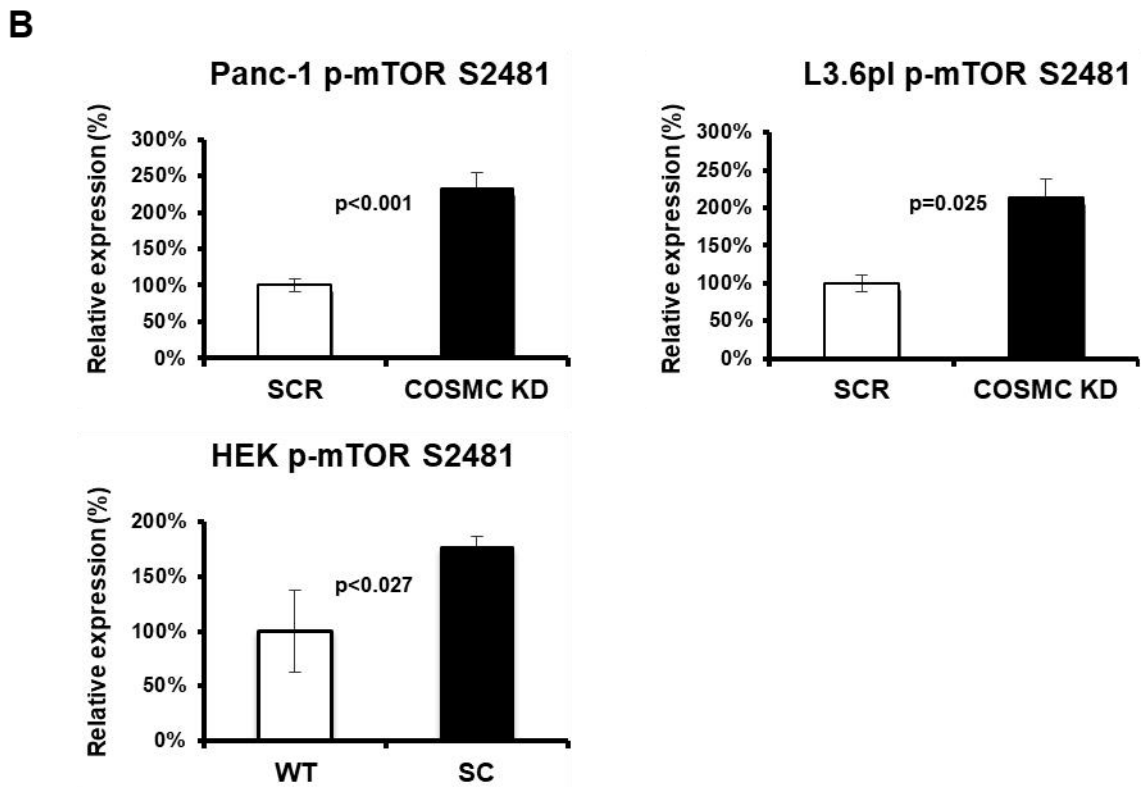
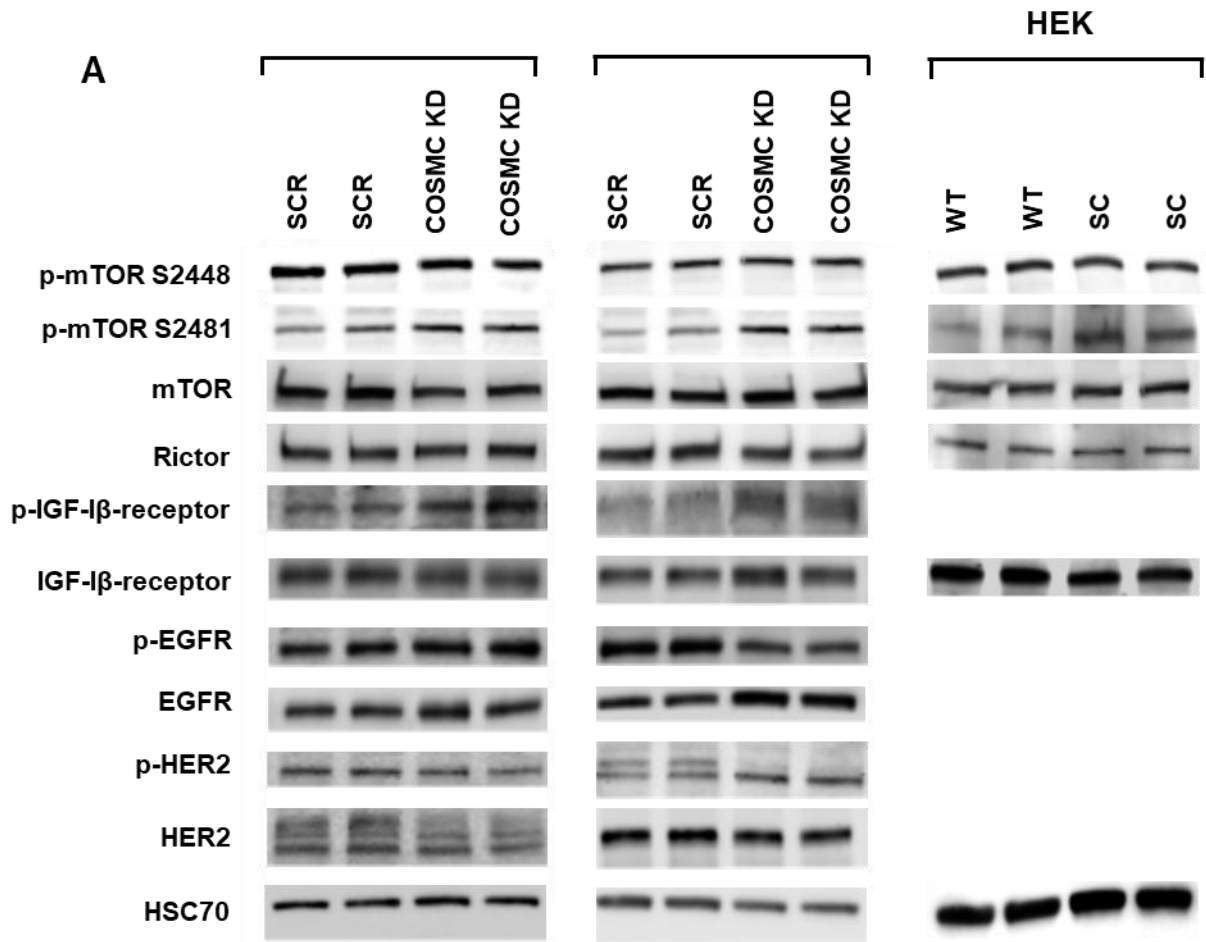
Es wurden auch RAF- und MEK-Phosphorylierung untersucht, da sie möglicherweise die verminderte MAPK vermitteln. Die Phosphorylierung der cRaf S338-Phosphorylierungsstelle

zeigte sich in Panc-1 erhöht, aber nicht in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen*. AKT-vermittelte hemmende Phosphorylierung von cRaf S259 wurde in Panc-1 nicht reguliert und wurde verringert oder unverändert in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* gesehen. P-MEK wurde in *COSMC-Knockdown-Zellen* nicht reguliert (siehe Abbildung 11). RAF und MEK zeigten keine konsequente unterschiedliche Phosphorylierung.

4.8 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung erhöht die Phosphorylierung am IGF-I-Rezeptor und die mTORC2-Aktivierung

Mehrere Rezeptoren sind bekannte Aktivatoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs. Hier wurden EGFR-, HER2- (EGFR2) und IGF-I-Rezeptor (IGF-I-R) Expressionen und Phosphorylierungen in *COSMC-Knockdown* und Kontroll-Zellen untersucht. In *COSMC-Knockdown-Zellen* ist die IGF-I β -Rezeptor-Phosphorylierung in Panc-1 um 219 % ($p = 0,007$) und in *L3.6pl-Zellen* um 156 % ($p < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (siehe Abbildung 13). Im p-HER2-Niveau konnte keine Regulierung in *COSMC-Knockdown-Zellen* festgestellt werden. Die EGFR-Phosphorylierung verringerte sich auf 30 % ($p = 0,005$) in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen*, wurde aber in Panc-1-Zellen nicht beeinflusst (siehe Abbildung 12). Somit deutet eine verstärkte IGF-I-R-Aktivität in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen daraufhin, eine verstärkte p-AKT Aktivierung zu verursachen. In HEK-SC, *COSMC-Knockdown-Panc-1*, *COSMC-Knockdown-L3.6pl* und jeweiligen Kontrollzellen konnte kein Unterschied in der Expression von IGF-I β -Rezeptor gesehen werden.

In *COSMC-Knockdown-Zellen* und HEK-SC zeigte sich im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen die mTOR S2448-Phosphorylierung nahezu unverändert. Die mTOR S2481-Phosphorylierung hingegen wurde zu 233 % ($p < 0,001$) in *Panc-1-COSMC-Knockdown*, bis zu 214 % ($p = 0,025$) in *L3.6pl-Zellen-COSMC-Knockdown* und bis 177 % ($p = 0,027$) in HEK-SC- gegenüber den Kontroll-Zellen gesehen (siehe Abbildung 13).



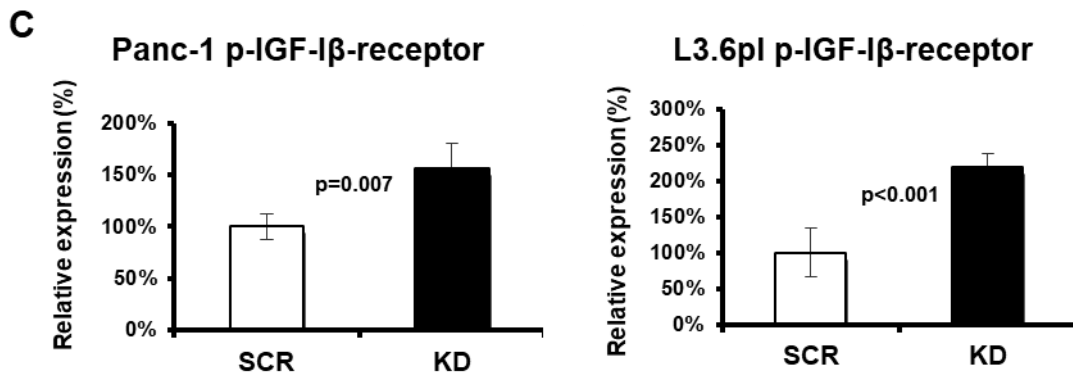


Abbildung 13: **Western-Blot-Analyse von *AKT-Upstream-Signalmolekülen***: In Abb. 13 A werden Substrate mit den gezeigten Antikörpern in COSMC-KD und SCR in Panc-1, L3.6pl und in SC und WT in HEK gezeigt. Antikörper wurden wie angegeben verwendet. p-IGF-Iβ-Rezeptor zeigte ein verbessertes Signal im COSMC KD im Vergleich zu SCR. In Abb. 13 B ist die relative Quantifizierung der p-mTOR S2481-Phosphorylierung in *Panc-1*-, *L3.6pl*-COSMC-Knockdown-Zellen und HEK SC im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen (p-Werte wie angegeben). Ein erhöhtes Signal ist bei p-mTOR S2481 in den *Panc-1*-, *L3.6pl*-COSMC-KD und HEK-SC zu finden. In Abb. 13 C ist p-IGF-Iβ-Rezeptor-Phosphorylierung als relative Quantifizierung in *Panc-1*- und *L3.6pl*-COSMC-Knockdown-Zellen und Kontrollen dargestellt (p-Werte wie angegeben). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

4.9 IGF-1- und EGF-Stimulationen verursachen unterschiedliche Veränderungen in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen

Die Bindung von IGF-1 an den IGF-I-Rezeptor und den Insulinrezeptor aktiviert den PI3K/AKT/mTOR und Ras/Raf/MAPK-Signalweg (Appleman *et al.*, 2012). Eine Stimulation mit IGF-1 von *COSMC-Knockdown-Zellen* zeigte im Vergleich zu den Kontrollen eine unterschiedliche Regulierung von Proteinen, die an PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalwegen beteiligt sind (siehe Tabelle 12, Abbildung 14 und Abbildung 15). Nicht alle Unterschiede in *COSMC-Knockdown-Zellen* ohne IGF-1-Stimulation zeigten sich auch nach der Behandlung mit IGF-1, jedoch bestätigten sich einige Unterschiede auch hoch signifikant.

Nach IGF-1-Stimulation zeigte sich die EGFR-Phosphorylierung in *Panc-1*-COSMC-Knockdown-Zellen um das 5,29-fache erhöht (p = 0,014). IGF-1-stimulierte *L3.6pl*-COSMC-Knockdown-Zellen zeigten eine erhöhte Expression von EGFR (152 %, p = 0,009), IGF-I-βR (215 %, p = 0,036), p-mTOR S2448 (181 %; p = 0,036) sowie von p-mTOR S2481 (526 %; p = 0,001).

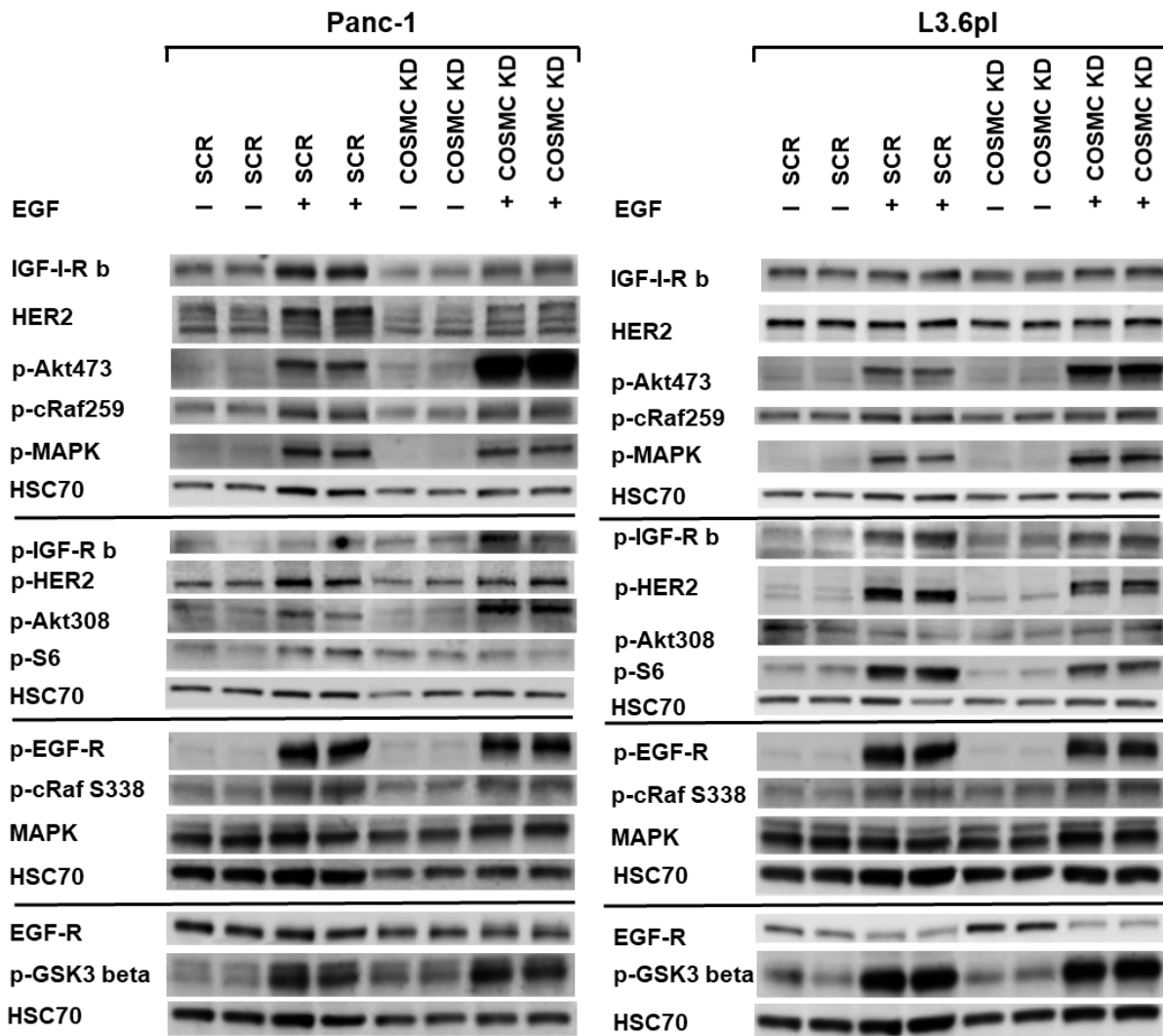


Abbildung 14: **Western Blot Analyse von *Panc-1*- und *L3.6pl*-COSMC-Knockdown und Kontrollen mit (+) und ohne (-) EGF-Stimulation:** Antikörper verwendet wie angegeben. In der Horizontalen unterschiedliche Western Blots. HSC70 als Ladekontrolle für jedes Experiment. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

Tabelle 12: ***Panc-1*- und *L3.6pl*-COSMC-Knockdown-Zellen und Kontrollen nach Behandlung mit IGF-1 und EGF:** *Panc-1*- und *L3.6pl*-COSMC-Knockdown-Zellen (COSMC KD) und Kontrollen (SCR) wurden mit IGF-1 oder EGF behandelt. Die Protein-Expression wurde für die angegebenen Proteine mit relativen Verhältnisse einschließlich ihrer p-Werte quantifiziert. Relative Verhältnisse werden für COSMC KD / SCR, COSMC KD + IGF-1 / SCR + IGF-1 und COSMC KD + EGF / SCR + EGF präsentiert. Verhältnisse und zugehörige p-Werte < 0,05 sind hervorgehoben.

Panc-1 IGF-1 stimulation										
Protein	SCR	SCR + IGF-1	p-value	COSMC KD	COSMC KD + IGF-1	p-value	Ratio COSMC KD / SCR	p-value	Ratio COSMC KD + IGF-1 / SCR + IGF-1	p-value
EGF-R	1 (±0.115)	1.470 (±0.413)	0.261	1.835 (±0.127)	1.763 (±0.157)	0.808	1.835	0.02	1.199	0.589
IGF-I-β-R	1 (±0.081)	2.072 (±0.311)	0.042	0.906 (±0.089)	1.401 (±0.117)	0.12	0.906	0.386	0.613	0.094
p-Akt308	1 (±0.085)	0.929 (±0.051)	0.418	0.495 (±0.210)	1.394 (±0.424)	0.04	0.495	0.087	1.394	0.322
p-Akt473	1 (±0.165)	26.734 (±0.474)	<0.001	6.217 (±0.006)	41.960 (±0.044)	<0.001	6.217	<0.001	1.570	0.232
p-cRAF259	1 (±0.153)	1.567 (±0.556)	0.22	1.324 (±0.058)	1.282 (±0.169)	0.826	1.324	0.108	0.818	0.633
p-EGF-R	1 (±0.206)	6.948 (±0.556)	0.005	1.362 (±0.005)	36.329 (±0.430)	<0.001	1.362	0.131	5.289	0.014
p-IGF-I-β-R	1 (±0.048)	6.183 (±0.097)	<0.001	3.128 (±0.028)	17.055 (±0.603)	0.009	3.128	<0.001	2.758	0.055
p-MAPK	1 (±0.030)	0.763 (±0.196)	0.233	0.562 (±0.733)	2.176 (±0.767)	0.062	0.562	0.487	2.853	0.08
p-m TOR2448	1 (±0.069)	0.685 (±0.356)	0.344	0.438 (±0.078)	0.788 (±0.195)	0.033	0.438	0.017	1.150	0.654
p-m TOR2481	1 (±0.168)	0.858 (±0.212)	0.534	1.278 (±0.003)	1.273 (±0.073)	0.947	1.278	0.046	1.484	0.093
p-S6	1 (±0.049)	1.649 (±0.029)	0.004	4.710 (±0.049)	2.555 (±0.253)	0.129	4.710	<0.001	1.549	0.093
L3.6pl IGF-1 stimulation										
EGF-R	1 (±0.026)	0.781 (±0.013)	0.009	1.634 (±0.318)	1.186 (±0.068)	0.355	1.634	0.106	1.518	0.009
IGF-I-β-R	1 (±0.372)	0.707 (±0.312)	0.483	1.472 (±0.090)	1.520 (±0.064)	0.712	1.472	0.049	2.151	0.036
p-Akt308	1 (±0.461)	0.924 (±0.031)	0.837	0.887 (±0.044)	1.130 (±0.079)	0.05	0.887	0.693	1.223	0.065
p-Akt473	1 (±0.281)	1.655 (±0.985)	0.461	1.983 (±0.085)	5.160 (±0.240)	0.012	1.983	0.004	3.117	0.098
p-cRAF259	1 (±0.011)	1.480 (±0.096)	0.02	0.599 (±0.063)	0.617 (±0.297)	0.904	0.599	0.013	0.417	0.118
p-EGF-R	1 (±0.063)	0.704 (±0.055)	0.038	0.304 (±0.029)	0.606 (±0.195)	0.019	0.304	0.005	0.861	0.433
p-IGF-I-β-R	1 (±0.042)	8.361 (±0.312)	0.003	1.802 (±0.042)	11.883 (±0.227)	0.001	1.802	<0.001	1.421	0.263
p-MAPK	1 (±0.091)	2.365 (±0.294)	0.025	0.341 (±0.100)	1.005 (±0.213)	0.007	0.341	0.02	0.425	0.154
p-m TOR2448	1 (±0.080)	1.000 (±0.185)	0.998	0.738 (±0.339)	1.812 (±0.128)	0.03	0.738	0.398	1.812	0.036
p-m TOR2481	1 (±0.105)	0.381 (±0.216)	0.068	2.143 (±0.240)	2.006 (±0.024)	0.743	2.143	0.025	5.264	0.001
p-S6	1 (±0.501)	1.372 (±0.038)	0.405	1.455 (±0.242)	1.139 (±0.457)	0.612	1.455	0.367	0.83	0.652

Panc-1 EGF stimulation										
Protein	SCR	SCR + EGF	p-value	COSMC KD	COSMC KD + EGF	p-value	Ratio COSMC KD / SCR	p-value	Ratio COSMC KD + EGF / SCR + EGF	p-value
EGF-R	1 (±0.074)	0.746 (±0.172)	0.195	1.282 (±0.129)	1.216 (±0.035)	0.64	1.282	0.116	1.630	0.037
HER2	1 (±0.146)	1.037 (±0.128)	0.813	0.794 (±0.110)	1.037 (±0.128)	0.681	0.794	0.251	0.737	0.102
IGF-I-β-R	1 (±0.025)	1.668 (±0.138)	0.021	0.992 (±0.182)	1.692 (±0.117)	0.044	0.992	0.955	1.014	0.92
MAPK	1 (±0.090)	0.819 (±0.064)	0.146	1.093 (±0.069)	1.258 (±0.022)	0.099	1.093	0.368	1.535	0.008
p-Akt308	1 (±0.207)	0.558 (±0.438)	0.326	0.675 (±0.456)	1.813 (±0.063)	0.035	0.675	0.455	3.250	0.019
p-Akt473	1 (±0.002)	3.403 (±0.034)	<0.001	2.527 (±0.073)	45.077 (±0.049)	<0.001	2.527	0.001	13.245	<0.001
p-cRAF259	1 (±0.051)	0.916 (±0.030)	0.183	0.870 (±0.210)	1.460 (±0.116)	0.057	0.87	0.484	1.594	0.02
p-cRAF338	1 (±0.304)	0.748 (±0.336)	0.514	1.954 (±0.041)	1.813 (±0.191)	0.171	1.954	0.048	2.423	0.027
p-EGF-R	1 (±0.497)	8.992 (±0.150)	0.002	1.914 (±0.072)	13.088 (±0.256)	<0.001	1.914	0.123	1.467	0.122
p-GSK3β	1 (±0.062)	2.773 (±0.143)	0.004	2.923 (±0.121)	6.630 (±0.196)	0.016	2.923	0.003	2.391	0.015
p-HER2	1 (±0.096)	1.369 (±0.033)	0.036	1.087 (±0.259)	1.731 (±0.191)	0.121	1.087	0.699	1.266	0.192
p-IGF-I-β-R	1 (±0.178)	0.729 (±0.342)	0.424	1.731 (±0.153)	2.046 (±0.311)	0.536	1.731	0.048	2.808	0.031
p-MAPK	1 (±0.022)	1.186 (±0.008)	0.008	0.262 (±0.519)	1.397 (±0.064)	0.007	0.262	0.183	1.178	0.06
p-S6	1 (±0.357)	0.760 (±0.091)	0.454	1.480 (±0.326)	1.065 (±0.030)	0.349	1.480	0.295	1.400	0.027
L3.6pl EGF stimulation										
EGF-R	1 (±0.269)	0.380 (±0.188)	0.116	2.161 (±0.393)	0.411 (±0.078)	0.104	2.161	0.075	1.081	0.628
HER2	1 (±0.003)	0.693 (±0.003)	n/a	0.784 (±0.054)	0.704 (±0.057)	0.208	0.784	0.029	1.017	0.713
IGF-I-β-R	1 (±0.102)	0.849 (±0.102)	0.278	1.037 (±0.041)	0.852 (±0.068)	0.086	1.037	0.681	1.003	0.975
MAPK	1 (±0.061)	0.663 (±0.207)	0.157	0.724 (±0.043)	1.058 (±0.211)	0.094	0.724	0.035	1.597	0.104
p-Akt308	1 (±0.364)	0.221 (±0.542)	0.234	0.330 (±0.133)	0.617 (±0.263)	0.053	0.330	0.134	2.797	0.052
p-Akt473	1 (±0.428)	4.495 (±0.206)	0.009	1.778 (±0.263)	19.391 (±0.028)	<0.001	1.778	0.16	4.314	0.002
p-cRAF259	1 (±0.003)	1.044 (±0.027)	0.147	1.024 (±0.082)	1.045 (±0.019)	0.765	1.024	0.72	1.000	0.989
p-cRAF338	1 (±0.213)	2.382 (±0.008)	0.012	1.359 (±0.240)	2.851 (±0.097)	0.027	1.359	0.255	1.197	0.104
p-EGF-R	1 (±0.087)	1.000 (±0.158)	0.997	0.373 (±0.105)	1.054 (±0.098)	0.003	0.373	0.023	1.055	0.718
p-GSK3β	1 (±0.449)	3.201 (±0.112)	0.026	1.118 (±0.218)	3.876 (±0.015)	0.005	1.118	0.687	1.211	0.136
p-HER2	1 (±0.008)	4.931 (±0.126)	<0.001	1.142 (±0.185)	4.305 (±0.091)	0.003	1.142	0.393	0.873	0.367
p-IGF-I-β-R	1 (±0.275)	3.549 (±0.003)	0.006	3.274 (±0.302)	4.078 (±0.004)	0.369	3.274	0.016	1.149	<0.001
p-MAPK	1 (±0.156)	2.572 (±0.343)	0.028	0.563 (±0.126)	5.258 (±0.119)	<0.001	0.563	0.091	2.044	0.056

Zusammenfassend ist die IGF-vermittelte EGFR-Phosphorylierung in aberranten O-GalNAc-Glykosylierten Zellen stärker als die IGF-R-Phosphorylierung erhöht.

EGFR vermittelte Aktivierung moduliert den MAPK-Signalweg in PDAC-Zellen, auch in Gegenwart von Mutierten K-RAS (Lee *et al.*, 2016b), so dass auch die EGF-Stimulation in *COSMC-Knockdown-Zellen* untersucht wurde. EGF-stimulierte *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* zeigten ein breites Spektrum erhöhter Signale im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg im Vergleich zu unbehandelten *COSMC-Knockdown-Zellen* (siehe Tabelle 12, Abbildung 13 und Abbildung 14). Verstärkte Signale wurden in EGF-stimulierte *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* für EGFR (163 %, $p = 0,037$), MAPK (154 %, $p = 0,008$), p-AKT T308 (325 %; $p = 0,019$), p-AKT S473 (1325 %, $p < 0,001$), p-cRAF S259 (159 %; $p = 0,02$), p-cRAF S338 (242 %; $p = 0,027$), p-GSK3 β (239 %, $p = 0,015$), p-IGF-I- β R (281 %; $p = 0,031$) sowie p-S6 (140 %; $p = 0,027$) gefunden. In L3.6pl Zellen erhöhte die EGF-Stimulation in *COSMC-Knockdown* die Phosphorylierung von AKT S473 (431 %; $p = 0,002$) und p-IGF-I-R (115 %; $p < 0,001$) im Vergleich zu unbehandelten *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen*. Obwohl eine deutliche Heterogenität unter den verschiedenen Zelllinie zu sehen ist, kann eine verstärkte p-AKT S473- und p-IGFR-Phosphorylierung in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen durch EGF-Stimulation beobachtet werden.

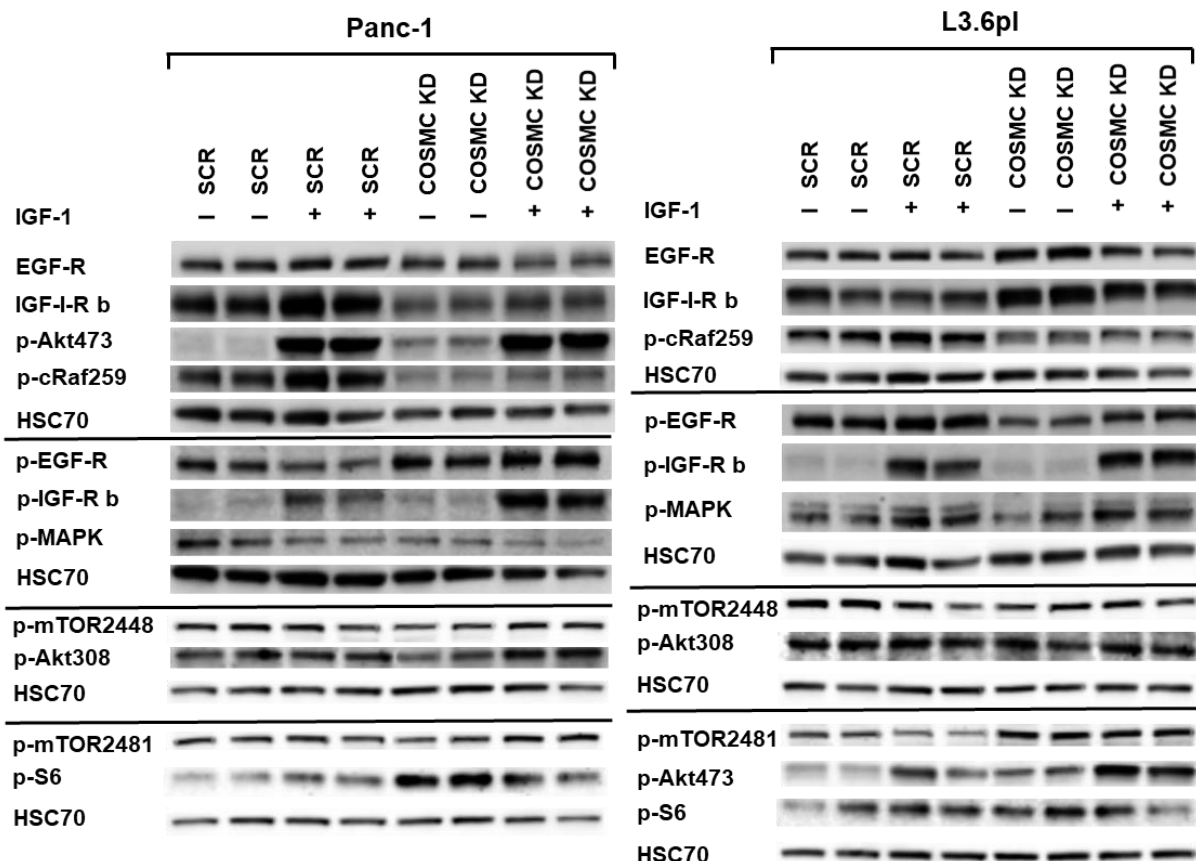


Abbildung 15: **Western Blot Analyse von *Panc-1*- und *L3.6pl*-*COSMC-Knockdown* und Kontrollen mit (+) und ohne (-) IGF-1-Stimulation:** Antikörper verwendet wie angegeben. In der Horizontalen unterschiedliche Western Blots. HSC70 als Ladekontrolle für jedes Experiment. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

4.10 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung vermittelt AZD8055-Resistenz von mTORC1 in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen*

Es wurde die mTOR-Aktivität in *COSMC-Knockdown-Zellen* unter Verwendung des mTOR-Inhibitor AZD8055 untersucht (Chresta *et al.*, 2010), um zu überprüfen, ob die aberrante O-GalNAc-Glykosylierung die hemmende Wirkung von AZD8055 beeinflusst.

In der Panc-1-Zelllinie wurde eine dosisabhängige Inhibition von p-mTOR S2448, p-mTOR S2481, p-AKT S473 und p-S6 beobachtet. Die anfänglich beobachteten Unterschiede der Phosphorylierungswerte (0 nM ADZ8055) wurden mit zunehmenden Inhibitor-Konzentrationen vermindert. Die Signalreduktion war in *COSMC-Knockdown-Zellen* und Kontrollen ähnlich (siehe Abbildung 17). Wie zu erwarten wurden p-AKT T308 und p-cRAF S259 nicht durch AZD8055 reguliert (siehe Abbildung 17, 18 und 19). Eine höhere Inhibitor-Konzentration von AZD8055 führte zu einer abnehmenden Phosphorylierung von p-MAPK in *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen*, jedoch nicht in Kontrollen (siehe Abbildung 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass AZD8055 in *Panc-1-COSMC-Knockdown* und Panc-1 SCR wirksam ist.

AZD8055 wurde auch in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* und Kontrollen getestet. In *L3.6pl-Zellen* war eine dosisabhängige Hemmung von p-mTOR S2481, p-AKT S473 und p-S6 zu beobachten. Interessanterweise wurde die mTOR S2448-Phosphorylierung in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* nicht reduziert (siehe Abbildung 16, 18 und 19), während *L3.6pl-SCR-Kontrollen* dosisabhängig gehemmt wurde (siehe Abbildung 16, 18 und 19). Wie bei der Panc-1-Zelllinie waren p-AKT T308 und p-cRAF S259 in der *L3.6pl-Zelllinie* nicht reguliert durch AZD8055 (siehe Abbildung 18 und 19). Mit ansteigender AZD8055-Konzentration blieb das p-MAPK-Signal in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht (siehe Abbildung 16).

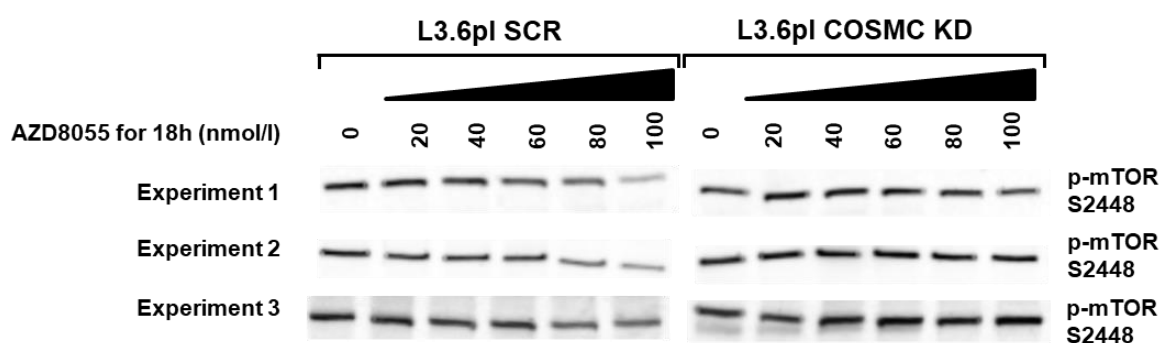


Abbildung 16: **Western Blot-Analyse von p-mTOR S2448 nach AZD8055-Behandlung in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen***: *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* und Kontrolle mit zunehmender Inhibitor-Konzentration von AZD8055 in drei unabhängigen Experimenten.

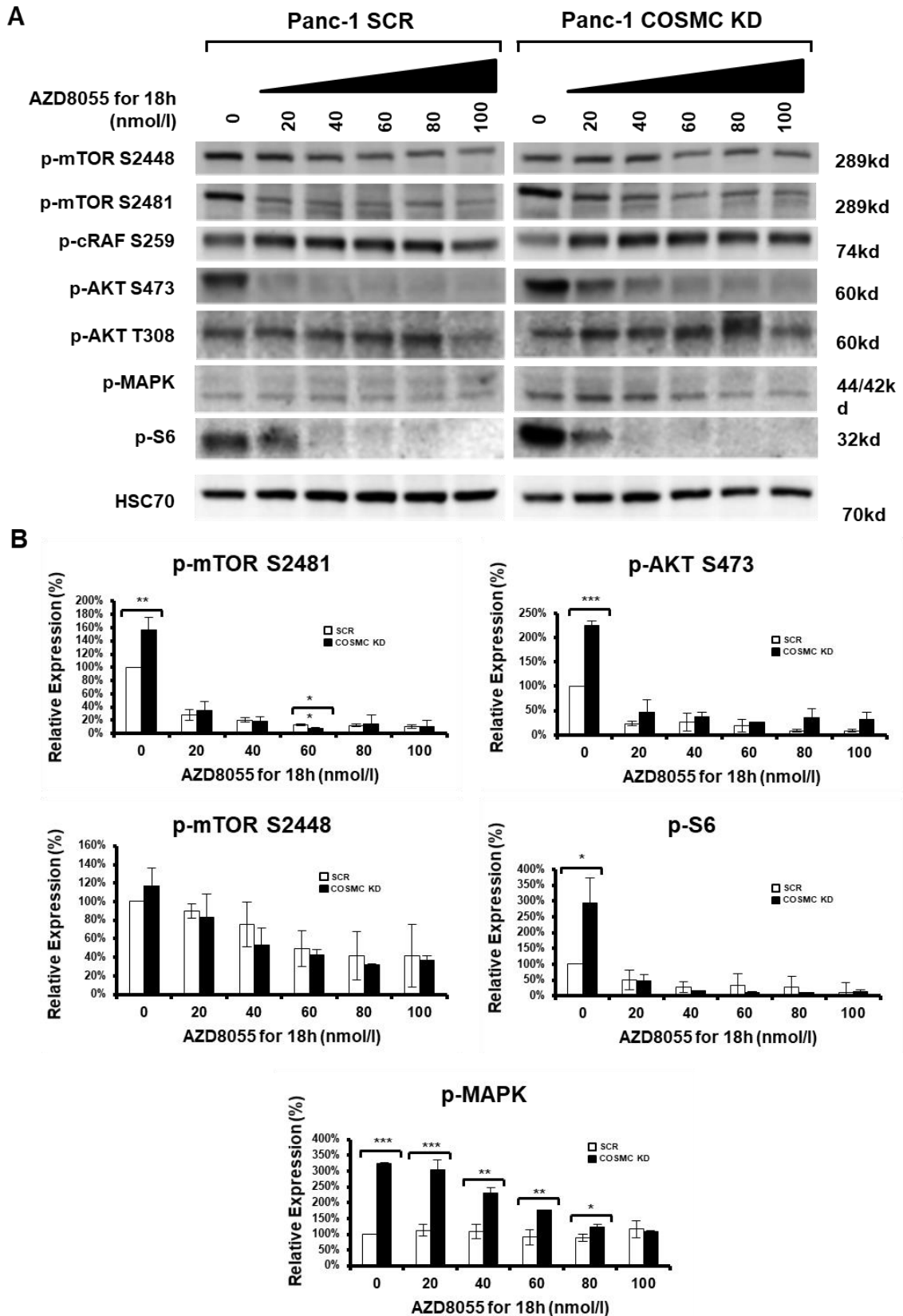


Abbildung 17: AZD8055 inhibiert mTOR und vermindert Aktivierung von mTOR *downstream-Substraten* in *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* und *Kontrollen*: In Abb. 16 A Western-Blot-Analyse von *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* (COSMC KD) und *Kontrollen* (SCR) behandelt mit AZD8055 für 18 Stunden. Die Erhöhung der AZD8055-Konzentrationen in (nmol/l) wie angegeben. p-mTOR S2481, p-mTOR S2448, p-AKT S473, p-MAPK und

p-S6 zeigen mit zunehmender Inhibitor-Konzentration verminderte Phosphorylierung. HSC70 dient als Ladekontrolle. In Abb. 16 B relative Quantifizierung der angegebenen Proteine in der Panc-1-Zelllinie mit steigenden Konzentrationen von AZD8055. P-Werte sind mit Sternchen angegeben (* = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

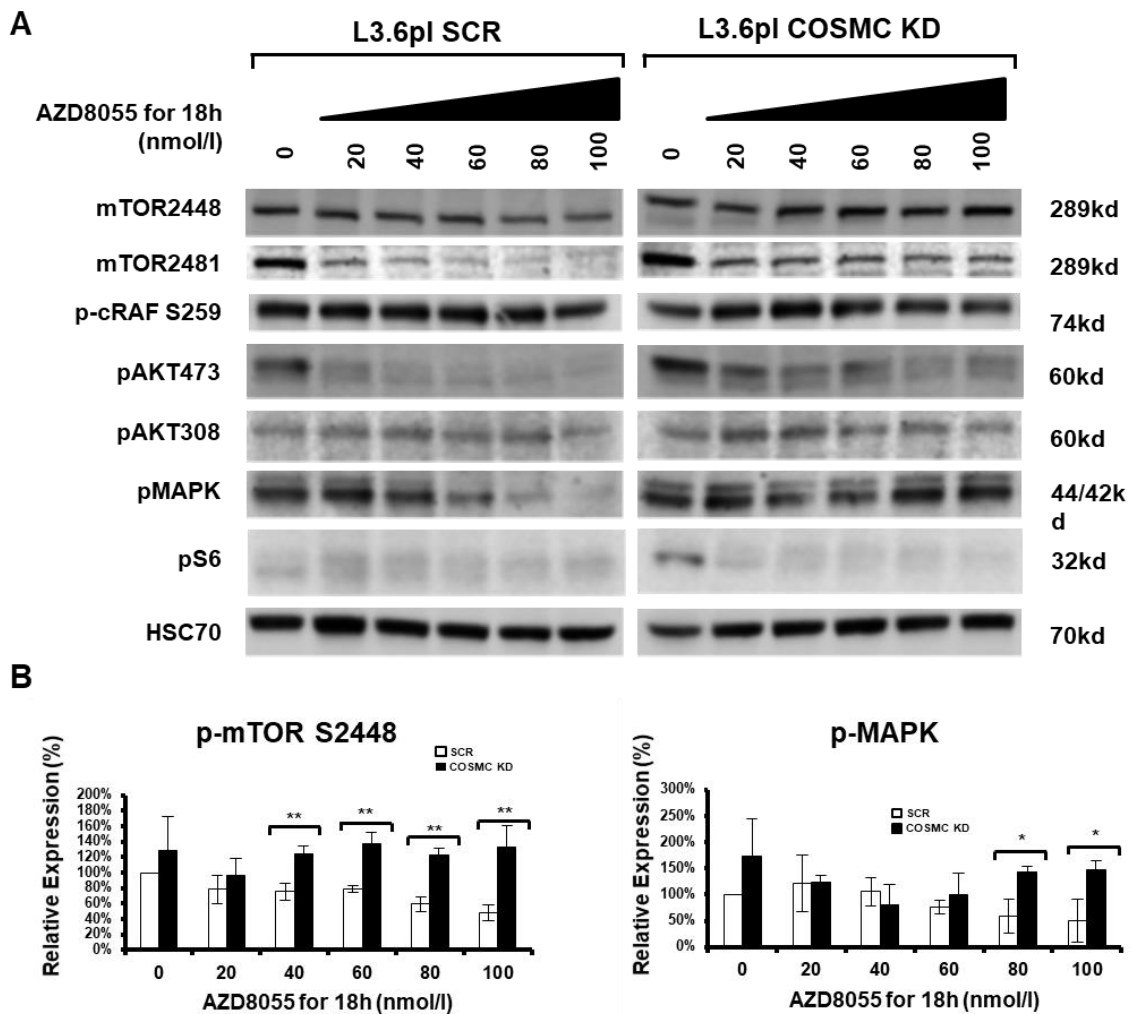


Abbildung 18: **Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung modifiziert die mTOR S2448 Phosphorylierung in L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen nach Behandlung mit mTOR-Inhibitor AZD8055:** In Abb. 17 A Western Blot-Analyse von *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* (COSMC KD) und Kontroll-Zellen (SCR), die mit AZD8055 behandelt wurden. Inhibitor-Konzentrationen und verwendete Antikörper wie angegeben. In Abb. 17 B relative Quantifizierung vom p-mTOR S2448 und p-MAPK mit steigenden Konzentrationen von AZD8055. p-Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (* entspricht $p < 0,05$; ** entsprechen $p < 0,01$). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

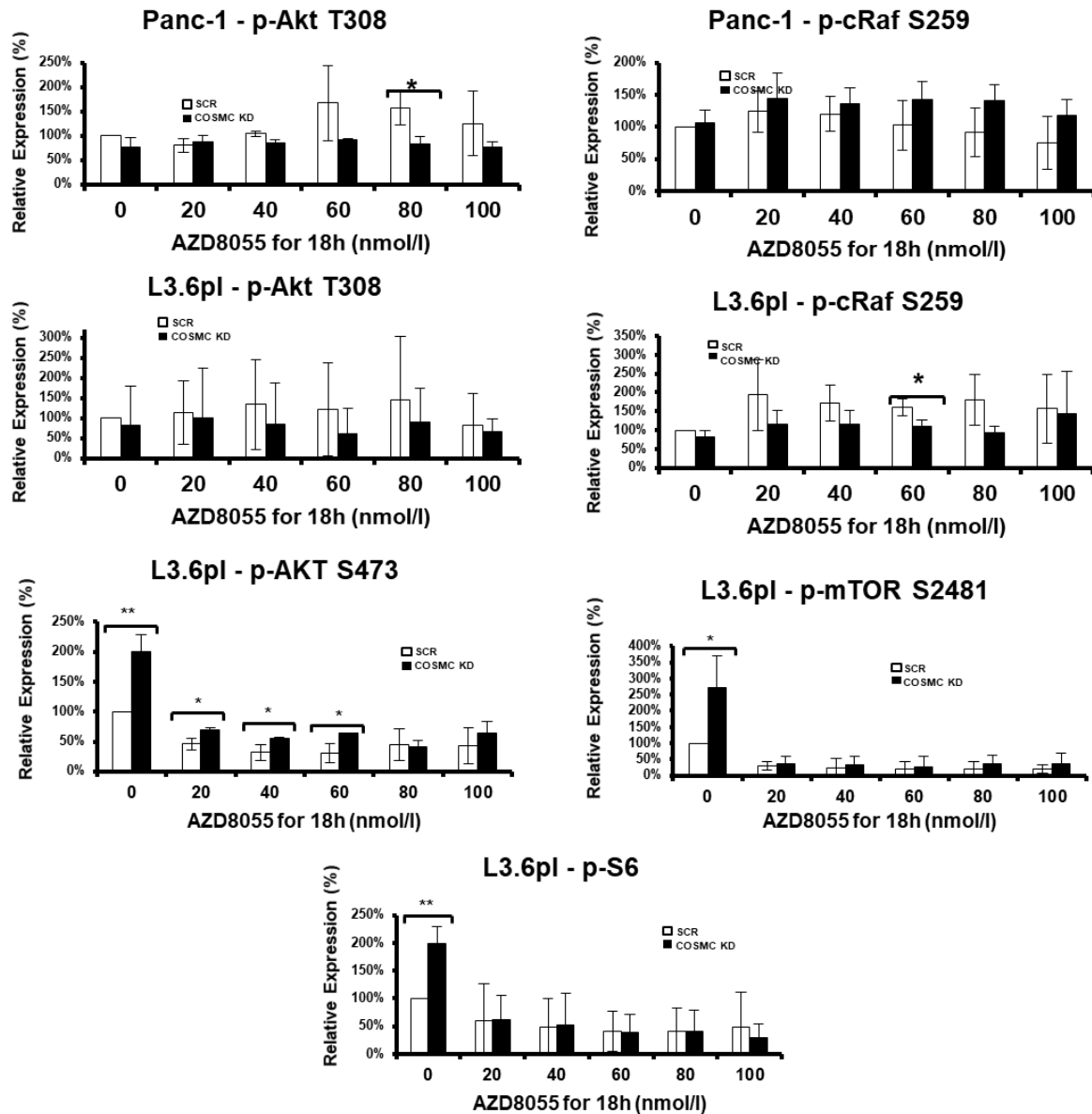


Abbildung 19: **Western Blot-Analyse nach Behandlung mit AZD8055 in Panc-1- und L3.6pl-Zelllinie:** In Panc-1-Zelllinie relative Quantifizierung nach Western Blot bei p-AKT 308, p-cRaf S259 beziehungsweise in L3.6pl-Zelllinie bei p-Akt S473, p-mTOR S2481, p-S6 jeweils in *COSMC-Knockdown-Zellen* und Kontrollen. Die Zelllinien wurden mit den angegebenen Konzentrationen des mTOR-Inhibitors AZD8055 behandelt. p-Werte sind mit Sternchen gekennzeichnet (* entspricht $p < 0,05$; ** entsprechen $p < 0,01$). Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

4.11 Verbesserte Expression von EMT-Markern in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen

In Vorarbeiten wurde bereits in aberranten O-GalNAc-glykosylierten PDAC eine verbesserte Migration beschrieben, die die EMT als molekularen Mechanismus ausgelöst werden kann (Hofmann *et al.*, 2015). Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit Marker, die auf EMT hindeuten, in O-GalNAc-glykosylierten überexprimierenden PDAC-Zellen untersucht. In *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* waren erhöhte S100A4- (2,43-fach; $p < 0,001$), ZEB1 (1,69-fach; $p < 0,001$) und SNAI2- Expressionen (1,74-fach; $p = 0,038$) verglichen zu den Kontrollen festzustellen. ZEB2- und TWIST1-Expressionen waren in Panc-1-Zellen nicht nachweisbar. P27 und N-Cadherin (NCAD) zeigten keinen Expressionsunterschied *Panc-1-COSMC-Knockdown-Zellen* im Vergleich zu Kontrollen (siehe Tabelle 13).

L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen zeigten eine erhöhte Expression von S100A4 (3,76-fach; $p = 0,004$), p27 (6,39-fach, $p < 0,001$), ZEB1 (6,30-fach, $p < 0,001$), TWIST1 (4,00-fach, $p = 0,006$), SNAI2 (4,50-fach, $p < 0,001$) und N-CAD (3,66-fach, $p = 0,008$). ZEB2 war in L3.6pl-Zellen nicht nachweisbar (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: **Darstellung von relativen mRNA-Expressionsniveaus von EMT-assoziierten Transkripten für Panc-1- und L3.6pl-Zelllinie in COSMC und Kontrollen: COSMC-Knockdown-Zellen (COSMC KD) und Kontrollen (SCR) unter Verwendung des $\Delta\Delta C_t$ -Verfahrens.** P-Werte werden für 3 unabhängige Experimente berechnet. P-Werte $< 0,05$ werden hervorgehoben. C_t -Werte > 40 haben eine hohe Unsicherheit und sind daher als nicht verfügbar (n/a) angegeben. Ergebnisse sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente.

Panc-1								
Gene transcript	SCR			COSMC KD			Ratio COSMC KD/SCR *	p-value
	Mean C_t	ΔC_t	SD	Mean C_t	ΔC_t	SD		
S100A4	23,84	3,57	0,01	21,48	2,29	0,02	2,43	<0.001
p27	33,01	12,74	0,15	31,61	12,42	0,03	1,24	0.150
ZEB1	29,42	9,15	0,00	27,59	8,40	0,01	1,69	<0.001
ZEB2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
TWIST1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
SNAI2	33,62	13,35	0,06	31,74	12,55	0,20	1,74	0.038
E-CAD	32,15	11,88	0,15	31,29	12,10	0,08	0,86	0.355
L3.6pl								
S100A4	32,35	13,81	0,22	30,90	11,90	0,10	3,76	0.004
p27	34,54	16,00	0,03	32,33	13,33	0,14	6,39	<0.001
ZEB1	33,52	14,98	0,13	31,33	12,33	0,00	6,30	<0.001
ZEB2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
TWIST1	30,50	11,96	0,32	28,96	9,96	0,08	4,00	0.006
SNAI2	27,72	9,18	0,07	26,02	7,01	0,05	4,50	<0.001
E-CAD	38,25	19,71	0,00	36,85	17,84	0,33	3,66	0.008

5 Diskussion

Im folgenden Abschnitt sollen die zuvor präsentierten Ergebnisse zur Thematik der Modulation vom PI3K/AKT/mTOR-, Ras/Raf/MAPK-Signalweg und von EMT durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung im Pankreaskarzinom im aktuellen wissenschaftlichen Kontext dargestellt und diskutiert werden.

5.1 Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung im PI3K/AKT/mTOR-, Ras/Raf/MAPK-Signalweg und EMT im Pankreaskarzinom

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung auf wichtige Zellsignalwege, die für die Entwicklung und den Fortschritt des Pankreaskarzinoms entscheidend sind, untersucht. Das Pankreaskarzinom hat eine sehr hohe Mortalität im Vergleich zu anderen Karzinomarten (Robert Koch Institut, 2015), weswegen neue wissenschaftliche Erkenntnisse und Therapieansätze wünschenswert sind. Der lentivirale *COSMC-Knockdown* und die CRISPR/Cas9-Methode zum *COSMC-Knockout* wurde benutzt, um die aberrante O-GalNAc-Glykosylierung in den Zelllinien zu erhöhen. Mit quantitativer Proteomik wurden unterschiedliche exprimierte Proteine im PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg in den aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen identifiziert. Unter den unterschiedlichen exprimierten Proteinen wurde auch AKT identifiziert. Bei der Analyse von AKT wurde in aberranten O-GalNAc-glykosylierten PDAC-Zellen eine starke Zunahme der AKT S473-Phosphorylierung gefunden. Dadurch entstand die Frage auf, ob AKT durch eine noch unbekannte O-GalNAc-Modifikation direkt reguliert wird und dadurch eine starke Erhöhung der Phosphorylierung verursacht wird. Tatsächlich konnten wir eine unbekannte O-GalNAc-Modifikation von AKT1 und AKT2 nachweisen. Weitere Signalweganalysen ergaben, dass die aberrante O-GalNAc-Glykosylierung auch mit der Aktivierung von *AKT-upstream-* und *downstream-Effektoren* wie S6, GSK-3 β , IGF-I-Rezeptor und mTORC2 assoziiert ist. Im Ras/Raf/MAPK-Signalweg ergaben zudem weitere Signalweganalysen, dass in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen eine Abnahme der MAPK-Phosphorylierung zu beobachten ist. Insgesamt zeigt sich ein aktivierender Effekt im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg bei gleichzeitiger Hemmung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges. Darüber hinaus wurde der mTOR-Inhibitor AZD8055, ein potenter kompetitiver Inhibitor von ATP der mTOR-Kinase-Aktivität (Chresta *et al.*, 2010), in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen untersucht. In der Literatur findet sich bereits durch mTOR-Inhibition im Mausmodell des PDAC ein Proliferationsarrest und eine Tumor-Regression (Morrán *et al.*, 2014), weswegen eine mTOR-Inhibition ein interessantes therapeutisches Ziel darstellen könnte.

Interessanterweise wurde in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen*, die mit AZD8055 behandelt wurden, keine Abnahme von p-mTOR S2448, ein Marker für die mTORC1-Aktivität, beobachtet, während in *L3.6pl-Kontrollzellen* eine deutliche Abnahme von p-mTOR S2448 zu sehen war. Diese Daten deuten auf Arzneimittelresistenz durch aberranten O-GalNAc-Glykosylierung hin und müssen in weiteren Studien eingehender untersucht werden, da durch O-GalNAc-Glykosylierung vermittelte Resistenzen einen entscheidenden Einfluss auf die Planung zukünftiger Therapieregime haben kann. Der Einfluss von aberranten O-GalNAc-Glykosylierung auf EMT-Marker-Expression wurde ebenfalls betrachtet, da AKT eng mit EMT-Prozessen verknüpft ist (Galvan *et al.*, 2015) und dies einen wichtigen Schritt in der Entwicklung des Pankreaskarzinomes darstellt. Dabei wurde eine verbesserte Expression von EMT-assoziierten Transkripten in *COSMC-Knockdown-Zellen* gefunden.

Zusammenfassend zeigt die aberrante O-GalNAc-Glykosylierung einen starken insgesamt eher aktivierenden Einfluss auf Schlüsselsignalwege wie PI3K/AKT/mTOR und Ras/Raf/MAPK. Dieser Einfluss der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung stellt demnach eine weitere wichtige zelluläre Komponente dar, die bei der tumorfördernden Aktivität von PDAC-Zellen zukünftig Berücksichtigung finden sollte.

5.2 Wie und wo könnte AKT O-GalNAc glykosyliert werden?

Zytoplasmatische Proteine gelten bislang als nicht O-GalNAc-glykosyliert. Nur Proteine, die den sekretorischen Weg über ER und Golgi nehmen, sind bislang als O-GalNAc-glykosyliert bekannt und nehmen auf der Zelloberfläche unter anderem Aufgaben in der Zell-Zell-Kommunikation, Zell-Adhäsion, Migration, Signaltransduktion und Immunvermittlung wahr (Varki *et al.*, 2009). Im ER sind früh auftretende Glykosylierungen zudem für Proteinstabilität, Zielsetzung der Proteine und Qualitätskontrolle im ER essentiell (Hoseki *et al.*, 2010, Kollmann *et al.*, 2010). Da wir einen starken Anstieg der AKT Phosphorylierung in aberrant O-GalNAcglykosylierten Zellen nachweisen konnten, stellte sich die Frage, ob es einen direkten oder indirekten Einfluss der aberranten O-GalNAc-Glykosylierung auf AKT als zytoplasmatisches Protein gibt.

Für die zytoplasmatische O-GalNAc-Glykosylierung sind zwei Szenarien möglich. Entweder befindet sich AKT im Endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat, wo es glykosyliert und zum Zytoplasma transportiert wird oder die AKT O-GalNAc-Glykosylierung findet im Zytoplasma statt. Einer der Erklärungsansätze ist, dass AKT co- oder posttranslational zum ER transportiert wird und dort dann die O-GalNAc-Glykosylierung erhält. Signalmoleküle an Proteinen ermöglichen cotranslational einen zellulären Transport zu Zellorganellen, zur

Zellmembran, zu unterschiedlichen intrazellulären Membranen oder auch eine Sekretion außerhalb der Zelle (Saraogi und Shan, 2011). Der Proteintransport von AKT zum ER/Golgi könnte über eine angehängte Polypeptid-Kette, die als Signalmolekül fungiert, ermöglicht werden (Stefanovic und Hegde, 2007). Andere Signalmoleküle sind in der Primärstruktur des Proteins getrennt und nicht funktional und werden erst im gefalteten Zustand in der Quartärstruktur als Signalmolekül aktiv (Aviram und Schuldiner, 2017). Da in der AKT Sequenz jedoch keine Signalmoleküle in Form einer Signal-Peptid-Sequenz oder im gefalteten AKT in der Quartärstruktur bekannt sind, wäre eine weitere Erklärung wahrscheinlicher. AKT könnte nämlich in das Lumen des ER als Pre-Protein ohne die Notwendigkeit einer Signalpeptidsequenz transportiert werden. Dies ist bereits für kurze Pre-Proteine bekannt, die gezielt posttranslational aus dem Zytoplasma in das ER lokalisiert werden können (Segev, 2010).

Alternativ zur Glykosylierung in ER und Golgi könnte AKT im Zytoplasma O-GalNAc glykosyliert werden. Dies wäre möglich, wenn GalNAc-Transferasen sich nicht ausschließlich in ER/Golgi befinden und somit auch zytosolische Proteine modifizieren könnten. Bisher wurden GalNAc-Transferasen nur im Golgi und/oder ER untersucht und gefunden (Gill *et al.*, 2011). Es gibt jedoch Hinweise, dass GalNAc-Transferasen im Zytoplasma Funktionen haben können (Gerken *et al.*, 2011). Die Daten in dieser Arbeit unterstützen die These, dass es lösliche Formen von GalNAc-Transferasen gibt, die O-GalNAc-Glykosylierung im Zytoplasma katalysieren können (siehe Abbildung 5). Eine Isoform-Analyse aller bekannten 20 menschlichen GalNAc-Transferasen (GalNT) ergab, dass bei den Isoformen-2 von GalNT2-, GalNT9-, GalNT10- und GalNT12-Transmembran-Domänen fehlen, die die GalNTs in der ER/Golgi-Membran verankern würden. Gleichzeitig enthalten die Isoformen-2 beide Domänen, die notwendig für die O-GalNAc-Glykosylierung sind. Zusätzlich haben die Spleißvarianten von GalNT4 und GalNT17 sowie die Isoform 4 von GalNT14 eine veränderte Aminosäuresequenz im Transmembranen Bereich. Falls die Veränderung der Aminosäuresequenz die Verankerung in der Membran stört, könnten diese GalNTs also auch in löslichen Formen im Zytosol vorliegen. Prinzipiell ist eine Übertragung von O-GalNAc im Zytosol möglich, da gezeigt werden konnte, dass rekombinante GalNAc-Transferasen, die als lösliche Proteine exprimiert werden, die O-GalNAc-Übertragung katalysieren (Gerken *et al.*, 2011).

Dass GalNTs einen relevanten Einfluss auf das Tumorgeschehen haben, wurde in mehreren Arbeiten bereits beschrieben (Chugh *et al.*, 2016). Eine verringerte Expression von GALNT2 konnte im Zusammenhang mit verstärkter Gefäßinvasion und früheren Tumorrezidiven im HCC durch Inhibierung von Liganden induzierter Endozytose und Modulation von *downstream* Substraten von EGFR und damit dem AKT/PI3K/mTOR-Signalweg gefunden werden (Wu *et*

al., 2011). Im Magenkarzinom wird zudem eine erhöhte GALNT2-Expression mit verringerter MMP-2- und TGF- β 1-Expression assoziiert (Hua *et al.*, 2012) und eine erhöhte GALNT10-Expression mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht (Gao *et al.*, 2013). Zudem sind Mutationen von Glykosyltransferasen im Kolonkarzinom in GALNT12 gefunden worden. Zwei somatische Mutationen und sechs Keimbahnmutationen von GALNT12 führen im Kolonkarzinom zu einer verstärkten O-GalNAc-Glykosylierung (Guda *et al.*, 2009).

Letztendlich konnten tatsächlich in der vorliegenden Arbeit die GalNAc-Transferasen (GALNT2, GALNT4, GALNT9, GALNT12), die eine fehlende Transmembran-Domäne vorweisen oder eine mögliche Veränderung im transmembranären Bereich aufzeigen, im Zytosol nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass einige GalNAc-Transferasen löslich sind und die O-GalNAc-Glykosylierung von AKT direkt im Zytoplasma katalysieren können. Offen bleibt weiterhin, welche spezifische GalNAc-Transferase eine O-GalNAc-Glykosylierung von AKT oder O-GalNAc-Glykosylierung an Proteinen im Zytosol ermöglicht und soll in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

5.3 Einfluss aberranter O-GalNAc-Glykosylierung auf die AKT Kinaseaktivität

AKT reguliert wichtige zelluläre Prozesse wie Zellüberleben, Proliferation, Glukosemetabolismus, Zellmigration und Metastasierung durch Phosphorylierung von *downstream* Substraten. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass aberrante O-GalNAc-Glykosylierung mit einer erhöhten Phosphorylierung und einer reduzierten Kinasefunktion von AKT im PDAC assoziiert ist. Eine gesteigerte Phosphorylierung wurde in dieser Arbeit an Ser473 gefunden. Phosphorylierung von Thr308 und Ser473 sind prinzipiell für die vollständige Aktivierung von AKT notwendig (Alessi *et al.*, 1996). Maximale Aktivierung von AKT erfordert insbesondere die Phosphorylierung Ser473 im C-terminalen Anteil von AKT. Am AKT sind neben Thr308 und S473 noch zahlreiche weitere Phosphorylierungsstellen bekannt (Manning und Toker, 2017).

Eine weitere Regulationsmöglichkeit der AKT-Kinase-Aktivität ist durch verschiedene posttranslationalen Modifikationen (PTM) (Risso *et al.*, 2015). So verstärkt beispielsweise O-GlcNAc-Glykosylierung (β -N-acetylglucosamine-Glykosylierung) von T430 und T479 die AKT-Aktivität, während O-GlcNAc-Glykosylierung von T305, T312 und S473 eine hemmende Wirkung auf die AKT-Aktivität zeigt (Risso *et al.*, 2015).

In Überexpressions- oder Inhibitionsversuchen von O-GlcNAc-Transferasen konnte bereits gezeigt werden, dass eine erniedrigte Phosphorylierung von Thr308, eine Blockade der

Bindung von PDK1 an AKT vermittelt und dadurch eine erhöhte Insulinresistenz zu beobachten ist (Chan *et al.*, 2014, Vosseller *et al.*, 2002). Eine verminderte Phosphorylierung von Thr308 wird dabei durch GlcNAc-Glykosylierung von Thr305 und Thr312 vermittelt (Yang *et al.*, 2008). In weiterführenden Untersuchungen könnte also analog zur O-GlcNAc-Glykosylierung der Einfluss einer O-GalNAc-Glykosylierung auf die AKT-Kinase-Aktivität untersucht werden.

Am humanen EGFR sind des Weiteren an Ser-, Thr und auch Tyr-Resten O-GlcNAc-Modifikationen als auch an selbigen Residuen Phosphorylierungen bekannt. Dieses Zusammenspiel von Phosphorylierung und O-GlcNAc-Modifikation an gleichen oder benachbarten Ser-/Thr-Residuen wird als Yin-Yang-Hypothese bezeichnet, und die Wechselwirkungsstellen werden entsprechend als Yin-Yang-Stellen bezeichnet (Kaleem *et al.*, 2009). Durch Glykosylierung könnte somit eine negative Regulierung der Kinaseaktivität am EGFR oder auch am AKT durch PTMs vermittelt werden (Wang *et al.*, 2012). Durch O-GalNAc-Modifikation am AKT können entsprechend dieser Hypothese die Veränderungen der Phosphorylierung und Kinase-Aktivität an Ser473 AKT erklärt werden.

Die funktionelle Bedeutung und das Zusammenspiel der O-GalNAc-Glykosylierung an AKT und somit potentiell an anderen intrazellulären Proteinen ist bislang völlig ungeklärt und nicht beschrieben. In einer theoretischen Analyse mit NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013) können 9 Serin und 12 Threonin in AKT1 als möglicherweise O-GalNAc-glykosyliert prognostiziert werden. Unter diesen sind an AKT T92, S124, S129, T450 und S473 zuvor als Phosphorylierungsstellen mit aktivierender oder stabilisierender Wirkung auf die Kinaseaktivität berichtet worden (Risso *et al.*, 2015). Im Gegensatz zur Aktivierung durch Phosphorylierung kann O-GalNAc-Modifikation offenbar an Ser473 oder in der Nähe des Ser473-Residuums auftreten und eine hemmende Wirkung auf die Kinase-Aktivität vermitteln, was die Daten in der vorliegenden Arbeit auch unterstützen. Dies deutet auf eine Konkurrenz der O-GalNAc-Glykosylierung und Phosphorylierung an S473 entsprechend der Yin-Yang-Hypothese hin. Es ist zudem anzunehmen, dass nur spezifische Seitenketten von Proteinen und somit auch AKT mit einer begrenzten Anzahl Glykanstrukturen glykosyliert werden (Hanisch und Breloy, 2009). Zusammenfassend kann folglich die O-GalNAc-Glykosylierung direkt mit anderen PTMs auf der gleichen Aminosäure konkurrieren oder indirekt in unmittelbarer Nähe PTMs modifizieren, wodurch wiederum die Kinaseaktivität reguliert wird. Ob andere, AKT-aktivierende-Phosphorylierungsstellen, wie T92, S124, S129 oder T450, eine O-GalNAc-Modifikation enthalten, ist bislang noch ungeklärt und soll in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

5.4 O-GalNAc-Modifikationen am EGF- und IGF-1-Rezeptor

Durch die Wechselwirkung der Phosphorylierungsstellen und O-GalNAc-Modifikationen kann trotz erhöhter Phosphorylierung eine geringere AKT-Kinase-Aktivität in O-GalNAc überexprimierenden Zellen erklärt werden. Für die erhöhte AKT-Phosphorylierung am Ser473 im *COSMC-Knockdown* kann am ehesten im AKT/PI3K/mTOR-Signalweg *upstream* gelegene O-GalNAc-Modifikationen angenommen werden. O-GalNAc-Modifikationen auf Rezeptorebenen werden in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht. Am EGFR und IGF-1 Rezeptor konnten jedoch bereits im Tumorkontext durch O-GalNAc-Glykosylierung hervorgerufene Beeinflussungen am PI3K/AKT/mTOR-Signalweg beschrieben werden (Huang *et al.*, 2015).

Durch eine GALNT1- und GALNT2-Überexpression wird, ähnlich zum *COSMC-Knockdown*, eine erhöhte Tn-Antigen-Expression-Rate und verstärkte O-GalNAc-Glykosylierung in Zelllinien erzielt. Auf Rezeptor Ebene ist beim EGFR durch *GALNT1-Knockdown* im HCC eine verringerte EGF-Phosphorylierung und damit verringerte PI3K/AKT/mTOR-Signalweg-Aktivierung beschrieben (Huang *et al.*, 2015). Im oralen Plattenepithelkarzinom konnte durch die Überexpression der GALNT2 eine EGF-induzierte gesteigerte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und eine konsekutiv gesteigerte AKT-Phosphorylierung induziert werden. Durch eine gesteigerte Signalstärke im Western Blot des EGFR nach Inkubation mit *vicia villosa lectin* (O-GalNAc-bindend) ist eine O-GalNAc-Modifikation des EGFR sehr wahrscheinlich. Insgesamt zeigten die GALNT2 überexprimierende Zellen zudem eine vermehrt Migration und eine gesteigertes invasives Wachstum (Lin *et al.*, 2014). Dies deckt sich mit vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, in der die verstärkt O-GalNAc exprimierenden Pankreaskarzinomzelllinien gesteigerte Migration zeigten (Hofmann *et al.*, 2015).

Im Neuroblastom ist eine O-GalNAc-Modifikation zudem am IGF-1-Rezeptor bekannt. Durch eine GALNT2-Überexpression im Neuroblastom konnte eine IGF-1-vermitteltes Zellwachstum, Migration und Invasion vermindert werden, wohingegen ein *GALNT2-Knockdown* die IGF-1-vermittelten Phänotypen verstärkt (Ho *et al.*, 2014). Durch die O-GalNAc-Glykosylierung des IGF-1R konnte eine verstärkte IGF-induzierte IGF-1R α -Dimerisierung und damit verstärkte Aktivierung von p-AKT und p-MAPK beobachtet werden. Analog könnten auch die in dieser Arbeit verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung auf Rezeptorebene reguliert werden. Tatsächlich konnte auch in dieser Arbeit eine erhöhte p-IGF-1R-Phosphorylierung in den Pankreaskarzinomzelllinien festgestellt werden. Die erfassten, erhöhten Phosphorylierungen an Tyr1131, Tyr1135 und Tyr1136 am IGF-1R befinden sich an Residuen mit Kinasefunktion. Durch Autophosphorylierung kann die Kinase Funktion und weiter *downstream* im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg mTOR2481 und AKT

phosphoryliert und aktiviert werden. Durch die mutmaßliche O-GalNAc-Modifikation am IGF-1R kann damit eine erhöhte mTOR2481 und AKT Ser473 erklärt werden. Durch Verwendung einer theoretischen Analyse mit NetOGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013) konnte weder am IGF-1R noch am EGFR an den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phosphorylierungsstellen eine O-GalNAc-Glykosylierung vorhergesagt werden. IGF-R und EGFR enthalten jedoch zahlreiche andere potentielle O-GalNAc-Glykosylierungsstellen, die eine Modifikation der Kinasefunktion der Rezeptoren erklären können.

Um die Modifizierungen auf Rezeptorebene an EGFR und IGF-1R, PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg-Substraten weiter zu differenzieren, wurde eine IGF-1- und EGF-Stimulation an den Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt. Viele Unterschiede in *COSMC-Knockdown-Zellen* ohne IGF-1- beziehungsweise EGF-Stimulation verminderten sich nach der Behandlung mit der jeweiligen Stimulanz. Dieses Phänomen deutet auf einen Ceiling-Effekt der Aktivierung hin. Bei diesem Effekt ist trotz Dosissteigerung der Stimulanz der maximale Wirkungseintritt bereits erreicht. Unterschiede waren jedoch trotzdem feststellbar. Obwohl eine deutliche Heterogenität unter den verschiedenen Zelllinien zu sehen ist, kann eine verstärkte p-AKT S473- und p-IGF-1R-Phosphorylierung in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen durch IGF-1- und EGF-Stimulation beobachtet werden. Diese Daten unterstützen eine mögliche O-GalNAc-Modifikation am IGF-1R und EGFR in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien.

5.6 O-GalNAc vermittelte Arzneimittelresistenz

Der mTOR-Inhibitor AZD8055, ein kompetitiver ATP Inhibitor (Chresta *et al.*, 2010), wurde ebenfalls in dieser Arbeit in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen untersucht. In der Panc-1 Zelllinie wurde eine dosisabhängige Inhibition von p-mTOR S2448, p-mTOR S2481, p-AKT S473 und p-S6 beobachtet. Die anfänglich beobachteten Unterschiede der Phosphorylierungswerte (0 nM ADZ8055) wurden mit zunehmender Inhibitor-Konzentration vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass AZD8055 in *Panc-1-COSMC-Knockdown* und Panc-1 SCR wirksam ist. Interessanterweise wurde in *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen*, die mit AZD8055 behandelt wurden, keine Abnahme von p-mTOR S2448, ein Marker für die mTORC1-Aktivität, beobachtet, während in L3.6pl-Kontrollzellen eine deutliche Abnahme von p-mTOR S2448 zu sehen war. Die Resistenz blieb auch unter einer steigenden Inhibitor-Konzentration bestehen. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da eine aberrante O-GalNAc-Glykosylierung die Wirksamkeit eines Medikamentes auf sein Zielproteins beeinflussen könnte.

Bei anderen Glykosylierungen, wie die Fucosylierung oder Sialylierung, sind Beeinflussungen von Arzneimittelresistenzen bereits zahlreich bekannt. Beispielsweise moduliert die N-Glykan Fucosylierung die EGF-Rezeptor-Aktivität und die Empfindlichkeit für Kinase-Inhibitoren (Matsumoto *et al.*, 2008). Zudem erhöht eine verbesserte Sialylierung des EGF-Rezeptors beispielsweise die Gefitinib-Resistenz (Park *et al.*, 2012). Auch im Zusammenhang mit einer O-GalNAc-Glykosylierung sind Arzneimittelbeeinflussungen beschrieben. Im kolorektalen Karzinom konnte bereits durch eine retrospektive Studie gezeigt werden, dass eine Überexpression von GALNT14 mit ungünstigeren Gesamtüberleben bei Patienten mit Zustand nach kurativer Operation und adjuvanter Oxaliplatin-basierte Chemotherapie assoziiert ist (Very *et al.*, 2018). Bei einer GALNT14-Überexpression wird eine verstärkte O-GalNAc-Glykosylierung im kolorektalen Karzinom beobachtet. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine verstärkte O-GalNAc-Glykosylierung mit einer verminderten Oxaliplatin Sensitivität im kolorektalen Karzinom und mit einer verstärkten Migration und invasiven Wachstumsverhalten einhergeht (Very *et al.*, 2018). Eine Inhibitor-Resistenz durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung wurde jedoch bislang nicht vorher veröffentlicht, scheint durch die eben genannten Daten jedoch nicht abwegig.

5.7 Gesteigerte Expression von EMT-Markern im Kontext von O-GalNAc-Modifikationen

Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) beschreibt eine Veränderung bei dem neoplastische Epithelzellen mesenchymale Eigenschaften erlangen, wodurch ihre Fähigkeit zur Migration, Invasion und Resistenz gegen Apoptose deutlich gebessert wird (Krantz *et al.*, 2012). EMT ist ein wichtiger Prozess für die Progression im PDAC (Galvan *et al.*, 2015). Hierbei beeinflusst auch der AKT-Signalweg EMT und die Aggressivität eines Tumors (Larue und Bellacosa, 2005). Deswegen wurden in dieser Arbeit auch EMT-Marker in aberranten O-GalNAc-glykosylierten Zellen untersucht. Eine p27-Expressionsanalyse wurde auch eingeschlossen, weil zytoplasmatisches p27 durch Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs EMT fördert (Zhao *et al.*, 2015).

Einer der untersuchten EMT-Marker ist S100A4. S100A4 ist ein Calcium-bindendes Protein und wird direkt durch den Wnt/ β -catenin-Signalweg kontrolliert (Stein *et al.*, 2006). Zudem ist S100A4 als starker Induktor von EMT bekannt (Xu *et al.*, 2016). S100A4 wird besonders mit verstärkter Metastasierung in Zusammenhang gebracht. Sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Effekte sind durch gesteigerte S100A4-Expression bekannt. Es interagiert mit zytoskelettalen Proteinen, verstärkt Metastasierung und wird über einen bislang unbekannt

Mechanismus in den extrazellulären Raum sekretiert. Im extrazellulären Raum kann S100A4 unter anderem die Angiogenese stimulieren (Schneider *et al.*, 2008). Sowohl in *Panc-1*- und *L3.6pl-Knockdown-Zellen* konnte eine starke Überexpression von S100A4 gefunden werden, was auf eine bislang unbekannte Hochregulierung von S100A4 durch O-GalNAc-Modifikationen im Pankreaskarzinom hindeutet. Eine starke Assoziation von S100A4 mit dem Wnt/ β -catenin-Signalweg lässt eine O-GalNAc-Modifikation im Wnt/ β -catenin-Signalweg vermuten. Im Bronchialkarzinom konnte tatsächlich bereits eine durch GALNT14 assoziierte erhöhte Sensitivität für den WNT-Signalweg, eine gesteigerte β -catenin-Protein-Stabilität, eine erhöhte HOXB9-Expression und letztendlich ein invasiver Phänotyp gefunden werden (Kwon *et al.*, 2015). Die erhöhte S100A4-Expression wurde im Zusammenhang von GALNT14 und dem WNT-Signalweg im Bronchialkarzinom zwar nicht direkt untersucht, wird jedoch durch eine Aktivierung im Wnt/ β -catenin-Signalweg mutmaßlich hochreguliert. Eine mögliche O-GalNAc-Modifikation im Pankreaskarzinom im Wnt/ β -catenin-Signalweg, die möglicherweise eine stark erhöhte Expression in *COSMC-Knockout-Zellen* verursachen kann, oder andere unbekannte O-GalNAc-Modifikationen sind bislang nicht beschrieben.

Zudem wurde das transmembranäre Protein N-Cadherin mittels Expressionsanalyse untersucht. In *L3.6pl-COSMC-Knockdown-Zellen* zeigte sich eine Überexpression von N-CAD. Der Verlust von E-Cadherin und die Hochregulation von N-Cadherin an der Zelloberfläche ist ein initialer Schritt zum EMT-Phänotyp (Sanchez-Tillo *et al.*, 2010). Durch Verlust der interzellulären Adhäsion werden Zellmobilität und Metastasierung begünstigt (Nakajima *et al.*, 2004).

Andere untersuchte EMT-Marker sind die E-Cadherin-Repressoren ZEB1, ZEB2 und SNAIL. Zudem wurde als EMT-Marker der Transkriptionsfaktor TWIST1 (Zhu *et al.*, 2016) und der Enzym Inhibitor p27 mittels Expressionsanalyse untersucht. Im Pankreaskarzinom konnten bereits eine verstärkte Tumorknospung mit gesteigerter ZEB1-, ZEB2- und SNAIL-Expression in Verbindung gebracht werden (Galvan *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte in den *COSMC-Knockout-Zelllinien* ebenfalls eine jeweilige Überexpression von ZEB1 und SNAIL nachgewiesen werden. Zudem konnte in *L3.6pl-Knockdown-Zellen* eine erhöhte ZEB2- und TWIST1-Expression festgestellt werden.

Auch hier stellt sich die Frage, wie aberrante O-GalNAc-Glykosylierung zu einer erhöhten Expression von den EMT Markern führen kann. Als Erklärungsansatz kommen hierbei verschiedene bislang weitestgehend unbekannte O-GalNAc-Modifikationen in Frage. Der TGF β -Signalweg kann beispielsweise über Aktivierung von SMAD-Proteinen und weiteren *downstream* Substraten ZEB1-, ZEB2- und TWIST1-Expression induzieren (Tan *et al.*, 2012). In der Literatur werden bereits O-GalNAc-Modifikationen und verstärkte EMT im Zusammenhang des TGF β -Signalweges in einer Prostatakarzinomzelllinie beschrieben.

Durch TGF β induziert, konnte in der Prostatakarzinomzelllinie onkofetales Fibronectin hochreguliert und verstärkte EMT-Eigenschaften beobachtet werden. Interessanterweise trägt onkofetales Fibronectin ein O-GalNAc-glykosyliertes Threonin in der IIICS-Domäne. Durch einen *GALNT6*- und *GALNT3-Knockdown* ließen sich in dieser Zelllinie die TGF β -induzierte Hochregulierung von onkofetalem Fibronectin und EMT inhibieren (Freire-de-Lima *et al.*, 2011). Selbige Ergebnisse sind möglicherweise auch auf Pankreaskarzinomzelllinien anwendbar.

Einige untersuchte EMT Marker zeigen auch Assoziationen zum PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg. So erfolgt die Regulation des Transkriptionsfaktor ZEB1 im Pankreaskarzinom spezifischer durch MAPK-Interacting Protein Kinases (MNK) und eIF4E (Kumar *et al.*, 2016). Zytoplasmatisches p27 kann wiederum PI3K-abhängig am C-terminalen-Proteinanteil phosphoryliert und damit aktiviert werden. Aktiviertes p27 kann über weitere Substrate die Expression des Transkriptionsfaktor TWIST1 induzieren und EMT-Eigenschaften fördern (Zhao *et al.*, 2015). Ein weiterer E-Cadherin-Repressor, der Transkriptionsfaktor-SNAIL, wird durch ein komplexes Netzwerk auf transkriptioneller und posttranskriptionaler Ebene reguliert. Dieses Netzwerk umfasst Phosphatidylinosit-3-Kinase (PI3-K), Integrin-Linked-Kinase (ILK), NF κ B-Signalwege, Glykogen-Synthase-Kinase 3-Beta (GSK-3 β) und Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPKs) (Wu und Zhou, 2010). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wird bereits in der vorliegenden Arbeit als O-GalNAc-modifiziert und der Ras/Raf/MAPK-Signalweg als mutmaßlich O-GalNAc-modifiziert beschrieben. So könnten dadurch verstärkte EMT-Eigenschaften in O-GalNAc-modifizierten Pankreaskarzinomzelllinien erklärt werden.

Zusammenfassend ist es sehr wahrscheinlich, dass die beschriebenen O-GalNAc-Modifikation EMT-Eigenschaften durch Überexpression der beschriebenen EMT-Marker fördern. Dabei tragen eine Vielzahl von spezifischen O-GalNAc-Modifikationen in unterschiedlichen Signalwegen und Schlüssel molekülen zu einer verstärkten Expression von EMT-Markern und EMT-Eigenschaften in *COSMC-Knockdown-Pankreaskarzinomzellen* bei.

5.8 Prognostische, diagnostische und therapeutische Anwendungsmöglichkeiten durch O-GalNAc-Modifikationen im Pankreaskarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurden durch O-GalNAc-Glykosylierungen verursachte Modifikationen am PI3K/AKT/mTOR-, RAS/MAPK-Signalweg und von EMT gefunden. Hierbei stellt sich die Frage, wie die O-GalNAc-Modifikationen für prognostische, diagnostische und therapeutische Anwendungsmöglichkeiten im Pankreaskarzinom verwendet werden könnte.

Für prognostische Zwecke finden bei Tumoren oft Biomarker Verwendung. Biomarker erfordern eine hohe Sensitivität und Spezifität, um Fehldiagnosen zu vermeiden. Eine hohe Expression des Tn-Antigens und damit einer aberranten O-GalNAc-Modifikation von Proteinen kann in zahlreichen soliden Tumorentitäten wie Kopf-Hals, Mamma, Urothel, Ösophagus, Prostata, Endometrium, Zervix, Kolon, Lunge und eben auch im Pankreas beobachtet werden (Desai, 2000, Munkley, 2016), wohingegen im normalen Gewebe keine Überexpression von Tn-Antigen festzustellen ist (Ju *et al.*, 2011). Im PDAC wird eine vermehrte Expression von Tn-Antigen in 75-95 % (Itzkowitz *et al.*, 1991, Motoo *et al.*, 1991) und in bis zu 67 % der Vorläuferläsionen gefunden (Kim *et al.*, 2002). Damit bieten sich O-GalNAc-Modifikationen im Pankreas als Biomarker mit hoher Sensitivität und Spezifität an. Tatsächlich werden mit dem Pankreaskarzinom assoziierte O-GalNAc-Glykoproteine bereits als Biomarker im Serum von Patienten verwendet. Hierzu zählen CA125 (Cancer-Antigen 125) und CA19-9 (Carbohydrate-Antigen 19-9) (Zhang *et al.*, 2018). Insbesondere im frühen Tumorstadien weisen diese Biomarker jedoch eine zu geringe Sensitivität und Spezifität auf (Chia *et al.*, 2016). Als diagnostische und prognostische Marker werden auch die Expressionsraten von GALNTs beschrieben. Die Expression von GALNT3 konnte beispielsweise im PDAC mit der Differenzierung und Aggressivität korreliert werden (Yamamoto *et al.*, 2004a). Für diagnostische und prognostische Zwecke können O-GalNAc-Glykosylierungen auch in Gewebebiopsien dienen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien zeigten in den *O-GalNAc-Knockdown-Zellen* eine starke mTOR-Phosphorylierung. Eine mögliche therapeutische Anwendung wäre damit eine mTOR-Inhibition. In der Literatur findet sich bereits durch mTOR-Inhibition im Mausmodell des PDAC ein Proliferationsarrest und eine Tumor-Regression (Morran *et al.*, 2014). In einer Phase II Studie konnte zudem im PDAC, insbesondere durch Inhibition mehrerer Moleküle im mTOR-Signalweg, die Proliferation und ein migratives Wachstum verringert werden, wohingegen jedoch eine alleinige mTOR-mono-Inhibition nicht den erhofften Erfolg brachte (Iriana *et al.*, 2016). Auf Grund von Toxizität und *crossover-Hemmung* anderer Lipid- und Proteinkinasen finden die Inhibitoren im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg bislang in klinischen Studien keine größere Anwendung (Ebrahimi *et al.*, 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz des mTOR-Inhibitors AZD8055 eine verminderte Phosphorylierung von *downstream* Substraten, auch in den O-GalNAc-modifizierten Zelllinien, erreicht werden. Somit könnte vermutlich durch Inhibition mehrerer Schritte im mTOR-Signalweg ein O-GalNAc-vermittelte Phänotyp verringert werden.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern. In den letzten 20 Jahren stellen monoklonale Antikörper bei soliden Tumoren eine der erfolgreichsten Therapiemethoden dar (Scott *et al.*, 2012). Verschiedene Antikörper wurden bereits entwickelt

um O-GalNAc-assoziierte Proteine wie Tn, S-Tn oder Mucine als Antigenbindungsstelle zu nutzen. Über antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität und unabhängige zytolytische Aktivität konnten in vivo einige Antikörper erfolgreich getestet werden (An *et al.*, 2013, Ibrahim *et al.*, 2011). Beispielsweise wird durch einen Anti-S-Tn-Antikörper im S-Tn-exprimierenden Kolorektalenkarzinom sowohl die Proliferation als auch die Migration verringert und Apoptose induziert (An *et al.*, 2013). Im Bronchialkarzinom konnte in vivo durch einen Anti-Tn-Antikörper das Tumorstadium stark verringert werden (Welinder *et al.*, 2011). Vielversprechend erscheint auch die in vivo und in vitro Anwendung der Kopplung von monomethyl-auristatin E, einer antineoplastischen Substanz, an S-Tn-Antikörper. Durch diese Antikörper-Medikament-Kopplung konnte eine signifikante Tumorstadiumhemmung ohne Auftreten von Toxizität beobachtet werden (Prendergast *et al.*, 2017). Antikörper gegen Tn-, S-Tn- oder O-GalNAc-assoziierte Mucine oder eine entsprechende Antikörper-Medikament-Kopplung im PDAC werden in der Literatur bislang nicht beschrieben. Diese könnten jedoch eine sinnvolle Zielstruktur für Antikörper und antineoplastische Therapie darstellen.

Eine andere therapeutische Anwendung stellt die Immunisierung über O-GalNAc-Vakzine dar. Über eine Immunisierung mit Vakzinen gegen Tn-, S-Tn- oder O-GalNAc-assoziierte Proteine sollen im Menschen spezifische Antikörper ausgebildet werden. In einer Studie mit metastasierten Mammakarzinomen konnte durch entsprechende Vakzinierung gegen S-Tn-Antigen ein langsames Tumorstadium beobachtet werden (Ibrahim *et al.*, 2013). Die beobachteten Immunantworten reichten jedoch bislang nicht für eine langfristige T-zell-vermittelte Immunität aus (Chia *et al.*, 2016).

Letztendlich muss für eine effektive therapeutische Nutzung von O-GalNAc-modifizierten Proteinen der regulatorische Mechanismus der Initiierung und Verlängerung der O-GalNAc-Glykan-Strukturen tiefgreifender verstanden werden. Während die genetischen und histologischen Hintergründe der Karzinogenese vom PDAC bereits gut beschrieben werden konnten (Gaiano *et al.*, 2017), sind die genauen molekularen Mechanismen für den aggressiven migrativen und invasiven Charakter im PDAC weitestgehend unklar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit helfen indes diese molekularen Mechanismen besser zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Aberrante O-GalNAc-Glykosylierung ist ein wichtiges Merkmal des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC). Die Expression von aberranten O-GalNAc-Glykanen ist stark mit einem verringerten Überleben und einer schlechten Prognose assoziiert. Die Verstärkung onkogener Eigenschaften durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung wird im PDAC wahrscheinlich über die Regulation verschiedener Signalwege vermittelt. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob aberrante O-GalNAc-Glykosylierung einen aktivierenden und damit protumorigenen Einfluss auf die für das PDAC essentiellen PI3K/AKT/mTOR und Ras/Raf/MAPK Signalwege hat.

In aberrant O-GalNAc-glykosylierten PDAC-Zellen wurde durch quantitative Proteomik unterschiedliche Expressionslevel von Proteinen, die mit dem PI3K/AKT/mTOR- und dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg assoziiert sind, identifiziert. Unter den identifizierten Proteinen war auch die Proteinkinase AKT, ein wichtiges Schlüsselmolekül im PDAC. Weitere Untersuchungen von AKT zeigten eine verstärkte S473-Phosphorylierung und eine direkte aberrante O-GalNAc-Glykosylierung. Aberrant O-glykosylierte PDAC-Zellen zeigten außerdem starke Veränderungen in der Aktivität von weiteren Signalmolekülen des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. So zeigte die mTOR S2448 Phosphorylierung eine Stabilisierung durch aberrante O-GalNAc-Glykosylierung. Da zwischen dem PI3K/AKT/mTOR- und dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg zahlreiche *cross-talks* bekannt sind, wurden auch diese untersucht. Der Ras/Raf/MAPK-Signalweg zeigte sich insgesamt negativ reguliert. Abschließend konnte gezeigt werden, dass eine aberrante O-GalNAc Glykosylierung eine erhöhte Expression von Markermolekülen der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition zur Folge hat, die wiederum ein wichtiges Merkmal aggressiver PDAC-Zellen darstellt.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine aberrante O-GalNAc-Glykosylierung den PI3K/AKT/mTOR- und Ras/Raf/MAPK-Signalweg stark beeinflusst und EMT fördert, wodurch wiederum die ausgeprägte tumorigene Aktivierung von aberrant O-GalNAc glykosylierten PDAC-Zellen erklärt werden kann.

Abstract

Immature truncated O-GalNAc glycosylation is an important feature of the pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC). The expression of truncated O-GalNAc glycans is strongly associated with decreased survival rates and poor prognosis. Aberrant O-GalNAc glycosylation is assumed to influence PDAC signaling and therefore likely to promote oncogenic properties. To address this assumption the ability of aberrant O-GalNAc glycosylation to exercise a triggering and protumorigenic influence over two important PDAC signaling pathways, PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK, has been investigated in this study.

Different expression levels of proteins associated with PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK pathways could be identified in aberrant O-glycosylated PDAC cells by using quantitative proteomics. The proteins that were identified also included the protein kinase AKT, a major key signaling molecule in PDAC. Further investigation of AKT led to the detection of an enhanced S473 phosphorylation and a directly aberrant O-GalNAc-glycosylation. Aberrant O-glycosylated PDAC cells also revealed strong changes in the activity of other signaling molecules belonging to the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. For instance, aberrant O-GalNAc glycosylation was found to stabilize mTOR S2448 phosphorylation. Since numerous cross talks between the PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK pathways are known to exist, they were included in the investigation. The analysis identified the Ras/Raf/MAPK pathway as predominantly negatively regulated. Finally, the research result revealed that an aberrant O-GalNAc-glycosylation leads to an enhanced expression of epithelial-mesenchymal-transition markers, known as key features of aggressive PDAC cells.

In conclusion the study demonstrates that aberrant O-GalNAc glycosylation strongly affects the PI3K/AKT/mTOR and Ras/Raf/MAPK signaling pathways and supports EMT, thereby providing an explanation for the pronounced tumorigenic activity of aberrant O-GalNAc-glycosylated PDAC cells.

7 Literaturverzeichnis

- ADAMS, M. D., KELLEY, J. M., GOCAYNE, J. D., DUBNICK, M., POLYMEROPOULOS, M. H., XIAO, H., MERRIL, C. R., WU, A., OLDE, B., MORENO, R. F. & ET AL. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252, 1651-6.
- AKSAMITIENE, E., KIYATKIN, A. & KHOLODENKO, B. N. 2012. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans*, 40, 139-46.
- ALESSI, D. R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. & HEMMINGS, B. A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 15, 6541-51.
- ALTOMARE, D. A., TANNO, S., DE RIENZO, A., KLEIN-SZANTO, A. J., TANNO, S., SKELE, K. L., HOFFMAN, J. P. & TESTA, J. R. 2002. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem*, 87, 470-6.
- AN, Y., HAN, W., CHEN, X., ZHAO, X., LU, D., FENG, J., YANG, D., SONG, L. & YAN, X. 2013. A novel anti-sTn monoclonal antibody 3P9 Inhibits human xenografted colorectal carcinomas. *J Immunother*, 36, 20-8.
- ANDERSEN, D. K., KORC, M., PETERSEN, G. M., EIBL, G., LI, D., RICKELS, M. R., CHARI, S. T. & ABBRUZZESE, J. L. 2017. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. *Diabetes*, 66, 1103-1110.
- APPLEMAN, V. A., AHRONIAN, L. G., CAI, J., KLIMSTRA, D. S. & LEWIS, B. C. 2012. KRAS(G12D)- and BRAF(V600E)-induced transformation of murine pancreatic epithelial cells requires MEK/ERK-stimulated IGF1R signaling. *Mol Cancer Res*, 10, 1228-39.
- ARTINYAN, A., SORIANO, P. A., PRENDERGAST, C., LOW, T., ELLENHORN, J. D. & KIM, J. 2008. The anatomic location of pancreatic cancer is a prognostic factor for survival. *HPB (Oxford)*, 10, 371-6.
- AVIRAM, N. & SCHULDINER, M. 2017. Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *J Cell Sci*, 130, 4079-4085.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. & CLARK, B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21, 389-95.
- BARRANGOU, R. 2015. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr Opin Immunol*, 32, 36-41.
- BAYASCAS, J. R. & ALESSI, D. R. 2005. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell*, 18, 143-5.
- BECKER, A. E., HERNANDEZ, Y. G., FRUCHT, H. & LUCAS, A. L. 2014. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*, 20, 11182-98.
- BENNETT, E. P., MANDEL, U., CLAUSEN, H., GERKEN, T. A., FRITZ, T. A. & TABAK, L. A. 2012. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*, 22, 736-56.
- BERNARD, S. & EILERS, M. 2006. Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ*, 42, 329-42.
- BRABLETZ, T., KALLURI, R., NIETO, M. A. & WEINBERG, R. A. 2018. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*, 18, 128-134.
- BRANKATSCHK, R., BODENHAUSEN, N., ZEYER, J. & BURGMANN, H. 2012. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl Environ Microbiol*, 78, 4481-9.
- BRUNS, C. J., HARBISON, M. T., KUNIYASU, H., EUE, I. & FIDLER, I. J. 1999. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia*, 1, 50-62.

- BRYANT, K. L., MANCIAS, J. D., KIMMELMAN, A. C. & DER, C. J. 2014. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem Sci*, 39, 91-100.
- BUCHLER, M. W., ESPOSITO, I., GREINACHER, L., HACKERT, T. & MAYERLE, J. 2015. Precancerous Lesions and Carcinoma of the Pancreas. *Viszeralmedizin*, 31, 53-7.
- BUROTTA, M., CHIOU, V. L., LEE, J. M. & KOHN, E. C. 2014. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*, 120, 3446-56.
- CARGNELLO, M. & ROUX, P. P. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75, 50-83.
- CASTELLANO, E. & DOWNWARD, J. 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer*, 2, 261-74.
- CHAN, C. H., JO, U., KOHRMAN, A., REZAEIAN, A. H., CHOU, P. C., LOGOTHETIS, C. & LIN, H. K. 2014. Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci*, 4, 59.
- CHIA, J., GOH, G. & BARD, F. 2016. Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 1623-39.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- CHRESTA, C. M., DAVIES, B. R., HICKSON, I., HARDING, T., COSULICH, S., CRITCHLOW, S. E., VINCENT, J. P., ELLSTON, R., JONES, D., SINI, P., JAMES, D., HOWARD, Z., DUDLEY, P., HUGHES, G., SMITH, L., MAGUIRE, S., HUMMERSONE, M., MALAGU, K., MENEAR, K., JENKINS, R., JACOBSEN, M., SMITH, G. C., GUICHARD, S. & PASS, M. 2010. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res*, 70, 288-98.
- CHUGH, S., MEZA, J., SHEININ, Y. M., PONNUSAMY, M. P. & BATRA, S. K. 2016. Loss of N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in poorly differentiated pancreatic cancer: augmented aggressiveness and aberrant ErbB family glycosylation. *Br J Cancer*, 114, 1376-86.
- CICENAS, J., KVEDERAVICIUTE, K., MESKINYTE, I., MESKINYTE-KAUSILIENE, E., SKEBERDYTE, A. & CICENAS, J. 2017. KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 9.
- CLEMENT, M., ROCHER, J., LOIRAND, G. & LE PENDU, J. 2004. Expression of sialyl-Tn epitopes on beta1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *J Cell Sci*, 117, 5059-69.
- COPP, J., MANNING, G. & HUNTER, T. 2009. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*, 69, 1821-7.
- COX, J., MATIC, I., HILGER, M., NAGARAJ, N., SELBACH, M., OLSEN, J. V. & MANN, M. 2009. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 4, 698-705.
- DEER, E. L., GONZALEZ-HERNANDEZ, J., COURSEN, J. D., SHEA, J. E., NGATIA, J., SCAIFE, C. L., FIRPO, M. A. & MULVIHILL, S. J. 2010. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39, 425-35.
- DESAI, P. R. 2000. Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Transfus Med Rev*, 14, 312-25.
- DICKSON, C. 2008. Protein techniques: immunoprecipitation, in vitro kinase assays, and Western blotting. *Methods Mol Biol*, 461, 735-44.
- DOCHEVA, D., POPOV, C., MUTSCHLER, W. & SCHIEKER, M. 2007. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med*, 11, 21-38.
- EBRAHIMI, S., HOSSEINI, M., SHAHIDSALES, S., MAFTOUH, M., FERNS, G. A., GHAYOUR-MOBARHAN, M., HASSANIAN, S. M. & AVAN, A. 2017. Targeting the Akt/PI3K Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Curr Med Chem*, 24, 1321-1331.

- ESER, S., SCHNIEKE, A., SCHNEIDER, G. & SAUR, D. 2014. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 111, 817-22.
- FINGAR, D. C., RICHARDSON, C. J., TEE, A. R., CHEATHAM, L., TSOU, C. & BLENIS, J. 2004. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 24, 200-16.
- FREIRE-DE-LIMA, L., GELFENBEYN, K., DING, Y., MANDEL, U., CLAUSEN, H., HANDA, K. & HAKOMORI, S. I. 2011. Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 17690-5.
- FRESNO VARA, J. A., CASADO, E., DE CASTRO, J., CEJAS, P., BELDA-INIESTA, C. & GONZALEZ-BARON, M. 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30, 193-204.
- FRIAS, M. A., THOREEN, C. C., JAFFE, J. D., SCHRODER, W., SCULLEY, T., CARR, S. A. & SABATINI, D. M. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 16, 1865-70.
- FUJIOKA, A., TERAJ, K., ITOH, R. E., AOKI, K., NAKAMURA, T., KURODA, S., NISHIDA, E. & MATSUDA, M. 2006. Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J Biol Chem*, 281, 8917-26.
- FUSTER, M. M. & ESKO, J. D. 2005. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 5, 526-42.
- GAIANIGO, N., MELISI, D. & CARBONE, C. 2017. EMT and Treatment Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 9.
- GALVAN, J. A., ZLOBEC, I., WARTENBERG, M., LUGLI, A., GLOOR, B., PERREN, A. & KARAMITOPOULOU, E. 2015. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 112, 1944-50.
- GAO, Y., LIU, Z., FENG, J., SUN, Q., ZHANG, B., ZHENG, W. & MA, W. 2013. Expression pattern of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-10 in gastric carcinoma. *Oncol Lett*, 5, 113-116.
- GERKEN, T. A., JAMISON, O., PERRINE, C. L., COLLETTE, J. C., MOINOVA, H., RAVI, L., MARKOWITZ, S. D., SHEN, W., PATEL, H. & TABAK, L. A. 2011. Emerging paradigms for the initiation of mucin-type protein O-glycosylation by the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 286, 14493-507.
- GIEHL, K., SKRIPCZYNSKI, B., MANSARD, A., MENKE, A. & GIERSCHIK, P. 2000. Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene*, 19, 2930-42.
- GIGLIO, S., MONIS, P. T. & SAINT, C. P. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res*, 31, e136.
- GILL, D. J., CLAUSEN, H. & BARD, F. 2011. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends Cell Biol*, 21, 149-58.
- GONZALEZ, E. & MCGRAW, T. E. 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*, 8, 2502-8.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GRAHAM, J. M. 2002. Fractionation of Golgi, endoplasmic reticulum, and plasma membrane from cultured cells in a preformed continuous iodixanol gradient. *ScientificWorldJournal*, 2, 1435-9.
- GREER, J. B. & WHITCOMB, D. C. 2007. Role of BRCA1 and BRCA2 mutations in pancreatic cancer. *Gut*, 56, 601-5.
- GROVER, S. & SYNGAL, S. 2010. Hereditary pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 139, 1076-80, 1080 e1-2.

- GUDA, K., MOINOVA, H., HE, J., JAMISON, O., RAVI, L., NATALE, L., LUTTERBAUGH, J., LAWRENCE, E., LEWIS, S., WILLSON, J. K., LOWE, J. B., WIESNER, G. L., PARMIGIANI, G., BARNHOLTZ-SLOAN, J., DAWSON, D. W., VELCULESCU, V. E., KINZLER, K. W., PAPADOPOULOS, N., VOGELSTEIN, B., WILLIS, J., GERKEN, T. A. & MARKOWITZ, S. D. 2009. Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12921-5.
- GUPTA, R. M. & MUSUNURU, K. 2014. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest*, 124, 4154-61.
- HACKEL, P. O., ZWICK, E., PRENZEL, N. & ULLRICH, A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 184-9.
- HANAHAH, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANISCH, F. G. & BRELOY, I. 2009. Protein-specific glycosylation: signal patches and cis-controlling peptidic elements. *Biol Chem*, 390, 619-26.
- HE, H., SHEN, Z., ZHANG, H., WANG, X., TANG, Z., XU, J. & SUN, Y. 2014. Clinical significance of polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 (GalNAc-T5) expression in patients with gastric cancer. *Br J Cancer*, 110, 2021-9.
- HEMMINGS, B. A. & RESTUCCIA, D. F. 2012. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a011189.
- HO, W. L., CHOU, C. H., JENG, Y. M., LU, M. Y., YANG, Y. L., JOU, S. T., LIN, D. T., CHANG, H. H., LIN, K. H., HSU, W. M. & HUANG, M. C. 2014. GALNT2 suppresses malignant phenotypes through IGF-1 receptor and predicts favorable prognosis in neuroblastoma. *Oncotarget*, 5, 12247-59.
- HOFMANN, B. T., SCHLUTER, L., LANGE, P., MERCANOGLU, B., EWALD, F., FOLSTER, A., PICKSAK, A. S., HARDER, S., EL GAMMAL, A. T., GRUPP, K., GUNGOR, C., DRENCKHAN, A., SCHLUTER, H., WAGENER, C., IZBICKI, J. R., JUCKER, M., BOCKHORN, M. & gün
- EISFELD, G. 2015. COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 14, 109.
- HOLZ, M. K. & BLENIS, J. 2005. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 280, 26089-93.
- HORVATH, P. & BARRANGOU, R. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327, 167-70.
- HOSEKI, J., USHIODA, R. & NAGATA, K. 2010. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem*, 147, 19-25.
- HRUBAN, R. H., GOGGINS, M., PARSONS, J. & KERN, S. E. 2000. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 6, 2969-72.
- HSU, P. D., LANDER, E. S. & ZHANG, F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157, 1262-78.
- HUA, D., SHEN, L., XU, L., JIANG, Z., ZHOU, Y., YUE, A., ZOU, S., CHENG, Z. & WU, S. 2012. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer. *Int J Mol Med*, 30, 1267-74.
- HUANG, J. & MANNING, B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans*, 37, 217-22.
- HUANG, M. J., HU, R. H., CHOU, C. H., HSU, C. L., LIU, Y. W., HUANG, J., HUNG, J. S., LAI, I. R., JUAN, H. F., YU, S. L., WU, Y. M. & HUANG, M. C. 2015. Knockdown of GALNT1 suppresses malignant phenotype of hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR signaling. *Oncotarget*, 6, 5650-65.
- HUXLEY, R., ANSARY-MOGHADDAM, A., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., BARZI, F. & WOODWARD, M. 2005. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*, 92, 2076-83.
- IBRAHIM, N. K., MURRAY, J. L., ZHOU, D., MITTENDORF, E. A., SAMPLE, D., TAUTCHIN, M. & MILES, D. 2013. Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer

- Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *J Cancer*, 4, 577-84.
- IBRAHIM, N. K., YARIZ, K. O., BONDARENKO, I., MANIKHAS, A., SEMIGLAZOV, V., ALYASOVA, A., KOMISARENKO, V., SHPARYK, Y., MURRAY, J. L., JONES, D., SENDEROVICH, S., CHAU, A., ERLANDSSON, F., ACTON, G. & PEGRAM, M. 2011. Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 17, 6822-30.
- IRIANA, S., AHMED, S., GONG, J., ANNAMALAI, A. A., TULI, R. & HENDIFAR, A. E. 2016. Targeting mTOR in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Oncol*, 6, 99.
- ITZKOWITZ, S., KJELDEN, T., FRIERA, A., HAKOMORI, S., YANG, U. S. & KIM, Y. S. 1991. Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas. *Gastroenterology*, 100, 1691-700.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., XU, J. & WARD, E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60, 277-300.
- JU, T. & CUMMINGS, R. D. 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, 16613-8.
- JU, T., LANNEAU, G. S., GAUTAM, T., WANG, Y., XIA, B., STOWELL, S. R., WILLARD, M. T., WANG, W., XIA, J. Y., ZUNA, R. E., LASZIK, Z., BENBROOK, D. M., HANIGAN, M. H. & CUMMINGS, R. D. 2008. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res*, 68, 1636-46.
- JU, T., OTTO, V. I. & CUMMINGS, R. D. 2011. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 1770-91.
- KABOORD, B. & PERR, M. 2008. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*, 424, 349-64.
- KAIDANOVICH-BEILIN, O. & WOODGETT, J. R. 2011. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front Mol Neurosci*, 4, 40.
- KALEEM, A., AHMAD, I., HOESSLI, D. C., WALKER-NASIR, E., SALEEM, M., SHAKOORI, A. R. & NASIR UD, D. 2009. Epidermal growth factor receptors: function modulation by phosphorylation and glycosylation interplay. *Mol Biol Rep*, 36, 631-9.
- KATO, K., JEANNEAU, C., TARP, M. A., BENET-PAGES, A., LORENZ-DEPIEREUX, B., BENNETT, E. P., MANDEL, U., STROM, T. M. & CLAUSEN, H. 2006. Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation. *J Biol Chem*, 281, 18370-7.
- KIM, G. E., BAE, H. I., PARK, H. U., KUAN, S. F., CRAWLEY, S. C., HO, J. J. & KIM, Y. S. 2002. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology*, 123, 1052-60.
- KING, J. C., NG, T. T., WHITE, S. C., CORTINA, G., REBER, H. A. & HINES, O. J. 2009. Pancreatic serous cystadenocarcinoma: a case report and review of the literature. *J Gastrointest Surg*, 13, 1864-8.
- KLIMSTRA, D. S., MODLIN, I. R., COPPOLA, D., LLOYD, R. V. & SUSTER, S. 2010. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*, 39, 707-12.
- KOLLMANN, K., POHL, S., MARSCHNER, K., ENCARNACAO, M., SAKWA, I., TIEDE, S., POORTHUIS, B. J., LUBKE, T., MULLER-LOENNIES, S., STORCH, S. & BRAULKE, T. 2010. Mannose phosphorylation in health and disease. *Eur J Cell Biol*, 89, 117-23.
- KOMOR, A. C., BADRAN, A. H. & LIU, D. R. 2017. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*, 168, 20-36.
- KRANTZ, S. B., SHIELDS, M. A., DANGI-GARIMELLA, S., MUNSHI, H. G. & BENTREM, D. J. 2012. Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression. *J Surg Res*, 173, 105-12.
- KUMAR, K., CHOW, C. R., EBINE, K., ARSLAN, A. D., KWOK, B., BENTREM, D. J., ECKERDT, F. D., PLATANIAS, L. C. & MUNSHI, H. G. 2016. Differential Regulation of ZEB1 and EMT by MAPK-Interacting Protein Kinases (MNK) and eIF4E in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Res*, 14, 216-27.

- KWIATKOWSKI, M., WURLITZER, M., KRUTILIN, A., KIANI, P., NIMER, R., OMIDI, M., MANNAA, A., BUSSMANN, T., BARTKOWIAK, K., KRUBER, S., USCHOLD, S., STEFFEN, P., LUBBERSTEDT, J., KUPKER, N., PETERSEN, H., KNECHT, R., HANSEN, N. O., ZARRINE-AFSAR, A., ROBERTSON, W. D., MILLER, R. J. D. & SCHLUTER, H. 2016. Homogenization of tissues via picosecond-infrared laser (PIRL) ablation: Giving a closer view on the in-vivo composition of protein species as compared to mechanical homogenization. *J Proteomics*, 134, 193-202.
- KWON, O. S., OH, E., PARK, J. R., LEE, J. S., BAE, G. Y., KOO, J. H., KIM, H., CHOI, Y. L., CHOI, Y. S., KIM, J. & CHA, H. J. 2015. GalNAc-T14 promotes metastasis through Wnt dependent HOXB9 expression in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 6, 41916-28.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LANDER, E. S. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164, 18-28.
- LANUCARA, F. & EYERS, C. E. 2011. Mass spectrometric-based quantitative proteomics using SILAC. *Methods Enzymol*, 500, 133-50.
- LAPLANTE, M. & SABATINI, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-93.
- LARUE, L. & BELLACOSA, A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24, 7443-54.
- LEE, J., JR., CHEN, C. H., CHEN, Y. H., HUANG, M. J., HUANG, J., HUNG, J. S., CHEN, M. T. & HUANG, M. C. 2013. COSMC is overexpressed in proliferating infantile hemangioma and enhances endothelial cell growth via VEGFR2. *PLoS One*, 8, e56211.
- LEE, J. H., KIM, Y., CHOI, J. W. & KIM, Y. S. 2016a. KRAS, GNAS, and RNF43 mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: a meta-analysis. *Springerplus*, 5, 1172.
- LEE, S., HEINRICH, E. L., LU, J., LEE, W., CHOI, A. H., LUU, C., CHUNG, V., FAKIH, M. & KIM, J. 2016b. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling to the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway Bypasses Ras in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas*, 45, 286-92.
- LEMMON, M. A. & SCHLESSINGER, J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117-34.
- LEVI, F., LUCCHINI, F., NEGRI, E. & LA VECCHIA, C. 2003. Pancreatic cancer mortality in Europe: the leveling of an epidemic. *Pancreas*, 27, 139-42.
- LEWIS, M. A. & YAO, J. C. 2014. Molecular pathology and genetics of gastrointestinal neuroendocrine tumours. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21, 22-7.
- LI, L., ZHAO, G. D., SHI, Z., QI, L. L., ZHOU, L. Y. & FU, Z. X. 2016. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol Lett*, 12, 3045-3050.
- LIEBER, M., MAZZETTA, J., NELSON-REES, W., KAPLAN, M. & TODARO, G. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*, 15, 741-7.
- LIN, M. C., HUANG, M. J., LIU, C. H., YANG, T. L. & HUANG, M. C. 2014. GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity. *Oral Oncol*, 50, 478-84.
- LIN, Y., TAMAKOSHI, A., KAWAMURA, T., INABA, Y., KIKUCHI, S., MOTOHASHI, Y., KUROSAWA, M. & COHORT, J. S. G. J. C. 2002. A prospective cohort study of cigarette smoking and pancreatic cancer in Japan. *Cancer Causes Control*, 13, 249-54.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOWENFELS, A. B. & MAISONNEUVE, P. 2006. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20, 197-209.

- LUO, J., FIELD, S. J., LEE, J. Y., ENGELMAN, J. A. & CANTLEY, L. C. 2005. The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J Cell Biol*, 170, 455-64.
- MACHADO, N. O., AL QADHI, H. & AL WAHIBI, K. 2015. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of Pancreas. *N Am J Med Sci*, 7, 160-75.
- MAGNUSON, B., EKIM, B. & FINGAR, D. C. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*, 441, 1-21.
- MAHMOOD, T. & YANG, P. C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4, 429-34.
- MALKA, D., HAMMEL, P., MAIRE, F., RUFAT, P., MADEIRA, I., PESSIONE, F., LEVY, P. & RUSZNIEWSKI, P. 2002. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51, 849-52.
- MANJUNATH, N., WU, H., SUBRAMANYA, S. & SHANKAR, P. 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 732-45.
- MANNING, B. D. & CANTLEY, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-74.
- MANNING, B. D. & TOKER, A. 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169, 381-405.
- MARINI, F., FALCHETTI, A., LUZI, E., TONELLI, F. & MARIA LUISA, B. 2009. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) Syndrome. In: RIEGERT-JOHNSON, D. L., BOARDMAN, L. A., HEFFERON, T. & ROBERTS, M. (eds.) *Cancer Syndromes*. Bethesda (MD).
- MATSUMOTO, K., YOKOTE, H., ARAO, T., MAEGAWA, M., TANAKA, K., FUJITA, Y., SHIMIZU, C., HANAFUSA, T., FUJIWARA, Y. & NISHIO, K. 2008. N-Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci*, 99, 1611-7.
- MCGUIRE, S. 2016. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr*, 7, 418-9.
- MI, H., POUDEL, S., MURUGANUJAN, A., CASAGRANDE, J. T. & THOMAS, P. D. 2016. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 44, D336-42.
- MOLINA, J. R. & ADJEI, A. A. 2006. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*, 1, 7-9.
- MOREMEN, K. W., TIEMEYER, M. & NAIRN, A. V. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 448-62.
- MORRAN, D. C., WU, J., JAMIESON, N. B., MROWINSKA, A., KALNA, G., KARIM, S. A., AU, A. Y., SCARLETT, C. J., CHANG, D. K., PAJAK, M. Z., AUSTRALIAN PANCREATIC CANCER GENOME, I., OIEN, K. A., MCKAY, C. J., CARTER, C. R., GILLEN, G., CHAMPION, S., PIMLOTT, S. L., ANDERSON, K. I., EVANS, T. R., GRIMMOND, S. M., BIANKIN, A. V., SANSOM, O. J. & MORTON, J. P. 2014. Targeting mTOR dependency in pancreatic cancer. *Gut*, 63, 1481-9.
- MOTOO, Y., KAWAKAMI, H., WATANABE, H., SATOMURA, Y., OHTA, H., OKAI, T., MAKINO, H., TOYA, D. & SAWABU, N. 1991. Serum sialyl-Tn antigen levels in patients with digestive cancers. *Oncology*, 48, 321-6.
- MUNKLEY, J. 2016. The Role of Sialyl-Tn in Cancer. *Int J Mol Sci*, 17, 275.
- NAKAJIMA, S., DOI, R., TOYODA, E., TSUJI, S., WADA, M., KOIZUMI, M., TULACHAN, S. S., ITO, D., KAMI, K., MORI, T., KAWAGUCHI, Y., FUJIMOTO, K., HOSOTANI, R. & IMAMURA, M. 2004. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 4125-33.
- NICHOLSON, K. M. & ANDERSON, N. G. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 14, 381-95.
- OHTSUBO, K. & MARTH, J. D. 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126, 855-67.
- ONG, S. E., FOSTER, L. J. & MANN, M. 2003. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 29, 124-30.

- OSAKI, M., OSHIMURA, M. & ITO, H. 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9, 667-76.
- OUGOLKOV, A. V., FERNANDEZ-ZAPICO, M. E., SAVOY, D. N., URRUTIA, R. A. & BILLADEAU, D. D. 2005. Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 65, 2076-81.
- PARK, J. H., NISHIDATE, T., KIJIMA, K., OHASHI, T., TAKEGAWA, K., FUJIKANE, T., HIRATA, K., NAKAMURA, Y. & KATAGIRI, T. 2010. Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res*, 70, 2759-69.
- PARK, J. J., YI, J. Y., JIN, Y. B., LEE, Y. J., LEE, J. S., LEE, Y. S., KO, Y. G. & LEE, M. 2012. Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 83, 849-57.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PRENDERGAST, J. M., GALVAO DA SILVA, A. P., EAVARONE, D. A., GHADERI, D., ZHANG, M., BRADY, D., WICKS, J., DESANDER, J., BEHRENS, J. & RUEDA, B. R. 2017. Novel anti-Sialyl-Tn monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates demonstrate tumor specificity and anti-tumor activity. *MAbs*, 9, 615-627.
- RADHAKRISHNAN, P., DABELSTEEN, S., MADSEN, F. B., FRANCAVILLA, C., KOPP, K. L., STEENTOFT, C., VAKHRUSHEV, S. Y., OLSEN, J. V., HANSEN, L., BENNETT, E. P., WOETMANN, A., YIN, G., CHEN, L., SONG, H., BAK, M., HLADY, R. A., PETERS, S. L., OPAVSKY, R., THODE, C., QVORTRUP, K., SCHJOLDAGER, K. T., CLAUSEN, H., HOLLINGSWORTH, M. A. & WANDALL, H. H. 2014. Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E4066-75.
- RAMAGE, J. K., AHMED, A., ARDILL, J., BAX, N., BREEN, D. J., CAPLIN, M. E., CORRIE, P., DAVAR, J., DAVIES, A. H., LEWINGTON, V., MEYER, T., NEWELL-PRICE, J., POSTON, G., REED, N., ROCKALL, A., STEWARD, W., THAKKER, R. V., TOUBANAKIS, C., VALLE, J., VERBEKE, C., GROSSMAN, A. B., UK & IRELAND NEUROENDOCRINE TUMOUR, S. 2012. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours (NETs). *Gut*, 61, 6-32.
- RISSE, G., BLAUSTEIN, M., POZZI, B., MAMMI, P. & SREBROW, A. 2015. Akt/PKB: one kinase, many modifications. *Biochem J*, 468, 203-14.
- RKI, R. K. I. 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012
- Zentrum für Krebsregisterdaten*, 10. Ausgabe.
- RODRIGUEZ-VICIANA, P., WARNE, P. H., DHAND, R., VANHAESEBROECK, B., GOUT, I., FRY, M. J., WATERFIELD, M. D. & DOWNWARD, J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370, 527-32.
- ROMERO-CALVO, I., OCON, B., MARTINEZ-MOYA, P., SUAREZ, M. D., ZARZUELO, A., MARTINEZ-AUGUSTIN, O. & DE MEDINA, F. S. 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*, 401, 318-20.
- ROSNER, M., SIEGEL, N., VALLI, A., FUCHS, C. & HENGSTSCHLAGER, M. 2010. mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids*, 38, 223-8.
- ROUX, P. P., SHAHBAZIAN, D., VU, H., HOLZ, M. K., COHEN, M. S., TAUNTON, J., SONENBERG, N. & BLENIS, J. 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*, 282, 14056-64.
- RUBINSON, D. A., DILLON, C. P., KWIATKOWSKI, A. V., SIEVERS, C., YANG, L., KOPINJA, J., ROONEY, D. L., ZHANG, M., IHRIG, M. M., MCMANUS, M. T., GERTLER, F. B., SCOTT, M. L. & VAN PARIJS, L. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 33, 401-6.

- RUVINSKY, I. & MEYUHAS, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, 31, 342-8.
- RYAN, D. P., HONG, T. S. & BARDEESY, N. 2014. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 371, 1039-49.
- SAFRAN, H., STEINHOFF, M., MANGRAY, S., RATHORE, R., KING, T. C., CHAI, L., BERZEIN, K., MOORE, T., IANNITTI, D., REISS, P., PASQUARIELLO, T., AKERMAN, P., QUIRK, D., MASS, R., GOLDSTEIN, L. & TANTRAVAHU, U. 2001. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*, 24, 496-9.
- SANCAK, Y., THOREEN, C. C., PETERSON, T. R., LINDQUIST, R. A., KANG, S. A., SPOONER, E., CARR, S. A. & SABATINI, D. M. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25, 903-15.
- SANCHEZ-TILLO, E., LAZARO, A., TORRENT, R., CUATRECASAS, M., VAQUERO, E. C., CASTELLS, A., ENGEL, P. & POSTIGO, A. 2010. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene*, 29, 3490-500.
- SARAOGI, I. & SHAN, S. O. 2011. Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic*, 12, 535-42.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SARKAR, F. H., BANERJEE, S. & LI, Y. 2007. Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224, 326-36.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHACHTER, H. 2000. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J*, 17, 465-83.
- SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T. & FUNKE-KAISER, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84, 901-10.
- SCHNEIDER, M., HANSEN, J. L. & SHEIKH, S. P. 2008. S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)*, 86, 507-22.
- SCHOCHETMAN, G., OU, C. Y. & JONES, W. K. 1988. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 158, 1154-7.
- SCOTT, A. M., ALLISON, J. P. & WOLCHOK, J. D. 2012. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun*, 12, 14.
- SEGEV, N. 2010. Trafficking Inside Cells. *Springer Science & Business Media*.
- SEKULIC, A., HUDSON, C. C., HOMME, J. L., YIN, P., OTTERNESS, D. M., KARNITZ, L. M. & ABRAHAM, R. T. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res*, 60, 3504-13.
- SEUFFERLEIN, T., PORZNER, M., HEINEMANN, V., TANNAPFEL, A., STUSCHKE, M. & UHL, W. 2014. Ductal pancreatic adenocarcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 111, 396-402.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V. & MANN, M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1, 2856-60.
- SHIBAO, K., IZUMI, H., NAKAYAMA, Y., OHTA, R., NAGATA, N., NOMOTO, M., MATSUO, K., YAMADA, Y., KITAZATO, K., ITOH, H. & KOHNO, K. 2002. Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 94, 1939-46.
- SHIBUYA, K., MATHERS, C. D., BOSCHI-PINTO, C., LOPEZ, A. D. & MURRAY, C. J. 2002. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*, 2, 37.

- SHUGANG, X., HONGFA, Y., JIANPENG, L., XU, Z., JINGQI, F., XIANGXIANG, L. & WEI, L. 2016. Prognostic Value of SMAD4 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Transl Oncol*, 9, 1-7.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67, 7-30.
- SILVER, N., BEST, S., JIANG, J. & THEIN, S. L. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 7, 33.
- SIMPSON, I. A. & SONNE, O. 1982. A simple, rapid, and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation. *Anal Biochem*, 119, 424-7.
- SLADE, P. G., HAJIVANDI, M., BARTEL, C. M. & GORFIEN, S. F. 2012. Identifying the CHO secretome using mucin-type O-linked glycosylation and click-chemistry. *J Proteome Res*, 11, 6175-86.
- SMITH, B. J. 1997. SDS polyacrylamide gel electrophoresis for N-terminal protein sequencing. *Methods Mol Biol*, 64, 17-24.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- SONG, G., OUYANG, G. & BAO, S. 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 9, 59-71.
- STANLEY, P. 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- STEENTOF, C., VAKHRUSHEV, S. Y., JOSHI, H. J., KONG, Y., VESTER-CHRISTENSEN, M. B., SCHJOLDAGER, K. T., LAVRSEN, K., DABELSTEEN, S., PEDERSEN, N. B., MARCOS-SILVA, L., GUPTA, R., BENNETT, E. P., MANDEL, U., BRUNAK, S., WANDALL, H. H., LEVERY, S. B. & CLAUSEN, H. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32, 1478-88.
- STEFANOVIC, S. & HEGDE, R. S. 2007. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*, 128, 1147-59.
- STEIN, U., ARLT, F., WALTHER, W., SMITH, J., WALDMAN, T., HARRIS, E. D., MERTINS, S. D., HEIZMANN, C. W., ALLARD, D., BIRCHMEIER, W., SCHLAG, P. M. & SHOEMAKER, R. H. 2006. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology*, 131, 1486-500.
- STEPHENS, L., ANDERSON, K., STOKOE, D., ERDJUMENT-BROMAGE, H., PAINTER, G. F., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B., MCCORMICK, F., TEMPST, P., COADWELL, J. & HAWKINS, P. T. 1998. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*, 279, 710-4.
- TANAKA, M., FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C., ADSAY, V., CHARI, S., FALCONI, M., JANG, J. Y., KIMURA, W., LEVY, P., PITMAN, M. B., SCHMIDT, C. M., SHIMIZU, M., WOLFGANG, C. L., YAMAGUCHI, K., YAMAO, K. & INTERNATIONAL ASSOCIATION OF, P. 2012. International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas. *Pancreatology*, 12, 183-97.
- TARHAN, Y. E., KATO, T., JANG, M., HAGA, Y., UEDA, K., NAKAMURA, Y. & PARK, J. H. 2016. Morphological Changes, Cadherin Switching, and Growth Suppression in Pancreatic Cancer by GALNT6 Knockdown. *Neoplasia*, 18, 265-272.
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-42.
- VANDEVANTER, D. R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E. R., COULTER, S., GARBER, R. L. & ROSE, T. M. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol*, 34, 1666-71.
- VANHAESEBROECK, B. & ALESSI, D. R. 2000. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, 346 Pt 3, 561-76.

- VARKI, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97-130.
- VARKI, A., KANNAGI, R. & TOOLE, B. P. 2009. Glycosylation Changes in Cancer. In: ND, VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. & ETZLER, M. E. (eds.) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY).
- VERY, N., LEFEBVRE, T. & EL YAZIDI-BELKOURA, I. 2018. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9, 1380-1402.
- VOSSELLER, K., WELLS, L., LANE, M. D. & HART, G. W. 2002. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5313-8.
- WAGNER, K. W., PUNNOOSE, E. A., JANUARIO, T., LAWRENCE, D. A., PITTI, R. M., LANCASTER, K., LEE, D., VON GOETZ, M., YEE, S. F., TOTPAL, K., HUW, L., KATTA, V., CAVET, G., HYMOWITZ, S. G., AMLER, L. & ASHKENAZI, A. 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med*, 13, 1070-7.
- WANG, S., HUANG, X., SUN, D., XIN, X., PAN, Q., PENG, S., LIANG, Z., LUO, C., YANG, Y., JIANG, H., HUANG, M., CHAI, W., DING, J. & GENG, M. 2012. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. *PLoS One*, 7, e37427.
- WELINDER, C., BALDETORP, B., BORREBAECK, C., FREDLUND, B. M. & JANSSON, B. 2011. A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with in vivo anti-tumor activity. *Glycobiology*, 21, 1097-107.
- WIECHELMAN, K. J., BRAUN, R. D. & FITZPATRICK, J. D. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175, 231-7.
- WU, Y. & ZHOU, B. P. 2010. Snail: More than EMT. *Cell Adh Migr*, 4, 199-203.
- WU, Y. M., LIU, C. H., HU, R. H., HUANG, M. J., LEE, J. J., CHEN, C. H., HUANG, J., LAI, H. S., LEE, P. H., HSU, W. M., HUANG, H. C. & HUANG, M. C. 2011. Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor. *Cancer Res*, 71, 7270-9.
- XU, H., LI, M., ZHOU, Y., WANG, F., LI, X., WANG, L. & FAN, Q. 2016. S100A4 participates in epithelial-mesenchymal transition in breast cancer via targeting MMP2. *Tumour Biol*, 37, 2925-32.
- YADAV, D. & LOWENFELS, A. B. 2013. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144, 1252-61.
- YAMAMOTO, S., NAKAMORI, S., TSUJIE, M., TAKAHASHI, Y., NAGANO, H., DONO, K., UMESHITA, K., SAKON, M., TOMITA, Y., HOSHIDA, Y., AOZASA, K., KOHNO, K. & MONDEN, M. 2004a. Expression of uridine diphosphate N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 in adenocarcinoma of the pancreas. *Pathobiology*, 71, 12-8.
- YAMAMOTO, S., TOMITA, Y., HOSHIDA, Y., MOROOKA, T., NAGANO, H., DONO, K., UMESHITA, K., SAKON, M., ISHIKAWA, O., OHIGASHI, H., NAKAMORI, S., MONDEN, M. & AOZASA, K. 2004b. Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 2846-50.
- YAN, A. & LENNARZ, W. J. 2005. Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem*, 280, 3121-4.
- YANG, J. M., BYRD, J. C., SIDDIKI, B. B., CHUNG, Y. S., OKUNO, M., SOWA, M., KIM, Y. S., MATTA, K. L. & BROCKHAUSEN, I. 1994. Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology*, 4, 873-84.
- YANG, X., ONGUSAHA, P. P., MILES, P. D., HAVSTAD, J. C., ZHANG, F., SO, W. V., KUDLOW, J. E., MICHELL, R. H., OLEFSKY, J. M., FIELD, S. J. & EVANS, R. M. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*, 451, 964-9.

- YING, H., DEY, P., YAO, W., KIMMELMAN, A. C., DRAETTA, G. F., MAITRA, A. & DEPINHO, R. A. 2016. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 30, 355-85.
- ZEISBERG, M. & NEILSON, E. G. 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119, 1429-37.
- ZEITOUNI, D., PYLAYEVA-GUPTA, Y., DER, C. J. & BRYANT, K. L. 2016. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers (Basel)*, 8.
- ZHANG, G. & NEUBERT, T. A. 2009. Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for phosphotyrosine protein identification and quantitation. *Methods Mol Biol*, 527, 79-92, xi.
- ZHANG, X., SHI, S., ZHANG, B., NI, Q., YU, X. & XU, J. 2018. Circulating biomarkers for early diagnosis of pancreatic cancer: facts and hopes. *Am J Cancer Res*, 8, 332-353.
- ZHAO, D., BESSER, A. H., WANDER, S. A., SUN, J., ZHOU, W., WANG, B., INCE, T., DURANTE, M. A., GUO, W., MILLS, G., THEODORESCU, D. & SLINGERLAND, J. 2015. Cytoplasmic p27 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis via STAT3-mediated Twist1 upregulation. *Oncogene*, 34, 5447-59.
- ZHENG, X., BI, C., BROOKS, M. & HAGE, D. S. 2015. Analysis of Hormone-Protein Binding in Solution by Ultrafast Affinity Extraction: Interactions of Testosterone with Human Serum Albumin and Sex Hormone Binding Globulin. *Anal Chem*, 87, 11187-94.
- ZHOU, L., YUAN, D., ZHANG, Z. G., LIANG, Z. Y., ZHOU, W. X., YANG, J. Y., JIANG, S. H., LU, J., ZHANG, T. P., YOU, L., GUO, J. C. & ZHAO, Y. P. 2017. Expression of key mTOR pathway components in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multicenter study for clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer Lett*, 395, 45-52.
- ZHU, H., PAN, S., GU, S., BRADBURY, E. M. & CHEN, X. 2002. Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16, 2115-23.
- ZHU, Q. Q., MA, C., WANG, Q., SONG, Y. & LV, T. 2016. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol*, 37, 185-97.
- ZIMMERMANN, S. & MOELLING, K. 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, 286, 1741-4.
- ZONCU, R., EFEYAN, A. & SABATINI, D. M. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 21-35.

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei dem Klinikdirektor Prof. Dr. Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki, meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bockhorn und dem Laborleiter Dr. rer. nat. Güngör für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der wissenschaftlichen Betreuung und dem Bereitstellen der Materialien.

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Bockhorn möchte ich mich insbesondere für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Betreuung sowie für die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Größter Dank gilt Frau Dr. med. Hofmann für die außerordentliche Betreuung, den stetigen und qualifizierten Rat und die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit. Selbiges gilt für Dr. rer. nat. Wolters-Eisfeld.

Bei meinen Eltern Friederike und Dr.-Ing. Aeint Picksak möchte ich mich für die Ermöglichung des Medizinstudiums, die Durchsicht der Arbeit und die fleißige Unterstützung während der Dissertation bedanken.

Vielen Dank gilt auch Henriette und François, meinen Geschwistern Doerte, Beeke und Gesine für die stetige Motivation, die Durchsicht der Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Zudem möchte ich mich bei der Werner-Otto-Stiftung bedanken, die mich während der Dissertation mit einem Forschungsstipendium unterstützte.

9 Curriculum Vitae

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Eidesstaatliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift:

S. Pichler