

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

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

## **Untersuchung pankreatischer Alterationen konditional transgener Mausmodelle mit differentieller O-Glykosylierung induziert durch Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Elena Neuburg  
aus Hamburg

Hamburg 2021



**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.12.2021**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Daniel Wicklein**

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

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	7
1.1	Das Pankreas.....	7
1.1.1	Histologischer Aufbau und Funktion .....	7
1.1.2	Pathologien des Pankreas .....	8
1.1.2.1	Pankreatitis .....	8
1.1.2.1.1	Akute Pankreatitis .....	8
1.1.2.1.2	Chronische Pankreatitis .....	9
1.1.2.2	Pankreaskarzinom .....	11
1.1.2.2.1	Epidemiologie und Ätiologie .....	11
1.1.2.2.2	Pathogenese.....	13
1.2	O-Glykosylierung.....	15
1.2.1	Allgemeines .....	15
1.2.2	Funktion .....	17
1.2.3	Pathologische Veränderungen.....	18
1.2.4	Biochemie .....	20
1.2.4.1	Überblick.....	20
1.2.4.2	GalNAc-Transferasen .....	21
1.2.4.3	Tn- und STn-Antigen .....	24
1.2.4.4	T-Synthase und Cosmc .....	26
1.3	Genetik der Mausmodelle .....	30
2	Material und Methoden .....	33
2.1	Materialien.....	33
2.1.1	Geräte .....	33
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	34
2.1.3	Chemikalien .....	35
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	36
2.1.5	Antikörper.....	37

2.1.6	Lektine .....	38
2.1.7	Hersteller-Kits .....	39
2.2	Methoden .....	40
2.2.1	Biochemische Methoden.....	40
2.2.1.1	Herstellung von Proteinlysaten .....	40
2.2.1.2	BCA-Test (Proteinkonzentrationsbestimmung) .....	40
2.2.1.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	40
2.2.1.4	Immunoblot-Analyse (Western Blot).....	41
2.2.1.5	Immunreaktion .....	41
2.2.1.6	ECL-Detektion .....	42
2.2.1.7	Entfernen gebundener Antikörper.....	42
2.2.2	Immunhistochemische Methoden .....	42
2.2.2.1	Entparaffinierung von Paraffinschnitten.....	42
2.2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) .....	43
2.2.2.3	Antigendemaskierung .....	43
2.2.2.4	Immunhistochemische Färbungen.....	43
2.2.2.4.1	Chromogenfärbung .....	44
2.2.2.4.2	Fluoreszenzfärbungen .....	45
3	Ergebnisse .....	46
3.1	GaINT2-transgene Mauslinie .....	46
3.1.1	Körper- und Organgewichte.....	46
3.1.2	Makroskopie.....	48
3.1.3	Mikroskopie.....	48
3.1.4	Immunmarkierung .....	50
3.1.4.1	Nachweis von GaINT2 mit GALNT2-Antikörper.....	50
3.1.4.2	Nachweis von T-Antigen mit PNA.....	53
3.2	Tripletransgene Mauslinie (Cosmc-KO; GaINT2-Tg) .....	57
3.2.1	Körper- und Organgewichte.....	57

3.2.2	Makroskopie.....	58
3.2.3	Mikroskopie.....	59
3.2.4	Immunmarkierung .....	61
3.2.4.1	Nachweis von GalNT2 mit GALNT2-Antikörper.....	61
3.2.4.2	Nachweis von Tn-Antigen mit Tn-Antikörper und VVA.....	62
3.2.4.3	VVA- & GALNT2-Antikörper-Doppelfärbung.....	66
3.2.4.4	Nachweis von STn mit STn-Antikörper.....	68
3.2.4.5	Untersuchung von T-Antigen mit PNA.....	69
3.2.4.6	Untersuchung von O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung mit Phospho-(Ser/Thr)- und O-GlcNAc-Antikörper .....	70
4	Diskussion.....	73
5	Zusammenfassung .....	88
6	Summary.....	90
7	Abkürzungsverzeichnis .....	92
8	Abbildungsverzeichnis .....	94
9	Tabellenverzeichnis .....	97
10	Literaturverzeichnis.....	98
11	Danksagung.....	118
12	Eidesstattliche Versicherung.....	119

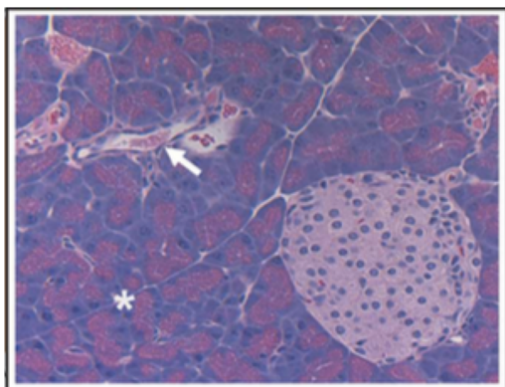
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreas

### 1.1.1 Histologischer Aufbau und Funktion

Das Pankreas (die Bauchspeicheldrüse) ist ein retroperitoneal im Oberbauch gelegenes Drüsenorgan. Es lässt sich in einen exokrinen und einen endokrinen Drüsenanteil unterteilen, wobei der exokrine Anteil im Wesentlichen für die Verdauung zuständig ist und der endokrine eine zentrale Rolle im Glucosestoffwechsel spielt.

Der exokrine, rein seröse Drüsenanteil macht die Hauptmasse des Pankreas aus. In den Drüsenzellen (Azinuszellen) werden die Verdauungsenzyme produziert, welche für die Spaltung der Nahrungsbestandteile Eiweiße, Fette und Kohlenhydrate zuständig sind. Die wichtigsten Verdauungsenzyme sind  $\alpha$ -Amylase zur Stärkespaltung, Lipase, Phospholipase A und Cholesterinesterase zur Lipolyse sowie verschiedene proteolytische Enzyme (z.B. Trypsin und Elastase). Die von den Azinuszellen sezernierten Verdauungsenzyme werden über Drüsengänge (Azini) weitergeleitet und münden über Schaltstücke in größere Ausführungsgänge (Ducti). Das Parenchym besteht insgesamt aus tausenden Läppchen (Lobuli), die durch Bindegewebssepten separiert werden. In diesen Bindegewebsstraßen verlaufen die intra- und interlobulären Ausführungsgänge, welche sich im Hauptausführungsgang, dem Ductus pancreaticus, vereinigen. Dieser mündet schließlich im Duodenum auf der Papilla duodeni major. Täglich werden so bis zu zwei Liter Pankreassekret in den Verdauungstrakt abgegeben (Lüllmann-Rauch 2015).



**Abb. 1:** Histologischer Aufbau des Pankreas. Zu sehen ist rechts unten im Bild eine Langerhans-Insel, umgeben von Azini (mit Stern markiert), der Pfeil zeigt auf einen beispielhaft angeschnittenen Ausführungsgang (Ductus). Modifiziert nach (Hezel et al. 2006).

Die 1869 von Paul Langerhans entdeckten Langerhans-Inseln (s. Abb. 1) bilden den endokrinen Anteil der Drüse. Die Masse der über eine Million Inseln macht nur ein bis zwei Prozent der Drüse aus. Man unterscheidet je nach produzierender Hormonart immunhistochemisch verschiedene Zellarten:

- $\alpha$ -Zellen produzieren Glucagon (ca. 20% der Zellen)
- $\beta$ -Zellen produzieren Insulin (ca. 70%)
- $\delta$ -Zellen produzieren Somatostatin (ca. 5%)
- PP-Zellen produzieren pankreatisches Polypeptid (<5%)

(Lüllmann-Rauch 2015)

## **1.1.2 Pathologien des Pankreas**

### **1.1.2.1 Pankreatitis**

Das Krankheitsbild der Bauchspeicheldrüsenentzündung lässt sich in zwei verschiedene Kategorien unterteilen, in die akute und die chronische Pankreatitis. Beide unterscheiden sich gravierend in klinischen sowie ätiologischen Merkmalen.

#### **1.1.2.1.1 Akute Pankreatitis**

Der pathophysiologische Mechanismus der akuten Pankreatitis beruht zumeist auf einer durch die Verdauungsenzyme stattfindenden Autodigestion des Parenchyms, insbesondere sind hier Proteasen wie z.B. Trypsin oder Elastase zu nennen. Hierdurch wird eine inflammatorische Reaktion ausgelöst (Shah et al. 2009; Sah and Saluja 2011). Als die häufigsten Auslöser sind neben idiopathischen Ursachen insbesondere Gallensteine und exzessiver Alkoholgenuss zu nennen (Johnson, Besselink, and Carter 2014; Nesvaderani et al. 2015)

Bei der akuten Pankreatitis handelt es sich um ein ernsthaftes Krankheitsbild mit hoher Morbidität und Mortalität (Gullo et al. 2002; Popa et al. 2016). Klinisch manifestiert es sich klassischerweise mit akuten gürtelförmigen Oberbauchschmerzen und starkem allgemeinen Krankheitsgefühl, teilweise begleitet von Übelkeit und Erbrechen (Johnson, Besselink, and Carter 2014).

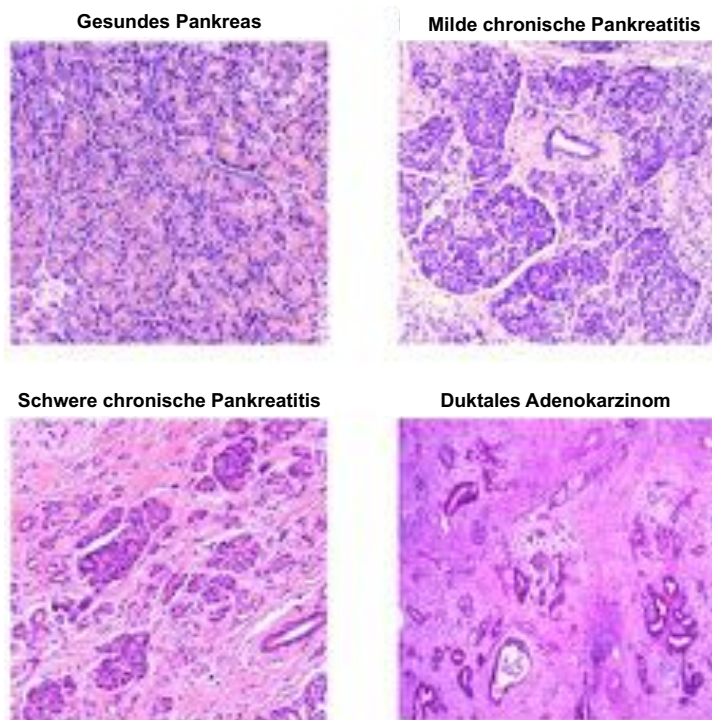


### **1.1.2.1.2 Chronische Pankreatitis**

Die chronische Pankreatitis ist gekennzeichnet durch rezidivierende Entzündungsschübe und einem daraus resultierenden fibrotischen Umbau des Parenchyms (Braganza et al. 2011; Gupte and Forsmark 2014). Klinisch stehen neben rezidivierenden bis hin zu chronischen Oberbauchschmerzen auch Symptome der exokrinen Pankreasinsuffizienz, wie Mangelernährungserscheinungen und Steatorrhö, im Vordergrund (Mayerle et al. 2013). Bei fortschreitender Erkrankung entwickeln sich zusätzlich Symptome der endokrinen Pankreasinsuffizienz, sodass ein Diabetes mellitus (als Typ 3c bezeichnet) eine ernstzunehmenden Komplikation darstellt (Ewald and Hardt 2013).

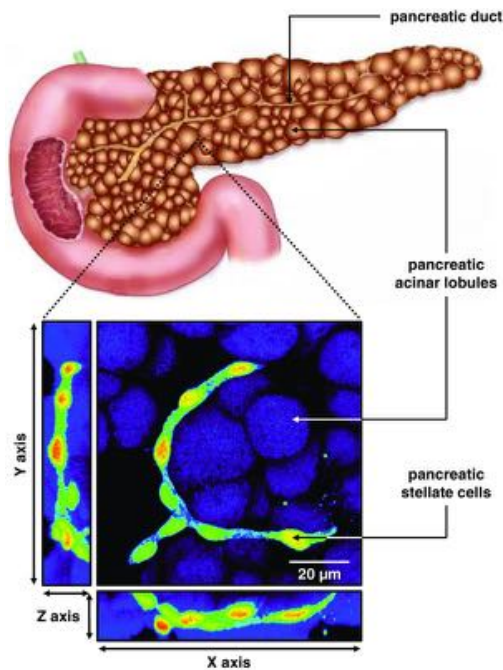
Alkoholabusus ist als wichtigster ätiologischer Faktor zu nennen (Yadav and Lowenfels 2013; Lee et al. 2015; Masamune 2015) und erhöht das Risiko an chronischer Pankreatitis zu erkranken um ein vierfaches (Yadav et al. 2007). Auch durch Tabakkonsum, insbesondere in Kombination mit Alkohol, wird das Risiko eindeutig erhöht (Maisonneuve et al. 2005; Lee et al. 2015). Darüber hinaus sind auch hereditäre Formen bekannt, bei denen z.B. Mutationen im kationischen Trypsinogen-Gen (PRSSI) für die Krankheit ursächlich sein können (Ellis, Lerch, and Whitcomb 2002; Rebours et al. 2008). Das Risiko der Chronifizierung einer rezidivierenden akuten Pankreatitis wird außerdem auf bis zu 35% geschätzt (Sankaran et al. 2015).

Bei der chronischen Pankreatitis handelt es sich trotz modernster Medizin immer noch um eine schwerwiegendes Krankheitsbild mit einer Letalität von 13 – 20% und einer 10-Jahres-Überlebensrate von 70%, welche im Gegensatz zu einer 93%igen einer altersgleichen Kohorte signifikant erniedrigt ist (Lankisch et al. 1993). Die Sterblichkeit der betroffenen Patienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um das ungefähr 3,5-fache erhöht (Lowenfels et al. 1994; Bang et al. 2014).



**Abb. 2:** Histologie des gesunden Pankreas, der milden und der schweren chronischen Pankreatitis sowie des duktales Adenokarzinoms. Modifiziert nach (Pan et al. 2011).

Histologisch ist die chronische Pankreatitis charakterisiert durch unterschiedlich stark ausgeprägte interstitielle Fibrosierung des Drüsenparenchyms infolge wiederholter Nekrosen und inflammatorischer Reaktionen („Nekrose-Fibrose-Sequenz“) (Oruc and Whitcomb 2004; Pandol et al. 2011). Durch den bindegewebigen Umbau kommt es zum Verlust des normalen Drüsenparenchyms und damit zu einer Atrophie des exokrinen Pankreasgewebes (s. Abb. 2). Häufig ist auch eine chronische lymphozytenreiche Entzündungsinfiltration zu beobachten (Conwell et al. 2014). Weitere histologische Merkmale können Duktusproliferation und muzinöse Metaplasien sein. Die Abgrenzung zum invasiven Pankreaskarzinom gelingt dabei häufig nicht leicht (vgl. Abb. 2). Bei dem Prozess der Fibrosierung spielen sogenannte Pankreassternzellen (Pancreatic stellate cells (PaSCs), s. Abb. 3) eine zentrale Rolle.



**Abb. 3:** Schematische Illustration des Pankreas mit Darstellung der Pankreassternzellen (pancreatic stellate cells) in Fluoreszenzmarkierung, welche ein dreidimensionales Netzwerk zwischen den azinären Lobuli bilden. Aus (Ferdek and Jakubowska 2017).

Bei den Pankreassternzellen handelt es sich um spezielle Bindegewebszellen, welche ähnlich wie die bei der Entwicklung einer Leberzirrhose maßgeblich beteiligten hepatischen Ito-Zellen von einem ruhenden in einen aktiven Zustand übergehen können (Omary et al. 2007; Apte, Pirola, and Wilson 2012). Sie machen dabei 4 – 7% der Organmasse aus (Apte et al. 1998). Durch parakrine und autokrine Stimuli erlangen sie im aktivierten Zustand myofibroblastäre Eigenschaften und können Aktin- sowie Kollagenfasern produzieren. Dies steht im engen Zusammenhang mit den schwerwiegenden Veränderungen, welche beim Krankheitsbild der chronischen Pankreatitis sowie bei der Entwicklung des Pankreaskarzinoms eine tragende Rolle spielen (Apte et al. 2004; Ferdek and Jakubowska 2017). Der Übergang zwischen den beiden Krankheitsbildern scheint dabei ein dynamischer Prozess zu sein (Shi et al. 2014).

### 1.1.2.2 Pankreaskarzinom

#### 1.1.2.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Bauchspeicheldrüsenkrebs ist eine schwerwiegende Erkrankung mit fast immer letalem Ausgang und steht an vierter Stelle der Krebstodesfälle der westlichen Welt (Malvezzi et al. 2014). Mit >95% ist das duktales Adenokarzinom (pancreatic ductal adenocarcinoma, kurz PDAC) die häufigste Form des Pankreaskarzinoms. Zu den selteneren Pankreastumoren zählen azinäre Adenokarzinome, Papillenkarzinome,

muzinöse Zystadenokarzinome, intraduktale Neoplasien oder endokrine Karzinome, die hier nur der Vollständigkeit halber mit aufgeführt werden (Taucher and Haybaeck 2017).

Das PDAC wird durch frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung charakterisiert. Es handelt sich dabei um eine besonders aggressive Tumorform mit außerordentlich schlechter Prognose (Fokas et al. 2015). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind nur ca. 15 – 20% der Pankreaskarzinome lokal begrenzt, nicht metastasiert und somit überhaupt operabel (Vincent et al. 2011). Das mediane Überleben beträgt selbst in diesem Fall nur 9 – 11 Monate. Die Mehrzahl der Patienten (60 – 70%) hat bei Diagnosestellung bereits Metastasen entwickelt. Diese Patientengruppe hat im Vergleich eine mediane Überlebensrate von nur 6 – 8 Monaten (Hidalgo 2010). Insgesamt beträgt die Fünfjahresüberlebensrate bei Diagnosestellung nur 5 – 8% (Chang, Wong, and Chang 2014; Siegel, Miller, and Jemal 2016; Ying et al. 2016).

Die genaue Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist weitestgehend unbekannt. Diskutiert werden genetische Faktoren, wozu verschiedene hereditäre Syndrome zählen. Als Beispiel wäre das Peutz-Jehgers-Syndrom (Mutation des STK11-Gens) zu nennen, wobei betroffene Individuen ein bis zu 76 – 139-fach erhöhtes Risiko haben an Pankreaskrebs zu erkranken (Korsse et al. 2013; Resta et al. 2013). Auch familiäre Vorbelastung erhöht das Risiko für Neoplasien der Bauchspeicheldrüse. So haben Verwandte ersten Grades von Patienten mit Pankreaskarzinom verglichen mit der Normalbevölkerung ein doppelt so hohes Risiko ebenfalls betroffen zu sein (Hruban et al. 2010). Umgekehrt lässt sich bei 5 – 10% der betroffenen Patienten eine positive Familienanamnese nachweisen (Shi, Hruban, and Klein 2009).

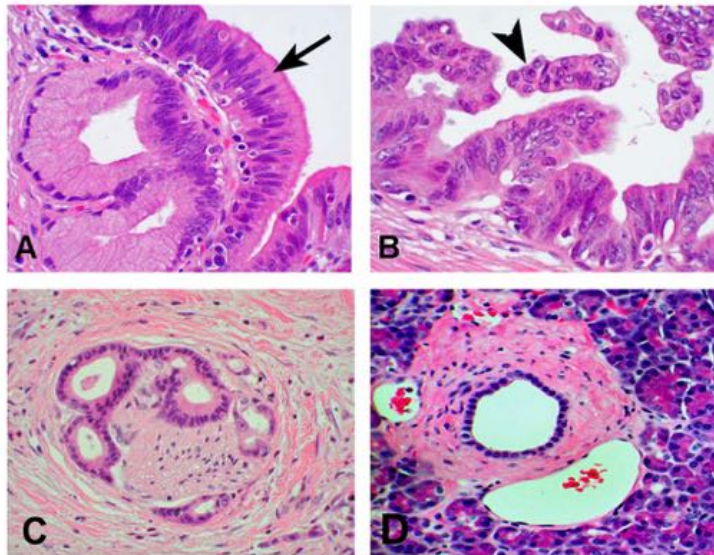
Als wichtigster Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ist die chronische Pankreatitis zu nennen. Das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms ist bei an chronischer Pankreatitis leidenden Patienten um das 13 – 45-fache erhöht (Lowenfels et al. 1993; Yadav and Lowenfels 2013; Kirkegård, Mortensen, and Cronin-Fenton 2017) und bei Menschen mit hereditärer Pankreatitis sogar um das 50-fache (Lowenfels et al. 1997; Lowenfels, Maisonneuve, and Whitcomb 2000).

Die Entstehung von Pankreaskrebs stellt insgesamt ein multifaktorielles Geschehen dar. Neben genetischer Prädisposition spielen auch weitere Risikofaktoren wie Rauchen (Silverman et al. 1994) und insbesondere Alkoholabusus (Hezel et al. 2006; Genkinger et al. 2009; Xu et al. 2015; Walling and Freelove 2017) eine entscheidende Rolle. Beide Faktoren überschneiden sich dabei mit den Risikofaktoren für die chronische Pankreatitis und lassen ätiologische Zusammenhänge erkennen (s.1.1.2.1.2) (Campa et al. 2018). Darüber hinaus zählt auch Adipositas zu den nachgewiesenen Risikofaktoren (de Gonzalez, Sweetland, and Spencer 2003). Ferner haben Patienten mit Diabetes ein zweifach erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, wobei jedoch zu beachten ist, dass das relative Risiko hierbei negativ mit der Erkrankungsdauer korreliert (Ben et al. 2011). Bei 40% aller Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs wurde in den davorliegenden drei Jahren Diabetes als Erstdiagnose diagnostiziert, verglichen mit nur 3 – 5% aller an anderen Krebsformen erkrankten Patienten (Aggarwal, Kamada, and Chari 2013).

#### **1.1.2.2.2 Pathogenese**

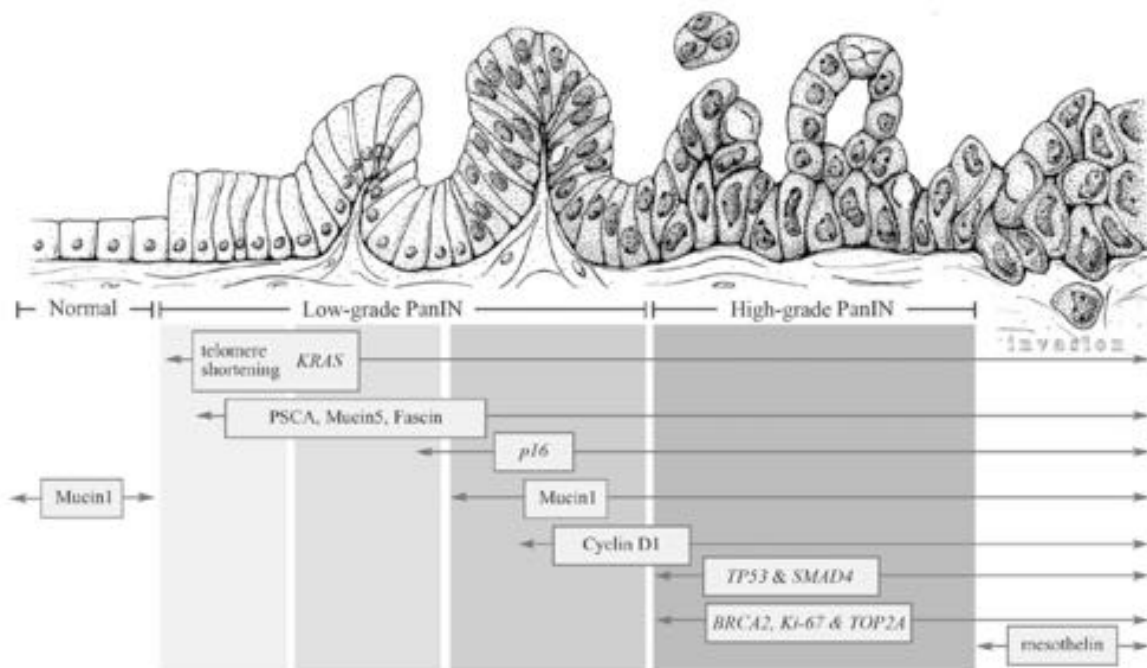
Die genaue Pathogenese des PDAC ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Eine bekannte Entstehungstheorie stellt die Tumorprogression über Präkanzerosen dar, die auch den Zusammenhang zwischen chronischer Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom erklären könnte (Pinho, Chantrill, and Rooman 2014). Es handelt sich dabei um präneoplastische Gangläsionen, auch Vorläuferläsionen genannt, die durch Akkumulation verschiedenster genetischer Mutationen entstehen. Hierzu zählen beispielsweise die Aktivierung des Onkogens K-ras und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p16, p53, DPC4/SMAD4, INK4A, BRCA2 und LKB1 sowie viele weitere Mutationen (Hezel et al. 2006). Die nichtinvasiven Vorläuferläsionen lassen sich in drei verschiedene Typen unterteilen: pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs), intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien (IPMNs) und muzinös-zystische Neoplasien (MCNs) (Singhi and Maitra 2017). Im Folgenden werden nur die PanINs behandelt. Diese stellen die häufigste und bekannteste Vorläuferläsion dar. PanINs treten in den interlobulären Ducti <5 mm auf und lassen sich in low-grade und high-grade PanINs einteilen. Während bei den low-grad PanINs nur wenige Zellkernveränderungen und Mitosen zu finden sind, nehmen die Anzahl der Zelltypen und der Mitosen bei den high-grad

PanINs signifikant zu. So sind die Kerne zunehmend vergrößert, hyperchromatisiert und die Zell-Plasma-Relation zeigt sich deutlich zugunsten der Kerne verschoben (s. Abb. 4).



**Abb. 4:** PanIN Histologie. A) Low-grade PanIN; B) High-grade PanIN; C) Duktales Adenokarzinom des Pankreas mit perineuraler Invasion; D) normales Pankreasgewebe (Ductus umgeben von Azini). Aus (Pan et al. 2009).

Die molekulargenetischen Mutationen, die schließlich zum invasiven Karzinom führen, geschehen dabei nicht in einer willkürlichen zeitlichen Reihenfolge, sondern lassen sich vielmehr in „frühe“ und „späte“ Veränderungen unterteilen (s. Abb. 5).



**Abb. 5:** Schematische Illustration der Progression von normalem Drüsenepithel zu Low-grade und High-grade PanINs mit entsprechenden Schlüsselereignissen genetischer Alterationen (sog. „PanIN-Progressionsmodell“). Aus (Singhi and Maitra 2018).

Zu den „frühen“ Veränderungen zählen beispielsweise die K-RAS-Mutation (Collins et al. 2012; Kanda et al. 2012) und der Verlust des p16-Tumorsuppressorgens (Wilentz et al. 1998). Am Übergang zwischen Low-grade und High-grade PanIN spielt z.B. die Überexprimierung von Cyclin D1 eine weitere wichtige Rolle. Cyclin D1 interagiert als Cyclin D1-CDK4 Komplex mit dem Tumorsuppressorgen Retinoblastomprotein (Rb) und führt zu dessen Inaktivierung (Alao 2007). Der Verlust der Tumorsuppressorgene p53 und SMAD4 stellt schließlich ein Beispiel für „späte“ Veränderungen dar (Singhi and Maitra 2018). Diese Erkenntnisse ermöglichen es die Entstehungsweise des Pankreaskarzinoms auf molekularbiologischer Ebene besser nachvollziehen zu können.

PanINs finden sich jedoch nicht nur beim duktalem Pankreaskarzinom gehäuft an, sondern auch bei der chronischen Pankreatitis. So konnten Andea und Kollegen in einer Studie feststellen, dass neben 82% der PDAC-Patienten auch 63% der Patienten mit chronischer Pankreatitis PanINs aufweisen. Bei Patienten mit normalem Pankreas waren es hingegen nur 28% (Andea, Sarkar, and Adsay 2003). Dies verdeutlicht weiter den bereits angesprochenen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen den beiden genannten Krankheitsbildern.

## **1.2 O-Glykosylierung**

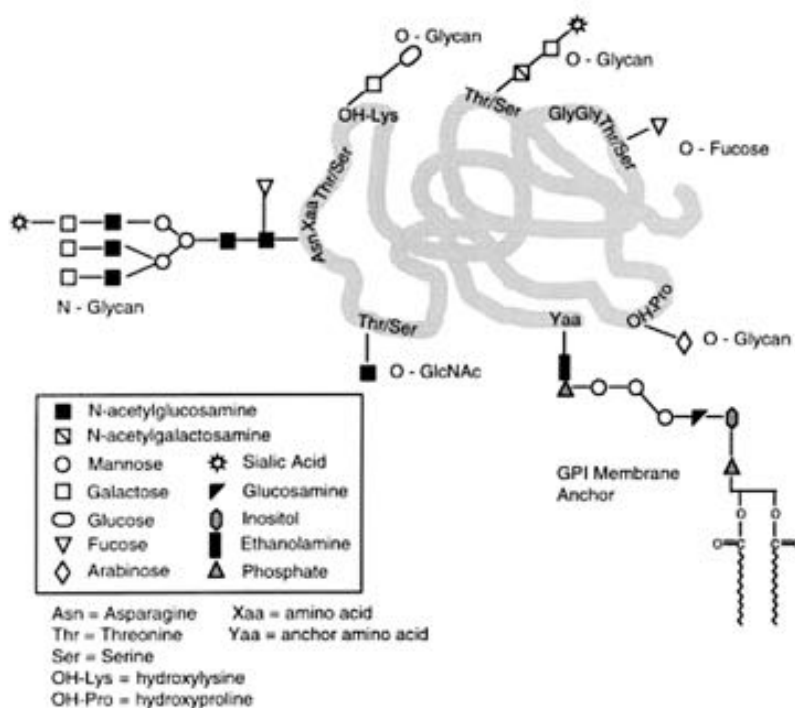
### **1.2.1 Allgemeines**

Glykosylierung beschreibt die enzymatische Anheftung von Zuckerresten an Proteine oder Lipide. Es soll eine Bandbreite von  $\geq 7000$  verschiedenen Glykanstrukturen bei Säugetieren existieren, welche durch die Kombination von nur 10 verschiedenen Monosacchariden gebildet werden. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um Glucose (Glc), Fucose (Fuc), Galactose (Gal), Mannose (Man), Xylose (Xyl), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc), Glucuronsäure (GlcA), Iduronsäure (IdA) und Sialinsäure (SA) (Moremen, Tiemeyer, and Nairn 2012). Insbesondere sekretorische und membranständige Proteine sind beim Menschen zum größten Teil in diverser Form glykosyliert. Ihre Diversität kann durch Modifikationen wie Sulfatierung, Phosphorylierung oder Bindungen an verschiedenste Makromoleküle erweitert werden (Kudelka et al. 2015).

Allgemein muss zwischen zwei verschiedenen Formen der Glykosylierung unterschieden werden. Bei der häufiger vorkommende N-Glykosylierung werden Zuckerketten vom komplexen Typ über einen Asparagin-Rest kovalent an Proteine gebunden. Diese Form der Glykosylierung erfolgt zunächst cotranslational im Endoplasmatischen Reticulum (ER). Die anschließende Modifikation, das sogenannte Trimmen, geschieht im Golgi Apparat (Voet et al. 2010). N-Glykane stellen ein deutlich besser erforschtes Gebiet dar, während über O-Glykane aufgrund ihrer großen Heterogenität insgesamt nur wenig bekannt ist.

Die O-Glykosylierung, die im Folgenden Gegenstand dieser Dissertation sein soll, stellt die zweite Form der Glykosylierung dar. Es handelt es sich dabei um eine im Golgi Apparat stattfindende posttranslationale Modifikation, bei welcher mit Hilfe von Glykosyltransferasen aktivierte Zuckerketten an Serin- und Threoninreste übertragen werden (Brooks 2006). Ein Überblick über beide Formen gibt Abb. 6.

O- und N-Glykane können dabei häufig koexistent in einem Protein oder in einer Zelle existieren (Reis et al. 2010).



**Abb. 6:** N- und O-Glykosylierung im Überblick. Aus (Van den Steen et al. 1998).

Die bedeutendste und häufigste Form der O-Glykosylierung ist die mucintypische Glykosylierung. Bei Mucinen (kurz MUC) handelt es sich um hochglykosylierte Proteine, die im menschlichen Körper von den mukösen Drüsen der Schleimhäute sezerniert werden und eine hohe Wasserbindungskapazität aufweisen (Corfield



2015; Petrou and Crouzier 2018). Mucintypisch gebundene O-Glykane finden sich häufig repetitiv in Clustern angelegt auf membrangebundenen und sekretorischen Proteinen. Als Transmembranproteine tragen sie zur Glykokalyx einer Zelle bei. Die Polysaccharide machen dabei >50% des Massengewichtes eines Glykoproteins aus und sind somit maßgebend an der Strukturgebung beteiligt (Hanisch and Müller 2000). Außerdem schützen sie das zentrale Proteine vor enzymatischer Proteolyse (Takehara et al. 2013; Petrou and Crouzier 2018). Es sind verschiedene menschliche MUC-Gene bekannt, so handelt es sich z.B. bei MUC1 oder MUC4 um Transmembranproteine (Gendler and Spicer 1995; Moniaux et al. 1999), bei MUC2, MUC6 oder MUC7 hingegen um sekretorische Mucine (Bartman et al. 1998; Jumblatt et al. 2003; Ma, Rubin, and Voynow 2018; Yamashita and Melo 2018). Die vermehrte Expression vieler Mucine lässt sich bei verschiedenen Karzinomkrankungen beobachten, weswegen sie großes Potential haben als mögliche Tumormarker eine Bedeutung zu erlangen (Nath and Mukherjee 2014; Pillai et al. 2015; Bhatia et al. 2019; Gautam et al. 2020) bzw. zum Teil wie beispielsweise MUC16 (CA125) beim Ovarialkarzinom als solche bereits klinische Anwendung finden (Felder et al. 2014).

### **1.2.2 Funktion**

Die genaue biologische Funktion der verschiedenen Glykoproteome ist u.a. aufgrund ihrer Komplexität weitestgehend ungeklärt. Das Forschungsfeld der Glykobiologie hat jedoch in den letzten Jahrzehnten an enormer Bedeutung gewonnen, sodass mittlerweile viele wissenschaftlich belegte Theorien zum Thema Glykosylierung erarbeitet werden konnten.

Die biologische Funktion der Glykanstrukturen lässt sich in zwei übergeordnete Kategorien einteilen. Zunächst ist bekannt, dass Glykane u.a. strukturelle und modulierende Funktionen haben. So sind Proteoglykane beispielsweise für die Stabilisierung von Gewebestruktur und –beschaffenheit von großer Bedeutung. Glykane fungieren auch als natürliches Schutzschild, indem sie Polypeptide von Proteasen abschirmen. Ferner wird durch nach extrazellulär orientierte Zuckerreste von Membranproteinen die auf der Mehrzahl der eukaryotischen Zellen vorhandene Glykokalix gebildet, welche als natürliche physikalische Barriere dient (Varki and Lowe 2009). Eine weitere wichtige Funktion in diesem Kontext stellt die

Qualitätskontrolle der korrekten Proteinfaltung im ER sowie die Aufrechterhaltung der Proteinkonformation dar (Xu and Ng 2015).

Das zweite große Feld in welchem Glykanstrukturen eine zentrale Rolle spielen, stellt die Interaktion und Kommunikation mit der Umwelt dar. Die Zuckerreste sind in diesem Fall strukturelle Bestandteile von Zellmembranen und werden von anderen Molekülen meist durch sogenannte Glykanbindungsproteine (GBP) erkannt. Intrinsische GBP spielen für verschiedenste Zell-Zellerkennungen und Zell-Matrix-Interaktionen eine bedeutende Rolle (Varki and Lowe 2009). Als bekanntes Beispiel hierfür sind die ABH-Kohlenhydratantigene des AB0-Blutgruppensystems auf Erythrozytenmembranen zu nennen (Yamamoto et al. 1990). Ein weiteres wichtiges Beispiel sind die Erkennungsreaktionen durch das Immunsystem, insbesondere die Erkennung von MHC-Proteinen durch den T-Zell-Rezeptorkomplex (Rudd et al. 2001). Als zentrale Bestandteile des Immunsystem zählen Immunglobuline und Interferone ebenfalls zu den Glykoproteinen (Rudd et al. 2001). Auch bei der Embryonalentwicklung sind Glykoproteine von großer Bedeutung (Haltiwanger and Lowe 2004), so spielen sie z.B. bei der Angiogenese eine wichtige Rolle (Xia et al. 2004). Ferner fungieren spezielle Glykane auch als spezifische Liganden für eine Vielzahl von Bakterien, Parasiten und Viren oder auch als Erkennungsziel für bakterielle Toxine (Varki and Lowe 2009).

### **1.2.3 Pathologische Veränderungen**

Es ist unbestritten, dass Alterationen in der Glykosylierung von Proteinstrukturen auch bei pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen. Eine der ersten wichtigen Erkenntnisse auf diesem Gebiet stellte die veränderte Glykosylierung des Immunglobulins G (IgG) bei rheumatoider Arthritis dar (Rademacher, Parekh, and Dwek 1988; Rudd et al. 2001).

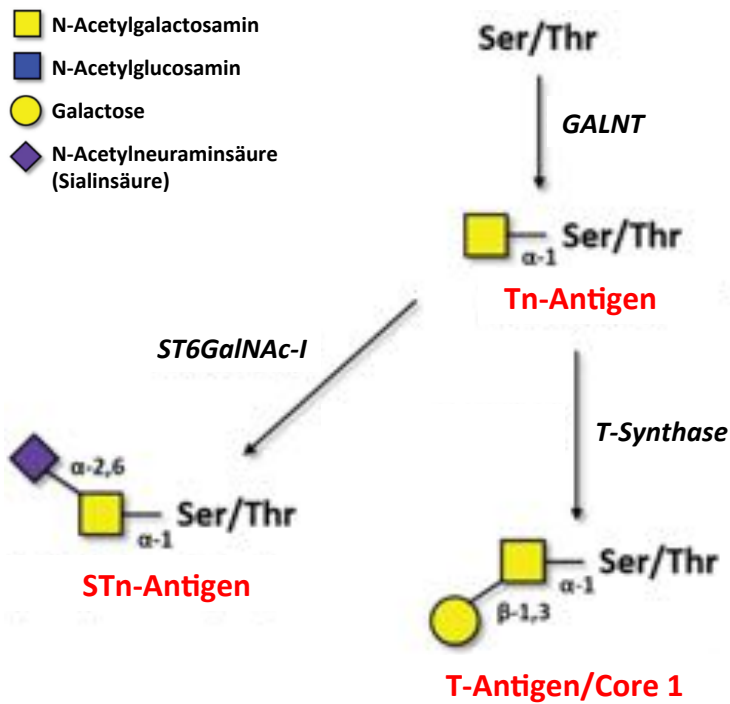
Von zentraler Bedeutung, insbesondere für den Inhalt dieser Arbeit, sind jedoch die veränderten Glykosylierungsprozesse im Tumorkontext. Dies stellt ein bedeutsames und komplexes Forschungsgebiet dar. Schon in den 1980er Jahren fanden Wissenschaftler heraus, dass neu generierte monoklonale Antikörper gegen Tumorzellen Glykanstrukturen und nicht wie erhofft spezifische Zelloberflächenantigene erkennen (Feizi 1985). In zahlreichen weiteren Studien ist mittlerweile belegt, dass in verschiedensten Tumorentitäten veränderte Zuckerreste

beobachtet werden können (Hakomori 2001; Brooks 2006; Pinho and Reis 2015; Munkley and Elliott 2016). Auch bei malignen Prozessen wie der Metastasierung (Brooks 2006; Magalhaes, Duarte, and Reis 2017) oder Angiogenese (Compagno et al. 2014; Munkley and Elliott 2016) spielen sie eine entscheidende Rolle. Dank spezieller Glykanstrukturen (z.B. GBP oder Selektinen) können Tumorzellen beispielsweise Bindungen mit Gefäßendothelien oder anderen Blutbestandteilen eingehen, wodurch Metastasenbildung ermöglicht wird (Häuselmann and Borsig 2014; Kannagi 1997; Witz 2008). Auch immunsuppressive Auswirkungen durch aberrante Glykosylierung spielen im Tumorkontext, insbesondere bei Metastasierung, eine wichtige Rolle (Borsig et al. 2002; Hoos, Protsyuk, and Borsig 2014).

Allgemein sind die Eigenschaften verbesserte Zelladhäsion, -mobilität und die Aktivierung verschiedener Rezeptoren einige der vielen Faktoren durch die veränderte Glykosylierung zum invasiven Phänotyp des Tumorgewebes beiträgt (Kannagi 1997; Fuster and Esko 2005). Insgesamt gibt es viele Theorien und Studien zu der komplexen Thematik, die genauen Mechanismen sind jedoch zum großen Teil immer noch nicht vollständig erforscht und verstanden.

## 1.2.4 Biochemie

### 1.2.4.1 Überblick



**Abb. 7:** Syntheseweg von O-Glykan-Strukturen. Modifiziert nach (Loureiro et al. 2015).

O-Glykane stellen, wie unter 1.2.1 bereits erwähnt, hochkomplexe und vielfach verzweigte Strukturen dar, welche in der Natur in einer äußerst heterogenen Vielfalt vorkommen. Die ersten Schritte der Synthese und somit die Grundstruktur der Zuckerreste sind dabei einheitlich und von zentraler Bedeutung.

Abbildung 7 gibt einen schematischen Überblick über die wichtigsten Bestandteile der O-Glykan-Synthese. Biochemisch wird beim initialen Schritt der O-Glykosylierung mit Hilfe der Enzymgruppe der Polypeptid N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs oder auch GALNTs abgekürzt, Details s. 1.2.4.2) zuerst ein UDP- $\alpha$ -N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-Rest an die Hydroxylgruppe eines Serin- und Threoninrestes einer Polypeptidstruktur übertragen (Hanisch 2001). Das so im Golgi-Apparat gebildete Vorläuferprotein namens Tn-Antigen, welches von zentralem Interesse dieser Arbeit ist (s. 1.2.4.3), kann als Akzeptor für verschiedene Glycosyltransferasen dienen und wird im physiologischen Kontext durch das Enzym T-Synthase zu einer Kernstruktur (Core) erweitert. Core 1 – 8 sind in der Literatur beschrieben, wobei Core 5 – 8 sehr selten vorkommen und kaum etwas über sie bekannt ist (Abbildung 7 zeigt aus didaktischen Gründen nur Core 1) (Kudelka et al.

2015). Tabelle 1 gibt hierbei einen Überblick über den Aufbau von Core 1 – 4.

Name	Zuckerstruktur
Tn-Antigen	GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
STn-Antigen	Sia $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
Core 1 oder T-Antigen	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
Core 2	GlcNAc $\beta$ 1-6(Gal $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
Core 3	GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ Ser/Thr
Core 4	GlcNAc $\beta$ 1-6(GlcNAc $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ Ser/Thr

**Tabelle 1:** Aufbau der wichtigsten O-Glykane.

Die Core Strukturen können anschließend in großer heterogener Vielfalt mit linearen oder verzweigten Zuckerketten modifiziert werden (Brockhausen and Stanley 2015). Die Core-1-Synthase, Glykoprotein-N-Acetylgalactosamin-3-beta-galactosyltransferase, 1 (C1GALT1 oder auch T-Synthase genannt, s. 1.2.4.4) fungiert hierbei als Schlüsselenzym der mucintypischen O-Glykosylierung und bildet das Core 1 Protein. Es wird auch als T-Antigen bezeichnet (für „Thomsen-Friedenreich-Antigen“, nach den Entdeckern Thomsen und Friedenreich im Jahre 1930 (Friedenreich 1930)) und stellt die häufigste Modifikation des Tn-Antigens dar (Ju et al. 2002; Ju, Zheng, and Cummings 2006; Ju, Otto, and Cummings 2011b). Das Tn-Antigen kann jedoch, vor allem im pathologischen Kontext, auch durch die Sialyltransferase ST6GalNAc-I (Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase) modifiziert werden, wodurch das Sialyl-Tn-Antigen (STn-Antigen) gebildet wird (Details s. 1.2.4.3). Tabelle 1 fasst den Aufbau der genannten O-Glykan-Strukturen nochmals zusammen.

#### 1.2.4.2 GalNAc-Transferasen

Die Polypeptid-GalNAc-Transferasen (ppGalNAcTs oder auch GALNTs abgekürzt), gehören zu der großen Familie der Glykosyltransferasen. Diese transferieren einzelne oder auch multiple aktivierte Zuckerreste auf verschiedene Moleküle (Khorolragchaa et al. 2014).

Die Familie der GalNAc-Transferasen umfasst wiederum eine Anzahl von bisher 20 bekannten Isoenzymen (GALNT1 – 20 ) (Hussain, Hoessli, and Fang 2016). Dies ist besonders erstaunlich, wenn man bedenkt, dass die Isoenzyme alle die gleiche

biochemische Reaktion katalysieren und nicht umsonst Gegenstand intensiver Forschung. Nach aktuellem Erkenntnisstand werden die verschiedenen Isoenzyme je nach Zelle auf unterschiedliche Weise und basierend auf verschiedensten Einflüssen exprimiert. Dadurch können Glykosylierungsvorgänge auf komplexe Weise reguliert werden (Beaman and Brooks 2014). Lokalisiert sind die GalNAc-Transferasen im Golgi-Apparat (Rottger et al. 1998).

Verschiedenste Studien beweisen, dass veränderte Expressionsmuster der GalNAc-Transferasen, sei es gesteigerte oder verringerte Expression, im Karzinomkontext eine entscheidende Rolle spielen (Brockhausen 1999; Hussain, Nasir, and Al-Aama 2014). Im Folgenden werden zur Veranschaulichung einige Beispiele genannt. So konnten Onitsuka und Kollegen beispielweise zeigen, dass ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen dem GALNT3-Expressionslevel und der Überlebensrate bei Patienten mit Magenkarzinomen besteht und postulieren das Enzym daher als möglichen Prognosemarker (Onitsuka et al. 2003). Ähnliches gilt für das GALNT5- (He et al. 2014) und GALNT10-Expressionslevel (Tian and Ten Hagen 2009) in Magenkarzinomzellen. Bei Nierenzellkarzinomen fanden Wissenschaftler heraus, dass die GALNT3-Positivität mit der Tumorgroße und einer schlechten Prognose korreliert (Kitada et al. 2013). Alterationen der GALNT1-Expression konnten wiederum z.B. bei Ovarial- (Sellers et al. 2008; Phelan et al. 2010) oder Blasentumoren (Ding et al. 2012) beobachtet werden. Ferner zeigt sich beim hepatozellulären Karzinom die GALNT1-Expression hochreguliert, was mit eindeutiger Prognoseverschlechterung assoziiert ist (Huang et al. 2015). Eine erhöhte Expressionsrate von GALNT13 konnte dagegen bei Lungenkrebs festgestellt werden (Nogimori et al. 2016). Umgekehrt zeigt eine Studie von Li und Kollegen bei Pankreaskarzinomen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen positiver GALNT6-Expression und einer besseren Gesamtüberlebensrate, wobei höhergradige Differenzierung, kleinere Tumorgroße und ein geringeres Tumorstaging eine Rolle spielen (Li et al. 2011).

All diese Beispiele lassen erkennen, dass GalNAc-Transferasen eine bedeutende Rolle in verschiedensten Tumorentitäten spielen und verschiedene, weitreichende Einflüsse auf die Tumormerkmale haben. Hierbei wird außerdem deutlich, dass, je nach Organ und Isoenzym, vermehrte als auch verminderte Expression einen proportionalen Zusammenhang zu malignen Eigenschaften haben kann.

Der Fokus dieser Arbeit soll dabei insbesondere auf der Glykosyltransferase GALNT2 liegen. In der bisherigen Literatur finden sich verschiedene Studien zu den Folgen veränderte GALNT2-Expression, insgesamt gibt es jedoch weiterhin wenig Forschungsergebnisse zu der Thematik.

In einer Arbeit zum Neuroblastom konnten Ho und Kollegen beispielsweise herausfinden, dass GALNT2-Überexprimierung zu verringerter Tumorzellproliferation und –invasion führt (Ho et al. 2014). Beim Adenokarzinom des Magens zeigte sich, dass GALNT2-Herunterregulierung zu Tumorzellwachstum, –invasion und Metastasierung führt, GALNT2 also einen malignitätsmindernden Effekt hat (Liu et al. 2016). In einer anderen Studien zeigten Hu und Kollegen, dass GALNT2 die Malignität beim Magenkarzinom über die Beeinflussung des EGFR-PI3K/Akt-Signalweges herabsetzt. GALNT2-Knockout bei Magenkarzinomzellen führte zu verstärkter Phosphorylierung des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (pEGFR), was mit vermehrter Metastasierung und schlechteren Tumorstadien assoziiert war. Gleichzeitig zeigte sich verminderte Expressionslevel des Tn-Antigens (Hu et al. 2018). Vergleichbare Ergebnisse konnten beim Hepatozellulären Karzinom erzielt werden (Wu et al. 2011).

Interessanterweise verhält es sich jedoch beim oralen Plattenepithelkarzinom gegenteilig, da vermehrte GALNT2-Aktivität durch Glykosylierung des EGFR in diesem Fall Tumorwachstum und Invasivität fördert (Lin et al. 2014). Diesen proportionalen Zusammenhang konnten Sun und Kollegen ebenfalls beim Gliom nachweisen. In der von ihnen durchgeführten Studie resultierte ein GALNT2-Knockdown zu verringerter Phosphorylierung sowie Tn-Antigen-Exprimierung des EGFR, wodurch der bei der Kanzerogenese wichtige EGFR/PI3K/mTOR Signalweg negativ beeinflusst wurde. Darüber hinaus ließ sich beweisen, dass GALNT2-Expression mit einem höheren Tumorstadium, schlechterer Krankheitsprognose und Zellproliferation sowie -migration assoziiert ist (Sun et al. 2019).

Auch der Lipoproteinstoffwechsel ist als weiterer wichtiger Prozess zu erwähnen, bei welchem GALNT2 ebenfalls involviert ist. So scheint GALNT2 beispielsweise in verschiedenen Studien regulatorische Einflüsse auf den HDL-Stoffwechsel zu haben (Roman et al. 2015; Khetarpal et al. 2016). Außerdem ließ sich bei Patienten mit Typ 2 Diabetes eine reduzierte GALNT2-Expression nachweisen. Dies impliziert, dass

GALNT2 ebenfalls im Glukosestoffwechsel eine Rolle zu spielen scheint (Marucci et al. 2013).

Zusammenfassend ist veränderte Glykosylierung in vielen pathologischen Prozessen und insbesondere im Tumorkontext zu beobachten. Daher ist die Thematik seit Jahren von großem wissenschaftlichen Interesse (Hollingsworth and Swanson 2004; Brockhausen and Stanley 2015; Pinho and Reis 2015) und wird als nicht umsonst als eines der „Hallmarks of cancer“ (Kennzeichen für Krebs) bezeichnet (Munkley and Elliott 2016).

### **1.2.4.3 Tn- und STn-Antigen**

Im ersten Schritt der O-Glykosylierung, katalysiert durch die GalNac-Transferasen, entsteht das verkürzte O-Glykan Tn-Antigen (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr). Dieses wird als Vorläuferprotein in humanen Zellen im Regelfall weiter prozessiert (s. 1.2.4.1) und lässt sich in benignem Gewebe kaum bis gar nicht nachweisen (Ju et al. 2013). Veränderungen der O-Glykosylierung, insbesondere das Vorliegen des Tn-Antigens sowie dessen sialysierte Form (STn-Antigen), werden bei vielen Krankheitsbildern, maßgeblich jedoch bei Tumorerkrankungen beobachtet (Radhakrishnan et al. 2014; Munkley and Elliott 2016). Entdeckt wurde das Tn-Antigen Ende der 60er Jahre durch die spezifische Bindung des Schlangenkletins Helix Pomatia Agglutinin (HPA) an den terminal  $\alpha$ -gebundenen GalNac-Rest (Prokop and Uhlenbruck 1969). Dies gilt als ein Meilenstein der Geschichte der Glykobiologie. Wenige Jahre später wurde erstmalig ein enger Zusammenhang mit Karzinomen beschrieben als Wissenschaftler deutlich erhöhte Tn-Expressionlevel bei 90% der untersuchten Fälle von Mammakarzinomen finden konnten (Springer, Desai, and Banatwala 1974). Seither ist die tumorspezifische Antigenstruktur und ihre sialysierte Form von großem wissenschaftlichen Interesse und Gegenstand intensiver Forschung.

Bekannt wurde das Tn-Antigen auch durch die Beschreibung des bereits vor vielen Jahren entdeckten Tn-Syndroms, auch als Tn-Polyagglutinabilität bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine seltene hämatologische Erkrankung, bei welcher ein erworbener, klonaler Enzymdefekt der beta-1,3-Galactosyltransferase in hämatopoetischen Stammzellen vorliegt. Dies hat eine deutlich erhöhte Tn-Expression in den betroffenen Blutzelllinien zur Folge (Bird 1977; Berger 1999). Im



Regelfall hat dieser Defekt bei den betroffenen Patienten keine klinischen Auswirkungen, laborchemisch können jedoch leichte Thrombozyto- und Leukozytopenien auffallen (Berger 1999). Auch Assoziationen zu Leukämien sind beschrieben (Ness et al. 1979).

Darüber hinaus ließ sich interessanterweise auch beim HI-Virus Tn-Expression nachweisen (Hansen et al. 1991).

Das Tn-Antigen konnte vor allem jedoch in einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen werden und ist somit als möglicher histologischer Marker und pharmakologischer Angriffspunkt zu werten (Springer 1984, 1997; Desai 2000; Fu et al. 2016). Allgemein gesprochen korreliert das Expressionslevel dabei negativ mit dem Grad der Differenzierung und positiv mit der Aggressivität des Tumors (Springer et al. 1995). In unzähligen Studien konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen Tn-Expression und schlechter Prognose bzw. Metastasierungspotential verschiedenster maligner Erkrankungen gezeigt werden (Desai 2000; Fu et al. 2016). Dies gilt insbesondere für Karzinome. Zu nennen wären neben Mammakarzinomen (Springer 1997; Tsuchiya et al. 1999) beispielsweise kolorektale Karzinome (Barrow et al. 2013; Wei et al. 2016; Jiang et al. 2018) oder Magenkarzinome (David et al. 1992; Li et al. 2016). Auch Karzinome der Zervix (Terasawa et al. 1996; Carrilho et al. 2000), der Ovarien (Inoue et al. 1991; Ghazizadeh et al. 1997; Akita et al. 2012), der Blase (Nishiyama et al. 1987; Langkilde et al. 1992), der Speicheldrüsen (Therkildsen et al. 1993; Fonseca et al. 1994) und der Lunge (Longenecker et al. 1987; Lisowska 1995; Matsumoto et al. 2012; Kato et al. 2021) wären in dem Kontext zu erwähnen. Das in dieser Arbeit besonders betrachtete Pankreaskarzinom reiht sich ebenfalls in diese Aufzählung ein (Itzkowitz et al. 1991; Osako et al. 1993; Terada and Nakanuma 1996; Hofmann et al. 2015; Doi et al. 2020). Wichtig zu erwähnen ist die Tatsache, dass auch bei prämaligen Epithelläsionen das Tn-Antigen in erhöhtem Maße zu finden ist, woraus sich ableiten lässt, dass es bereits bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt (Berriel et al. 2005; Radhakrishnan et al. 2014). Dies trifft vor allem für Neoplasien des Pankreas zu (Terada and Nakanuma 1996; Kim et al. 2002).

Die genauen Mechanismen durch die das Tn-Antigen bei der Tumorentwicklung eine Rolle spielt bleiben jedoch weiterhin unklar. Eine Theorie besagt, dass das Tn-Antigen u.a. immunmodulierende Effekte auf die Tumorzellen hat (Saeland et al. 2007; Ju et al. 2013).

Auch die sialysierte Form des Tn-Antigens, das STn-Antigen, findet man in ähnlicher Weise überexprimiert in Tumorzellen verschiedener Entitäten (Ju et al. 2013; Fu et al. 2016). Als Beispiele lassen sich Kolon- (Dahiya et al. 1992; Karlén et al. 1998), Magen- (Werther et al. 1994; Tamura et al. 2016), Pankreas- (Osako et al. 1993; Nanashima et al. 1999), Ovarial- (Kobayashi, Terao, and Kawashima 1992; Akita et al. 2012) sowie Zervixkarzinome (Carrilho et al. 2000) nennen. In vielerlei Hinsicht ähneln die wissenschaftlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle des STn-Antigens denen über die unsialysierte Form. So zeigt sich bei Magen- und Mammakarzinomen beispielsweise eine deutliche Korrelation zwischen STn-Expressionslevel und Tumorwachstum sowie Metastasierungsrate (Julien, Adriaenssens, et al. 2005; Ozaki et al. 2012). STn-positive Tumorzellen zeigen zusammengefasst ein aggressiveres Verhalten und spielen bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle (Fu et al. 2016). Es konnte ein Zusammenhang mit onkogenen Eigenschaften wie verringerter Zellaggregation oder vermehrter Migration und Invasion gezeigt werden (Julien, Adriaenssens, et al. 2005; Julien, Lagadec, et al. 2005; Pinho et al. 2007; Munkley 2016). Ein bedeutsamer Effekt des STn-Antigens ist außerdem die Inhibition der zytotoxischen Wirkung von NK-Zellen auf zirkulierende Metastazenzellen im Blut (Ogata, Maimonis, and Itzkowitz 1992). Ebenfalls von Bedeutung ist, dass das zuständige Enzym, die Sialyltransferase ST6GalNAc-I, in Tumorzellen erhöhte Expressionslevel sowie gesteigerte Aktivität zeigt (Marcos et al. 2004; Julien, Adriaenssens, et al. 2005; Ozaki et al. 2012; Tamura et al. 2016).

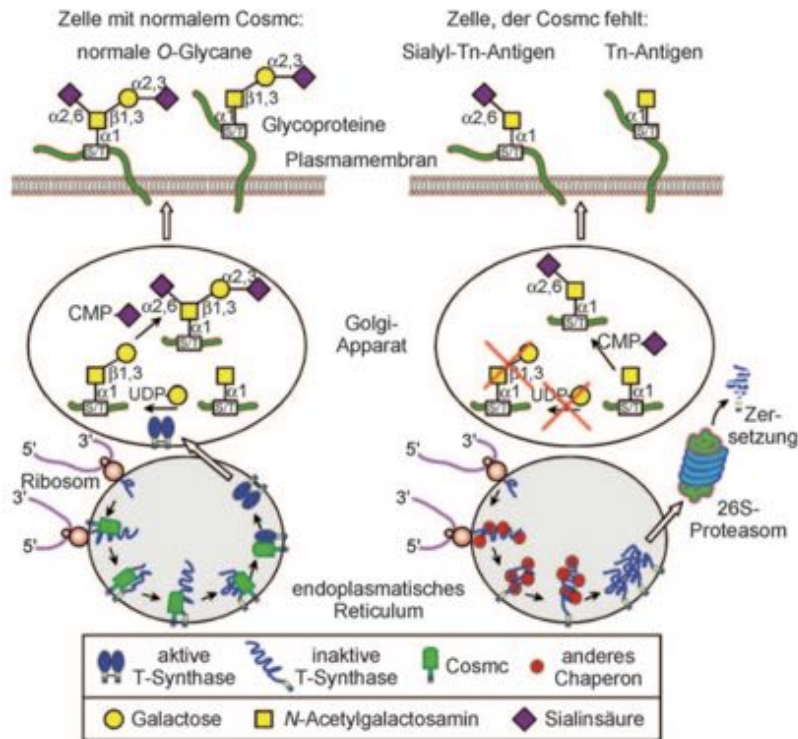
#### **1.2.4.4 T-Synthase und Cosmc**

Aus dem Vorläuferprotein Tn-Antigen wird durch die humane core 1  $\beta$ 3-Galactosyltransferase (C1GALT1), oder auch T-Synthase genannt, das Core 1 Protein bzw. T-Antigen gebildet. Durch das Enzym wird ein Galaktose-Rest mit dem GalNAc-Ser/Thr-Rest des Tn-Antigens kovalent verknüpft (s. Abb. 8). Die Aktivität der T-Synthase ist für die Wissenschaft von besonderem Interesse, da Veränderungen beim Prozess der Core 1 O-Glycan-Synthese, insbesondere die dysfunktionale Aktivität des Enzyms, mit vielen Krankheitsbildern assoziiert sind. Zu nennen wären neben Tumorerkrankungen (Springer 1984; Ju et al. 2014) auch Autoimmunerkrankungen wie die gA-Nephropathie (Novak et al. 2001; Zhong et al. 2021) oder Purpura Schönlein Hennoch (Saulsbury 1997). Besonders bedeutsam ist, dass das Enzym durch fehlende Funktionalität auch bei der Entwicklung des

Pankreaskarzinoms eine Rolle spielt, und somit von großem Interesse für das Thema dieser Arbeit ist (Chugh et al. 2018).

Bei Suppression der T-Synthase zeigen sich erhöhte Tn- und STn-Antigen-Expressionslevel, während die Expression des T-Antigens verringert ist (Barrow et al. 2013).

Die Enzymaktivität der T-Synthase ist in großem Maße von dem Chaperon COSMC (core 1 3-Gal-T-specific molecular chaperone) abhängig, welches von einem einzelnen x-chromosomalen Gen codiert wird (Xq24) (Ju and Cummings 2002; Wang et al. 2010). Chaperone sind spezielle Proteinstrukturen, die neu synthetisierten Proteinen helfen sich korrekt zu falten. Sie beschleunigen den Prozess der Faltung ohne selbst dabei Bestandteil der Struktur zu werden. Für die Mehrzahl der Proteine gilt, dass sie erst durch ihre abschließende Konformationsänderung gänzlich aktiv werden können (Jeng et al. 2015). Das Chaperon COSMC repräsentiert dabei das zuerst entdeckte Chaperon des Endoplasmatischen Reticulums (ER), welches für die Aktivierung einer Glykosyltransferase eine entscheidende Rolle spielt. Dabei bindet es zur Aktivierung der T-Synthase an die N-terminale Region namens CBRT und ist maßgeblich für die korrekte Faltung und Stabilisierung des Enzyms von Bedeutung (Aryal, Ju, and Cummings 2010; Fu et al. 2016). Anschließend wird die so aktivierte T-Synthase zum Golgi-Apparat transportiert und kann ihre physiologische Funktion aufnehmen (s. Abb. 8).



**Abb. 8:** Herstellung von O-Glycanen in Zellen mit funktionierendem Cosmc verglichen mit Zellen, in denen Cosmc als Chaperon fehlt. Links: das im ER exprimierte Cosmc bindet an die inaktive T-Synthase und aktiviert diese durch eine korrekte Faltung. Die als Dimer vorliegende T-Synthase wandert nun in den Golgi Apparat und kann dort ihre Funktion ausüben. Rechts: Fehlt Cosmc, wird die neu synthetisierte T-Synthase von anderen Chaperonen gebunden und falsch gefaltet, wodurch sie ins Zytosol retransloziert, ubiquitiniert und im 26S-Proteasom abgebaut wird. Dies hat die Expression von Tn- und STn-Antigenen auf der Zelloberfläche zur Folge. Aus (Ju, Otto, and Cummings 2011a)

In Zellen in denen COSMC fehlt bzw. defekt ist, wird die neu-synthetisierte T-Synthase falsch gefaltet und an ihrem N-Terminus verkürzt. Das nun fehlgefaltete Enzym wird durch den ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD) abgebaut, indem es ins Zytosol retransloziert wird, wo es schließlich polyubiquitiniert und zum Proteasom-Abbau freigegeben wird (Ju and Cummings 2002; Ju, Aryal, et al. 2008; Ju, Otto, and Cummings 2011b) (s. Abb. 8). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass fehlende COSMC-Aktivität eine erhöhte Tn-Expression zur Folge hat (Ju, Lanneau, et al. 2008; Ju et al. 2014). So beobachtet man bei somatischen Mutationen im COSMC-Gen, wie z.B. in der humanen T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat, fehlende T-Synthase-Aktivität. Dies hat zur Folge, dass T-Antigen in vermindertem und Tn-Antigen in erhöhtem Ausmaß vorliegen (Schietinger et al. 2006). Wang und Kollegen konnten darüber hinaus auch in vivo durch genetischen

Cosmc-Knockout beweisen, dass Cosmc-Deletion mit erhöhter Tn-Antigen-Expression korreliert. Außerdem zeigte sich, dass das Chaperon eine hohe Spezifität für das Enzym T-Synthase aufweist und keinen Einfluss auf andere Glykosylierungswege hat. In den Mauslinien führte der Verlust von Cosmc zu verschiedenen phänotypischen Veränderungen, abhängig vom Ausmaß der genetischen Deletion (teilweise bis zu komplett). So ließen sich von normaler Entwicklung über Wachstumsretardierung bis hin zu embryonaler Letalität unterschiedliche Auswirkungen beobachten (Wang et al. 2010). Dies zeigt die bedeutsame physiologische Funktion des Chaperons COSMC und des dazugehörigen Enzyms T-Synthase.

Die Wissenschaftler Ju und Kollegen konnten zudem herausfinden, dass bei Patienten mit Tn-Syndrom Blutvorläuferzellen häufig somatische Mutationen im COSMC-Gen zeigen (Ju and Cummings 2005). Dies ist als weiterer Hinweis dafür, dass COSMC auch im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle für physiologische Glykosylierungsprozesse spielt, zu werten. In einer späteren Studie konnten sie außerdem aufzeigen, dass bei neoplastischen Zellen mit erhöhter Tn-Expression COSMC nicht selten mutiert ist. Bei Transfektion von LSC-Zellen mit dem wt (wildtype) COSMC-Gen, welches aus der kolorektalen Karzinomzelllinie LS174T generiert wurde, konnte dahingegen wiederhergestellte T-Synthase-Aktivität beobachtet werden (Ju, Lanneau, et al. 2008). Bei LSC handelt es sich um eine aus der LS174T-Linie abgeleiteten Zelllinie, bei welcher die Zellen Tn- und STn-Antigen auf ihren Muzinen exprimieren, wodurch sie die Fähigkeit verlieren T-Antigen zu synthetisieren und die normalerweise vorhandenen muzintypischen O-Glykan-Strukturen zu bilden (Brockhausen et al. 1998).

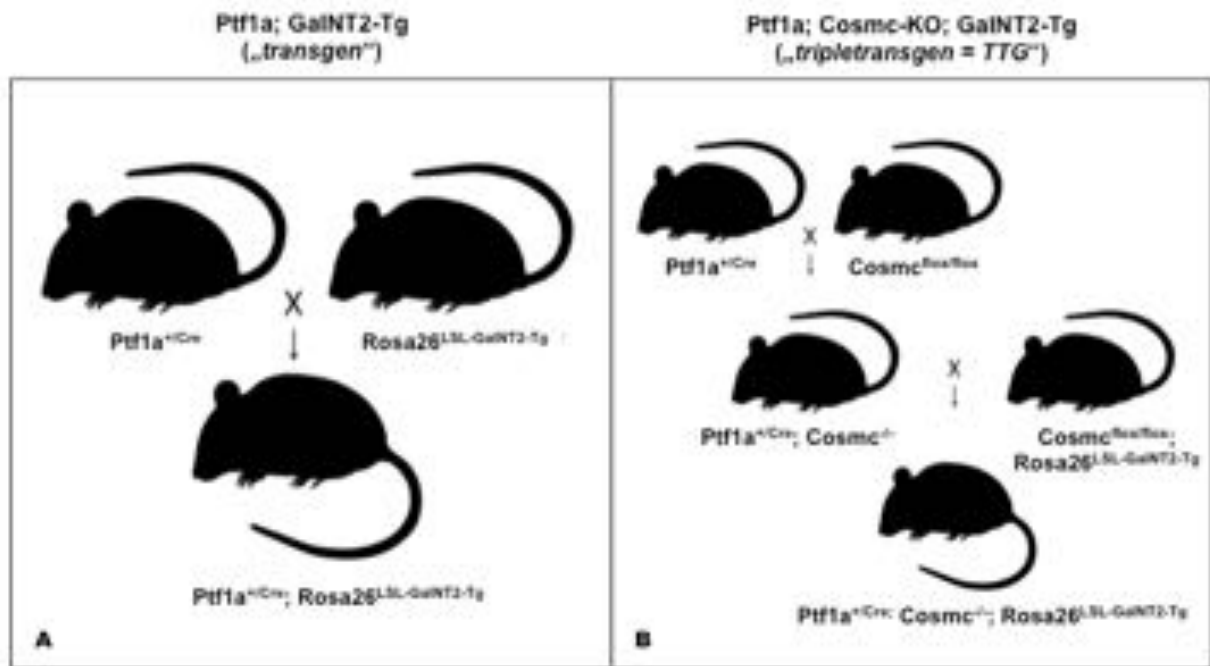
Die genauen Zusammenhänge zwischen fehlender COSMC-Aktivität und den pathologischen Auswirkungen, besonders im Karzinomkontext, sind jedoch weiterhin nur wenig verstanden. Hofmann und Kollegen untersuchten die Auswirkungen von COSMC-Knockout in verschiedenen PDAC-Zelllinien und konnten zum einen bestätigen, dass die Tn-Antigen-Expressionsrate signifikant steigt, und zum anderen zeigen, dass dies vermehrte onkogene Eigenschaften der Zellen, wie z.B. gesteigerte Migration und verminderte Apoptoserate, zur Folge hat (Hofmann et al. 2015). Auch in der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29-Tn<sup>+</sup> konnte der Verlust der COSMC gene coding sequence (CDS) mit fehlender T-Synthase-Aktivität und vermehrter Tn-

Expression nachgewiesen werden (Yu et al. 2015).

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei T-Synthase-Überexpression ohne die nötige COSMC-Koexpression das Protein dem Proteasom-Abbau zugeführt wird. Dies zeigt zum einen erneut, wie essentiell das Chaperon für die Aktivität der T-Synthase ist und zum anderen, dass endogenes COSMC in endlicher Weise vorliegt. (Ju and Cummings 2002).

### **1.3 Genetik der Mausmodelle**

Inhalt und Ziel dieser Arbeit ist es zwei verschiedene, neu generierte Mauslinien, insbesondere auf ihre molekularen und phänotypischen Auswirkungen auf das Pankreas, zu untersuchen und zu vergleichen. Dabei handelt es sich zum einen um die Mauslinie A mit pankreasspezifischer heterozygoter GalNT2-Überexpression nach dem Knock-In-Modell („transgen“) und zum anderen um die Mauslinie B, bei welcher, ebenfalls pankreasspezifisch, homozygoter Cosmc-Knockout mit heterozygoter GalNT2-Überexpression kombiniert wurde („tripletransgen“). Als Hintergrundinformation gilt es zu wissen, dass in einer vorausgehenden Arbeit von Wolters-Eisfeld und Kollegen die zu dem Zeitpunkt neu generierte pankreasspezifische Cosmc-Knockout Mauslinie eingehend untersucht wurde. Hierbei ließ sich feststellen, dass das molekulare Abschalten von Cosmc im Maus-Pankreas keine morphologischen oder karzinogenen Konsequenzen hat, sondern zur Entwicklung eines MODY Typ 8-Phänotyps (Maturity Onset Diabetes of the Young) führt (Wolters-Eisfeld et al. 2018). Nach diesen Erkenntnissen erfolgte nun zur weiterführenden Forschung die Entwicklung der Mauslinie B, in welcher Cosmc-Knockout mit einer GalNT2-Überexpression kombiniert wurde. Zur Differenzierung der Ergebnisse ist es nun von Wichtigkeit diese neu generierte Mauslinie (B) auch mit einer Mauslinie zu vergleichen, in welcher eine reine GalNT2 Überexpression vorliegt, daher wurde zusätzlich die Mauslinie A entwickelt und experimentell untersucht.



**Abb. 9:** Genetischer Hintergrund der Mausmodelle. A) Mauslinie A mit GalNT2-Überexpression ("transgen"); B) Mauslinie B mit Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression ("tripletransgen = TTG").

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 9 die Entstehung der beiden Mauslinien. Als Grundprinzip gilt die konditionale Mutagenese. Darunter versteht man den sequenzspezifischen, gezielten Einbau von Transgenen in das Wirtsgenom („gene targeting“) (Rajewsky et al. 1996). Mögliche Ziele können dabei sein, ein bestimmtes Gen lokal begrenzt zu inaktivieren („Gen-Knockout“) oder umgekehrt ein Gen einzufügen („Gen-Knockin“).

Bei der Mauslinie A wurde das Knockin-Modell verwendet. Es erfolgte die Insertion des Transgens (GalNT2) in einen spezifischen Genlocus (Rosa26), welcher sich seit vielen Jahren als passender Locus für Knockin-Linien wissenschaftlich bewährt hat (Casola 2010). Die GalNT2-Transkription wird jedoch durch eine vorgeschaltete geflochte LSL(lox-STOP-lox)-Kassette verhindert. Um das GalNT2-Gen pankreasspezifisch aktivieren zu können wurde die  $Rosa26^{LSL-GalNT2-Tg}$ -Maus mit der  $PTf1a^{+/Cre}$ -Maus gekreuzt, um sich das sogenannte Cre/loxP-System (Knockout-Modell) zu nutzen zu machen. Dieses Rekombinase-System benutzt das von Bakteriophagen gebildete Enzym Cre, welches im Genom die sogenannten loxP-Stellen erkennt und die flankierten DNA-Sequenzen exzidiert (sog. „floxing“) (Sauer and Henderson 1988). Dies geschieht bei den  $PTf1a^{+/Cre}$ -Mäusen in der

Embryonalentwicklung. Die Cre-Rekombinase wird jedoch nur in Zellen mit dem Genlocus *Ptf1a* (für „Pancreatic specific transcription factor 1a“) exprimiert, wodurch eine Pankreasspezifität gewährleistet werden kann. Durch das Entfernen der LSL-Sequenz kann das *GalNT2*-Gen nun abgelesen werden. Die *GalNT2*-Tg-Mauslinie besitzt somit im Gegensatz zum Wildtyp ein organspezifisches überexprimiertes *GalNT2*-Gen im Pankreas, weshalb es im Folgenden auch als „*GalNT2*-Überexpression“ bezeichnet wird. Es hat sich gezeigt, dass dabei nur heterozygote transgene Mäuse lebensfähig sind, da Homozygotie einen letalen Phänotyp zur Folge hatte.

Zur Generierung der Mauslinie B wurde im ersten Schritt die bereits oben erwähnte *Ptf1a*<sup>+/*Cre*</sup>-Maus mit der *Cosmc*<sup>flox/flox</sup>-Maus verpaart, was durch das Cre-loxP-Rekombinase-System (s. oben) bei den Nachkommen einen pankreasspezifischen homozygoten Knockout des *Cosmc*-Gens (*Cosmc*<sup>-/-</sup>) zur Folge hat (sog. *Cosmc*-KO-Mauslinie). Im darauffolgenden Schritt wurde diese Mauslinie mit der *Cosmc*<sup>flox/flox</sup>; *Rosa26*<sup>LSL-*GalNT2*-Tg</sup>-Mauslinie gekreuzt, sodass die Nachkommen beider Linien den Genotyp *Ptf1a*<sup>+/*Cre*</sup>; *Cosmc*<sup>-/-</sup>; *Rosa26*<sup>LSL-*GalNT2*-Tg</sup> aufweisen. Dadurch wurden die Eigenschaften der Pankreasspezifität, der *GalNT2*-Überexpression und des *Cosmc*-Knockouts kombiniert, wodurch die Bezeichnung „tripletransgen“, abgekürzt „TTG“ entstanden ist.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Blot-Apparatur		Bio-Rad
Digitalmikroskop	Keyence BZ-9000	Keyence
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad
ELISA reader	FLUOstar Omega	BMG Labtech
Entwickler-Maschine	Curix 60	Agfa
Filmkassette	x-ray cassette	Rego
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -80°C		Kryotec
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Kühlschrank +4°C		Liebherr
Magnetrührer	IKA® C-MAG HS 7	IKA®
Mikroskop	Axio Scope.A1	Zeiss
Mikrowelle		Bosch
PCR Arbeitsstation	PCR Workstation Pro	peqlab
Pipetten	2.5/10/20/100/200/1000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfen	pipetus®	Hirschmann
Schüttler	Orbital Shaker S03	Stuart
SDS-Page Power Supply	PowerPac Universal	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank	HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau
Spectrophotometer	NanoDrop® ND-1000	peqlab
Thermocycler	peqSTAR	peqlab
Waage	TE 153S	Sartorius

Vortexer	Certomatv® MV	B. Braun Biotech International
Wärmeinkubator	B15	Heraus Instruments
Zentrifugen	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
	Centrifuge 5430 R	Eppendorf

**Tabelle 2:** Übersicht der verwendeten Geräte.

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Modell	Hersteller
Deckgläser	verschiedene Größen	Carl Roth
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1.5/2 ml	Eppendorf
Filterpapier dick	Mini Trans-Blot® Filter paper	Bio-Rad
Filterpapier dünn	Whatman® Chromatography Filter	GE Healthcare
Homogenisator mit Glas Pistill	2 ml	
Inkubationskammer für Objektträger		Carl Roth
Mikrotiterplatten	96-Loch	Eppendorf
Membran-Schälchen		Sarstedt
Nitrocellulosemembran	Amersham™ Protran™ 0.45 µm NC	GE Healthcare
Objektträger		Marienfeld
Objektträgergestell mit Anfärbungsschale	Wheaton 900200 20 Objektträger	Wheaton
Pasteurpipetten	Disposable Glass Pasteur Pipettes	VWR
Pipettenspitzen, versch. Größen	Biosphere® Filter Tips	Sarstedt
Polyacrylamidgel	Long Shelf Life Mini-PROTEAN TGX™	Bio-Rad

	Precast Gel 4-15%, 10-well comb, 50 µl/well	
Röntgenfilm	Medical X-ray film	Typon Röntgen
Serologische Pipetten	Falcon®, versch. Größen	VWR
Zentrifugenröhrchen	10/30 ml	VWR

**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

### 2.1.3 Chemikalien

Produkt	Herstellername	Hersteller
Albumin Standard	Albumin Standard	Thermo Scientific
Antikörper-Verdünnungs-Lösung	Antibody diluent	Dako
BCA-Reagenz	Pierce® BCA Protein Assay Reagent A/B (1:50)	Thermo Scientific
Blot-Entwickler-Substrat	Pierce® ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific
	Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
BSA	Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich
Carbo-Free Blocking Solution	Carbo-Free™ Blocking Solution 10x Concentrate	Vector Laboratories
Denaturierungspuffer	Glycoprotein Denaturing Buffer 10x Concentrate	New England BioLabs
Destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)	Water	Sigma
		Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Eindeckmedium	Aquatex®	Merck Millipore
Eindeck-Medium mit DAPI	Fluorshield™ with DAPI	Sigma-Aldrich
Ethanol	Ethanol	J.T. Baker
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA

HiMark Protein-Standard	HiMark™ Pre-Stained Protein Standard	Life technologies™
Ladepuffer	Leampli Sample Buffer	Bio-Rad
Methanol	Methanol	VWR
Milchpulver	Blotting grade, pulv., fettarm	Roth
Neuraminidase Reaktionspuffer G1	G1 Reaction Buffer 10X concentrate	New England BioLabs
Phosphatase-Inhibitor	Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific
Ponceau Rot	Ponceau S	Serva
Protease Inhibitor	Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific
Protein-Standard	Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad
Saccharose	Sucrose	Sigma
Serum-Blockierlösung	Protein Block Serum-Free	Dako
TRIS	Trizma base	Sigma-Aldrich
Tween	Tween® 20	Serva
Xylol	Xylol	J.T. Baker
β-Mercaptoethanol	2- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

**Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Chemikalien.

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösungen	Milchpulver 5%ig in TBS-T
	BSA 5%ig in TBS-T
	Carbo-Free™ Blocking Solution 10%ig in TSM
Homogenisierungspuffer	50 mM Tris (pH 7,5) 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM Mg Cl <sub>2</sub>

	0,32 M Saccharose
Laemmli Ladepuffer (3x)	60 mM Tris/Hcl (pH 6,8) 10% SDS 10% $\beta$ -Mercaptoethanol 50% Glycerin 1,5% Bromphenolblau
Lyse-Puffer	RIPA-Puffer Phosphatase-Inhibitor (100x) Protease-Inhibitor (100x)
SDS PAGE Lauf-Puffer	25 mM Tris/Hcl 190 mM Glycerol 0,1% SDS (pH 8,3)
Stripping Solution	0,5 M Eisessig 0,5 M NaCl ad dH <sub>2</sub> O
Western Blot Transfer-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0) 380 mM Glycin 0,1% SDS
TBS-T	50 mM Tris-Hcl 0,15 M NaCl (pH 7,6)
TRIS-Puffer (10x)	60 g TRIS NaCl 85g (pH 7,4)
TSM-Puffer	20 mM Tris/Hcl (pH7,4) 150 mM NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,01 mM MnCl <sub>2</sub>

**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.

## 2.1.5 Antikörper

Name	Wirt	Hersteller
Alexa Fluor® 488 goat-anti rabbit IgG (H+L)	Ziege	Life technologies™
Alexa Fluor® 594 goat-anti rabbit IgG (H+L)	Ziege	Life technologies™

HSPA8 (D12F2)	Hase	Cell Signaling Technology
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	Cell Signaling Technology
CD175 Antibody (BRIC111)	Maus	Thermo Fisher Scientific
CD175s	Maus	Antikoerper-online.de
Cosmc (K-14)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GALNT2 antibody	Hase	Abcam®
GALNT2 Antibody	Hase	Thermo Fisher Scientific
O-GlcNac (CTD110.6), HRP Conjugate	Maus	Cell Signaling Technology
Phospho-(Ser/Thr) Phe Antibody	Hase	Cell Signaling Technology
Glucagon (D16G10) XP®	Hase	Cell Signaling Technology
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate	Ziege	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-mouse IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Mouse anti-goat IgG-HRP	Maus	Santa Cruz Biotechnology
Chicken anti-mouse IgG-HRP	Huhn	Santa Cruz Biotechnology

**Tabelle 6:** Übersicht der verwendeten Antikörper.

### 2.1.6 Lektine

Lektin	Hersteller
Biotinylated Vicia Villosa Lectin (VVA)	Vector Laboratories
Biotinylated Peanut Agglutinin (PNA)	Vector Laboratories
Fluorescein Vicia Villosa Lectin	Vector Laboratories

Lectin PNA, Alexa Fluor® 488 conjugate	Life technologies™
Lectin PNA, Alexa Fluor® 568 conjugate	Life technologies™

**Tabelle 7:** Übersicht der verwendeten Lektine.

### 2.1.7 Hersteller-Kits

Name	Inhalt	Hersteller
BCA™ Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible	Pierce® BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific
	Pierce® BCA Protein Assay Reagent B	
	Albumin Standard (2 mg/ml)	
Cell & Tissue Staining Kit	AEC Chromogen Buffer	R&D Systems
	Avidin Blocking Reagent	
	Biotin Blocking Reagent	
	AEC Chromogen	
	Peroxidase Blocking Reagent	
	Serum Blocking Reagent	
	HSS-HRP	
	Biotinylated Anti-rabbit Antibody	
Pierce® ECL Western Blotting Substrat	Detection Reagent 1: <i>Peroxidase Solution</i>	Thermo Scientific
	Detection Reagent 2: <i>Luminol Enhancer Solution</i>	
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	SuperSignal® West Dura Stable Peroxidase Buffer	Thermo Scientific
	SuperSignal® West Dura Luminol/Enhancer Solution	

**Tabelle 8:** Übersicht der verwendeten Hersteller-Kits.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Biochemische Methoden**

#### **2.2.1.1 Herstellung von Proteinlysaten**

Nach der CO<sub>2</sub>-Tötung der Mäuse beinhaltete der erste Schritt der Proteinlysatherstellung das Freipräparieren des Pankreas und die Organentnahme. Darauf folgend wurde das Gewebe mit 0,5 – 2 ml Lyse-Puffer (je nach Organgröße) homogenisiert um die Proteine aus den Zellen freizusetzen. Nach 15-minütiger Wartezeit auf Eis wurden die Proben für weitere 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C weggefroren. Anschließend stehen die Proteinlysate für weitere Experimente zur Verfügung.

#### **2.2.1.2 BCA-Test (Proteinkonzentrationsbestimmung)**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde das BCA™ Protein Assay Kit und 96-well Mikrotiter-Platten verwendet. Dabei wurden für die Herstellung der BCA-Lösung die Reagenzien A und B im Verhältnis 1:50 gemischt. 200 µl der Lösung wurden zu je 10 µl der zu analysierenden Proben gegeben, nachdem diese zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1:10 verdünnt worden sind. Um die Proteinkonzentration der Proben bestimmen zu können wurden außerdem je 10 µl des Albumin-Standards mit je 200 µl der BCA-Lösung versetzt. Bei den Proben sowie beim Albumin-Standard wurden Doppelbestimmungen durchgeführt um eine höhere Genauigkeit zu erzielen. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Extinktionsmessung bei 562 nm im ELISA-Reader durchgeführt. Mit Hilfe der Omega Data-Analysis Software konnte die lineare Regression und damit die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben ermittelt werden.

#### **2.2.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wird verwendet um Proteine ihrer molekularen Größe nach in einem Gel elektrophoretisch aufzutrennen. Dies stellt die Vorbereitung für die anschließende Immunoblot-Analyse dar (s. 2.2.1.4).

Es wurden vorgefertigte Gele bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel verwendet, wobei das Sammelgel dazu dient, die Proben zu konzentrieren und das



Trenngel dafür da ist diese anschließend ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen. Die Konzentration entscheidet hierbei über die Trenneigenschaften der Gele, da zur Auftrennung von kleineren Molekülen eine größere Konzentration Acrylamid und umgekehrt erforderlich ist. Für die Experimente wurden 4 – 15%ige Gele verwendet. In die Taschen der Gele wurden zunächst die vorher mit Laemmli-Probenpuffer versetzten und für fünf Minuten bei 95°C aufgekochten Lysate sowie der Proteinstandard pipettiert. Im Anschluss wurde die Elektrophorese für ca. eine Stunde, zuerst bei 80 V (für das Sammelgel) anschließend bei 120 V (für das Trenngel), durchgeführt.

#### **2.2.1.4 Immunoblot-Analyse (Western Blot)**

Ein Immunoblot, oder auch als Western Blot bezeichnet, wird verwendet um Proteine auf eine Trägermembran zu übertragen, woraufhin diese im Anschluss durch eine Immunreaktion (s. 2.2.1.5) sichtbar gemacht werden können. Es wurde eine 0,45 µm Nitrocellulose-Membran benutzt, welche zusammen mit dem durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese gewonnenen Gel (s. 2.2.1.3), eingebettet in jeweils einem dünnen und einem dicken Filterpapier, in die Blot-Apparatur eingesetzt wurde. Unter Verwendung des Transfer-Puffers und einer angelegten Spannung von 100 V erfolgte der Transport für 60 Minuten bei 4°C Raumtemperatur. Dabei sorgt das senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegte elektrische Feld für die Wanderung der Proteine Richtung Anode, wodurch sie auf die Membran transferiert („geblottet“) werden.

#### **2.2.1.5 Immunreaktion**

Im nächsten Schritt können die Proteine auf der Membran mittels Immunreaktion detektiert werden, wofür spezifische Antikörper oder Lektine zum Einsatz kommen. Zuerst wurde die Membran zur Blockierung der freien Bindungsstellen mit einer Blockierlösung (Milchpulver oder BSA bei Verwendung von Primär-Antikörpern bzw. Carbo-Free™ Blocking Solution bei Lektinen) eine Stunde lang bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurden die Primär-Antikörper bzw. Lektine hinzugegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Es folgten 5x 5-minütige Waschschrte mit TBS-T am nächsten Tag. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit dem in TBS-T verdünnten HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (entfällt bei Lektinen, da diese

direkt HRP-gekoppelt sind) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kopplung mit dem Marker-Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) ist dabei die notwendige Voraussetzung für die im nächsten Schritt stattfindende Chemiluminescence (ECL)-Detektion (s. 2.2.1.6)

#### **2.2.1.6 ECL-Detektion**

Hierfür wurde die Membran mit dem Blot-Entwickler-Substrat (meist wurde ECL oder bei schwachem Signal „Super Signal“ verwendet) für ca. 5 min inkubiert. Über einen Röntgenfilm konnten die Banden der gebundenen Proteine anschließend sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.1.7 Entfernen gebundener Antikörper**

Um die gebundenen Antikörper von einer Membran wieder zu entfernen wurde diese zunächst für 15 min mit der Stripping Solution inkubiert. Es folgten ein kurzer Waschschrift mit Aqua dest. und eine 10-minütige Neutralisation mit 1M Tris Puffer (pH 8,0). Anschließend können die Membranen für neue Immunreaktionen verwendet werden.

### **2.2.2 Immunhistochemische Methoden**

#### **2.2.2.1 Entparaffinierung von Paraffinschnitten**

Der erste Schritt der Entparaffinierung von Gewebeschnitten beinhaltet die zweimalige fünfminütige Inkubation in reinem Xylol. Im Anschluss daran folgte die absteigende alkoholische Reihe, beginnend mit 100-, über 96- und 80- bis zu 70%igem Ethanol. Dabei erfolgte die Inkubation bei reinem sowie 96%igem Ethanol jeweils zweimal drei Minuten und bei 80- sowie 70%igem Ethanol jeweils einmal drei Minuten lang. Anschließend wurden die Küvetten mit den Objektträgern für mindestens zwei Minuten in destilliertes Wasser überführt. Nach der Entparaffinierung stehen die Gewebeschnitte für HE- (s. 2.2.2.2) sowie immunhistochemische-Färbungen (s. 2.2.2.4) zur Verfügung.

### **2.2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) stellt die Standard-Färbung der Histologie dar. Hierfür wurden die Gewebeschnitte nach der Entparaffinierung (s. 2.2.2.1) für drei Minuten in Mayers Hämatoxylin Lösung getaucht um saure Strukturen anzufärben. Die Zellkerne färben sich somit blau an. Nach einem kurzen Bad in destilliertem Wasser folgte die dreiminütige Gegenfärbung mit Eosin, wodurch Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot gefärbt werden. Abschließend wurde die Alkoholreihe (s. 2.2.2.1) in aufsteigender Reihenfolge durchlaufen und die Schnitte eingedeckelt.

### **2.2.2.3 Antigendemaskierung**

Die Prozedur der Antigendemaskierung dient der Vorbereitung auf immunhistochemische-Färbungen, da die Gewebefixierung in Formalin zu Quervernetzungen und Modifikationen von Proteinen führt. Dies hat zur Folge, dass die Epitope der zu färbenden Antigene für viele Antikörper nicht mehr detektierbar sind. Durch das Verfahren der Antigendemaskierung, auch Retrieval genannt, soll diese Maskierung wieder rückgängig und die Epitope dadurch wieder zugänglich gemacht werden. Für die Prozedur wurden die Objektträger in Citrat-Puffer (pH 8,0) überführt und das Ganze zwei Mal für fünf Minuten bei 600 W in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend musste das Ganze mindestens eine Stunde abkühlen und abschließend kurz mit TBS-T gewaschen werden. Im Anschluss können die Gewebeschnitte für immunhistochemische Färbungen (s. 2.2.2.4) verwendet werden.

### **2.2.2.4 Immunhistochemische Färbungen**

Generell muss bei immunhistochemischen Färbungen zwischen Chromogen- und Fluoreszenzfärbungen unterschieden werden. Bei beiden Methoden können entweder tierische Antikörper oder Lektine zum Einsatz kommen. Bei Lektinen handelt es sich um Antikörper pflanzlichen Ursprungs, welche direkt an die gewünschte Proteinstruktur binden. Bei Färbungen mit tierischen Antikörpern hingegen werden ein Primär- und ein Sekundärantikörper, welcher an den Fc-Teil des ersteren bindet, verwendet.

#### 2.2.2.4.1 Chromogenfärbung

Bei der Immunfärbung von Gewebeschnitten wird ein enzymkonjugierter Antikörper-Antigenkomplex gebildet. Das Enzym (Peroxidase) reagiert dabei mit dem Chromogen zum farbigen Endprodukt.

Für diese Peroxidase-Färbung wurde das Protokoll spezieller Färbe-Kits verwendet. Nach der Entparaffinierung (s. 2.2.2.1) und Antigendemaskierung (s. 2.2.2.3) folgten zunächst Blockierungsschritte, welche notwendig sind, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Zuerst erfolgte das Peroxidase Blocking für 2 – 5 min, dann das Serum Blocking für 10 – 15 min (hinfällig bei Lektin-Färbungen), anschließend das Avidin Blocking für 15 min und als letzter Schritt das Biotin Blocking für nochmals 10 – 15 min. Zwischen dem ersten und zweiten, dem dritten und vierten, sowie nach dem letzten Blockierungsschritt erfolgten je Waschschrte in TBS-T für 2 – 5 min. Als nächstes erfolgte nun die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. mit dem Lektin. Antikörper wurden, je nach Hersteller-Empfehlung, meist 1:100 mit der Antibody Diluent Lösung verdünnt und die Objektträger über Nacht bei 4°C damit inkubiert. Die Lektinansätze wurden hingegen mit HSM-Puffer so angesetzt, dass sie eine Endkonzentration von 10 µg/ml enthielten, außerdem wurde noch 1 µl Streptavidin HRP direkt hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug hierbei eine Stunde bei Raumtemperatur.

Bei der Verwendung von Primärantikörpern folgte am nächsten Tag ein dreimaliges Waschen für jeweils 10 min mit TBS-T und die anschließende Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper. Durch die Verwendung von biotinylierten Sekundär-Antikörpern kann aufgrund der starken Affinität von Avidin und Streptavidin zu Biotin das Signal deutlich amplifiziert werden (Bratthauer 2010). Der Sekundär-Antikörper wurde passend zum Wirt des Primär-Antikörpers gewählt und je nach Hersteller-Angabe mit Antibody diluent Lösung verdünnt. Die Objektträger wurden im darauffolgenden Schritt für 60 min mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert und anschließend erneut drei Mal für je 10 min mit TBS-T gewaschen.

Im Anschluss daran erfolgte die 30-minütige Inkubation mit High Sensitivity Streptavidin-konjugierter Meeretichperoxidase (HSS-HRP), welche als Reporterenzym dient. Nach einem erneuten Waschschrte (drei Mal zwei Minuten mit TBS-T) folgte schließlich die AEC Chromogen Färbung. Diese konnte bei Lektinfärbungen direkt im Anschluss an die Lektininkubation und dem Waschschrte erfolgen, da die Ansätze bereits mit HRP gekoppelt worden sind. Zuerst wurde das

Chromogen angesetzt indem zu je 1 ml Puffer ein Tropfen Chromogen hinzugegeben wurde, womit die Objektträger anschließend für drei bis 20 min inkubiert wurden (abhängig von der Reaktionsgeschwindigkeit). Darauffolgend wurden sie für fünf Minuten mit Aqua dest. gewaschen um danach abschließend mit Hämalaun gefärbt zu werden. Für diesen letzten Schritt wurde die Küvette mit den Objektträgern für wenige Sekunden in Hämalaun getaucht um anschließend für mindestens drei Minuten mit Leitungswasser abgewaschen zu werden. Zum Abschluss folgte die Fixierung mit Deckgläschen, wofür ein wässriges Eindeckmittel verwendet wurde.

#### **2.2.2.4.2 Fluoreszenzfärbungen**

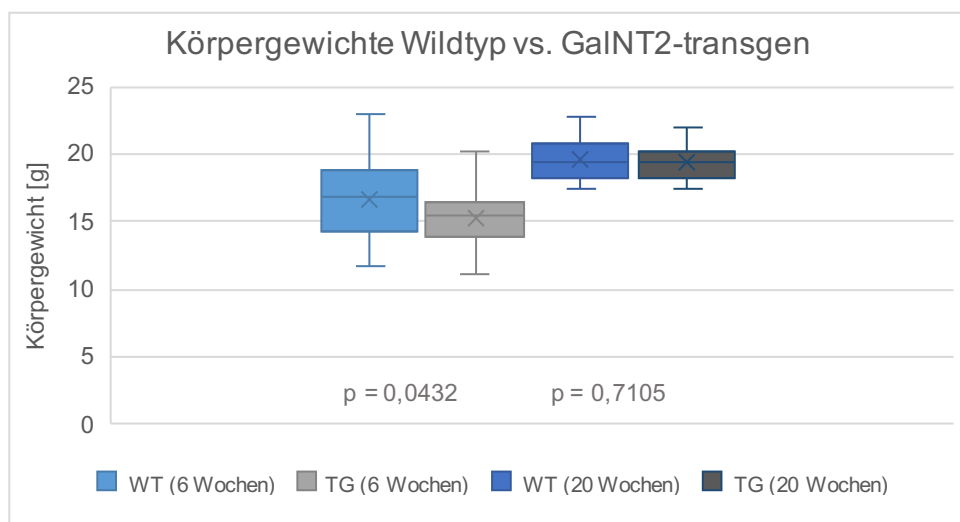
Bei Fluoreszenzfärbungen sind weniger Blockierungsschritte nötig als bei der AEC Chromogenfärbung, da die zu verwendeten Sekundär-Antikörper direkt Fluoreszenzgekoppelt sind. Somit folgte nach der Entparaffinierung und der Antigendemaskierung nur ein Blockierungsschritt, das 10-minütige Serum-Blocking (bei Antikörper-Verwendung) bzw. Carbofree Blocking (bei Lektinen). Danach wurden die Gewebeschnitte dreimal fünf Minuten lang mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Primär-Antikörper bzw. dem Lektin entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde wieder drei Mal für 10 min mit TBS-T gewaschen um anschließend (nur nötig bei Färbung mit Antikörpern) die Objektträger mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper (meist 1:1000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren zu lassen. Daraufhin folgte ein erneuter Waschschrift über drei Mal fünf Minuten in TBS-T. Abschließend wurde mit dem DAPI enthaltenden Eindeckmedium eingedeckelt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 GalNT2-transgene Mauslinie

#### 3.1.1 Körper- und Organgewichte

Die Bauchspeicheldrüse spielt als exokrines Drüsenorgan eine zentrale Rolle für das Verdauungssystem, weswegen eine Mangelversorgung im Regelfall mit einem Gewichtsverlust einhergeht (Domínguez-Muñoz et al. 2018). Die Körpergewichte der GalNT2-transgenen Mäuse wurden daher mit denen der wildtypischen Mäuse verglichen. Hierbei wurden Gewichtsdaten von Jungtieren (sechs Wochen alt) und älteren Tieren (20 Wochen alt) erhoben. Die Ergebnisse werden in Abbildung 10 als Kastengrafik dargestellt und miteinander verglichen.



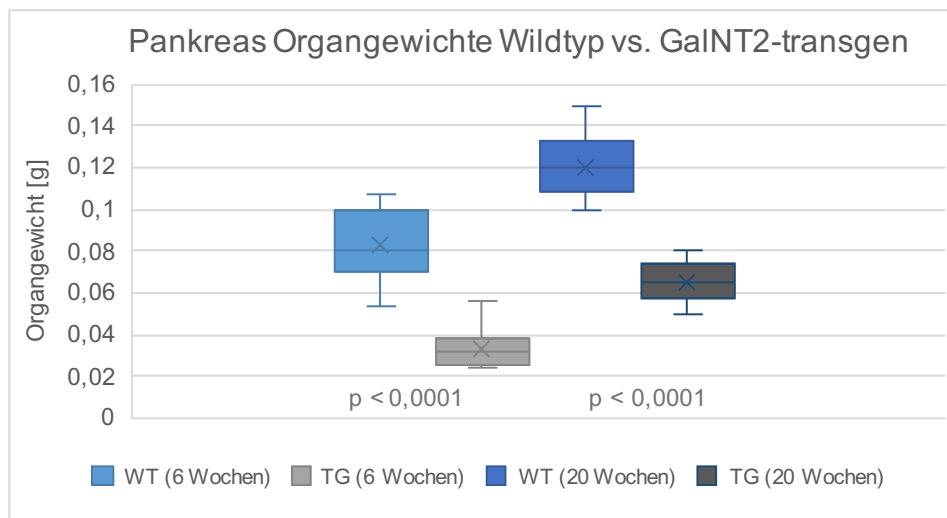
**Abb. 10:** Körpergewichte wildtypischer (WT) vs. GalNT2-transgener (TG) Mäuse der Altersstufen 6 und 20 Wochen im Vergleich.

In dem Diagramm sind Minimum, Maximum, der Mittelwert (Kreuz) und Median (Mittelbalken) sowie das erste und dritte Quartil (die Box entspricht dem Interquartilsabstand) abgebildet. Eventuelle Ausreißer werden mit einem Punkt markiert. Um die Daten beider Mauslinien miteinander zu vergleichen wurde als statistisches Verfahren der ungepaarte t-Test (unpaired t-Test) verwendet. Der p-Wert als Signifikanzniveau sollte hierbei  $< 0,05$  sein, damit die Nullhypothese, dass sich die Körpergewichte nicht signifikant unterscheiden, verworfen und der gemessene Unterschied als statistisch signifikant bezeichnet werden kann. Dies ist

auch für die nachfolgenden Diagramme allgemein gültig.

Bei den sechs Wochen alten Mäusen zeigt sich der Unterschied der Körpergewichte knapp signifikant ( $p = 0,0432$ ), wohingegen sich der Unterschied im Alter von 20 Wochen relativiert und sich nicht mehr als signifikant präsentiert ( $p = 0,7105$ ).

Neben den Körpergewichten wurden auch die Organgewichte der Pankreata beider Mauslinien ermittelt. Abbildung 11 zeigt die statistische Auswertung der Gewichtsdaten, wobei die gleichen Altersstufen wie in Abbildung 10 abgebildet sind.



**Abb. 11:** Pankreas Organgewichte wildtypischer (WT) vs. GalNT2-transgener (TG) Mäuse der Altersstufen 6 und 20 Wochen im Vergleich.

Die Organgewichte der GalNT2-transgenen Mauslinie sind dabei in beiden Altersstufen im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert (jeweils  $p < 0,0001$ ). Somit hat eine GalNT2-Überexpression eindeutige Auswirkungen auf die Organentwicklung des Pankreas.

### 3.1.2 Makroskopie

Um die Organe der transgenen Tiere makroskopisch mit dem wildtypischen Erscheinungsbild vergleichen zu können, wurden Pankreas Präparate von 8 Wochen alten Mäusen nach der Organentnahme in Formalin eingelegt und abfotografiert.



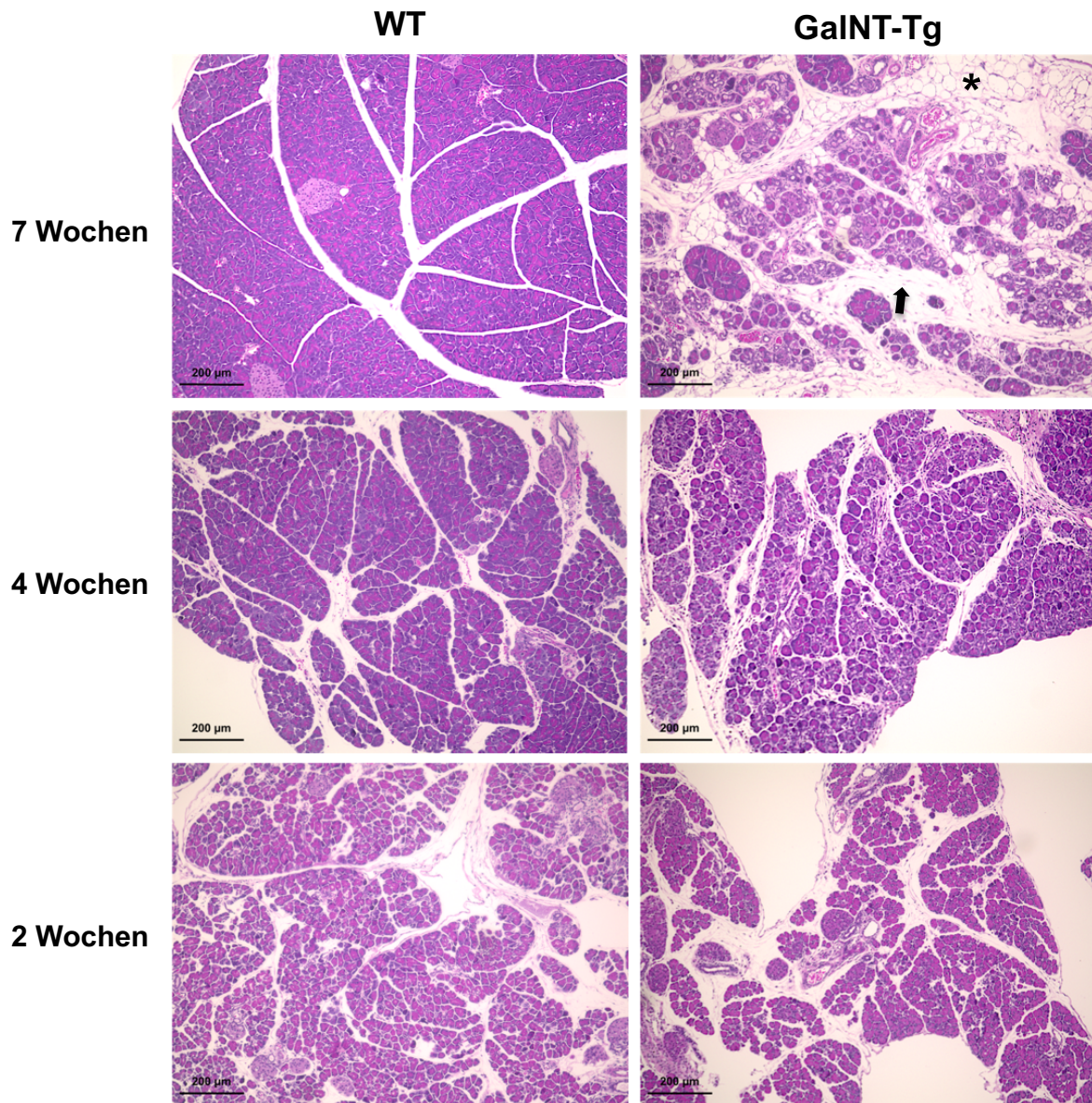
**Abb. 12:** Makroskopische Pankreas Präparate, Wildtyp (WT) vs. GalNT2-Überexpression (GalNT2-Tg) im Alter von 8 Wochen.

Auf Abbildung 12 sind beide Präparate im Vergleich zu sehen. Das optische Ergebnis deckt sich dabei mit den unter 3.1.1 beschriebenen signifikant geringeren Organgewichten, da auf der Abbildung ein deutlicher Größenunterschied im Vergleich zum Wildtyp zu sehen ist. Im Alter von acht Wochen erscheint das Organ der Wildtyp-Maus in seiner Masse mehr als doppelt so groß im Vergleich zum altersidentischen Präparat der transgenen Mauslinie und scheint auch in seiner Struktur verändert zu sein.

### 3.1.3 Mikroskopie

Beim Pankreas handelt es sich um eine gemischte Drüse, bestehend aus einem exokrinen, rein serösen und einem endokrinen Anteil (s. 1.1). Der exokrine Anteil macht den Großteil des Gewebes aus und bestimmt somit maßgeblich das mikroskopische Erscheinungsbild. Zur histologischen Beurteilung des Pankreas bei Tieren mit GalNT2-Überexpression wurden HE-Färbungen (s. 2.2.2.2) angefertigt.





**Abb. 13:** HE-Färbung Pankreas; Wildtyp vs. GalNT2-Überexpression verschiedener Alterstufen. Sternmarkierung: Fettzellen; Pfeilmarkierung: Bindegewebe. 100-fache Vergrößerung.

Zu sehen ist in Abbildung 13 der Vergleich verschiedener Altersstufen zum Wildtyp. Dabei wurden die Präparate zwei, vier und sieben Wochen alter Tiere verglichen, um insbesondere Einwirkungen auf die frühe Entwicklung des Pankreas sowie den ungefähren Zeitpunkt möglicher Veränderungen bei den transgenen Tieren zu untersuchen.

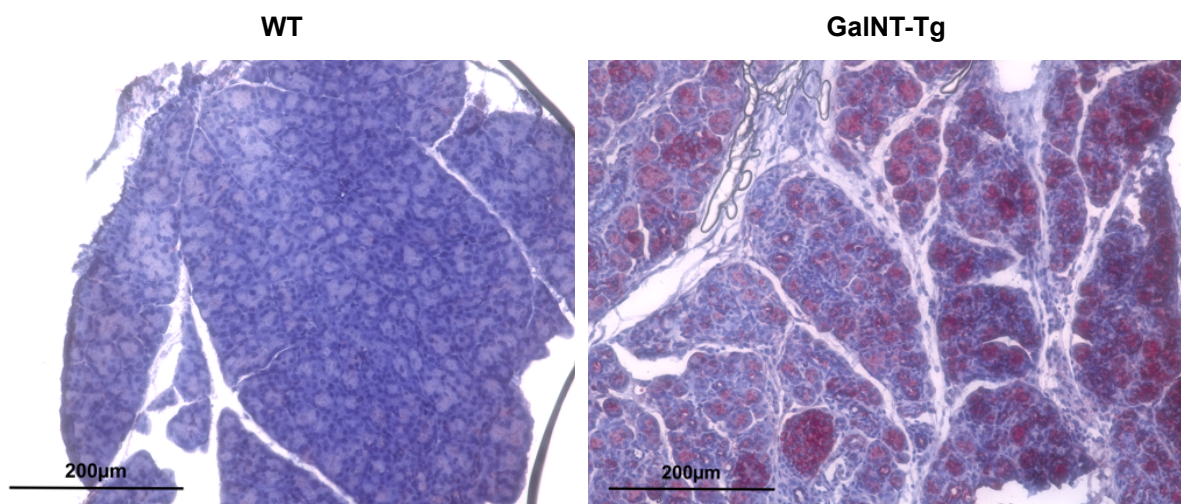
Bei den zwei und vier Wochen alten Mäusen zeigt sich noch kein wesentlicher Unterschied zum Wildtyp. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass insbesondere bei den zwei Wochen alten Jungtieren das Drüsengewebe noch nicht voll ausgebildet und verglichen zum ausgewachsenen Organ mit mehr Bindegewebe durchsetzt ist. In der Altersstufe von sieben Wochen wird ein deutlicher Unterschied im histologischen

Erscheinungsbild sichtbar. Während beim Wildtyp das Pankreasgewebe mittlerweile deutlich mehr ausgereift ist und einen dichten Verband aus Azinuszellen sowie einige Langerhans-Inseln aufweist, ist beim Bild der GalNT2-transgenen Mauslinie ein sichtbarer Verlust des physiologischen Drüsengewebes zu beobachten. Stattdessen zeigen sich vor allem vermehrt Fettzellen (Adipozyten, beispielhaft mit Stern markiert), aber auch vermehrte Fibrosierung (Pfeilmarkierung). Vereinzelte Drüsenläppchen zeigen physiologische Konfiguration, die Mehrheit der Drüsenverbände ist jedoch aufgelockert und nur als einzelne Azinuszellen zu finden. Die angeschnittenen Langerhans-Inseln links oben im Bild erscheinen unverändert.

### 3.1.4 Immunmarkierung

#### 3.1.4.1 Nachweis von GalNT2 mit GALNT2-Antikörper

Bei der neu generierten Mauslinie A mit genetischer GalNT2-Überexpression (s. 1.3) ist es von besonderer Bedeutung herauszufinden, ob sich die vermehrte GalNT2-Expression immunhistochemisch als auch molekularbiologisch nachweisen lässt, und darüber hinaus welche Verteilung sie im histologischen Bild zeigt. Um dies zu untersuchen wurden zum einen immunhistochemische Färbungen (s. 2.2.2.4) und zum anderen Western Blots (s. 2.2.1.4) mit GALNT2-Antikörpern angefertigt.

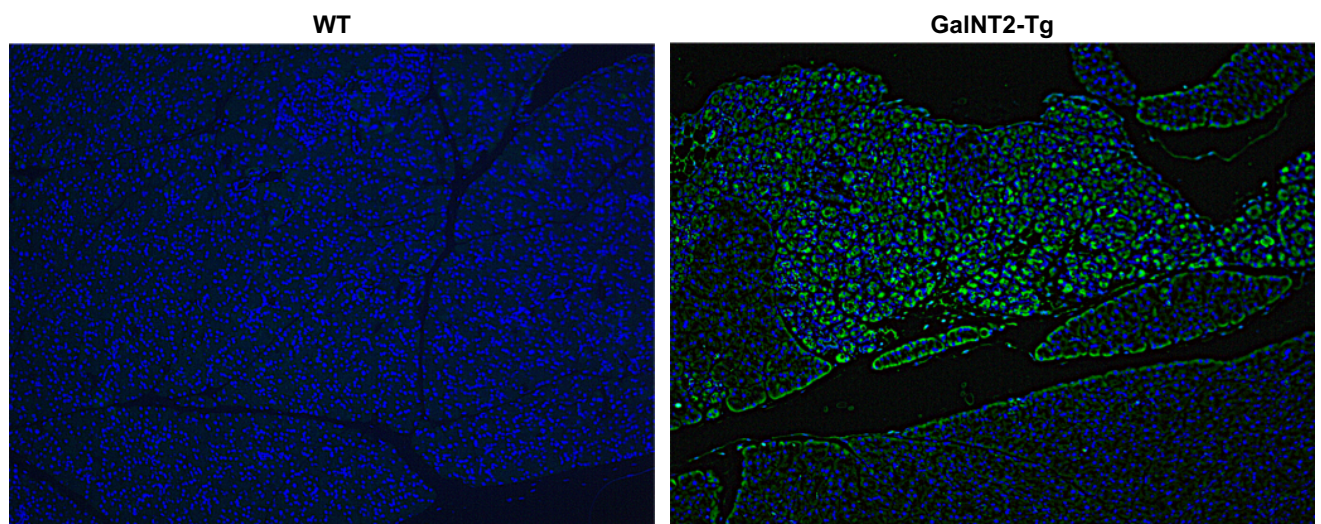


**Abb. 14:** Chromogenfärbung Pankreas mit GALNT2-Antikörper (rot). 200-fache Vergrößerung.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der GALNT2-Antikörper-Chromogenfärbung beim Wildtyp im Vergleich zur transgenen Maus. Positiver Antigen-Nachweis wird dabei mit einer Rotfärbung markiert. Beim Wildtyp ist kein Antigennachweis zu verzeichnen, wohingegen beim Bild der transgenen Maus in der Mehrzahl der

Azinuszellen deutliche GALNT2-Positivität nachzuweisen ist. Es zeigen sich jedoch auch GALNT2-negative Zellen. Insgesamt lässt sich das Verteilungsmuster der positiven Areale als homogen bezeichnen. Interessanterweise ist auch bei den Zellen der Langerhansinsel (Mitte links unten im Bild) eine intensive Rotfärbung zu erkennen.

Zum GalNT2-Nachweis bei den transgenen Tieren wurden neben Chromogen- auch Fluoreszenz-GALNT2-Antikörper-Färbungen vom Pankreas durchgeführt. Zusätzlich zur speziellen Antikörper-Färbung wird bei Fluoreszenzfärbungen immer auch mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. DAPI dient hierbei zur DNA-Markierung, sodass die Zellkerne angefärbt werden. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert es blau (das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm). Der GALNT2-Antikörper wurde mit einem fluoreszierenden Sekundär-Antikörper gekoppelt, welcher sein Emissionsmaximum bei 520 nm (Anregungsmaximum: 488 nm) hat und somit grün leuchtend erscheint. Beim Übereinanderlegen (Overlay) beider Bilder lässt sich so ein Überblick über des Präparats generieren.

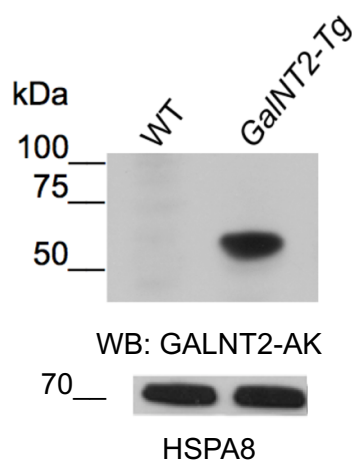


**Abb. 15:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und GALNT2-Antikörper (grün). 100-fache Vergrößerung.

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Fluoreszenzfärbung des Wildtyps im Vergleich zum transgenen Typ. Beim Präparat mit GalNT2-Überexpression wird in der Mehrzahl der Zellen ein deutlich positives grün leuchtendes Signal sichtbar, auch wenn die Verteilung nicht vollkommen homogen erscheint. Beim Wildtyp hingegen ist der GALNT2-Antigen-Nachweis gänzlich negativ.

Neben immunhistochemischen Methoden wurden auch Western Blots als molekularbiologisches Verfahren zum Antigennachweis durchgeführt. Dafür wurden nach der Pankreas-Präparation zunächst Protein-Lysate (s. 2.2.1.1) angefertigt. Mittels eines BCA-Tests wurde anschließend der Proteingehalt der Proben bestimmt (s. 2.2.1.2). Dies ist die Voraussetzung dafür, dass bei der späteren Immunoblot-Analyse (Western Blot) in allen Proben die Verwendung der gleichen Proteinmenge gewährleistet werden kann, da nur dann die Ergebnisse quantitativ miteinander verglichen werden können. Als Vorbereitung auf den Western Blot musste zunächst eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt werden (s. 2.2.1.3). Diese biochemische Methode dient zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Anschließend können die Proteinstrukturen mit Hilfe des Immunoblots weiter analysiert werden, um das Vorhandensein eines spezifischen Proteins in der Proteinmischung nachweisen zu können. Die Proteine werden dabei auf eine Membran transferiert (s. 2.2.1.4). Im darauffolgenden Schritt können einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden (Immunreaktion, s. 2.2.1.5). Durch die Verwendung HRP-konjugierter Sekundärantikörper gelingt durch eine Lumineszenzreaktion (ECL-Detektion, s. 2.2.1.6) der qualifizierte Proteinnachweis in Form einer Bande.

Um schließlich auch auf Proteinebene GalNT2-Expression nachweisen zu können wurden Western Blots von wildtypischen und transgenen Pankreas-Präparaten mit einem GALNT2-Antikörper sowie anschließend mit HSPA8 als Ladekontrolle angefertigt.



**Abb. 16:** Western Blot (WB) zur Darstellung von GALNT2-Antigenen mittels GALNT2-Antikörper (AK) bei GalNT2-Überexpression. Ladekontrolle mittels HSPA8.

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis dieser Immundetektion. Zu sehen ist eine deutliche Bande bei 65 kDa, die sich beim Wildtyp hingegen nicht zeigt. Somit ist auch der molekularbiologische Nachweis von GalNT2 bei der transgenen Mauslinie gelungen.

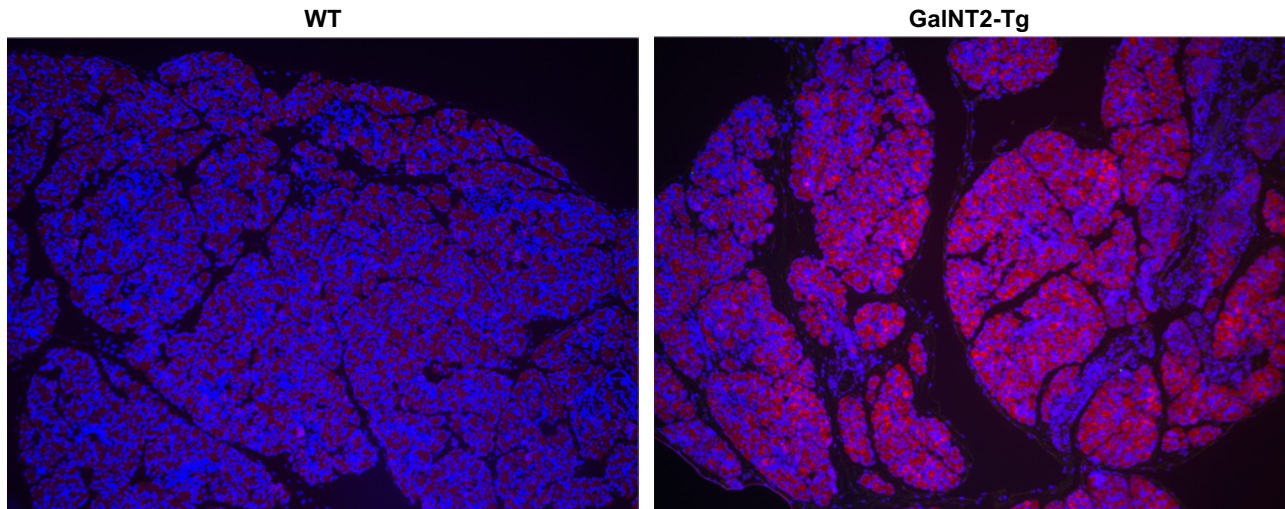
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bei der genetisch neu generierten GalNT2-Tg-Mauslinie die GalNT2-Expression sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch eindeutig nachweisen lässt.

### **3.1.4.2 Nachweis von T-Antigen mit PNA**

Bei der Mauslinie mit genetischer GalNT2-Überexpression galt es insbesondere die möglichen Auswirkungen auf die Wege der O-Glykosylierung (s. 1.2.4) zu untersuchen, da diese Mauslinie in der Forschung eine bis dato unbekannte Neuheit darstellt. Neben verschiedenen Antikörpern tierischen Ursprungs stehen auch pflanzliche Lektine zur Untersuchung von Kohlenhydratstrukturen zur Verfügung. Bei Lektinen handelt es sich um komplexe Proteinstrukturen, welche mit spezifischen Glykananteilen von Glykoproteinen bzw. -lipiden Bindungen eingehen können. Dabei lösen sie jedoch keinerlei enzymatische Reaktion aus (Goldstein and Hayes 1978). Sie sind in der Natur weit verbreitet und finden auf Grund ihrer technisch einfachen Reinigung sowie ihrer Stabilität und Spezifität große Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung.

Bei dem hier zur Fluoreszenzmarkierung verwendeten Lektin PNA (Peanut Agglutinin) handelt es sich um ein spezielles Lektin, welches den Zuckerrest Gal- $\beta$ (1-3)-GalNAc (Galactose- $\beta$ 1-3-N-Acetylgalactosamin- $\alpha$ 1-Ser/Thr), bekannt als T-Antigen (s. 1.2.4.1), erkennt (Skutelsky et al. 1977). Bei nachgewiesener Positivität leuchtet es rot. Gleichzeitig wurde mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Lektin VVA (Vicia Villosa Agglutinin) gefärbt, welches bei Antigenbindung grün leuchtet. Das Lektin VVA bindet bevorzugt an  $\alpha$ - oder  $\beta$ -gebundene terminale N-Acetylgalactosamine, insbesondere an das Tn-Antigen (GalNAc-O-Ser/Thr) (Tollefsen and Kornfeld 1983; Piller, Piller, and Cartron 1990).

Um also der Frage nachzugehen, welche möglichen Alterationen der O-Glykosylierung im Pankreas durch GalNT2-Überexpression entstehen, wurden PNA- und VVA-Fluoreszenzfärbungen in Kombination durchgeführt (s. 2.2.2.4.1).

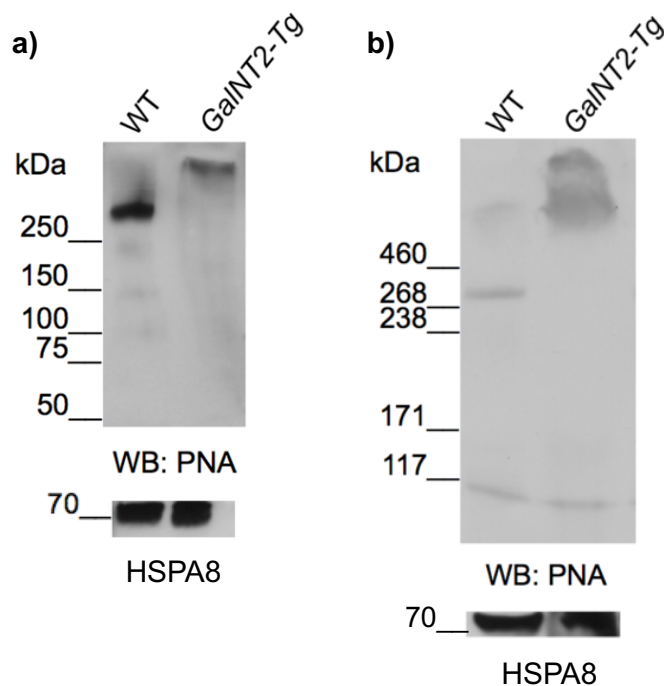


**Abb. 17:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau), PNA (rot) und VVA (grün, hier nicht zu erkennen). 100-fache Vergrößerung.

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis dieser Doppelfärbung beim Wildtyp und bei den transgenen Mäusen im Vergleich. Zunächst fällt auf, dass VVA, welches sich grün leuchtend präsentieren würde, keinerlei Positivität zeigt, weder beim Wildtyp (was den Erwartungen entspricht), noch beim GalNT2-Tg-Präparat. Folglich lässt sich auch bei GalNT2-Überexpression kein Tn-Antigen nachweisen.

PNA hingegen, welches bei positiver Bindung rot leuchtend erscheint, lässt sich in beiden Präparaten nachweisen, wobei beim GalNT2-Tg-Präparat insgesamt mehr Intensität zu verzeichnen ist. Somit wird deutlich, dass durch vermehrte GalNT2-Expression auch vermehrt T-Antigen gebildet wird. Dies lässt den Rückschluss zu, dass der physiologische Signalweg der O-Glykosylierung (Tn-Antigen → T-Antigen, katalysiert durch die Cosmc-abhängige T-Synthase; s. 1.2.4.1) weiterhin ablaufen und sich der vermehrten GalNT2-Aktivität anpassen kann, sodass am Ende vermehrt T-Antigen gebildet wird. Die Überlegung, ob bei GalNT2-Überexpression Tn-Antigen entstehen könnte, zeigt sich hingegen als unbestätigt.

Um die beschriebenen Beobachtungen bezüglich der T-Antigen-Expression auch in Form eines quantifizierten Proteinnachweis zu verifizieren, wurde ebenfalls mit PNA eine Immunoblot-Analyse durchgeführt.



**Abb. 18:** Western Blots zur Darstellung von T-Antigen mittels PNA bei GalNT2-Überexpression. Ladekontrolle mittels HSPA8. a) regulärer Proteinstandard; b) HiMark™ Pre-Stained Proteinstandard.

Das Ergebnis ist in Abbildung 18 zu sehen. Dabei wurde zunächst der reguläre Proteinstandard (a) verwendet. Beim Wildtyp als auch bei der transgenen Maus ließen sich deutlich sichtbare Banden im hochmolekularen Bereich >250 kDa detektieren, wobei zwischen beiden Banden ein deutlicher Höhenunterschied zu verzeichnen ist. Die genaue Molekülgröße ist anhand der Skalierung des regulären Proteinstandards schwer abzuschätzen, deutlich wird jedoch, dass beim GalNT2-Tg-Präparat die Molekülgröße der mit PNA delektierten Proteine weit über der des Wildtyp-Präparats liegt. Darüber hinaus fällt auf, dass beim Wild- sowie beim transgenen Typ nicht nur eine scharf begrenzte Bande zu sehen ist, sondern dass sich die Banden eher unscharf präsentieren und sich auch positiver PNA-Nachweis in den niedrigeren Molekularbereichen erahnen lässt. Um die hochmolekularen Banden genauer analysieren zu können wurde im nächsten Schritt ein spezieller Proteinstandard für Proteine mit hohem Molekulargewicht (HiMark™ Pre-Stained Proteinstandard) verwendet (b). Beim Wildtyp zeigt sich, übereinstimmend mit dem Ergebnis unter a), eine Bande bei ca. 300 kDa, wobei zusätzlich auch PNA-Bindung im hochmolekularen Bereich >460 kDa in geringer Menge zu erahnen ist. Darüber hinaus zeigt sich interessanterweise bei beiden Präparaten eine zusätzliche schwache Bande bei ca. 115 kDa. Die unter a) detektierte hochmolekulare Bande des transgenen Präparats lässt sich unter Verwendung des HiMark Proteinstandards als breite Bande im hochmolekularen Bereich >460 kDa identifizieren. Die genaue

Molekülmasse der detektierten Glykoproteine lässt sich jedoch weiterhin nicht feststellen, da sie weit über der höchsten Skalierung von 460 kDa liegt.

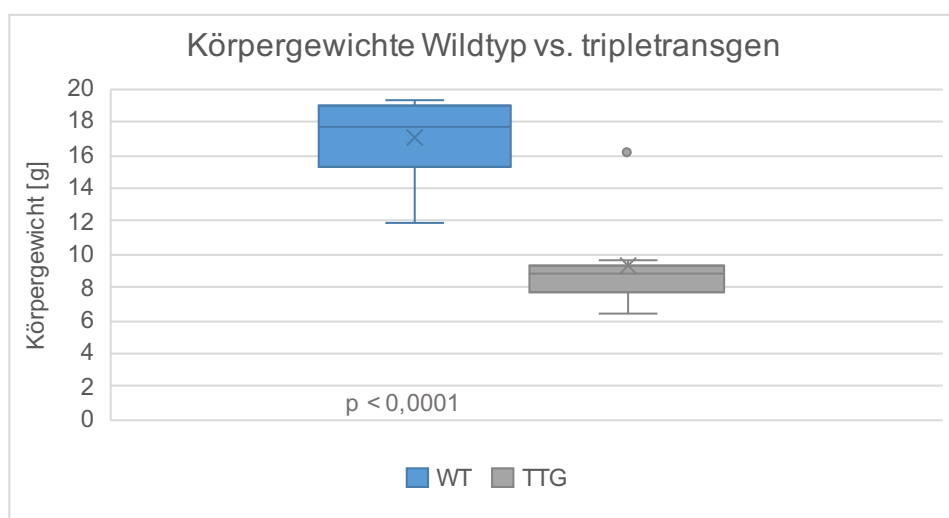
Zusammenfassend zeigt Abbildung 18, dass sich zum einen positive PNA-Bindung bei der Mauslinie mit GalNT2-Überexpression nachweisen lässt (vergleichbar zu den Ergebnissen der Fluoreszenz-Mikroskopie) und zum anderen, dass sich der Großteil der durch PNA detektierten Glykoproteine verglichen zum Wildtyp im deutlich höheren kDa-Bereich befindet (>460), was den Rückschluss auf aberrante O-Glykosylierung mit vermehrter T-Antigen-Expression im Pankreas zulässt.



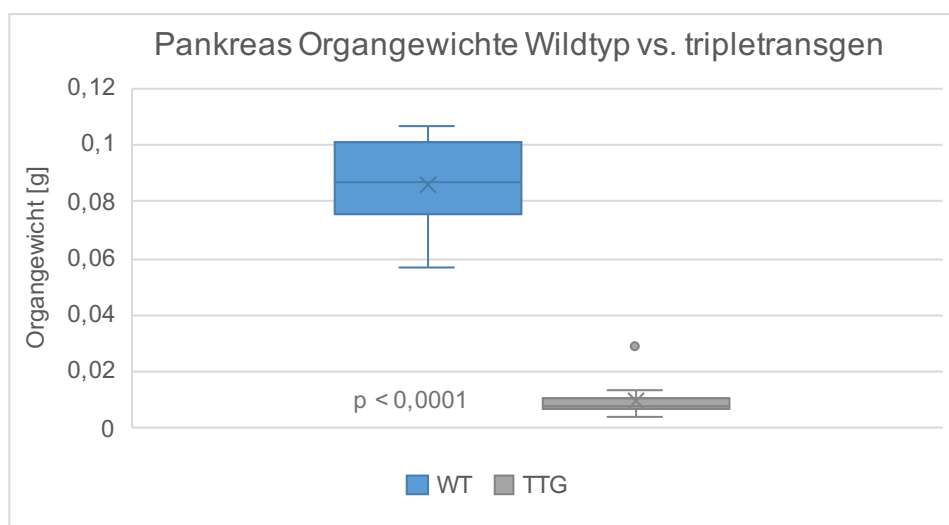
## 3.2 Tripletransgene Mauslinie (Cosmc-KO; GalNT2-Tg)

### 3.2.1 Körper- und Organgewichte

Analog zu den Ergebnissen der GalNT2-transgenen Mauslinie (s. 3.1.1) wurden auch bei der tripletransgenen (TTG) Mauslinie Körper- und Organgewichte erhoben und mit alsterentsprechenden wildtypischen Mäusen verglichen. Da die Mäuse der TTG-Linie zumeist nicht das Alter von 20 Wochen erreichten, wurden die Daten der sechs Wochen alten Tiere abgebildet.



**Abb. 19:** Körpergewichte 6 Wochen alter wildtypischer (WT) vs. tripletransgener (TTG) Mäuse im Vergleich.

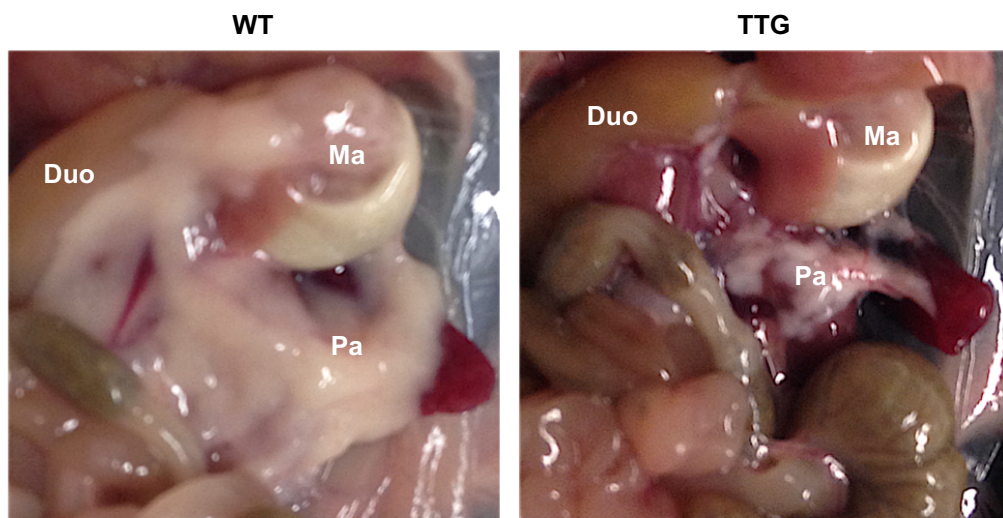


**Abb. 20:** Pankreas Organgewichte 6 Wochen alter wildtypischer (WT) vs. tripletransgener (TTG) Mäuse im Vergleich.

Die Körper- (s. Abb. 19) als auch die Organgewichte (s. Abb. 20) zeigen sich bei den Tieren der tripletransgenen Mauslinie im Vergleich zum Wildtyp statistisch signifikant vermindert (jeweils  $p < 0,001$ ). Somit lassen sich eindeutig phänotypische Auswirkungen der genetischen Mutationen mit Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression nachweisen, wobei insbesondere die deutlich verringerten Körpergewichte den Rückschluss auf eine mangelnde Pankreasfunktion zulassen.

### 3.2.2 Makroskopie

Der erste notwendige Schritt zur Untersuchung der Bauchspeicheldrüse der Mäuse beinhaltet die sorgfältige Präparation des Organs. Schon der makroskopische Blick auf das Pankreas in situ kann hierbei erste Hinweise auf mögliche Pathologien oder Unterschiede zwischen Wildtyp und tripletransgener Mauslinie liefern. Aus diesem Grund wurden in situ Fotografien beim Wildtyp als auch bei der TTG-Mauslinie angefertigt.



**Abb. 21:** In situ Fotografie Wildtyp (WT) vs. Tripletransgene Mauslinie (TTG).  
(Abk.: Duo = Duodenum, Ma = Magen, Pa = Pankreas)

Abbildung 21 zeigt exemplarisch den Vergleich beider Mäuse. Zur besseren anatomischen Orientierung wurden neben dem Pankreas (Pa) auch der Magen (Ma) sowie das Duodenum (Duo) markiert. Hierbei wird schon makroskopisch ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Organen sichtbar. Während sich beim Wildtyp das Organ physiologisch darstellt, präsentiert es sich bei der TTG-Maus deutlich verkleinert und auch in seiner Gewebestruktur sowie Farbe verändert. Dies

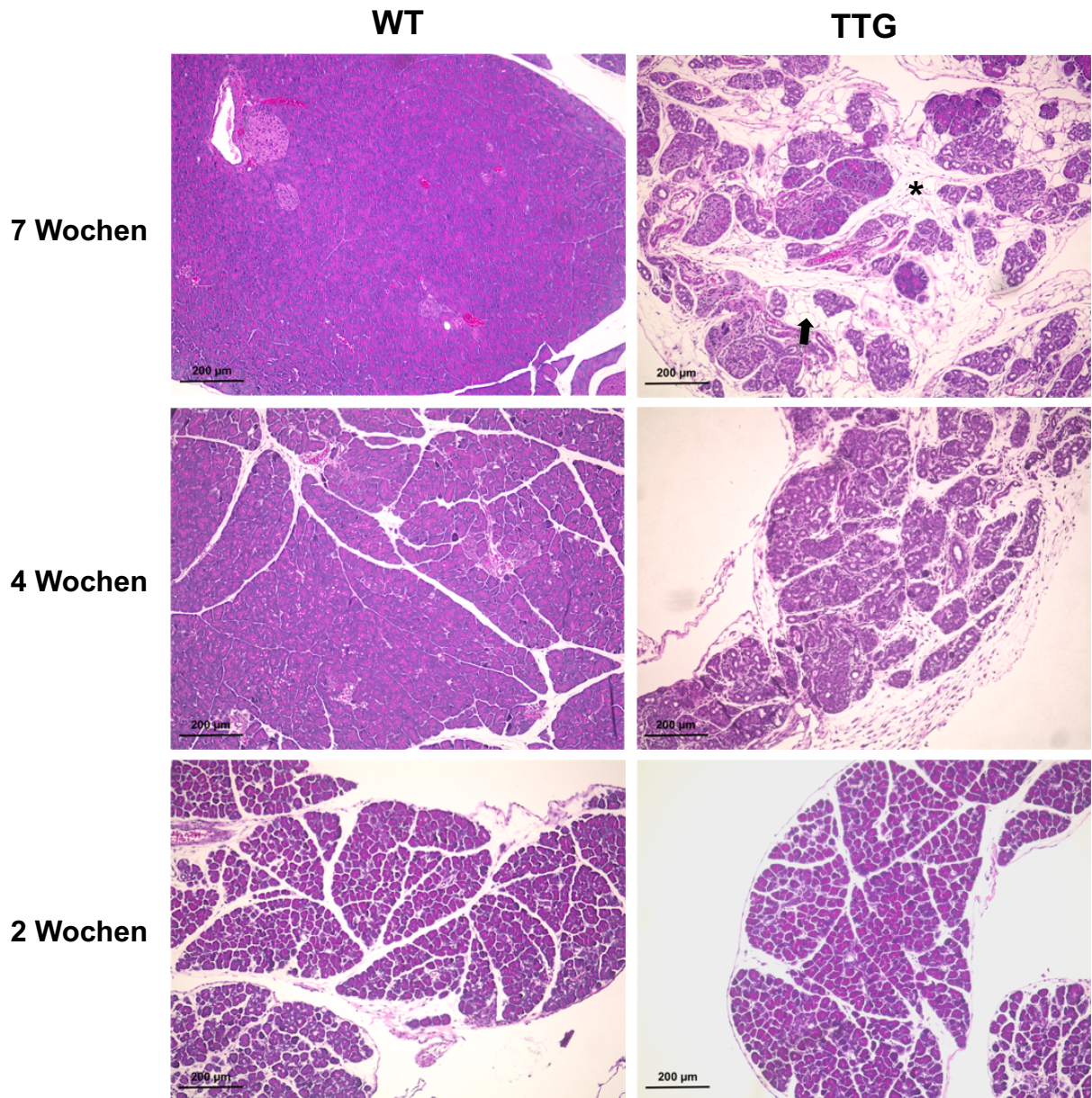
deckt sich mit den unter 3.2.1 beschriebenen Ergebnissen. Das Erscheinungsbild erinnert dabei an ein entzündliches Geschehen.

### **3.2.3 Mikroskopie**

Zentrales Ziel dieser Arbeit ist es die Auswirkungen der genetischen Veränderungen der neu generierten Mauslinien auf das Pankreas zu untersuchen. Dabei sind insbesondere die Veränderungen der O-Glykosylierung auf biochemischer Ebene sowie die daraus resultierenden Auswirkungen auf den Phänotyp und die exokrine Pankreasfunktion (und deren Zusammenhänge) von Interesse.

Die unter 3.2.1 beschriebenen Ergebnisse zeigen zunächst auf, dass die Mäuse der TTG-Linie ein deutliches Wachstumsdefizit aufweisen und dass auch das Gewicht des Pankreas deutlich vermindert ist. Der wachstumsgeminderte Phänotyp scheint hierbei eindeutig im Zusammenhang mit der Pankreasfunktion zu stehen, da die genetischen Alterationen im Vergleich zum altersentsprechenden Wildtyp pankreasspezifisch sind. Den Zusammenhang zwischen Phänotyp und aberranter Glykosylierung im Pankreas gilt es weiter zu untersuchen.

Um herauszufinden wie sich das Organ histologisch darstellt und ob sich möglicherweise Pathologien durch die Kombination aus GalNT2-Überexpression und Cosmc-Knockout zeigen, wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit der klassischen HE-Färbung versehen (s. 2.2.2.2). Auch der histologische Vergleich mit den Ergebnissen der GalNT2-Tg-Mauslinie (s. 3.1.3) ist hierbei von besonderem Interesse.



**Abb. 22:** HE-Färbung Pankreas Wildtyp vs. TTG-Mauslinie verschiedener Altersstufen. Sternmarkierung: Bindegewebe; Pfeilmarkierung: Fettzellen. 100-fache Vergrößerung.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der HE-Färbung beim Wildtyp verglichen mit der TTG-Mauslinie in verschiedenen Altersstufen. Wie auch bei den GalNT2-Tg-Mäusen wurden die Altersstufen zwei, vier und sieben Wochen untersucht um ein besseres Verständnis für die zeitliche Entwicklung der möglichen pathologischen Veränderungen zu gewinnen. Vergleichbar mit den Ergebnissen der transgenen Mäuse (s. 3.1.3) zeigen die Präparate der zwei Wochen alten Jungtiere keine wesentlichen Differenzen im histologischen Bild. Zu sehen ist beim Wild- als auch beim TTG-Typ altersentsprechendes physiologisches Pankreasgewebe, welches sich noch in der Entwicklung befindet. Beim histologischen Vergleich der vier

Wochen alten Tiere wird hingegen bereits ein deutlicher Unterschied sichtbar. Im Gegensatz zum Wildtyp fällt zunächst ein atrophisches und aufgelockertes Drüsengewebe auf. Die Drüsenläppchen zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine physiologische Konfiguration und sind statt dicht beieinander liegend von Bindegewebsstraßen durchzogen sowie atypischen Zellen umgeben. Ein ähnliches Bild präsentiert sich beim sieben Wochen alten TTG-Präparat, wobei die pathologischen Veränderungen progredient erscheinen. Die histopathologischen Merkmale Atrophie, Fibrosierung und Zellinfiltration sind nochmals deutlicher ausgeprägt. Neben dem bindegewebigen Umbau (beispielhaft mit Stern markiert) zeigen sich auch vereinzelt Fettzellen (beispielhaft mit Pfeil markiert), jedoch bestimmen sie weitaus weniger das histologische Erscheinungsbild als beim altersgleichen Präparat der transgenen Mauslinie (vgl. Abb. 13). Bei der Infiltration atypischer Zellen handelt es sich vermutlich um Entzündungszellen wie Lymphozyten. Insgesamt erinnert das histologische Erscheinungsbild an das Bild einer chronischen Pankreatitis mit diffuser interstitieller Fibrose, Abflachung des normalerweise zylindrischen Drüsenepithels und assoziierter Atrophie des exokrinen Pankreasparenchyms (vgl. 1.1.2.1.2, Abb. 2).

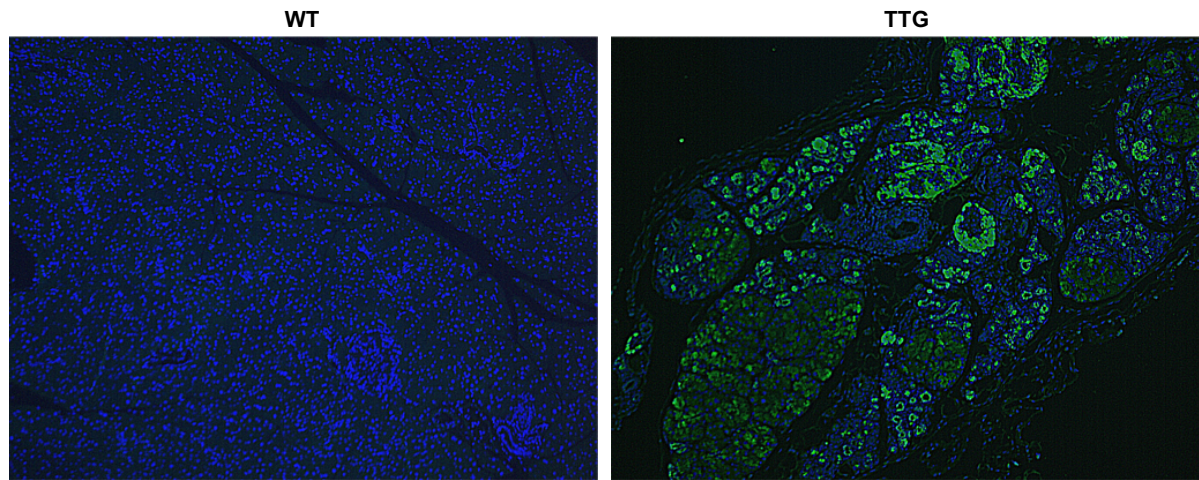
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ab einem Alter von ungefähr vier Wochen bei den TTG-Mäusen ein fibrotischer Umbauprozess mit assoziierter Atrophie des azinären Pankreasparenchyms beginnt. Das histologische Erscheinungsbild zeigt dabei eindeutige Übereinstimmungsmerkmale mit dem Bild einer chronischen Pankreatitis. Diese Erkenntnisse unterscheiden sich von den histologischen Ergebnissen der GalNT2-Mauslinie, bei welcher insbesondere die Invasion von Fettzellen im Vordergrund steht (s. 3.1.3).

## **3.2.4 Immunmarkierung**

### **3.2.4.1 Nachweis von GalNT2 mit GALNT2-Antikörper**

Bei der tripletransgenen Mauslinie wurden die genetischen Alterationen Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression kombiniert. Wie auch bei den Untersuchungen der Mauslinie mit ausschließlicher GalNT2-Überexpression ist es zunächst von Interesse die GalNT2-Expression zu überprüfen und mit den Ergebnissen der transgenen sowie wildtypischen Mäuse zu vergleichen. Folglich

wurden bei der TTG-Mauslinie ebenfalls immunhistochemischen Färbungen mit GALNT2-Antikörper durchgeführt.



**Abb. 23:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und GALNT2-Antikörper (grün).

Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der GALNT2-Antikörper-Fluoreszenzfärbung (Wildtyp- vs. TTG-Präparat). Wie auch bei den Fluoreszenzfärbungen der GalNT2-Tg-Mauslinie (s. 3.1.4.1) wurde der GALNT2-Antikörper mit einem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper gekoppelt. Zunächst ist eine eindeutige Antigen-Antikörper-Bindung beim TTG-Präparat und ein negatives Ergebnis bei der Wildtyp-Kontrolle zu erkennen. Interessanterweise ist eine nicht vollkommen gleichmäßige Verteilung der GALNT2-positiven Areale zu beobachten, da es auch eindeutig GALNT2-negative Bereiche gibt. Die mit DAPI angefärbten Kernstrukturen lassen jedoch die Vermutung zu, dass es sich bei den GALNT2-positiven Arealen hauptsächlich um die verbliebenen physiologischen Azinuszellverbände handelt, die, wie unter 3.2.3 beschrieben, zum großen Teil fibrotisch und mit atypischen Zellen durchsetzt sind.

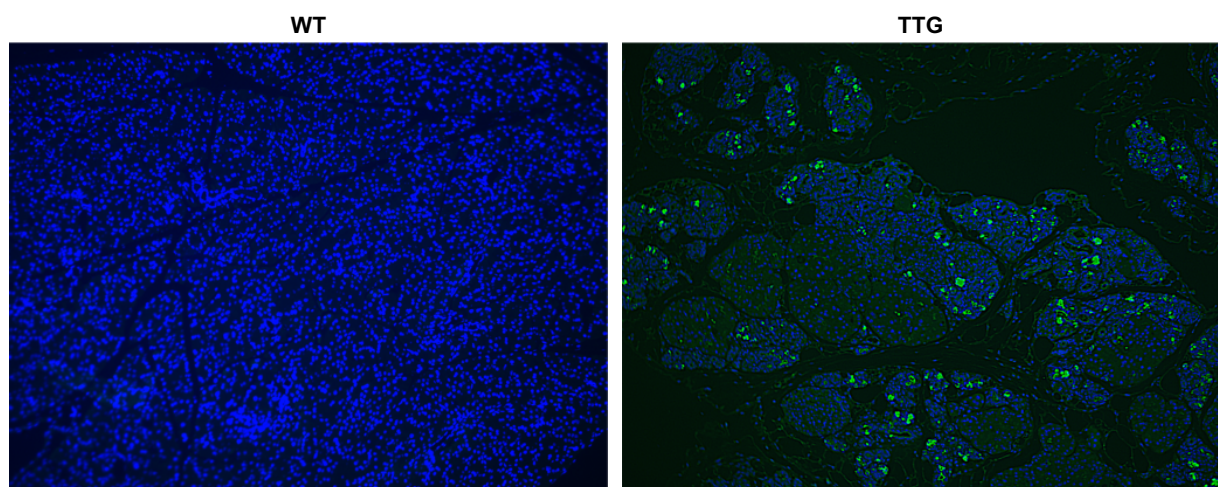
### **3.2.4.2 Nachweis von Tn-Antigen mit Tn-Antikörper und VVA**

Der verkürzte Zuckerrest GalNAc-O-Ser/Thr (Tn-Antigen) ist im gesunden Pankreasgewebe nicht nachweisbar, da beim Vorgang der O-Glykosylierung besagter Glykanrest mit Hilfe verschiedener Glykosyltransferasen zu größer verzweigten Core-Strukturen erweitert und somit maskiert wird (s. 1.2.4.1). Aberrante Glykosylierung und insbesondere der Nachweis des Tn-Antigens wird in der Literatur im Zusammenhang mit verschiedenen Karzinomen, insbesondere des Gastrointestinal-Trakts, beschrieben (s. 1.2.4.3). Die genauen Zusammenhänge sind

dabei noch nicht vollständig verstanden und aktuell von großem Interesse in der wissenschaftlichen Forschung. Durch die Generierung der Mauslinien mit A) pankreasspezifischer GalNT2-Überexpression (GalNT2-tg) sowie B) GalNT2-Überexpression kombiniert mit Cosmc-Knockout (TTG) wurde die Möglichkeit geschaffen weitere Untersuchungen bezüglich aberranter Glykosylierung in vivo durchzuführen, mit dem langfristigen Ziel die biochemischen Abläufe sowie die Auswirkungen auf das Pankreas besser nachvollziehen zu können.

Insbesondere bei der tripletransgenen Mauslinie stellt sich die Frage, ob die Kombination aus vermehrter GalNT2-Expression und genetischem Knockout des für die T-Synthase essentiellen Chaperons Cosmc ein erhöhtes Tn-Expressionslevel zur Folge hat. Untersuchungen mit Pankreaskarzinomzelllinien haben bereits in vitro gezeigt, dass durch alleinigen Cosmc-Knockout nachweislich Tn-Expression induziert wird (Hofmann et al. 2015). In besagter Studie konnte die vermehrte Entwicklung onkogener Eigenschaften der Zellen, wie z.B. gesteigerte Migrations- oder verminderte Apoptoselevel, beobachtet werden. Dies lässt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Cosmc-Knockout, vermehrter Tn-Expression und Pankreaskarzinogenese vermuten.

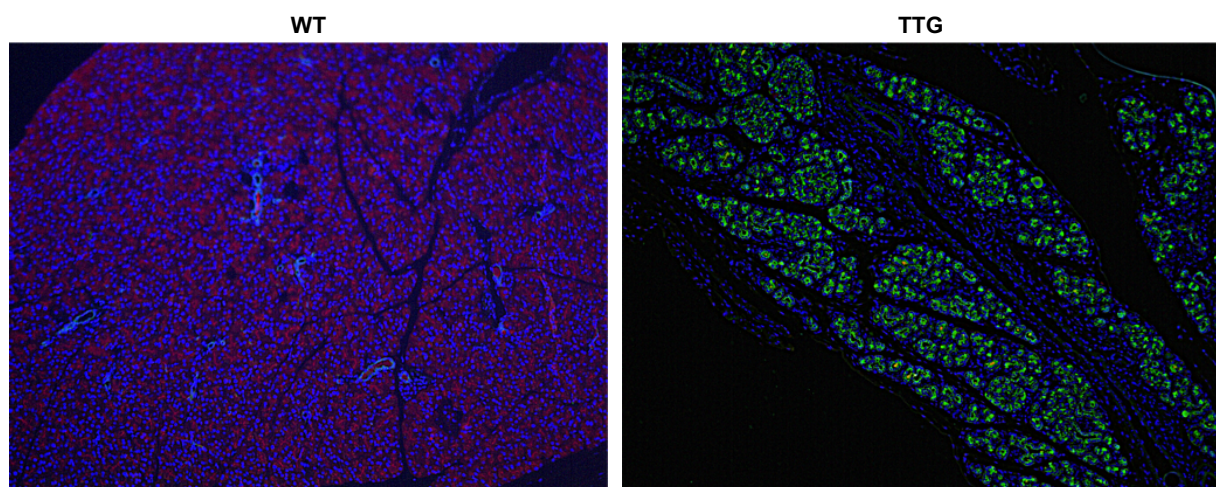
Um der Fragestellung nachzugehen welche Veränderungen durch die Kombination aus Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression in vivo induziert werden, wurden Fluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Antikörpern und Lektinen (s. 2.2.2.4.2) durchgeführt. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse bezüglich des Tn-Antigen-Nachweises besprochen.



**Abb. 24:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und Tn-Antikörper (grün).

Auf Abbildung 24 ist das Ergebnis der Fluoreszenzfärbung mit einem gegen das Tn-Antigen gerichteten tierischen Antikörper zu sehen. Dabei wurde standardmäßig der Vergleich zum Wildtyp abgebildet. Zu sehen sind einzelne positiv aufleuchtende Areale, die relativ gleichmäßig, insgesamt jedoch eher spärlich verteilt sind. Das Wildtyp-Präparat zeigt hingegen erwartungsgemäß keinerlei positiven Nachweis.

Neben Tn-Antikörpern stehen verschiedene Lektine, welche das Tn-Antigen erkennen und binden, für immunhistochemische Färbungen oder Western Blots zur Verfügung. Einer der bekanntesten und am häufigsten verwendeten ist das unter 3.1.4.2 bereits erwähnte *Vicia Villosa* Lectin (VVA) (Tollefsen and Kornfeld 1983). Um die Untersuchungen bezüglich der Tn-Expression bei der TTG-Mauslinie zu komplementieren, wurden neben den Tn-Antikörper-Färbungen auch Färbungen mit Fluoreszenz-gekoppeltem VVA durchgeführt. Wie bei der GalNT2-Tg-Mauslinie wurde ebenfalls eine Co-Färbung mit dem Lektin PNA durchgeführt (s. 3.1.4.2), um weitere Aufschlüsse über veränderte Glykosylierung zu erhalten (PNA erkennt das Core 1 Protein/T-Antigen).



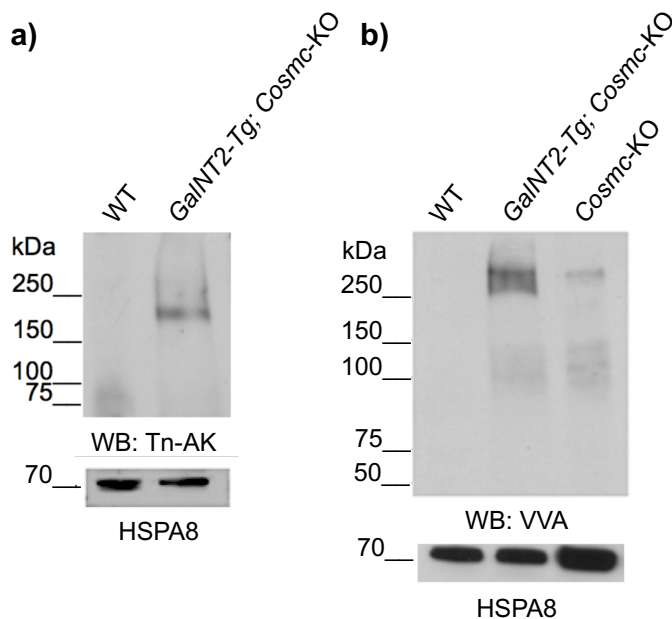
**Abb. 25:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau), VVA (grün) und PNA (rot).

Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der Co-Fluoreszenzfärbung mit VVA und PNA der TTG-Mauslinie verglichen mit dem Wildtyp. VVA leuchtet bei Positivität grün, wohingegen sich PNA rot leuchtend präsentiert (vgl. 3.1.4.2). Beim TTG-Präparat imponieren über das gesamte Drüsengewebe verteilt intensive VVA-positive Areale, wobei im Vergleich zur Tn-Antikörper-Färbung (s. Abb. 24) insgesamt deutlich mehr Azinuszellverbände angefärbt sind. Das Wildtyp-Präparat hingegen zeigt, übereinstimmend mit Abbildung 24, keine VVA-positiven Bereiche. Stattdessen sind



ubiquitär verteilt PNA-positive Zellen zu sehen, wodurch erneut der T-Antigen-Nachweis gelungen ist. Bei den TTG-Mäusen zeigt sich hingegen keine PNA-Bindung im Pankreas-Präparat.

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen bezüglich der Tn-Antigen-Expression weiter zu verifizieren, wurden zusätzlich Western Blots (s. 2.2.1.4) mit Tn-Antikörper sowie Vicia Villosa Agglutinin angefertigt.



**Abb. 26:** Western Blots zur Darstellung von Tn-Antigen; a) mittels Tn-Antikörper (AK) bei TTG-Mäusen; b) mittels VVA bei TTG- und Cosmc-KO-Mäusen. Ladekontrolle mittels HSPA8.

Abbildung 26a zeigt das Ergebnis der Tn-Antikörper-Immundetektion. Hierbei lässt sich durch eine eindeutig positive Bande in Höhe von ungefähr 210 kDa Tn-Expression nachweisen, wohingegen die Wildtyp-Kontrolle negativ ist.

Auf Abbildung 26b ist das Ergebnis des VVA-Immunoblots, bei welchem zusätzlich zur TTG-Mauslinie eine Cosmc-Knockout(KO)-Mauslinie untersucht wurde, zu sehen. Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass bei pankreasspezifischen Cosmc-KO-Mäusen (Wolters-Eisfeld et al. 2018) sowie -Zelllinien (Hofmann et al. 2015) Tn-Expression induziert wird. Folglich stellt sich die interessante Frage, ob und inwieweit sich die durch die Kombination aus GalNT2-Überexpression und Cosmc-Knockout induzierte Tn-Expression quantitativ von der Expression der Cosmc-KO-Mäuse unterscheidet. Auffällig ist in Abbildung 26b zunächst, dass zwei breite positive Bandenbereiche in beiden Mauslinien zu sehen sind, wohingegen beim Wildtyp sich keinerlei durch VVA detektierte Tn-Expression zeigt. Die erste Bande befindet sich im hochmolekularen Bereich >250 kDa. Bei der TTG-Mauslinie ist diese Bande im Vergleich zur Cosmc-KO-Mauslinie deutlich stärker und breiter ausgeprägt.

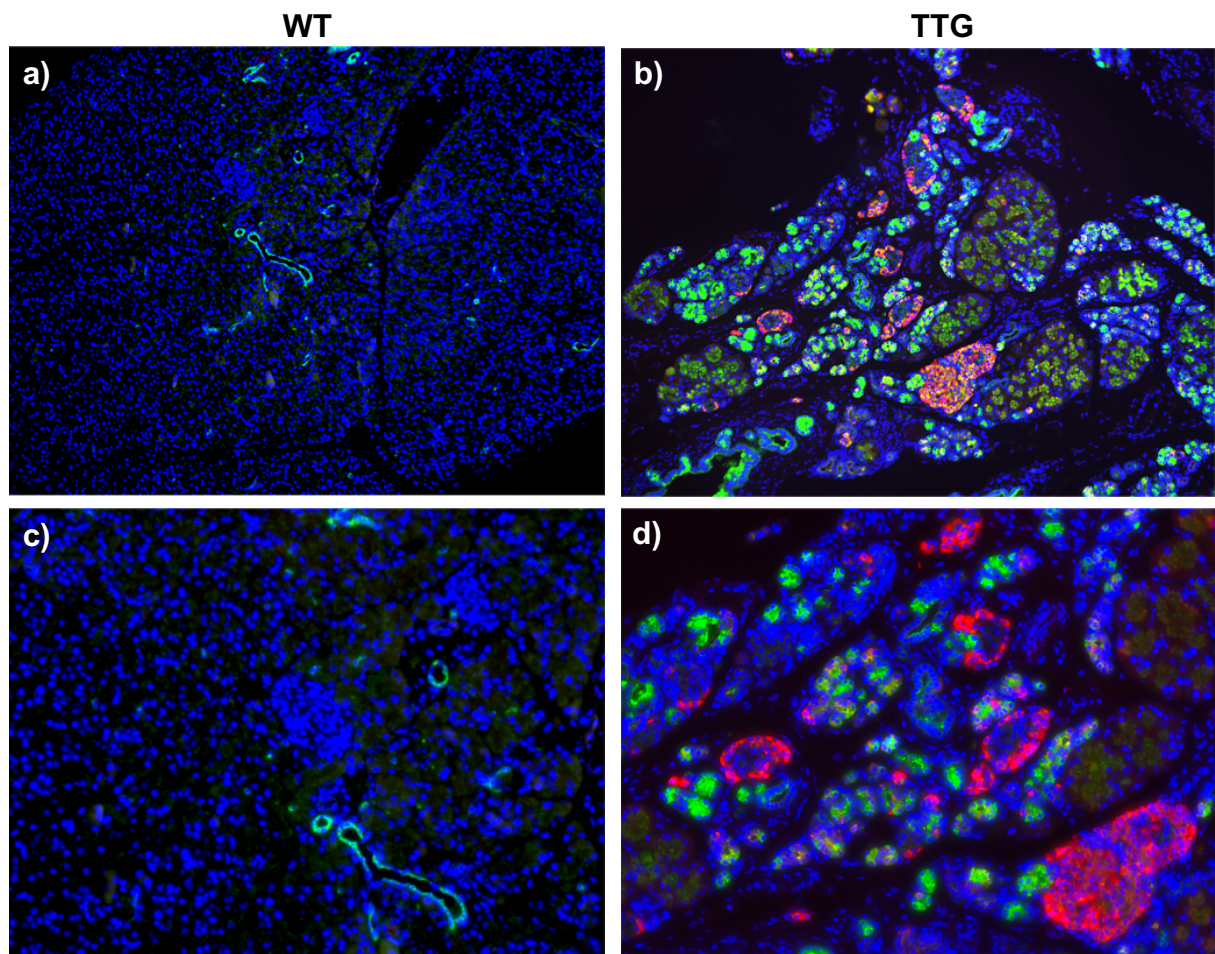
Der zweite positive Bandenbereich in Höhe von ca. 90 -150 kDa zeigt sich insgesamt deutlich schwächer und bei beiden Mauslinien vergleichbar ähnlich ausgeprägt.

In Zusammenschau der präsentierten Ergebnisse der immunhistochemischen sowie Immunoblot-Markierungen lässt sich feststellen, dass durch genetische Alteration mit GalNT2-Überexpression und Cosmc-Knockout im Pankreasgewebe eindeutig Tn-Expression induziert wird.

### **3.2.4.3 VVA- & GALNT2-Antikörper-Doppelfärbung**

Die bisherigen Ergebnisse der TTG-Mauslinie konnten zeigen, dass die genetischen Alterationen zum einen eine vermehrte Tn-Antigen-Expression zur Folge haben (s. 3.2.4.2) und zum anderen, dass, analog zur GalNT2-Tg-Mauslinie (s.3.1.4.1), eine GalNT2-Überexpression der Azinuszellen nachweisbar ist (s. 3.2.4.1).

Um einen noch besseren Überblick über genannte Alterationen zu erhalten wurden in einem weiteren Experiment die Untersuchungen bezüglich Tn-Expression und GalNT2-Überexpression in einer Doppelfärbung mit VVA und GALNT2-Antikörper kombiniert. Dabei wurde Fluoreszenz-gekoppeltes VVA verwendet, welches ein Exzitationsmaximum von 488 nm besitzt und somit im grünen Wellenlängenbereich sichtbar ist. Der GALNT2-Primärantikörper hingegen wurde mit einem 568 nm-Sekundärantikörper gekoppelt und leuchtet bei positiver Bindung folglich rot.



**Abb. 27:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau), VVA (grün) und GALNT2-Antikörper (rot). a) und b) 10-fache Vergrößerung; c) und d) 40-fache Vergrößerung.

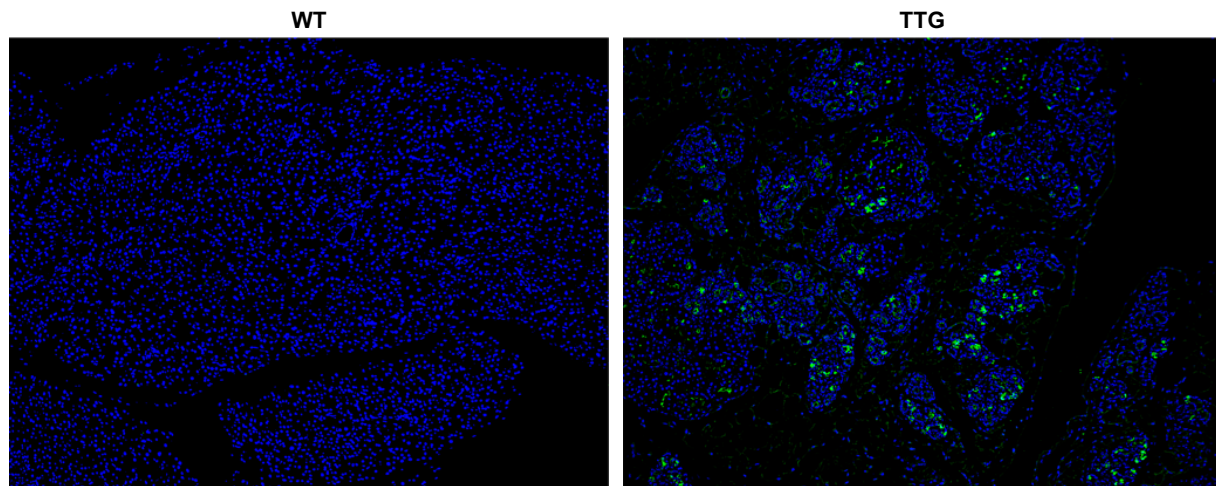
Auf Abbildung 27 ist das Ergebnis dieser Fluoreszenz-Doppelfärbung im Vergleich zum Wildtyp sichtbar, wobei zur besseren Übersicht jeweils zwei Vergrößerungsstufen (10- und 40-fach) abgebildet wurden. Auf der Übersichtsabbildung (27b) ist beim TTG-Präparat eindeutige VVA- als auch GALNT2-Antikörper-Positivität zu sehen. Dabei zeigen sich jedoch unterschiedliche Verteilungsmuster. VVA-positive Areale sind relativ homogen, wenn auch in scheinbar unterschiedlicher Intensität, über das gesamte (Rest-)Drüsengewebe verteilt. Die VVA-negativen Bereiche zwischen den Drüsenläppchen sind durch die DAPI-Färbung in Zusammenschau mit den Erkenntnissen der HE-Färbungen (s. 3.2.2) wahrscheinlich als Fibrozyten, Fett- sowie Entzündungszellen zu identifizieren. Interessanterweise unterscheidet sich das Verteilungsmuster der GALNT2-positiven Bereiche in dieser Färbung von dem Bild der unter 3.2.4.1 präsentierten Ergebnisse (vgl. Abb. 23), da sich insgesamt weniger positive Areale zeigen. Hierbei fällt außerdem auf, dass die angefärbten Zellen entweder VVA- oder GALNT2-positiv, jedoch nicht beides zugleich sein können. Zur Verdeutlichung dieses Phänomens

wurde auch die 40-fache Vergrößerung (27d) abgebildet. Darüber hinaus lässt sich anhand der Anordnung der Zellen vermuten, dass es sich bei den meisten der GALNT2-positiven Areale um Langerhans-Inseln, und insbesondere deren Randbereiche, handelt. Anhand einer Fluoreszenzfärbung lässt sich dies jedoch nur schwer verifizieren, da mit DAPI nur die Zellkerne angefärbt werden. Die 40-fache Vergrößerung zeigt jedoch, dass auch einzelne Azinuszellen GALNT2-positiv sind. Beim Wildtyp-Präparat ist analog zur Abbildung 23 (s. 3.2.4.1) keinerlei GALNT2-Antikörper-Bindung nachweisbar. Überraschenderweise zeigt jedoch das Epithel der Drüsenausführungsgänge VVA-Positivität (nochmals verdeutlicht durch die 40-fache Vergrößerung (27c), was jedoch nicht mit den Ergebnissen der VVA-Färbung in Abbildung 25 (s. 3.2.4.2) übereinstimmt. Das restliche Drüsengewebe hingegen ist ebenfalls VVA-negativ.

#### **3.2.4.4 Nachweis von STn mit STn-Antikörper**

Eine mögliche Modifikation des Tn-Antigens stellt die sialysierte Form, das sogenannten STn-Antigen, dar. Es entsteht, indem die Sialyltransferase ST6GalNAc1 ein Sialinsäurerest  $\alpha$ -2,6-gebunden an den GalNAc-O-Ser/Thr-Rest heftet (s. Abb. 7 unter 1.2.4.1). Die Expression des verkürzten O-Glykans wird ähnlich wie die unsialysierte Form mit verschiedenen Karzinomen und schlechter Prognose assoziiert (s. 1.2.4.3)

Im Gesamtkontext der aberkannten O-Glykosylierung ist es daher von Wichtigkeit auch die Expression des STn-Antigens im Pankreas der TTG-Mauslinie in die Untersuchungen dieser Arbeit miteinzubeziehen. Aus diesem Grunde wurden zusätzlich Fluoreszenzfärbungen mit einem Anti-STn-Antikörper durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 zu sehen.

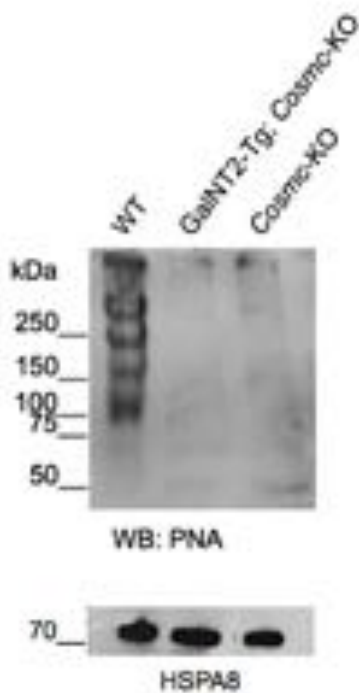


**Abb. 28:** Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und STn-Antikörper (grün).

Abbildung 28 zeigt den eindeutig positiven Nachweis des STn-Antigens beim TTG-Präparat im Vergleich zum STn-negativen Wildtyp, wobei insgesamt jedoch nur vereinzelte Areale des Drüsengewebes Positivität aufweisen.

#### **3.2.4.5 Untersuchung von T-Antigen mit PNA**

Bei den Untersuchungen bezüglich des Tn-Antigens wurden, auch um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der transgenen Mauslinie zu erreichen, Doppelfärbungen mit Fluoreszenz-gekoppeltem VVA und PNA durchgeführt. Abbildung 25 (s. 3.2.4.2) zeigte hierbei den negativen Nachweis von T-Antigen-Expression durch PNA bei der TTG-Mauslinie. Um dieses Ergebnis weiter zu verifizieren wurde, wie auch bei der GalNT2-Tg-Mauslinie (s. Abb. 20 unter 3.1.4.2), eine Immunoblot-Analyse mit PNA durchgeführt.



**Abb. 29:** Western Blot zur Darstellung von T-Antigen mittels PNA bei TTG- und Cosmc-KO-Mäusen. Ladekontrolle mittels HSPA8.

Abbildung 29 zeigt das Ergebnis des Western Blots, wobei neben der TTG-Mauslinie auch erneut die Cosmc-KO-Mauslinie mitverglichen wurde. Zu sehen sind mehrere deutliche Banden beim Wildtyp, wohingegen bei der TTG- sowie Cosmc-KO-Mauslinie kein T-Antigen-Nachweis zu verzeichnen ist. Dies stimmt somit mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Färbungen überein.

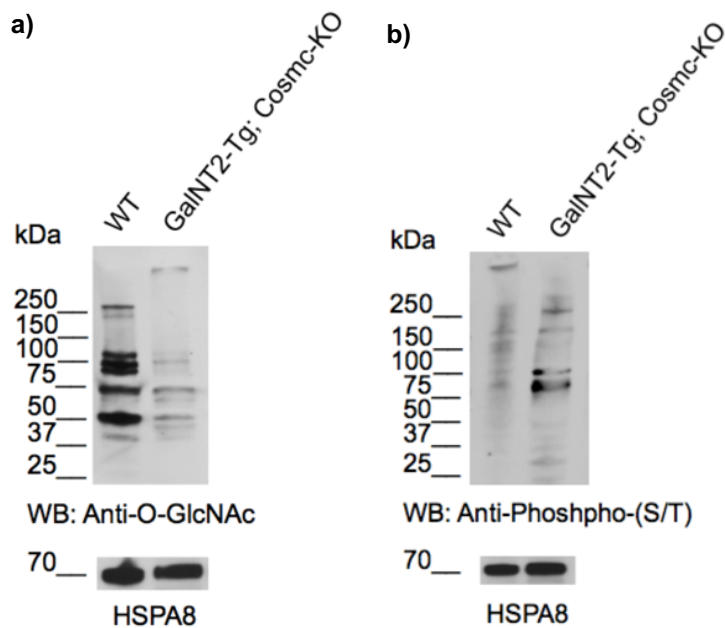
### 3.2.4.6 Untersuchung von O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung mit Phospho-(Ser/Thr)- und O-GlcNAc-Antikörper

Hauptaugenmerk dieser Arbeit stellt die muzintypische O-Glykosylierung dar, bei der ein N-Acetylgalactosamin(GalNAc)-Zuckerrest an Serin oder Threonin einer Proteinkette mit Hilfe von Polypeptid N-acetylgalactosaminyltransferasen (GALNTs) geheftet wird. Darüber hinaus existieren jedoch auch weitere Formen der O-Glykosylierung, bei denen Kohlenhydrate wie N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Glucose (Glc), Mannose (Man) oder Fucose (Fuc) als erste Zuckerstruktur an Serin oder Threonin gebunden werden (s. 1.2.1).

Die Anheftung eines O-GlcNAc-Restes, auch O-GlcNAcylierung genannt, unterscheidet sich dabei wesentlich von den anderen Formen der Glykosylierung, da diese posttranslationale Modifikation anstatt an der Zellmembran oder an sekretorischen, im Zytosol vorkommenden Proteinen im Zellkern sowie in den Mitochondrien stattfindet (Hart, Housley, and Slawson 2007; Yang and Qian 2017). Eine Vielzahl O-GlcNAcylierter Proteine spielt eine Rolle bei der Regulation von Signalwegen, Transkription und der Stressantwort einer Zelle (Hart et al. 2011), aber auch bei der Tumorphagenese (Slawson and Hart 2011) und anderen Erkrankungen wie Alzheimer (Zhu et al. 2014) oder Diabetes mellitus (Vaidyanathan and Wells 2014).

Zu den posttranslationalen Modifikationen zählt neben der Glykosylierung auch die Phosphorylierung von Proteinen. Die Phosphorylierung ist maßgeblich an der Regulation von biologischen Prozessen in der Zelle beteiligt, insbesondere an der Aktivierung und Inaktivierung von Proteinen, bspw. in den Kaskaden der Signaltransduktion (Alberts et al. 2013). Veränderungen von Signalwegen spielen auch bei der Kanzerogenese einer Zelle eine entscheidende Rolle.

Um zu untersuchen, ob die Kombination aus pankreatischer GalNT2-Überexpression und Cosmc-Knockout auch Einflüsse auf die O-GlcNAcylierung oder Phosphorylierung hat, wurden zusätzliche Immunoblot-Analysen mit Antikörpern gegen O-GlcNAc sowie Phospho-(Ser/Thr) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abb. 30:** Western Blots zur Darstellung von a) O-GlcNAc und b) Phospho-(Ser/Thr) mit entsprechenden Antikörpern bei TTG-Mäusen. Ladekontrolle mittels HSPA8.

Zu sehen ist in Abbildung 30a (O-GlcNAc-Antikörper) ein im Gegensatz zum Wildtyp ähnliches, aber deutlich abgeschwächtes Bandenmuster. Außerdem wird eine, wenn auch schwache, Bande im hochmolekularen Bereich weit über 250 kDa sichtbar, die sich beim Wildtyp nicht wiederfindet. Stattdessen sind beim Wildtyp wiederum zwei Banden im Bereich von 250 kDa sichtbar.

Bei Abbildung 30b (Phospho-(Ser/Thr)-Antikörper) zeigt sich hingegen bei der TTG-Mauslinie ein anderes Bandenmuster als beim wildtypischen Vergleich. Insbesondere fehlt zum einen die beim Wildtyp auffällige Bande im hochmolekularen Bereich >250 kDa und zum anderen zeigen sich zwei deutlich positive Banden im Bereich von ungefähr 100 und 90 kDa.

Zusammengefasst implizieren die vorliegenden Ergebnisse, dass sich im Vergleich zum Wildtyp bei der TTG-Mauslinie teilweise ein unterschiedliches O-GlcNAcylierungs- und Phosphorylierungsmuster der Proteinstrukturen finden lässt. Somit könnten Alterationen der muzintypischen O-Glykosylierung auch einen Einfluss auf andere Formen der O-Glykosylierung sowie Phosphorylierungsprozesse haben.



## 4 Diskussion

Die Glykobiologie stellt ein mannigfaltiges Forschungsgebiet mit zahlreichen biomedizinischen Implikationen dar. In den vergangenen Jahrzehnten konnten Wissenschaftler bereits weitreichende Erkenntnisse zum Thema aberrante Glykosylierung erlangen.

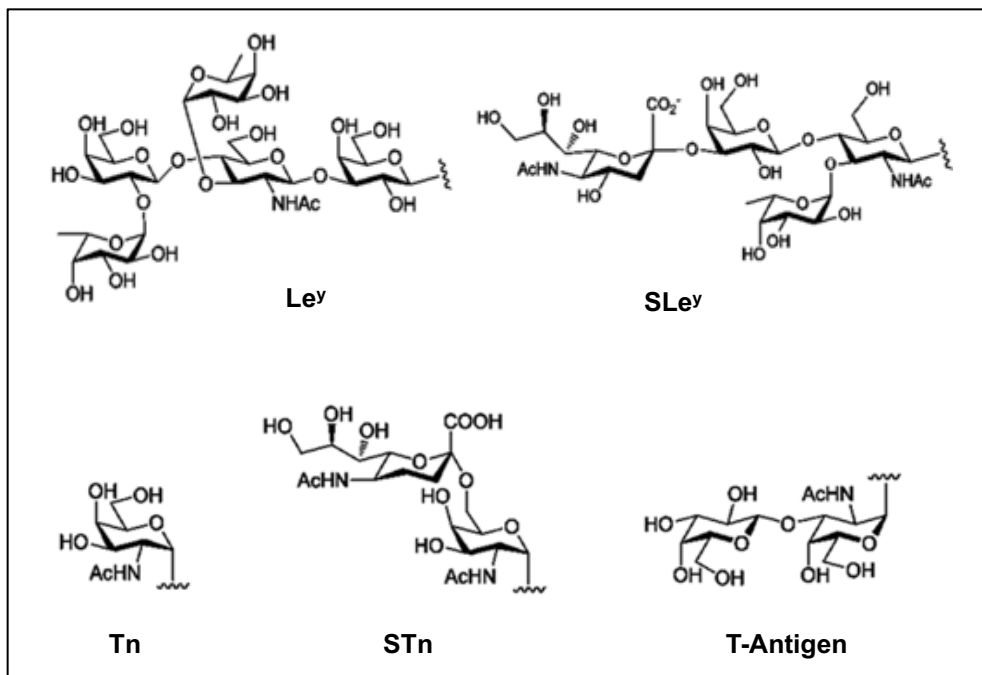
Bei der Glykosylierung von Proteinen handelt es sich im Kontext der Tumorbiologie um einen sehr wichtigen, ubiquitär vorhandenen, komplexen biochemischen Vorgang. Über die genaue Funktion der Proteoglykane ist im Detail erst wenig bekannt. Neben strukturellen sowie modulierenden Eigenschaften, z.B. für Gewebestabilisierung oder Abwehrmechanismen, haben sie große funktionelle Bedeutung für die Kommunikation und Interaktion mit anderen Molekülen (Varki and Lowe 2009).

Alterationen der Glykosylierung haben weitreichende Konsequenzen und lassen sich mit vielen Pathologien und Krankheitsbildern assoziieren.

An wichtigster Stelle stehen hierbei Tumorerkrankungen. Krebs in jeglicher Form stellt vom Verständnis der Pathogenese bis hin zur Erarbeitung erfolgreicher Therapiekonzepte die Wissenschaft bis heute vor eine gewaltige Herausforderung. Nicht umsonst ist die Thematik seit Jahrzehnten ein zentrales Forschungsthema. In zahlreichen Studien wurde der Zusammenhang zwischen veränderter Glykosylierung und verschiedensten Karzinomen bereits untersucht. Aberrante Glykosylierung wird aufgrund der Beteiligung an Karzinogenese, Metastasierung und Tumorprogression daher seit mehreren Jahren als ein „hallmark of cancer“ bezeichnet (Munkley 2016; Vajaria and Patel 2017).

In der Literatur sind mittlerweile eine Vielzahl an tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen (tumor-associated carbohydrate antigens, kurz TACAs) bekannt, welche als tumorspezifische molekulare Marker dienen und im Regelfall gar nicht oder nur äußerst wenig in normalen Zellen vorkommen (Feng, Shaikh, and Wang 2016). Tumore mit erhöhter TACA-Expression zeigen eine stärkere Metastasierungs- und verringerte Überlebensrate (Hakomori 1996, 2001). TACAs lassen sich in zwei verschiedene Klassen einteilen, zum einen in Glykolipidantigene und zum anderen in klassische Glykoproteinantigene. Bei ersteren handelt es sich um Kohlenhydrate die an Ceramide, eine Untergruppe der Sphingolipide, kovalent verknüpft und an der Lipiddoppelschicht der Zelloberfläche verankert sind. Als

bekannte Beispiele wären die Blutgruppenantigene Lewis<sup>y</sup> oder Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>y</sup>/Le<sup>x</sup>) und ihre sialysierten Formen (SLe<sup>y</sup>/SLe<sup>x</sup>) zu nennen (s. Abb. 31), welche z.B. bei kolorektalen (Shimodaira et al. 1997), Brust- (Cohen et al. 2019) oder Pankreaskarzinomen (Balmaña et al. 2015) vermehrt vorkommen. Zu der zweiten Klasse, den Glykoproteinantigenen, zählen die in dieser Arbeit detailliert behandelten Tn-, STn- und T-Antigene (Strukturformeln der genannten Antigene im Vergleich s. Abb. 31).



**Abb. 31:** Strukturformel der Glykolipidantigene Lewis<sup>y</sup> und Sialyl-Lewis<sup>y</sup> sowie der mucintypischen Glykoproteinantigene Tn-Antigen, STn-Antigen und T-Antigen. Modifiziert nach (Feng, Shaikh, and Wang 2016).

Insbesondere das Tn- und STn-Antigen spielen eine entscheidende Rolle im Tumorkonzept. In einer Vielzahl von Studien konnte das vermehrte Vorkommen beider Antigenstrukturen bei verschiedensten Tumorentitäten nachgewiesen werden (Itzkowitz et al. 1989; Ørntoft, Harving, and Langkilde 1990; Inoue et al. 1991; David et al. 1992; Nanashima et al. 1999; Munkley 2016). Darüber hinaus zeigt sich bei vielen Karzinomen ein positiver Zusammenhang zwischen dem (S)Tn-Expressionslevel und der Metastasierungsrate sowie einer schlechteren Prognose bzw. Überlebensrate (Springer 1984; Karlén et al. 1998; Desai 2000; Ozaki et al. 2012). Auch in der Pathogenese und Karzinogenese scheinen die verkürzten O-Glykane involviert zu sein. So zeigen sich beispielsweise bei gastrointestinalen

Polypen (Itzkowitz et al. 1992; Carneiro et al. 1994) oder auch bei prämaligen Epithelläsionen mit erhöhter Dysplasierate teilweise erhöhte (S)Tn-Expressionslevel (Cao, Schlag, and Karsten 1997; Carrilho et al. 2000; Berriel et al. 2005). In einer interessanten Studie zu der Thematik untersuchten die Wissenschaftler Kim und Kollegen aberrante Expression von verschiedenen Mucin-Genen (MUC1 – MUC6) sowie des STn-Antigens bei pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN-1A, -1B, -2 und -3). Hierbei zeigten sich erhöhte Expressionslevel des sialylierten Tn-Antigens bei In Situ Karzinomen (PanIN-3) und invasiven Adenokarzinomen, nicht jedoch bei früheren Vorläuferläsionen. Daraus lässt sich schließen, dass beim Pankreaskarzinom die Expression verkürzter O-Glykane erst spät während der Tumorphathogenese auftritt, jedoch an dem zeitlich entscheidenden Übergang zwischen prämaligener Läsion und invasivem Karzinom. Interessanterweise zeigt sich in der Studie, dass die vermehrte STn-Expression zeitgleich mit der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens DPC4 (auch SMAD4 genannt) auftritt (Kim et al. 2002). Unter 1.1.2.2.2. wurde bereits das Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms („PanIN-Progressionsmodell“, vgl. Abb. 5) vorgestellt. DPC4/SMAD4-Mutation ist hier ein Beispiel für „späte“ genetische Veränderungen. Diese Theorie der Karzinogenese lässt sich nach aktuellem Forschungsstand auf viele andere epitheliale Tumore übertragen, sei es auf gynäkologische Tumore wie das Ovarialkarzinom (Lim and Oliva 2013) oder kolorektale Karzinome mit der bekannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“ (Vogelstein et al. 1988; Leslie et al. 2002; Xi et al. 2017). Ebenfalls angesprochen wurde unter 1.1.2.2.2 der ätiologische Zusammenhang zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom, welcher in unzähligen Studien aufgezeigt werden konnte (Guerra et al. 2007; Yadav and Lowenfels 2013; Pinho, Chantrill, and Rooman 2014; Xu et al. 2015). Die Entwicklung pankreatischer Epithelläsionen, als Vorläufer zum Pankreaskarzinom, scheint dabei eng mit dem Krankheitsbild der chronischen Pankreatitis verknüpft zu sein, da PanINs gehäuft bei Patienten mit chronischer Pankreatitis auftreten (Andea, Sarkar, and Adsay 2003). Das Vorkommen von PanIN-3 bei Patienten mit chronischer Pankreatitis ist als möglicher Prognosemarker für die Entwicklung eines invasiven Pankreaskarzinoms zu werten (Hwang et al. 2015).

Der genaue pathophysiologische Zusammenhang zwischen veränderter O-Glykosylierung mit dem Auftreten der tumorassoziierten Glykoproteine Tn- und STn-

Antigen und der Entwicklung von Pankreopathologien wie Pankreatitis bis hin zum Pankreaskarzinom bleibt jedoch weiterhin zum größten Teil unbekannt. Dies trifft auch andere Tumorentitäten im Allgemeinen zu.

Verschiedene genetische Mutationen scheinen hierbei eine Rolle zu spielen. Eine Theorie über das Auftreten veränderter Kohlenhydratantigene beschreibt als mögliche Ursache Alterationen der Aktivität von Glykosyltransferasen. Für den physiologischen Syntheseweg der O-Glykane sind zwei Glykosyltransferasen von zentraler Bedeutung. Zunächst die Familie der GalNAc-Transferasen (GALNTs), die den ersten Syntheseschritt der O-Glykosylierung katalysieren. Hierbei übertragen sie einen GalNAc-Rest an die Hydroxylgruppe eines Ser/Thr-Rest, wodurch das unreife Tn-Antigen entsteht. Darauf folgend wird dieses durch eine zweite Glykosyltransferase, am häufigsten durch die Core-1-Synthase bzw. T-Synthase, zu einer weiter verzweigten Zuckerstruktur modifiziert, sodass das Core 1-Protein bzw. T-Antigen entsteht (s. 1.2.4.1, Abb. 7). Entscheidend ist, dass die Enzymaktivität dabei von dem Chaperon COSMC abhängig ist (Details s. 1.2.4.4). Nach aktuellem Forschungsstand führen Mutationen im COSMC-Gen, welche mit einem Funktionsverlust des Gens einhergehen, zu einer vermehrten Tn-Expression. Dies konnte bei einer Vielzahl an humanen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Als Beispiele wären verschiedenste kolorektale Karzinomzelllinien wie HT-29 (Yu et al. 2015), LS174T, LSC (Ju, Lanneau, et al. 2008), LS180 und HCT8 (Sun, Ju, and Cummings 2018), Pankreaskarzinomzelllinien wie Panc-1 und L2.6pl (Hofmann et al. 2015), die T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat oder die Melanomzelllinie LOX (Ju and Cummings 2002) zu nennen. Dahingegen gibt es bisher kaum Studien in denen in vivo mit Hilfe von Mausmodellen die Folgen genetischer Cosmc-Mutationen untersucht wurden.

In den ersten in vivo Studien wurden zunächst die Auswirkungen von Mutationen im C1galt-Gen, welches für die T-Synthase codiert, untersucht. So stellten Alexander und Kollegen 2006 fest, dass ein Mangel an T-Synthase bei Mäusen zu Thrombozytopenien und Nierenfunktionsstörungen führt (Alexander et al. 2006). Die Wissenschaftler Fu und Kollegen generierten hingegen 2008 ein Mausmodell mit fehlender T-Synthase-Aktivität in Endothelzellen. Auch in dieser Studie konnte allgemein die enorme Bedeutung der O-Glykosylierung und insbesondere der T-Synthase-Aktivität aufgezeigt werden, da die Mäuse schwerwiegende Gefäßmissbildungen zeigten, die zu Steatohepatosis und früher embryonaler bzw.

neonataler Mortalität führten (Fu et al. 2008). 2010 veröffentlichten die Wissenschaftler Wang und Kollegen schließlich eine herausragende Studie, in welcher zum ersten Mal die Auswirkungen eines homozygoten Cosmc-Knockouts bei Mäusen auf Alterationen der O-Glykosylierung in vivo untersucht wurden. Sie konnten beweisen, dass Cosmc hochspezifisch für die T-Synthase-Aktivität ist, da in allen Cosmc-Knockout-Zellen der Mausembryonen dies mit einem Verlust der T-Synthase-Aktivität und einer Überexpression des Tn-Antigens einherging.

Phänotypisch variierten die Auswirkungen, insgesamt zeigte sich jedoch eine sehr frühe embryonale Letalität. Als häufigste Ursache wurden hierfür Einblutungen im zentralen Nervensystem gefunden (Wang et al. 2010). Cutler und Kollegen generierten in einer aktuellen Studie wiederum eine Mauslinie mit Cosmc-Knockout in T-Zellen, wodurch die periphere T-Zell-Population einen massiven Verlust verglichen zum Wildtyp zeigte (Cutler et al. 2019).

Die Studienlage bezüglich Cosmc-Mutationen im Pankreas und deren Auswirkungen in vivo stellt sich insgesamt äußerst dürftig dar. In der im Jahr 2018 veröffentlichten Studie von den Wissenschaftlern um Dr. Wolters-Eisfeld wurde mit Hilfe einer neuen Mauslinie zum ersten Mal die Auswirkungen eines pankreasspezifischen Cosmc-Knockouts (Cosmc-KO) untersucht (zur Genetik s. 1.3). In der Arbeit konnten zahlreiche O-glykosylierte pankreatische Proteine identifiziert werden, wozu auch diverse Verdauungsenzyme zählen. Im Kontext der Ergebnisse dieser Arbeit stellt dies einen möglichen Erklärungsansatz bezüglich der Entstehung einer Pankreatitis bei Mäusen mit der Kombination aus Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression dar (s. 3.2.3), da eine durch Verdauungsenzyme ausgelöste Autodigestion des Pankreas von zentraler Bedeutung bei der Krankheitsentstehung ist (s. 1.1.2.1). Auf biochemischer Ebene ließ sich beweisen, dass fehlende Cosmc-Funktion zu aberranter Glykosylierung mit dem Auftreten deutlich erhöhter Tn-Expressionslevel führt. Interessanterweise zeigten sich phänotypische Auswirkungen auf die endokrine sowie exokrine Pankreasfunktion. Die Mäuse entwickelten einen Diabetes, der dem beim Menschen bekannten MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) ähnelt (Wolters-Eisfeld et al. 2018). Verschiedene genetische Mutationen sind beim Menschen als Ursache für das Auftreten der Krankheit bekannt, beim MODY Typ 8 liegt die Ursache bspw. in Veränderungen des CEL-Gens (carboxyl-ester lipase) (Ræder et al. 2006). Bei den Cosmc-KO-Mäusen konnte Cel als ein entscheidendes Tn-modifiziertes Glykoprotein identifiziert werden, wodurch fehlende T-Synthase-

Aktivität mit dem Auftreten des Krankheitsbildes in Zusammenhang gebracht werden kann. Auch auf die exokrine Pankreasfunktion konnten negative Effekte beobachtet werden. Funktionsstörungen der Verdauungsenzyme Lipase und Elastase sowie der exokrinen Pankreassekretion führten bei den Mäusen zu Symptomen der Maldigestion, -absorption und Gewichtsreduktion im jungen Alter von zwei bis vier Wochen (Wolters-Eisfeld et al. 2018)

Um die Auswirkungen weiterer genetischer Mutationen an entscheidenden Schritten der O-Glykosylierung im Pankreasgewebe zu untersuchen wurde, aufbauend auf die vorangegangene Studie, die pankreasspezifische Cosmc-KO-Mauslinie mit der neu generierten GalNT2-überexprimierenden Mauslinie („GalNT2-transgen bzw, GalNT2-tg“) gekreuzt, wodurch die „tripletransgene“ (TTG) Mauslinie entstand (Details s. 1.3, Abb. 8). Beide Mauslinien, GalNT2-transgen sowie TTG, wurden in dieser Arbeit eingehend untersucht und die Ergebnisse werden unten stehend diskutiert.

Auch die Studienlage zu aberranter O-Glykosylierung in Folge veränderter GalNAc-Transferasen-Expression präsentiert sich bis dato gering und zum Teil widersprüchlich (s. 1.2.4.2). Bisher sind 20 verschiedene Isoenzyme bekannt, von denen die meisten erst in den letzten zwei Jahrzehnten entdeckt wurden. Die Nummerierung bezieht sich dabei auf die Reihenfolge der Entdeckung. GalNAc-T2 wurde 1995 von den Wissenschaftlern White und Kollegen das erste Mal beschrieben (White et al. 1995). Wenig später, nachdem auch GalNAc-T3 entdeckt worden war (Bennett, Hassan, and Clausen 1996), war bereits bekannt, dass die verschiedenen Transferasen zwar Ähnlichkeiten in ihrer primären Struktur zeigen, sie sich jedoch in ihrer Aminosäuresequenz zu über 50% unterscheiden und auch ihre kodierenden Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Darüber hinaus werden sie in den Organen unterschiedlich exprimiert und zeigen signifikante Unterschiede in Akzeptor- und Donatorspezifität (Wandall et al. 1997). 2017 konnten Xu und Kollegen mit Hilfe eines humanen Protein-Microarrays 570 potentielle Proteinsubstrate der GalNAc-T1, -T2 und -T3 identifizieren, von denen 128 als Substrate für alle drei Glykosyltransferasen dienen, während die restlichen jeweils isoformspezifisch sind (Xu et al. 2017). Diese Erkenntnisse dienen als mögliche Erklärung für die unterschiedliche Studienlage im Tumorkonzept (s. 1.2.4.2) und verdeutlichen die außerordentliche Komplexität der Glykosylierung von Proteinen.

Über die Auswirkungen genetischer Mutationen der in beiden Mauslinien überexprimierten GalNAc-Transferase 2 (GALNT2), insbesondere auf das Pankreas bezogen, ist bisher wenig bekannt. In Pankreaskarzinomzelllinien fanden Sutherlin und Kollegen niedrige GALNT2-Expressionslevel (Sutherlin et al. 1997), ansonsten lassen sich keine weiteren pankreasspezifischen Studienergebnisse finden. Beim humanen oralen Plattenepithelkarzinom führt GALNT2-Überexpression zu vermehrtem Tumorwachstum und Invasivität (Lin et al. 2014), wohingegen beim Magen- und Hepatozellulären Karzinom ein GALNT2-Knockout Malignitätskriterien wie Metastasierung oder Invasivität fördert, GALNT2 also einen tumorprotektiven Einfluss zu haben scheint (Wu et al. 2011; Liu et al. 2016; Hu et al. 2018). In verschiedenen Studien präsentiert sich die veränderte Glykosylierung und Phosphorylierung von Proteinen in Signalwegen wie beispielsweise dem EGFR-PI3K/Akt-Signalweg als ein Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen GALNT2 und Karzinogenese (Wu et al. 2011; Hu et al. 2018; Sun et al. 2019), wobei die Auswirkungen sich von Organ zu Organ deutlich unterscheiden, wie die oben genannten Beispiele verdeutlichen. Daraus lässt sich schließen, dass die Ergebnisse bezüglich GALNT2 sich nicht gänzlich auf das Pankreas übertragen lassen, sondern pankreasspezifische Studien gefordert sind.

Die Untersuchung einer Mauslinie mit genetischer GalNT2-Überexpression im Pankreasgewebe stellt daher ein Novum in den bisherigen Wissenschaftsergebnissen dar. Zunächst konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von Chromogen- bzw. Fluoreszenzfärbungen sowie Western Blots bewiesen werden, dass sich im Pankreasgewebe eine vermehrte GalNT2-Expression zeigt (s. 3.1.4.1). Darüber hinaus wurden die biochemischen Auswirkungen auf die O-Glykosylierung untersucht. Die zentrale Fragestellung hierbei befasste sich mit der Überlegung, ob durch vermehrte GalNT2-Aktivität Tn-Antigen gebildet wird oder ob die T-Synthase mit ihrem Chaperon Cosmc ebenfalls gesteigerte Aktivität zeigt und folglich vermehrt T-Antigen entsteht. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmarkierung zeigen eindeutig, dass kein Tn-Antigen nachgewiesen werden kann, jedoch vermehrt T-Antigen (nachgewiesen durch das Lektin PNA) gebildet wird (s. 3.1.4.2, Abb. 17). Somit resultiert genetische GalNT2-Überexpression in vivo darin, dass die ersten Schritte des physiologischen Synthesewegs der O-Glykane weiter erfolgen können. Auch auf Proteinebene konnte mittels Western Blots gezeigt werden, dass sich T-Antigen in

relevantem Maße nachweisen lässt. Hierbei zeigte sich jedoch im Vergleich zum Wildtyp ein unterschiedliches Detektionsmuster, da PNA-Positivität bei äußerst hochmolekularen Proteinen auftrat (s. 3.1.4.2, Abb. 18). Um die komplexen Auswirkungen der GalNT2-Überexpression auf das Proteoglykom weiterführend zu analysieren wären jedoch weitere Forschungen, insbesondere mit Hinblick auf die Identifizierung der glykosylierten Proteine, notwendig.

Phänotypisch ließen sich verschiedene Auswirkungen in der GalNT2-transgenen Mauslinie beobachten. Zunächst zeigte sich im Alter von sechs Wochen ein signifikanter Unterschied in den Körpergewichten, welcher sich jedoch im Alter von 20 Wochen relativiert (s. 3.1.1., Abb. 10). Auf der anderen Seite präsentiert sich das Pankreas im Vergleich zum Wildtyp verändert. Das Organgewicht ist bei den sechs sowie 20 Wochen alten Tieren im Vergleich zum Wildtyp vermindert (s. 3.1.1, Abb. 11) und auch das makroskopische Bild bestätigt den Massenunterschied (s. 3.1.2, Abb. 12). Mikroskopisch zeigt sich ein mit steigendem Alter zunehmender Parenchymverlust. Das aufgelockerte Drüsengewebe wird vermehrt mit Adipozyten und Bindegewebssepten durchzogen (s. 3.1.3, Abb. 13).

Neueste Forschungsergebnisse passen zu den histopathologischen Beobachtungen im Pankreas mit vermehrter Adipozytenbildung, da ein eindeutiger Zusammenhang zwischen GALNT2-Expression und Adipozytenreifung gezeigt werden konnte.

GALNT2 scheint wichtige regulatorische Einflüsse auf Signalwege der Adipogenese zu haben, da in entsprechenden Zellen vermehrt Triglyzeride, Lipiddröpfchen als auch intrazelluläre Akkumulation von Lipiden nachgewiesen werden konnte (Marucci et al. 2019; Antonucci et al. 2021). Hierbei besteht mit großer Wahrscheinlichkeit der Zusammenhang mit einem stimulierenden Effekt auf den Insulin-Signalweg in Adipozyten (Marucci et al. 2013; Marucci et al. 2019).

Die genauen Zusammenhänge zwischen den biochemischen und phänotypischen Ergebnissen der in dieser Arbeit untersuchten GalNT2-transgenen Mauslinie sind insgesamt jedoch noch nicht eindeutig zu erklären und benötigen weitere intensive Forschungsarbeit. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass zwar die ersten Schritte der O-Glykosylierung ablaufen können, insgesamt jedoch durch das vermehrte Auftreten des T-Antigens, welches physiologischerweise durch GlcNAc-Transferasen mit verschiedensten Zuckerketten erweitert wird, eine aberrante Glykosylierung mit Auswirkungen auf die Organentwicklung stattfindet.



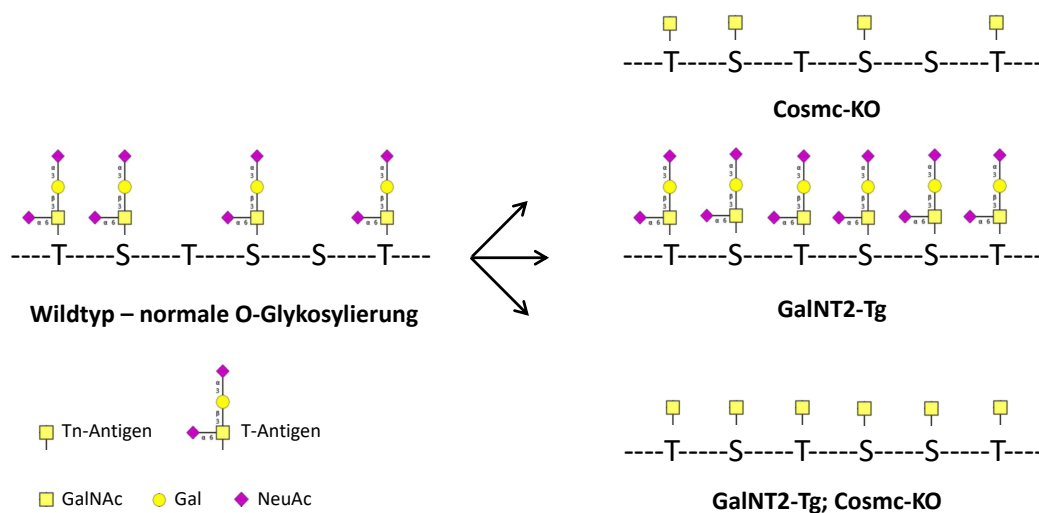
In verschiedenen Studien zeigte sich, dass nicht nur die verkürzten O-Glykane Tn- und STn-Antigen im pathologischen Kontext vorkommen, sondern auch die T-Antigen-Expression z.B. bei verschiedenen Tumorentitäten oder chronischen Entzündungen erhöht ist. Als bekannteste Beispiele wären Kolon- (Itzkowitz et al. 1989; Cao et al. 1995), Prostata- (Glinsky et al. 2001), Pankreas- (Itzkowitz et al. 1991) oder Mammakarzinome (Wang, Springer, and Carlstedt 1997) zu nennen, aber auch chronisch entzündliche Erkrankungen wie Colitis ulcerosa (Pihl et al. 1985; Campbell et al. 1995) oder die chronische Pankreatitis (Itzkowitz et al. 1991) zählen hierzu. Insgesamt ist das T-Antigen jedoch weitaus weniger tumorspezifisch als das Vorläuferprotein Tn-Antigen, da es sich auch im normalen Gewebe häufig nachweisen lässt. Daher ist es als diagnostischer und therapeutischer Marker von weniger Interesse (Desai 2000). Dies kongruiert mit den Ergebnissen unter 3.1.4.2, bei denen auch beim Wildtyp immunhistochemisch sowie molekularbiologisch T-Antigen nachgewiesen werden konnte, sowie mit den Ergebnissen der Studie von Itzkowitz und Kollegen, bei welcher beim gesunden Pankreasgewebe in 68% der Azinuszellen T-Antigen nachgewiesen werden konnte (Itzkowitz et al. 1991).

Die komplexen Zusammenhänge zwischen aberranter O-Glykosylierung und ihren pathologischen Auswirkungen, insbesondere im Tumorkontext, geben weiterhin große Rätsel auf. Um diese Zusammenhänge beim Pankreas in vivo noch weiter zu untersuchen wurde die GalNT2-transgene Mauslinie (A) mit der Cosmc-KO-Mauslinie verpaart (s. oben). Hierdurch entstand eine zweite neue Mauslinie (B), die beide genetische Eigenschaften miteinander vereint und als „tripletransgen“ (abgekürzt TTG) benannt wurde (für die Kombination der Eigenschaften „Ptf1a; Cosmc-KO; GalnT2-Tg“, vgl. Abb. 9 unter 1.3).

Mithilfe von Immunmarkierung wurden Alterationen der O-Glykosylierung untersucht. Zunächst konnte, analog zu den Ergebnissen der GalNT2-transgenen Mauslinie, durch immunhistochemische Färbungen eine GalNT2-Überexpression im Pankreasgewebe nachgewiesen werden (s. 3.2.4.1, Abb. 23). Von besonderem Interesse ist jedoch die Untersuchung der Tn-Expression gewesen. Wie oben bereits erwähnt konnte in einer vorangegangenen Studie bei Pankreaskarzinomzelllinien mit genetischem Cosmc-Knockout gesteigerte Tn-Expression nachgewiesen werden (Hofmann et al. 2015). Bei der de novo genetischen Kombination aus Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression ließ sich im Pankreasgewebe der Mäuse

durch Tn-Antikörper- und VVA-gekoppelte Fluoreszenzfärbungen (s. 3.2.4.2, Abb. 23 u. 24) sowie Western Blots (s. Abb. 26) ebenfalls eine gesteigerte Tn-Expression nachweisen. Um einen direkten Vergleich mit der Cosmc-KO-Mauslinie zu erhalten wurde bei der VVA-Immunoblotanalyse beide Mauslinien zusammen untersucht. Beide zeigten hierbei Tn-Positivität, interessanterweise fiel hierbei jedoch ein quantitativer Unterschied auf, da die TTG-Mauslinie eine deutlich breitere Bande aufwies. Dies lässt die Vermutung zu, dass durch GalNT2-Überexpression bei fehlender Cosmc-Funktion insgesamt noch mehr Tn-Antigen entsteht als bei isoliertem Cosmc-Knockout. Bei der TTG-Mauslinie konnte außerdem auch positive STn-Expression gezeigt werden (s. 3.2.4.4, Abb. 28). Darüber hinaus ließ sich durch Fluoreszenzfärbung mit dem T-Antigen erkennenden Lektin PNA eine negative T-Antigen-Expression nachweisen (s. Abb. 25).

Die neuen Erkenntnisse bezüglich Alterationen der O-Glykosylierung bei den beiden in dieser Arbeit untersuchten Mauslinien GalNT2-Tg sowie TTG werden in nachfolgender Abbildung (Abb. 32) gemeinsam mit der Cosmc-KO-Mauslinie schematisch zusammengefasst.



**Abb. 32:** Schematische Illustration der aberranten Glykosylierung verschiedener Genotypen. Modifiziert nach Wolters-Eisfeld.

Die Abbildung zeigt linksseitig die normale O-Glykosylierung beim Wildtyp sowie rechtsseitig die aberrante Glykosylierung bei den Mauslinien Cosmc-KO, GalNT2-Tg und tripletransgen (TTG) im Vergleich. Die Zuckerreste werden dabei an Serin- (S) oder Threoninreste (T) gebunden. Beim Wildtyp wird das aus einem O-GalNAc-Rest

bestehende Tn-Antigen zur Core-1-Struktur namens T-Antigen erweitert. Beim GalNT2-Tg-Genotyp entsteht ebenfalls T-Antigen und kein Tn-Antigen, wobei jedoch im Vergleich zum Wildtyp quantitativ mehr T-Antigen gebildet wird. Beim Cosmc-KO- und GalNT2-Tg; Cosmc-KO-Genotyp (TTG) wird hingegen Tn-Antigen exprimiert, wobei jedoch die tripletransgene Mauslinie wahrscheinlich eine gegenüber der Cosmc-KO-Mauslinie gesteigerte Tn-Expression aufweist. Diese neuen Erkenntnisse geben weitreichende Einblicke in veränderte Glykosylierungsprozesse und deren genetischen Grundlagen.

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen der TTG-Pankreaspräparate fiel zudem auf, dass vor allem GalNT2 ein inhomogenes Verteilungsmuster aufweist. Nicht alle Bereiche zeigen GALNT2-Positivität und es scheint als ob speziell die Langerhansinseln (insbesondere ihre Randbereiche) verstärkte Expression zeigen (s. 3.2.4.3, Abb. 27). Zirkulär in den Randbereichen der Langerhans-Inseln sind vor allem die Glukagon-produzierende Alphazellen lokalisiert, wohingegen die Insulin-produzierenden Betazellen den Großteil der übrigen, innerhalb gelegenen Zellen ausmachen (Elayat, el-Naggar, and Tahir 1995). Die genaue Ursache für diese Beobachtung ist derzeit nicht bekannt, jedoch zeigt es, dass das endokrine sowie exokrine Pankreasgewebe von den genetischen Veränderungen betroffen ist. Diese Erkenntnis stimmt auch mit den Ergebnissen der Studie über die Cosmc-KO-Mauslinie überein (Wolters-Eisfeld et al. 2018), bei welcher sich eine endokrine sowie exokrine Pankreasinsuffizienz nachweisen ließ (s. oben).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Ergebnissen wurden in einem Experiment auch Western Blots mit Antikörper gegen N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) und Phospho-(Ser/Thr) durchgeführt. Bei der O-GlcNAcylierung sowie Phosphorylierung von Proteinen handelt es sich ebenfalls um posttranslationale Modifikationen, die sich jedoch in vielerlei Hinsicht, sei es in ihrer Lokalisation oder Funktion, von der muzintypischen O-Glykosylierung unterscheiden (s. 3.2.4.6). Hierbei zeigten sich zum Teil unterschiedliche Bandenmuster, was den Rückschluss zulässt, dass die genetischen Veränderungen der TTG-Mauslinie möglicherweise Auswirkungen auf andere Formen der O-Glykosylierung sowie Phosphorylierungsprozesse haben. Dies wiederum könnte Einfluss z.B. auf verschiedene Signaltransduktionswege bis hin zur Kanzerogenese haben.

Neben den Alterationen der Glykosylierung wurden bei der tripletransgenen

Mauslinie ebenfalls phänotypische Auswirkungen untersucht. Das makroskopische Erscheinungsbild (s. 3.2.2, Abb. 21) sowie die Organgewichte des Pankreas (s. 3.2.1, Abb. 20) präsentieren sich im Vergleich zum Wildtyp deutlich verkleinert bzw. verringert. Darüber hinaus weisen die genetisch veränderten Mäuse signifikant geringere Körpergewichte auf (s. 3.2.1, Abb. 19), was auf eine Mangelversorgung rückschließen lässt. Da die genetischen Veränderungen pankreasspezifisch sind, lässt dies den Rückschluss zu, dass eine Pankreasfehlfunktion ursächlich für die Gewichtsreduktion ist. Das mikroskopische Erscheinungsbild bestätigt die Vermutung, dass sich das Pankreasgewebe der TTG-Mäuse mit steigendem Alter im Vergleich zum Wildtyp eindeutig verändert. Es zeigt sich eine deutliche Atrophie des exokrinen Pankreasgewebes, begleitet von interstitieller Fibrosierung (s. 3.2.3, Abb. 22). Dies ähnelt dem histologischen Erscheinungsbild der chronischen Pankreatitis (s. 1.1.2.1.2), woraus sich schließen lässt, dass durch Cosmc-Knockout kombiniert mit GalNT2-Überexpression Pankreasfehlfunktionen ähnlich der chronischen Pankreatitis ausgelöst werden. Durch eine Vielzahl von Studien konnte bewiesen werden, dass beim Menschen die chronische Pankreatitis wiederum einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms darstellt (s. 1.1.2.2.1). Chronische Pankreatitis lässt sich hierbei auch als mögliche Karzinomvorstufe werten, da mittlerweile bekannt ist, dass Karzinogenese einen mehrstufigen Prozess darstellt, welcher über präkanzerotische Vorläuferläsionen abläuft („PanIN-Progressionsmodell“, s. 1.1.2.2.2). Weitergefasst lässt sich dadurch vermuten, dass die zentralen Enzyme der O-Glykosylierung, GALNT2 sowie die vom Chaperon abhängige T-Synthase, eine Rolle bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielen. Die Entstehung von Krebs stellt jedoch einen äußerst komplexen, vielschichtigen Prozess dar, der durch eine weitere Vielzahl an genetischen Alterationen entsteht (vgl. Abb. 5 unter 1.1.2.2.2). Daher ist es nicht verwunderlich, dass in dieser Experimentreihe die Mäuse in den untersuchten Altersklassen kein Pankreaskarzinom entwickeln. Hierfür wären höchstwahrscheinlich weiterführende Experimente mit zusätzlichen genetischen Alterationen notwendig. Nichtsdestotrotz weisen die Ergebnisse in vivo auf die bedeutsame Rolle der O-Glykosylierung, insbesondere des beteiligten Enzyms GALNT2 und des Chaperons COSMC, bei der Entwicklung von Pankreopathologien hin und sind als möglicher Anhaltspunkt für das Verständnis über die in klinischen oder in vitro-Studien bereits aufgezeigten Zusammenhänge zwischen aberranter

Glykosylierung und chronischen Entzündungen sowie Karzinomen zu werten.

Um diese komplexen Zusammenhänge noch besser verstehen zu können wären noch eine Vielzahl weiterer Studien und Experimente notwendig. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wäre es von großem Interesse als nächstmöglicher Schritt die aberrant glykosylierten Proteine zu identifizieren, was mit Hilfe von Massenspektrometrie untersucht werden könnte. Insgesamt gilt es die Mechanismen, die zu den beobachteten Phänotypen führen, besser verstehen zu können.

Insbesondere die Ursache der verminderten Körpergewichte der tripletransgenen Mäuse, die auf eine Mangelernährung hinweisen, gilt es weiter zu erforschen. Ein mögliches Beispiel für die Verknüpfung zwischen Genotyp und pankreatischen Auswirkungen stellt das Enzym Carboxyl Ester Lipase (CEL) dar. Wie oben bereits erwähnt, konnte in der Studie von Wolters-Eisfeld und Kollegen mit Cosmc-Knockout-Mäusen CEL als eins der entscheidenden betroffenen Tn-modifizierten Glykoproteinen identifiziert werden (Wolters-Eisfeld et al. 2018). Bei den Cosmc-Knockout-Mäusen stand der dem MODY Typ 8 ähnelnde Diabetes-Phänotyp (bei welchem durch CEL-Genmutationen ein Insulinmangel hervorgerufen wird) im Vordergrund. Darüber hinaus zeigt jedoch eine interessante Studie von Xiao und Kollegen, dass CEL-Mutationen zu intrazellulärer Akkumulation des Proteins führt, wodurch der programmierte Zelltod durch Apoptose herbeigeführt wurde. Dies stellt eine mögliche Ursache für die Entstehung von chronischer Pankreatitis dar (Xiao et al. 2016).

Neben der Identifizierung der aberrant glykosylierten Proteine und die daraus resultierenden Folgen für die Organfunktion wäre ein weiterer wichtiger, darauf aufbauender Schritt Studien mit humanen Pankreasgewebeproben durchzuführen und die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Interessant wäre es beispielsweise herauszufinden, ob die gleichen Proteine bei humanen Pankreaskarzinomproben betroffen sind. Um die Thematik weiter zu vertiefen könnte man auch die Expression der anderen GalNAc-Transferasen-Typen (nicht nur GALNT2), z.B. via real time PCR untersuchen. Ob die Genotypen auch Einfluss auf die Isoenzyme haben wäre eine weitere interessante Fragestellung, die es noch zu klären gilt.

Insgesamt gilt es als weitreichendstes Ziel der medizinischen Forschung Krankheiten durch Früherkennung und spezielle Therapien zu bekämpfen. Krebs als ein

Krankheitsbild mit noch immer häufig letalem Ausgang hat hierbei einen besonders großen Stellenwert. Neben den klassischen Therapiekonzepten mit Radio-, Chemo- und operativer Therapie hat in den letzten Jahren das Forschungsgebiet rund um das Thema „targeted therapy“ („gezielte Krebstherapie“) an immenser Bedeutung gewonnen. Hierunter versteht man die Entwicklung von Medikamenten, die im Gegensatz zu Zytostatika das Tumorwachstum hemmen indem sie an spezifischen biologischen oder zytologischen Merkmalen von Krebsarten ansetzen und diese ausschalten bzw. blockieren. Meistens handelt es sich bei diesen Angriffspunkten um spezielle Gene oder Proteine. Wie bereits ausführlich erläutert zählt das Tn-Antigen zu den tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen (TACAs, s. oben), da es sich um ein tumorspezifisches Glykoprotein handelt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass auch das Tn-Antigen Potential besitzt als Angriffspunkt für z.B. aus monoklonalen Antikörper bestehende Medikamente zu fungieren. 1987 wurden in einer Studie von Longenecker und Kollegen erstmalig monoklonale Antikörper gegen das Tn-Antigen entwickelt, welche erfolgreich mit humanen Brust-, Kolon- und Lungenkarzinomproben reagierten (Longenecker et al. 1987). Seitdem wurden, vor allem für wissenschaftliche und diagnostische Zwecke, viele weitere Tn-bindende Antikörper und Lektine entwickelt und in Studien untersucht, als einige Beispiele wären VVL-B4 (Wu, Wu, and Shen 1994; Avichezer and Arnon 1996; Konska et al. 2002; Manimala et al. 2005), HBTn1 (Sakuraba et al. 2004; Manimala et al. 2005; Li et al. 2009), Bric111 (King et al. 1991; Karamatic Crew et al. 2008), Ca3638 (Avichezer et al. 1997; Ju, Otto, and Cummings 2011b), GOD3-2C4 (Welinder et al. 2011), MGL (Napoletano et al. 2020; Pirro et al. 2020) oder Remab6 als einer der neuesten (Matsumoto et al. 2020) zu nennen. Die Ergebnisse sind vielversprechend, auch wenn die Spezifität, mit welcher die Antikörper das tumorspezifische Tn-Antigen binden, eine der größten Herausforderungen darstellt.

Ein herausragendes Beispiel, wo Glykoproteine bereits eine tragende Rolle im klinischen Alltag mit Krebserkrankungen spielen, stellt die Verwendung von Tumormarkern dar. Sie finden vor allem in der Krebsdiagnostik Anwendung und bei der Mehrheit von ihnen handelt es sich um Glykoproteine (Reis et al. 2010; Wang et al. 2019). Als prominente Beispiele ließen sich PSA (prostataspezifisches Antigen) bei Prostata- (Gilgunn et al. 2013), AFP (Alpha-1-Fetoprotein) bei Leber- (Li, Mallory, and Satomura 2001), CEA (Carcinoembryonales Antigen) bei Kolon- (Goldstein and Mitchell 2005), CA 125 (Cancer Antigen 125, entspricht MUC16) bei Eierstock-

(Zurawski Jr et al. 1988; Giamougiannis, Martin-Hirsch, and Martin 2021) als auch Pankreaskrebs (Haridas et al. 2011; Thomas et al. 2020), CA15-3 bei Brust- (Ebeling et al. 2002) oder CA19-9 (entspricht Sialyl Lewis a = SLe<sup>a</sup>) ebenfalls bei Pankreaskrebs (Safi et al. 1997) auflisten. Weitere Glykoproteine wie beispielsweise die Akute-Phase-Proteine AGP (Serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein) (Hashimoto et al. 2004) oder Ceruloplasmin (Han et al. 2017; Matsuoka et al. 2018) werden in Studien aktuell erforscht.

Zusammenfassend zeigt das Tn-Antigen, wie viele andere Glykoproteinstrukturen, insgesamt großes Potential sowohl zu diagnostischen als auch therapeutischen Zwecken, sei es zur Krebsfrüherkennung oder für Tumorstoffe, eine klinische Bedeutung zu erlangen. Insbesondere als Prognosemarker für ein negatives Outcome verschiedener Tumorerkrankungen könnte es in naher Zukunft eine Rolle spielen.

## 5 Zusammenfassung

Aberrante Glykosylierung spielt bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen, insbesondere bei Tumorerkrankungen, eine entscheidende Rolle. Das tumorspezifische Tn-Antigen (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) konnte in unzähligen Studien bei verschiedensten Tumorentitäten, wozu auch das Pankreaskarzinom zählt, nachgewiesen und in Verbindung mit negativer Prognose gebracht werden. Diverse genetische Mutationen scheinen hierbei eine Rolle zu spielen. Die Enzyme Polypeptid-GalNAc-Transferase (GALNT) und T-Synthase mit dem dazugehörigen Chaperon COSMC sind dabei von zentraler Bedeutung und jeweils seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Im physiologischen Kontext katalysieren die beiden genannten Enzyme die ersten Schritte der O-Glykosylierung, wodurch die sogenannte Core Struktur entsteht. Core 1 als bekanntestes Protein wird auch als T-Antigen bezeichnet.

Um ein besseres Verständnis über die pathophysiologischen Zusammenhänge in vivo zu erlangen, wurden zwei pankreasspezifisch mutierte Mauslinien generiert. Die erste mit GalNT2-Überexpression („GalNT2-transgen“) und die zweite mit einer Kombination aus Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression („tripletransgen“). Bei beiden Mauslinien wurden phänotypische Auswirkungen sowie Alterationen der Glykosylierung mit Hilfe statistischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht.

Die Ergebnisse der GalNT2-transgenen Mauslinie konnten beweisen, dass durch GalNT2-Überexpression mehr T-Antigen, jedoch kein tumorspezifisches Tn-Antigen entsteht. Histologisch zeigt sich aufgelockertes, vermehrt mit Bindegewebssepten sowie Adipozyten durchsetztes Pankreasgewebe. Dies hat jedoch, insbesondere im Vergleich zur tripletransgenen Mauslinie, eher geringfügige Auswirkungen auf die Körpergewichte und somit rückschließend auf die Organfunktion.

Die Ergebnisse der tripletransgenen Mauslinie unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von denen der GalNT2-transgenen Mauslinie. Phänotypisch zeigen sich deutlich verringerte Organ- sowie Körpergewichte. Mikroskopisch ähnelt das Erscheinungsbild dem der chronischen Pankreatitis mit ausgeprägter Atrophie des



exokrinen Pankreasgewebes. Bei immunhistochemischen Färbungen und der Durchführung von Western Blots konnte eine vermehrte Tn- sowie STn-Expression nachgewiesen werden, jedoch keine gesteigerte T-Antigen-Expression.

Diese Ergebnisse liefern bedeutsame neue Erkenntnisse zum Thema aberrante Glykosylierung im Pankreas. Sie bedürfen jedoch weiterer intensiver Forschung um die Zusammenhänge dieser komplexen Thematik besser zu verstehen und um dem langfristigen Ziel der Anwendung im Klinikalltag, z.B. im Rahmen von Früherkennung oder gezielter Krebstherapie, näher zu kommen.

## 6 Summary

Aberrant glycosylation plays a crucial role in a variety of pathological processes, especially in tumor diseases. The tumor-specific Tn antigen (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) has been shown in numerous studies to be associated with a negative prognosis in various tumor entities, including pancreatic cancer. Various genetic mutations seem to play a role in this process. The enzymes polypeptide GalNAc-transferase (GALNT) and T-synthase with the associated chaperone COSMC are of central importance and have each been the subject of intensive research for some time. In the physiological context, the two enzymes mentioned catalyze the first steps of O-glycosylation, resulting in the so-called core structure, with Core 1 (T-antigen) being the most well-known protein.

To gain a better understanding of the pathophysiological relationships in vivo, two pancreas-specific mutant mouse lines were generated. The first one with GalNT2 overexpression ("GalNT2 transgene") and the second one with a combination of Cosmc knockout and GalNT2 overexpression ("tripletransgene"). In both mouse lines, phenotypic effects as well as alterations in glycosylation were investigated using statistical, immunohistochemical and molecular biology methods.

Results from the GalNT2 transgenic mouse line demonstrated that GalNT2 overexpression leads to more T-antigen, but not to the emergence of tumor-specific Tn antigen. Histologically, pancreatic tissue was found to be loosened and increasingly permeated with connective tissue septa as well as adipocytes. However, compared to the tripletransgenic mouse line, this has only minor effects on body weight and thus on organ function.

The results of the tripletransgenic mouse line differ in many respects from those of the GalNT2 transgenic mouse line. Phenotypically, a distinct reduction in both organ and body weights were observed. Microscopically, the appearance resembles that of chronic pancreatitis with marked atrophy of the exocrine pancreatic tissue.

Immunohistochemical staining and Western blots demonstrated increased Tn and STn expression, but no increased T antigen expression.

These results provide significant new insights into aberrant glycosylation of pancreatic tissue. However, further intensive research is required to better understand the interrelationships of this complex topic and to get closer to the long-term goal of application in daily clinical practice, including in the context of early cancer detection and targeted cancer therapy.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
AK	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
bspw.	Beispielsweise
CA	Cancer Antigen
CEL	carboxyl-ester lipase
Cosmc	Core 1 beta3Gal-T Specific Molecular Chaperone
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
ECL	enhanced chemiluminescence
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GALNT	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase
GalNT2-Tg	GalNT2-transgen
GBP	Glykanbindungsproteine
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HBTn1	
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSC-70	Heat shock cognate 71kDa protein
HSPA8	Heat shock 70 kDa protein 8
MHC	major histocompatibility complex
IgG	Immunglobulin G
MGL	Macrophage galactose-type lectin
min	Minuten
MODY	Maturity Onset Diabetes off the Young
MUC	Mucin-Gen
O-GlcNAc	O-linked N-Acetylglucoseamin

p	p-Wert = Signifikanzniveau
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PCR	Polymerase chain reaction
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
Phospho-(S/T)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -Serin/Threonin
PNA	Peanut Agglutinin
(pp)GalNAcTs	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferasen
Ptf1a	Pancreatic specific transcription factor 1a
Rb	Retinoblastomprotein
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s.	siehe
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
Ser	Seronin
STn-Antigen	Neu5Acα2-6GalNAcα1-O-Ser/Thr
T-Antigen	Core 1/Galactosyl (β-1,3) N-Acetylgalactosamin (Galβ1-3GalNAcα1-O-Ser/Thr)
T-Synthase	Core 1 β3-Galactosyltransferase
TACA	tumor-associated carbohydrate antigen
g/TG	transgen
Thr	Threonin
Tn-Antigen	GalNAc-O-Ser/Thr (O-linked NAcetylgalactosamin)
TTG	tripletransgen
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VVA	Vicia Villosa Agglutinin
WB	Western Blot
z.B.	Zum Beispiel

## 8      **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b> Histologischer Aufbau des Pankreas. Zu sehen ist rechts unten im Bild eine Langerhans-Insel, umgeben von Azini (mit Stern markiert), der Pfeil zeigt auf einen beispielhaft angeschnittenen Ausführungsgang (Ductus). Modifiziert nach (Hezel et al. 2006).....	7
<b>Abb. 2:</b> Histologie des gesunden Pankreas, der milden und der schweren chronischen Pankreatitis sowie des duktales Adenokarzinoms. Modifiziert nach (Pan et al. 2011).....	10
<b>Abb. 3:</b> Schematische Illustration des Pankreas mit Darstellung der Pankreassternzellen (pancreatic stellate cells) in Fluoreszenzmarkierung, welche ein dreidimensionales Netzwerk zwischen den azinären Lobuli bilden. Aus (Ferdek and Jakubowska 2017).....	11
<b>Abb. 4:</b> PanIN Histologie. A) Low-grade PanIN; B) High-grade PanIN; C) Duktales Adenokarzinom des Pankreas mit perinaeuraler Invasion; D) normales Pankreasgewebe (Ductus umgeben von Azini). Aus (Pan et al. 2009).....	14
<b>Abb. 5:</b> Schematische Illustration der Progression von normalem Drüsenepithel zu Low-grade und High-grade PanINs mit entsprechenden Schlüsselereignissen genetischer Alterationen (sog. „PanIN-Progressionsmodel“). Aus (Singhi and Maitra 2018). .....	14
<b>Abb. 6:</b> N- und O-Glykosylierung im Überblick. Aus (Van den Steen et al. 1998). ....	16
<b>Abb. 7:</b> Syntheseweg von O-Glykan-Strukturen. Modifiziert nach (Loureiro et al. 2015). .....	20
<b>Abb. 8:</b> Herstellung von O-Glycanen in Zellen mit funktionierendem Cosmc verglichen mit Zellen, in denen Cosmc als Chaperon fehlt. Links: das im ER exprimierte Cosmc bindet an die inaktive T-Synthase und aktiviert diese durch eine korrekte Faltung. Die als Dimer vorliegende T-Synthase wandert nun in den Golgi Apparat und kann dort ihre Funktion ausüben. Rechts: Fehlt Cosmc, wird die neu synthetisierte T-Synthase von anderen Chaperonen gebunden und falsch gefaltet, wodurch sie ins Zytoplasma retransloziert, ubiquitiniert und im 26S-Proteasom abgebaut wird. Dies hat die Expression von Tn- und STn-Antigenen auf der Zelloberfläche zur Folge. Aus (Ju, Otto, and Cummings 2011a).....	28

<b>Abb. 9:</b> Genetischer Hintergrund der Mausmodelle. A) Mauslinie A mit GalNT2-Überexpression ("transgen"); B) Mauslinie B mit Cosmc-Knockout und GalNT2-Überexpression ("tripletransgen = TTG").	31
<b>Abb. 10:</b> Körpergewichte wildtypischer (WT) vs. GalNT2-transgener (TG) Mäuse der Altersstufen 6 und 20 Wochen im Vergleich.	46
<b>Abb. 11:</b> Pankreas Organgewichte wildtypischer (WT) vs. GalNT2-transgener (TG) Mäuse der Altersstufen 6 und 20 Wochen im Vergleich.	47
<b>Abb. 12:</b> Makroskopische Pankreas Präparate, Wildtyp (WT) vs. GalNT2-Überexpression (GalNT2-Tg) im Alter von 8 Wochen.	48
<b>Abb. 13:</b> HE-Färbung Pankreas; Wildtyp vs. GalNT2-Überexpression verschiedener Alterstufen. Sternmarkierung: Fettzellen; Pfeilmarkierung: Bindegewebe. 100-fache Vergrößerung.	49
<b>Abb. 14:</b> Chromogenfärbung Pankreas mit GALNT2-Antikörper (rot). 200-fache Vergrößerung.	50
<b>Abb. 15:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und GALNT2-Antikörper (grün). 100-fache Vergrößerung.	51
<b>Abb. 16:</b> Western Blot (WB) zur Darstellung von GALNT2-Antigen mittels GALNT2-Antikörper (AK) bei GalNT2-Überexpression. Ladekontrolle mittels HSPA8.	52
<b>Abb. 17:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau), PNA (rot) und VVA (grün, hier nicht zu erkennen). 100-fache Vergrößerung.	54
<b>Abb. 18:</b> Western Blots zur Darstellung von T-Antigen mittels PNA bei GalNT2-Überexpression. Ladekontrolle mittels HSPA8. a) regulärer Proteinstandard; b) HiMark™ Pre-Stained Proteinstandard.	55
<b>Abb. 19:</b> Körpergewichte 6 Wochen alter wildtypischer (WT) vs. tripletransgener (TTG) Mäuse im Vergleich.	57
<b>Abb. 20:</b> Pankreas Organgewichte 6 Wochen alter wildtypischer (WT) vs. tripletransgener (TTG) Mäuse im Vergleich.	57
<b>Abb. 21:</b> In situ Fotografie Wildtyp (WT) vs. Tripletransgene Mauslinie (TTG). (Abk.: Duo = Duodenum, Ma = Magen, Pa = Pankreas)	58

<b>Abb. 22:</b> HE-Färbung Pankreas Wildtyp vs. TTG-Mauslinie verschiedener Altersstufen. Sternmarkierung: Bindegewebe; Pfeilmarkierung: Fettzellen. 100-fache Vergrößerung. ....	60
<b>Abb. 23:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und GALNT2-Antikörper (grün). ....	62
<b>Abb. 24:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und Tn-Antikörper (grün)..	63
<b>Abb. 25:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau), VVA (grün) und PNA (rot). ....	64
<b>Abb. 26:</b> Western Blots zur Darstellung von Tn-Antigen; a) mittels Tn-Antikörper (AK) bei TTG-Mäusen; b) mittels VVA bei TTG- und Cosmc-KO-Mäusen. Ladekontrolle mittels HSPA8. ....	65
<b>Abb. 27:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau), VVA (grün) und GALNT2-Antikörper (rot). a) und b) 10-fache Vergrößerung; c) und d) 40-fache Vergrößerung. ....	67
<b>Abb. 28:</b> Fluoreszenzfärbung Pankreas mit DAPI (blau) und STn-Antikörper (grün). ....	69
<b>Abb. 29:</b> Western Blot zur Darstellung von T-Antigen mittels PNA bei TTG- und Cosmc-KO-Mäusen. Ladekontrolle mittels HSPA8. ....	70
<b>Abb. 30:</b> Western Blots zur Darstellung von a) O-GlcNAc und b) Phospho-(Ser/Thr) mit entsprechenden Antikörpern bei TTG-Mäusen. Ladekontrolle mittels HSPA8....	72
<b>Abb. 31:</b> Strukturformel der Glykolipidantigene Lewis <sup>y</sup> und Sialyl-Lewis <sup>y</sup> sowie der mucintypischen Glykoproteinantigene Tn-Antigen, STn-Antigen und T-Antigen. Modifiziert nach (Feng, Shaikh, and Wang 2016). ....	74
<b>Abb. 32:</b> Schematische Illustration der aberranten Glykosylierung verschiedener Genotypen. Modifiziert nach Wolters-Eisfeld.....	82



## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Aufbau der wichtigsten O-Glykane. ....	21
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der verwendeten Geräte. ....	34
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	35
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht der verwendeten Chemikalien. ....	36
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.....	37
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht der verwendeten Antikörper.....	38
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der verwendeten Lektine. ....	39
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht der verwendeten Hersteller-Kits. ....	39

## 10 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, Gaurav, Pratima Kamada, and Suresh T Chari. 2013. 'Prevalence of diabetes mellitus in pancreatic cancer compared to common cancers', *Pancreas*, 42: 198.
- Akita, K., S. Yoshida, Y. Ikehara, S. Shirakawa, M. Toda, M. Inoue, J. Kitawaki, H. Nakanishi, H. Narimatsu, and H. Nakada. 2012. 'Different levels of sialyl-Tn antigen expressed on MUC16 in patients with endometriosis and ovarian cancer', *Int J Gynecol Cancer*, 22: 531-8.
- Alao, John P. 2007. 'The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention', *Molecular cancer*, 6: 24.
- Alberts, Bruce, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2013. *Essential cell biology* (Garland Science).
- Alexander, W. S., E. M. Viney, J. G. Zhang, D. Metcalf, M. Kauppi, C. D. Hyland, M. R. Carpinelli, W. Stevenson, B. A. Croker, A. A. Hilton, S. Ellis, C. Selan, H. H. Nandurkar, C. C. Goodnow, B. T. Kile, N. A. Nicola, A. W. Roberts, and D. J. Hilton. 2006. 'Thrombocytopenia and kidney disease in mice with a mutation in the C1galt1 gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 16442-7.
- Andea, Aleodor, Fazlul Sarkar, and Volkan N Adsay. 2003. 'Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma', *Modern Pathology*, 16: 996-1006.
- Antonucci, A., A. Marucci, M. G. Scarale, C. De Bonis, D. Mangiacotti, V. Trischitta, and R. Di Paola. 2021. 'Morphological and molecular characterization of GALNT2-mediated adipogenesis', *Int J Obes (Lond)*.
- Apte, M. V., S. Park, P. A. Phillips, N. Santucci, D. Goldstein, R. K. Kumar, G. A. Ramm, M. Buchler, H. Friess, J. A. McCarroll, G. Keogh, N. Merrett, R. Pirola, and J. S. Wilson. 2004. 'Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells', *Pancreas*, 29: 179-87.
- Apte, Minoti, Romano Pirola, and Jeremy Wilson. 2012. 'Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas', *Frontiers in physiology*, 3: 344.
- Apte, MV, PS Haber, TL Applegate, ID Norton, GW McCaughan, MA Korsten, RC Pirola, and JS Wilson. 1998. 'Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture', *Gut*, 43: 128-33.
- Aryal, R. P., T. Ju, and R. D. Cummings. 2010. 'The endoplasmic reticulum chaperone Cosmc directly promotes in vitro folding of T-synthase', *J Biol Chem*, 285: 2456-62.
- Avichezer, D., and R. Arnon. 1996. 'Differential reactivities of the Arachis hypogaea (peanut) and Vicia villosa B4 lectins with human ovarian carcinoma cells, grown either in vitro or in vivo xenograft model', *FEBS Lett*, 395: 103-8.
- Avichezer, Dody, Georg F Springer, Bilha Schechter, and Ruth Arnon. 1997. 'Immunoreactivities of polyclonal and monoclonal anti-T and anti-Tn antibodies with human carcinoma cells, grown in vitro and in a xenograft model', *International journal of cancer*, 72: 119-27.
- Balmaña, Meritxell, Ariadna Sarrats, Esther Llop, Sílvia Barrabés, Radka Saldova, María José Ferri, Joan Figueras, Esther Fort, Rafael de Llorens, and Pauline

- M Rudd. 2015. 'Identification of potential pancreatic cancer serum markers: Increased sialyl-Lewis X on ceruloplasmin', *Clinica chimica acta*, 442: 56-62.
- Bang, U. C., T. Benfield, L. Hyldstrup, F. Bendtsen, and J. E. Beck Jensen. 2014. 'Mortality, cancer, and comorbidities associated with chronic pancreatitis: a Danish nationwide matched-cohort study', *Gastroenterology*, 146: 989-94.
- Barrow, Hannah, Benjamin Tam, Carrie A Duckworth, Jonathan M Rhodes, and Lu-Gang Yu. 2013. 'Suppression of core 1 Gal-transferase is associated with reduction of TF and reciprocal increase of Tn, sialyl-Tn and Core 3 glycans in human colon cancer cells', *PLoS one*, 8: e59792.
- Bartman, A. E., M. P. Buisine, J. P. Aubert, G. A. Niehans, N. W. Toribara, Y. S. Kim, E. J. Kelly, J. E. Crabtree, and S. B. Ho. 1998. 'The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues', *J Pathol*, 186: 398-405.
- Beaman, Ellie-May, and Susan A Brooks. 2014. 'The extended ppGalNAc-T family and their functional involvement in the metastatic cascade', *Histol Histopathol*, 29: 293-304.
- Ben, Qiwen, Maojin Xu, Xiaoyan Ning, Jun Liu, Shangyou Hong, Wen Huang, Huagao Zhang, and Zhaoshen Li. 2011. 'Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of cohort studies', *European journal of cancer*, 47: 1928-37.
- Bennett, E. P., H. Hassan, and H. Clausen. 1996. 'cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3', *J Biol Chem*, 271: 17006-12.
- Berger, E. G. 1999. 'Tn-syndrome', *Biochim Biophys Acta*, 1455: 255-68.
- Berriel, E., M. Hill, J. J. Barcia, L. Ubillos, M. Gonzalez, G. Detjen, M. Rondan, H. Navarrete, and E. Osinaga. 2005. 'Simple mucin-type cancer associated antigens are pre-cancerous biomarkers during 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis', *Oncol Rep*, 14: 219-27.
- Bhatia, R., S. K. Gautam, A. Cannon, C. Thompson, B. R. Hall, A. Aithal, K. Banerjee, M. Jain, J. C. Solheim, S. Kumar, and S. K. Batra. 2019. 'Cancer-associated mucins: role in immune modulation and metastasis', *Cancer Metastasis Rev*, 38: 223-36.
- Bird, GWG. 1977. 'Erythrocyte polyagglutination', *Clinical Laboratory Science. T. J. Greenwalt and E. A. Steane, editors. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL*, 1: 443-54.
- Borsig, L., R. Wong, R. O. Hynes, N. M. Varki, and A. Varki. 2002. 'Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 2193-8.
- Braganza, J. M., S. H. Lee, R. F. McCloy, and M. J. McMahon. 2011. 'Chronic pancreatitis', *Lancet*, 377: 1184-97.
- Bratthauer, G. L. 2010. 'The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods', *Methods Mol Biol*, 588: 257-70.
- Brockhausen, I., and P. Stanley. 2015. 'O-GalNAc Glycans.' in rd, A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar and P. H. Seeberger (eds.), *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.: Cold Spring Harbor (NY)).

- Brockhausen, I., J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, and S. H. Itzkowitz. 1998. 'Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells', *Glycoconj J*, 15: 595-603.
- Brockhausen, Inka. 1999. 'Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1473: 67-95.
- Brooks, Susan A. 2006. 'Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins', *Expert review of proteomics*, 3: 345-59.
- Campa, Daniele, Manuela Pastore, Gabriele Capurso, Thilo Hackert, Milena Di Leo, Jakob R Izbicki, Kay-Tee Khaw, Domenica Gioffreda, Juozas Kupcinskis, and Claudio Pasquali. 2018. 'Do pancreatic cancer and chronic pancreatitis share the same genetic risk factors? A PANcreatic Disease ReseArch (PANDoRA) consortium investigation', *International journal of cancer*, 142: 290-96.
- Campbell, B. J., I. A. Finnie, E. F. Hounsell, and J. M. Rhodes. 1995. 'Direct demonstration of increased expression of Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in colonic adenocarcinoma and ulcerative colitis mucin and its concealment in normal mucin', *J Clin Invest*, 95: 571-6.
- Cao, Y., P. M. Schlag, and U. Karsten. 1997. 'Immunodetection of epithelial mucin (MUC1, MUC3) and mucin-associated glycotopes (TF, Tn, and sialosyl-Tn) in benign and malignant lesions of colonic epithelium: apolar localization corresponds to malignant transformation', *Virchows Arch*, 431: 159-66.
- Cao, Yi, Uwe R Karsten, Winfrid Liebrich, Wolfgang Haensch, Georg F Springer, and Peter M Schlag. 1995. 'Expression of thomsen-friedenreich-related antigens in primary and metastatic colorectal carcinomas. A reevaluation', *Cancer*, 76: 1700-08.
- Carneiro, F., L. Santos, L. David, E. Dabelsteen, H. Clausen, and M. Sobrinho-Simoes. 1994. 'T (Thomsen-Friedenreich) antigen and other simple mucin-type carbohydrate antigens in precursor lesions of gastric carcinoma', *Histopathology*, 24: 105-13.
- Carrilho, C., M. Cantel, P. Gouveia, and L. David. 2000. 'Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn, T and sialosyl-T) and gp 230 mucin-like glycoprotein are candidate markers for neoplastic transformation of the human cervix', *Virchows Arch*, 437: 173-9.
- Casola, S. 2010. 'Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus', *Methods Mol Biol*, 667: 145-63.
- Chang, Ming-Chu, Jau-Min Wong, and Yu-Ting Chang. 2014. 'Screening and early detection of pancreatic cancer in high risk population', *World journal of gastroenterology: WJG*, 20: 2358.
- Chugh, S., S. Barkeer, S. Rachagani, R. K. Nimmakayala, N. Perumal, R. Pothuraju, P. Atri, S. Mahapatra, I. Thapa, G. A. Talmon, L. M. Smith, X. Yu, S. Neelamegham, J. Fu, L. Xia, M. P. Ponnusamy, and S. K. Batra. 2018. 'Disruption of C1galt1 Gene Promotes Development and Metastasis of Pancreatic Adenocarcinomas in Mice', *Gastroenterology*.
- Cohen, Evan N, Tamer M Fouad, Bang-Ning Lee, Banu K Arun, Diane Liu, Sanda Tin, Angelica M Gutierrez Barrera, Toshihide Miura, Iwao Kiyokawa, and Jun Yamashita. 2019. 'Elevated serum levels of sialyl Lewis X (sLe X) and inflammatory mediators in patients with breast cancer', *Breast cancer research and treatment: 1-12*.
- Collins, Meredith A, Filip Bednar, Yaqing Zhang, Jean-Christophe Brisset, Stefanie Galbán, Craig J Galbán, Sabita Rakshit, Karen S Flannagan, N Volkan Adsay, and Marina Pasca di Magliano. 2012. 'Oncogenic Kras is required for both the

- initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice', *The Journal of clinical investigation*, 122: 639.
- Compagno, D., L. D. Gentilini, F. M. Jaworski, I. G. Perez, G. Contrufo, and D. J. Laderach. 2014. 'Glycans and galectins in prostate cancer biology, angiogenesis and metastasis', *Glycobiology*, 24: 899-906.
- Conwell, D. L., L. S. Lee, D. Yadav, D. S. Longnecker, F. H. Miller, K. J. Morteale, M. J. Levy, R. Kwon, J. G. Lieb, T. Stevens, P. P. Toskes, T. B. Gardner, A. Gelrud, B. U. Wu, C. E. Forsmark, and S. S. Vege. 2014. 'American Pancreatic Association Practice Guidelines in Chronic Pancreatitis: evidence-based report on diagnostic guidelines', *Pancreas*, 43: 1143-62.
- Corfield, A. P. 2015. 'Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection', *Biochim Biophys Acta*, 1850: 236-52.
- Cutler, C. E., M. B. Jones, A. A. Cutler, A. Mener, C. M. Arthur, S. R. Stowell, and R. D. Cummings. 2019. 'Cosmc is required for T cell persistence in the periphery', *Glycobiology*.
- Dahiya, Rajvir, Steven H Itzkowitz, James C Byrd, and Young S Kim. 1992. 'Mucin oligosaccharide biosynthesis in human colonic cancerous tissues and cell lines', *Cancer*, 70: 1467-76.
- David, L, JM Nesland, H Clausen, F Carneiro, and M Sobrinho-Simoes. 1992. 'Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases', *APMIS. Supplementum*, 27: 162-72.
- de Gonzalez, A Berrington, S Sweetland, and E Spencer. 2003. 'A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer', *British journal of cancer*, 89: 519-23.
- Desai, Parimal R. 2000. 'Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy', *Transfusion medicine reviews*, 14: 312-25.
- Ding, Ming-Xia, Hai-Feng Wang, Jian-Song Wang, Hui Zhan, Yi-Gang Zuo, De-Lin Yang, Jing-Yu Liu, Wei Wang, Chang-Xing Ke, and Ru-Ping Yan. 2012. 'ppGalNAc T1 as a potential novel marker for human bladder cancer', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13: 5653-57.
- Doi, N., Y. Ino, K. Angata, K. Shimada, H. Narimatsu, and N. Hiraoka. 2020. 'Clinicopathological significance of core 3 O-glycan synthetic enzyme,  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 in pancreatic ductal adenocarcinoma', *PLoS one*, 15: e0242851.
- Domínguez-Muñoz, J. E., L. Nieto-Garcia, J. López-Díaz, J. Lariño-Noia, I. Abdulkader, and J. Iglesias-Garcia. 2018. 'Impact of the treatment of pancreatic exocrine insufficiency on survival of patients with unresectable pancreatic cancer: a retrospective analysis', *BMC Cancer*, 18: 534.
- Ebeling, FG, P Stieber, M Untch, D Nagel, GE Konecny, UM Schmitt, A Fateh-Moghadam, and D Seidel. 2002. 'Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer', *British journal of cancer*, 86: 1217.
- Elayat, Ahmed A, MOSTAFA M el-Naggar, and Mohammad Tahir. 1995. 'An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets', *Journal of anatomy*, 186: 629.
- Ellis, Ian, Markus M Lerch, and David C Whitcomb. 2002. 'Genetic testing for hereditary pancreatitis: guidelines for indications, counselling, consent and privacy issues.' in, *Genetic Disorders of the Exocrine Pancreas* (Karger Publishers).
- Ewald, N., and P. D. Hardt. 2013. 'Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis', *World J Gastroenterol*, 19: 7276-81.

- Feizi, T. 1985. 'Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens', *Nature*, 314: 53-7.
- Felder, M., A. Kapur, J. Gonzalez-Bosquet, S. Horibata, J. Heintz, R. Albrecht, L. Fass, J. Kaur, K. Hu, H. Shojaei, R. J. Whelan, and M. S. Patankar. 2014. 'MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress', *Mol Cancer*, 13: 129.
- Feng, Danyang, Abdul Sami Shaikh, and Fengshan Wang. 2016. 'Recent advance in tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs)-based antitumor vaccines', *ACS chemical biology*, 11: 850-63.
- Ferde, Pawel E, and Monika A Jakubowska. 2017. 'Biology of pancreatic stellate cells—more than just pancreatic cancer', *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 469: 1039-50.
- Fokas, E., E. O'Neill, A. Gordon-Weeks, S. Mukherjee, W. G. McKenna, and R. J. Muschel. 2015. 'Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic', *Biochim Biophys Acta*, 1855: 61-82.
- Fonseca, I, J Costa Rosa, A Felix, Marianne Hamilton Therkildsen, Ulla Mandel, and J Soares. 1994. 'Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, Tn and sialosyl-Tn) in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands', *Histopathology*, 25: 537-43.
- Friedenreich, Viggo. 1930. *The Thomsen hemagglutination phenomenon: Production of a specific receptor quality in red corpuscles by bacterial activity* (Levin & Munksgaard).
- Fu, C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, and H. Chen. 2016. 'Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen', *Hla*, 88: 275-86.
- Fu, J., H. Gerhardt, J. M. McDaniel, B. Xia, X. Liu, L. Ivanciu, A. Ny, K. Hermans, R. Silasi-Mansat, S. McGee, E. Nye, T. Ju, M. I. Ramirez, P. Carmeliet, R. D. Cummings, F. Lupu, and L. Xia. 2008. 'Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice', *J Clin Invest*, 118: 3725-37.
- Fuster, M. M., and J. D. Esko. 2005. 'The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets', *Nat Rev Cancer*, 5: 526-42.
- Gautam, S. K., S. Kumar, V. Dam, D. Gheri, M. Jain, and S. K. Batra. 2020. 'MUCIN-4 (MUC4) is a novel tumor antigen in pancreatic cancer immunotherapy', *Semin Immunol*, 47: 101391.
- Gendler, S. J., and A. P. Spicer. 1995. 'Epithelial mucin genes', *Annu Rev Physiol*, 57: 607-34.
- Genkinger, J. M., D. Spiegelman, K. E. Anderson, L. Bergkvist, L. Bernstein, P. A. van den Brandt, D. R. English, J. L. Freudenheim, C. S. Fuchs, G. G. Giles, E. Giovannucci, S. E. Hankinson, P. L. Horn-Ross, M. Leitzmann, S. Mannisto, J. R. Marshall, M. L. McCullough, A. B. Miller, D. J. Reding, K. Robien, T. E. Rohan, A. Schatzkin, V. L. Stevens, R. Z. Stolzenberg-Solomon, B. A. Verhage, A. Wolk, R. G. Ziegler, and S. A. Smith-Warner. 2009. 'Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18: 765-76.
- Ghazizadeh, M., H. Ogawa, Y. Sasaki, T. Araki, and K. Aihara. 1997. 'Mucin carbohydrate antigens (T, Tn, and sialyl-Tn) in human ovarian carcinomas: relationship with histopathology and prognosis', *Hum Pathol*, 28: 960-6.

- Giamougiannis, P., P. L. Martin-Hirsch, and F. L. Martin. 2021. 'The evolving role of MUC16 (CA125) in the transformation of ovarian cells and the progression of neoplasia', *Carcinogenesis*.
- Gilgunn, Sarah, Paul J Conroy, Radka Saldova, Pauline M Rudd, and Richard J O'kenedy. 2013. 'Aberrant PSA glycosylation—a sweet predictor of prostate cancer', *Nature Reviews Urology*, 10: 99.
- Glinsky, V. V., G. V. Glinsky, K. Rittenhouse-Olson, M. E. Huflejt, O. V. Glinskii, S. L. Deutscher, and T. P. Quinn. 2001. 'The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium', *Cancer Res*, 61: 4851-7.
- Goldstein, Irwin J, and Colleen E Hayes. 1978. 'The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals.' in, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (Elsevier).
- Goldstein, Mitchell J, and Edith Peterson Mitchell. 2005. 'Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer', *Cancer investigation*, 23: 338-51.
- Guerra, C., A. J. Schuhmacher, M. Canamero, P. J. Grippo, L. Verdaguer, L. Perez-Gallego, P. Dubus, E. P. Sandgren, and M. Barbacid. 2007. 'Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice', *Cancer Cell*, 11: 291-302.
- Gullo, L., M. Migliori, A. Olah, G. Farkas, P. Levy, C. Arvanitakis, P. Lankisch, and H. Beger. 2002. 'Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality', *Pancreas*, 24: 223-7.
- Gupte, Anand R, and Chris E Forsmark. 2014. 'Chronic pancreatitis', *Curr Opin Gastroenterol*, 30: 500-05.
- Hakomori, Sen-itiroh. 1996. 'Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo (glyco) lipid metabolism', *Cancer Res*, 56: 5309-18.
- . 2001. 'Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines.' in, *The molecular immunology of complex carbohydrates—2* (Springer).
- Haltiwanger, R. S., and J. B. Lowe. 2004. 'Role of glycosylation in development', *Annu Rev Biochem*, 73: 491-537.
- Han, I. W., J. Y. Jang, W. Kwon, T. Park, Y. Kim, K. B. Lee, and S. W. Kim. 2017. 'Ceruloplasmin as a prognostic marker in patients with bile duct cancer', *Oncotarget*, 8: 29028-37.
- Hanisch, Franz-Georg. 2001. 'O-glycosylation of the mucin type', *Biological chemistry*, 382: 143-49.
- Hanisch, Franz-Georg, and Stefan Müller. 2000. 'MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin', *Glycobiology*, 10: 439-49.
- Hansen, J. E., C. Nielsen, M. Arendrup, S. Olofsson, L. Mathiesen, J. O. Nielsen, and H. Clausen. 1991. 'Broadly neutralizing antibodies targeted to mucin-type carbohydrate epitopes of human immunodeficiency virus', *J Virol*, 65: 6461-7.
- Haridas, Dhanya, Subhankar Chakraborty, Moorthy P Ponnusamy, Imayavaramban Lakshmanan, Satyanarayana Rachagani, Eric Cruz, Sushil Kumar, Srustidhar Das, Subodh M Lele, and Judy M Anderson. 2011. 'Pathobiological implications of MUC16 expression in pancreatic cancer', *PLoS one*, 6: e26839.
- Hart, G. W., M. P. Housley, and C. Slawson. 2007. 'Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins', *Nature*, 446: 1017-22.
- Hart, Gerald W, Chad Slawson, Genaro Ramirez-Correa, and Olof Lagerlof. 2011. 'Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease', *Annu Rev Biochem*, 80: 825-58.

- Hashimoto, Shinji, Takayuki Asao, Junko Takahashi, Yuko Yagihashi, Toyo Nishimura, Abby R Saniabadi, Dennis CW Poland, Willem van Dijk, Hiroyuki Kuwano, and Naohisa Kochibe. 2004. ' $\alpha$ 1-Acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis', *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101: 2825-36.
- Häuselmann, Irina, and Lubor Borsig. 2014. 'Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis', *Frontiers in oncology*, 4: 28.
- He, H, Z Shen, H Zhang, X Wang, Z Tang, J Xu, and Y Sun. 2014. 'Clinical significance of polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 (GalNAc-T5) expression in patients with gastric cancer', *British journal of cancer*, 110: 2021-29.
- Hezel, Aram F, Alec C Kimmelman, Ben Z Stanger, Nabeel Bardeesy, and Ronald A DePinho. 2006. 'Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Genes & development*, 20: 1218-49.
- Hidalgo, Manuel. 2010. 'Pancreatic cancer', *New England Journal of Medicine*, 362: 1605-17.
- Ho, W. L., C. H. Chou, Y. M. Jeng, M. Y. Lu, Y. L. Yang, S. T. Jou, D. T. Lin, H. H. Chang, K. H. Lin, W. M. Hsu, and M. C. Huang. 2014. 'GALNT2 suppresses malignant phenotypes through IGF-1 receptor and predicts favorable prognosis in neuroblastoma', *Oncotarget*, 5: 12247-59.
- Hofmann, Bianca T, Laura Schlüter, Philip Lange, Baris Mercanoglu, Florian Ewald, Aljonna Fölster, Aeint-Steffen Picksak, Sönke Harder, Alexander T El Gammal, and Katharina Grupp. 2015. 'COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer', *Molecular cancer*, 14: 109.
- Hollingsworth, Michael A, and Benjamin J Swanson. 2004. 'Mucins in cancer: protection and control of the cell surface', *Nature Reviews Cancer*, 4: 45-60.
- Hoos, A., D. Protsyuk, and L. Borsig. 2014. 'Metastatic growth progression caused by PSGL-1-mediated recruitment of monocytes to metastatic sites', *Cancer Res*, 74: 695-704.
- Hruban, Ralph H, Marcia Canto, Michael Goggins, Richard Schulick, and Alison P Klein. 2010. 'Update on familial pancreatic cancer', *Advances in surgery*, 44: 293.
- Hu, W. T., C. C. Yeh, S. Y. Liu, M. C. Huang, and I. R. Lai. 2018. 'The O-glycosylating enzyme GALNT2 suppresses the malignancy of gastric adenocarcinoma by reducing EGFR activities', *Am J Cancer Res*, 8: 1739-51.
- Huang, Miao-Juei, Rey-Heng Hu, Chih-Hsing Chou, Chia-Lang Hsu, Ya-Wen Liu, John Huang, Ji-Shiang Hung, I-Rue Lai, Hsueh-Fen Juan, and Sung-Liang Yu. 2015. 'Knockdown of GALNT1 suppresses malignant phenotype of hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR signaling', *Oncotarget*, 6: 5650.
- Hussain, Muhammad Ramzan M, Jamal Nasir, and Jumana Yousuf Al-Aama. 2014. 'Clinically significant missense variants in human GALNT3, GALNT8, GALNT12, and GALNT13 genes: intriguing in silico findings', *Journal of cellular biochemistry*, 115: 313-27.
- Hussain, Muhammad Ramzan Manwar, Daniel C Hoessli, and Min Fang. 2016. 'N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer', *Oncotarget*, 7: 54067.
- Hwang, I. K., H. Kim, Y. S. Lee, J. Kim, J. Y. Cho, Y. S. Yoon, H. S. Han, and J. H. Hwang. 2015. 'Presence of pancreatic intraepithelial neoplasia-3 in a background of chronic pancreatitis in pancreatic cancer patients', *Cancer Sci*, 106: 1408-13.



- Inoue, Masaki, Suming Ton, Haruki Ogawa, and Osamu Tanizawa. 1991. 'Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in tumor tissues of the ovary', *American journal of clinical pathology*, 96: 711-16.
- Itzkowitz, SH, EJ Bloom, TS Lau, and YS Kim. 1992. 'Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps', *Gut*, 33: 518-23.
- Itzkowitz, Steven H, Mei Yuan, Carolyn K Montgomery, Thomas Kjeldsen, Helio K Takahashi, William L Bigbee, and Young S Kim. 1989. 'Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer', *Cancer Res*, 49: 197-204.
- Itzkowitz, Steven, Thomas Kjeldsen, Annabelle Frieria, Sen-Itiroh Hakomori, Ung-Suk Yang, and Young S Kim. 1991. 'Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas', *Gastroenterology*, 100: 1691-700.
- Jeng, W., S. Lee, N. Sung, J. Lee, and F. T. Tsai. 2015. 'Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states', *F1000Res*, 4.
- Jiang, Yuliang, Zhe Liu, Feng Xu, Xichen Dong, Yurong Cheng, Yizhang Hu, Tianbo Gao, Jian Liu, Lei Yang, and Xingyuan Jia. 2018. 'Aberrant O-glycosylation contributes to tumorigenesis in human colorectal cancer', *Journal of cellular and molecular medicine*.
- Johnson, C. D., M. G. Besselink, and R. Carter. 2014. 'Acute pancreatitis', *Bmj*, 349: g4859.
- Ju, T., R. P. Aryal, M. R. Kudelka, Y. Wang, and R. D. Cummings. 2014. 'The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer', *Cancer Biomark*, 14: 63-81.
- Ju, T., Q. Zheng, and R. D. Cummings. 2006. 'Identification of core 1 O-glycan T-synthase from *Caenorhabditis elegans*', *Glycobiology*, 16: 947-58.
- Ju, Tongzhong, Rajindra P Aryal, Caleb J Stowell, and Richard D Cummings. 2008. 'Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc', *The Journal of Cell Biology*, 182: 531-42.
- Ju, Tongzhong, Kevin Brewer, Anil D'Souza, Richard D Cummings, and William M Canfield. 2002. 'Cloning and expression of human core 1  $\beta$ 1, 3-galactosyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 277: 178-86.
- Ju, Tongzhong, and Richard D Cummings. 2002. 'A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1  $\beta$ 3-galactosyltransferase', *Proceedings of the national academy of sciences*, 99: 16613-18.
- . 2005. 'Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome', *Nature*, 437: 1252.
- Ju, Tongzhong, Grainger S Lanneau, Tripti Gautam, Yingchun Wang, Baoyun Xia, Sean R Stowell, Margaret T Willard, Wenyi Wang, Jonathan Y Xia, and Rosemary E Zuna. 2008. 'Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc', *Cancer Res*, 68: 1636-46.
- Ju, Tongzhong, Vivianne I Otto, and Richard D Cummings. 2011a. 'Das Tn-Antigen—strukturell einfach und biologisch komplex', *Angewandte Chemie*, 123: 1808-30.
- . 2011b. 'The Tn antigen—structural simplicity and biological complexity', *Angewandte Chemie International Edition*, 50: 1770-91.
- Ju, Tongzhong, Yingchun Wang, Rajindra P Aryal, Sylvain D Lehoux, Xiaokun Ding, Matthew R Kudelka, Christopher Cutler, Junwei Zeng, Jianmei Wang, and Xiaodong Sun. 2013. 'Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers', *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 7: 618-31.
- Julien, Sylvain, Eric Adriaenssens, Katherin Ottenberg, Alessandro Furlan, Gilles Courtand, A-S Vercoutter-Edouart, F-G Hanisch, Philippe Delannoy, and Xuefen Le Bourhis. 2005. 'ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast

- cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity', *Glycobiology*, 16: 54-64.
- Julien, Sylvain, Chann Lagadec, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, Gilles Courtand, Xuefen Le Bourhis, and Philippe Delannoy. 2005. 'Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration', *Breast cancer research and treatment*, 90: 77-84.
- Jumblatt, M. M., R. W. McKenzie, P. S. Steele, C. G. Emberts, and J. E. Jumblatt. 2003. 'MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva', *Cornea*, 22: 41-5.
- Kanda, Mitsuro, Hanno Matthaei, Jian Wu, Seung-Mo Hong, Jun Yu, Michael Borges, Ralph H Hruban, Anirban Maitra, Kenneth Kinzler, and Bert Vogelstein. 2012. 'Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia', *Gastroenterology*, 142: 730-33. e9.
- Kannagi, R. 1997. 'Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer', *Glycoconj J*, 14: 577-84.
- Karamatic Crew, Vanja, Belinda K Singleton, Carole Green, Stephen F Parsons, Geoff Daniels, and David J Anstee. 2008. 'New mutations in C1GALT1C1 in individuals with Tn positive phenotype', *Br J Haematol*, 142: 657-67.
- Karlén, Per, Eric Young, Olle Broström, Robert Löfberg, Bernhard Tribukait, Åke Öst, Carol Bodian, and Steven Itzkowitz. 1998. 'Sialyl-Tn antigen as a marker of colon cancer risk in ulcerative colitis: relation to dysplasia and DNA aneuploidy', *Gastroenterology*, 115: 1395-404.
- Kato, T., H. Ujiie, K. C. Hatanaka, A. Nange, A. Okumura, K. Tsubame, K. Naruchi, M. Sato, K. Kaga, Y. Matsuno, S. Wakasa, and Y. Hatanaka. 2021. 'A novel Tn antigen epitope-recognizing antibody for MUC1 predicts clinical outcome in patients with primary lung adenocarcinoma', *Oncol Lett*, 21: 202.
- Khetarpal, S. A., K. T. Schjoldager, C. Christoffersen, A. Raghavan, A. C. Edmondson, H. M. Reutter, B. Ahmed, R. Ouazzani, G. M. Peloso, C. Vitali, W. Zhao, A. V. Somasundara, J. S. Millar, Y. Park, G. Fernando, V. Livanov, S. Choi, E. Noe, P. Patel, S. P. Ho, T. G. Kirchgessner, H. H. Wandall, L. Hansen, E. P. Bennett, S. Y. Vakhrushev, D. Saleheen, S. Kathiresan, C. D. Brown, R. Abou Jamra, E. LeGuern, H. Clausen, and D. J. Rader. 2016. 'Loss of Function of GALNT2 Lowers High-Density Lipoproteins in Humans, Nonhuman Primates, and Rodents', *Cell Metab*, 24: 234-45.
- Khorolragchaa, A., Y. J. Kim, S. Rahimi, J. Sukweenadhi, M. G. Jang, and D. C. Yang. 2014. 'Grouping and characterization of putative glycosyltransferase genes from *Panax ginseng* Meyer', *Gene*, 536: 186-92.
- Kim, G. E., H. I. Bae, H. U. Park, S. F. Kuan, S. C. Crawley, J. J. Ho, and Y. S. Kim. 2002. 'Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas', *Gastroenterology*, 123: 1052-60.
- King, MJ, SF Parsons, AM Wu, and N Jones. 1991. 'Immunochemical studies on the differential binding properties of two monoclonal antibodies reacting with Tn red cells', *Transfusion*, 31: 142-49.
- Kirkegård, Jakob, Frank Viborg Mortensen, and Deirdre Cronin-Fenton. 2017. 'Chronic pancreatitis and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis', *The American journal of gastroenterology*, 112: 1366.
- Kitada, S, S Yamada, A Kuma, S Ouchi, T Tasaki, A Nabeshima, H Noguchi, KY Wang, S Shimajiri, and R Nakano. 2013. 'Polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 3 independently predicts high-grade tumours and poor prognosis in patients with renal cell carcinomas', *British journal of cancer*, 109: 472-81.

- Kobayashi, Hiroshi, Toshihiko Terao, and Yoshiro Kawashima. 1992. 'Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer', *Journal of clinical oncology*, 10: 95-101.
- Konska, G, C Vissac, K Zagla, F Chezet, M-P Vasson, D Bernard-Gallon, and J Guillot. 2002. 'Ultrastructural localization of binding sites for PNA and VVA-B4 lectins in human breast cancer cell lines detected by confocal fluorescence microscopy', *Int J Oncol*, 21: 1009-14.
- Korsse, S. E., F. Harinck, M. G. van Lier, K. Biermann, G. J. Offerhaus, N. Krak, C. W. Looman, W. van Veelen, E. J. Kuipers, A. Wagner, E. Dekker, E. M. Mathus-Vliegen, P. Fockens, M. E. van Leerdam, and M. J. Bruno. 2013. 'Pancreatic cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome patients: a large cohort study and implications for surveillance', *J Med Genet*, 50: 59-64.
- Kudelka, M. R., T. Ju, J. Heimburg-Molinaro, and R. D. Cummings. 2015. 'Simple sugars to complex disease--mucin-type O-glycans in cancer', *Adv Cancer Res*, 126: 53-135.
- Langkilde, Niels C, Hans Wolf, Henrik Clausen, Thomas Kjeldsen, and Torben F Ørntoft. 1992. 'Nuclear volume and expression of T-antigen, sialosyl-Tn-antigen, and Tn-antigen in carcinoma of the human bladder. Relation to tumor recurrence and progression', *Cancer*, 69: 219-27.
- Lankisch, P. G., A. Lohr-Happe, J. Otto, and W. Creutzfeldt. 1993. 'Natural course in chronic pancreatitis. Pain, exocrine and endocrine pancreatic insufficiency and prognosis of the disease', *Digestion*, 54: 148-55.
- Lee, A. T., Z. Xu, S. P. Pothula, M. B. Patel, R. C. Pirola, J. S. Wilson, and M. V. Apte. 2015. 'Alcohol and cigarette smoke components activate human pancreatic stellate cells: implications for the progression of chronic pancreatitis', *Alcohol Clin Exp Res*, 39: 2123-33.
- Leslie, A., F. A. Carey, N. R. Pratt, and R. J. Steele. 2002. 'The colorectal adenoma-carcinoma sequence', *Br J Surg*, 89: 845-60.
- Li, Dave, Tonya Mallory, and Shinji Satomura. 2001. 'AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma', *Clinica chimica acta*, 313: 15-19.
- Li, Qian, Miriam R Anver, Donna O Butcher, and Jeffrey C Gildersleeve. 2009. 'Resolving conflicting data on expression of the Tn antigen and implications for clinical trials with cancer vaccines', *Molecular cancer therapeutics*, 8: 971-79.
- Li, X., F. Guan, D. Li, Z. Tan, G. Yang, Y. Wu, and Z. Huang. 2016. 'Identification of aberrantly expressed glycans in gastric cancer by integrated lectin microarray and mass spectrometric analyses', *Oncotarget*, 7: 87284-300.
- Li, Z, S Yamada, S Inenaga, T Imamura, Y Wu, KY Wang, S Shimajiri, R Nakano, H Izumi, and K Kohno. 2011. 'Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 expression in pancreatic cancer is an independent prognostic factor indicating better overall survival', *British journal of cancer*, 104: 1882-89.
- Lim, D., and E. Oliva. 2013. 'Precursors and pathogenesis of ovarian carcinoma', *Pathology*, 45: 229-42.
- Lin, Mei-Chun, Miao-Juei Huang, Chiung-Hui Liu, Tsung-Lin Yang, and Min-Chuan Huang. 2014. 'GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity', *Oral oncology*, 50: 478-84.
- Lisowska, Elwira. 1995. 'Tn antigens and their significance in oncology', *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*, 42: 11-11.
- Liu, Shin-Yun, Chia-Tung Shun, Kuan-Yu Hung, Hsueh-Fen Juan, Chia-Lang Hsu, Min-Chuan Huang, and I-Rue Lai. 2016. 'Mucin glycosylating enzyme

- GALNT2 suppresses malignancy in gastric adenocarcinoma by reducing MET phosphorylation', *Oncotarget*, 7: 11251.
- Longenecker, B Michael, David J Willans, Grant D MacLean, S Selvaraj, Mavanur R Suresh, and Antoine A Noujaim. 1987. 'Monoclonal antibodies and synthetic tumor-associated glycoconjugates in the study of the expression of Thomsen-Friedenreich-like and Tn-like antigens on human cancers', *journal of the national cancer institute*, 78: 489-96.
- Loureiro, Liliana R, Mylène A Carrascal, Ana Barbas, José S Ramalho, Carlos Novo, Philippe Delannoy, and Paula A Videira. 2015. 'Challenges in antibody development against Tn and sialyl-Tn antigens', *Biomolecules*, 5: 1783-809.
- Lowenfels, Albert B, Patrick Maisonneuve, Giorgio Cavallini, Rudolf W Ammann, Paul G Lankisch, Jens R Andersen, Eugene P DiMagno, Åke Andrén-Sandberg, Lennart Domellöf, and Vincenzo Di Francesco. 1994. 'Prognosis of chronic pancreatitis: an international multicenter study', *American Journal of Gastroenterology*, 89.
- Lowenfels, Albert B, Patrick Maisonneuve, Giorgio Cavallini, Rudolf W Ammann, Paul G Lankisch, Jens R Andersen, Eugene P Dimagno, Ake Andren-Sandberg, Lennart Domellof, and International Pancreatitis Study Group. 1993. 'Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer', *N Engl J Med*, 1993: 1433-37.
- Lowenfels, Albert B, Patrick Maisonneuve, Eugene P DiMagno, Yoram Elitsur, Lawrence K Gates Jr, Jean Perrault, David C Whitcomb, and International Hereditary Pancreatitis Study Group. 1997. 'Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer', *journal of the national cancer institute*, 89: 442-46.
- Lowenfels, Albert B, Patrick Maisonneuve, and David C Whitcomb. 2000. 'Risk factors for cancer in hereditary pancreatitis', *Medical Clinics of North America*, 84: 565-73.
- Lüllmann-Rauch, R. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie* (Thieme Georg Verlag).
- Ma, J., B. K. Rubin, and J. A. Voynow. 2018. 'Mucins, Mucus, and Goblet Cells', *Chest*, 154: 169-76.
- Magalhaes, A., H. O. Duarte, and C. A. Reis. 2017. 'Aberrant Glycosylation in Cancer: A Novel Molecular Mechanism Controlling Metastasis', *Cancer Cell*, 31: 733-35.
- Maisonneuve, P., A. B. Lowenfels, B. Mullhaupt, G. Cavallini, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg, L. Domellof, L. Frulloni, and R. W. Ammann. 2005. 'Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis', *Gut*, 54: 510-4.
- Malvezzi, M, P Bertuccio, F Levi, C La Vecchia, and E Negri. 2014. 'European cancer mortality predictions for the year 2014', *Annals of oncology*, 25: 1650-56.
- Manimala, J. C., Z. Li, A. Jain, S. VedBrat, and J. C. Gildersleeve. 2005. 'Carbohydrate array analysis of anti-Tn antibodies and lectins reveals unexpected specificities: implications for diagnostic and vaccine development', *ChemBiochem*, 6: 2229-41.
- Marcos, Nuno T, Sandra Pinho, Catarina Grandela, Andrea Cruz, Bénédicte Samyn-Petit, Anne Harduin-Lepers, Raquel Almeida, Filipe Silva, Vanessa Morais, and Julia Costa. 2004. 'Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen', *Cancer Res*, 64: 7050-57.
- Marucci, A., A. Antonucci, C. De Bonis, D. Mangiacotti, M. G. Scarale, V. Trischitta, and R. Di Paola. 2019. 'GALNT2 as a novel modulator of adipogenesis and adipocyte insulin signaling', *Int J Obes (Lond)*, 43: 2448-57.

- Marucci, A., L. di Mauro, C. Menzaghi, S. Prudente, D. Mangiacotti, G. Fini, G. Lotti, V. Trischitta, and R. Di Paola. 2013. 'GALNT2 expression is reduced in patients with Type 2 diabetes: possible role of hyperglycemia', *PLoS one*, 8: e70159.
- Masamune, A. 2015. 'Alcohol Misuse and Pancreatitis: A Lesson from Meta-Analysis', *EBioMedicine*, 2: 1860-1.
- Matsumoto, Y., M. R. Kudelka, M. S. Hanes, S. Lehoux, S. Dutta, M. B. Jones, K. A. Stackhouse, G. E. Cervoni, J. Heimbürg-Molinaro, D. F. Smith, T. Ju, E. L. Chaikof, and R. D. Cummings. 2020. 'Identification of Tn antigen O-GalNAc-expressing glycoproteins in human carcinomas using novel anti-Tn recombinant antibodies', *Glycobiology*, 30: 282-300.
- Matsumoto, Yasuyuki, Qing Zhang, Kaoru Akita, Hiroshi Nakada, Kazunori Hamamura, Noriyo Tokuda, Akiko Tsuchida, Takeshi Matsubara, Tomoko Hori, and Tetsuya Okajima. 2012. 'pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen', *Biochemical and biophysical research communications*, 419: 7-13.
- Matsuoka, R., A. Shiba-Ishii, N. Nakano, A. Togayachi, S. Sakashita, Y. Sato, Y. Minami, and M. Noguchi. 2018. 'Heterotopic production of ceruloplasmin by lung adenocarcinoma is significantly correlated with prognosis', *Lung Cancer*, 118: 97-104.
- Mayerle, Julia, Albrecht Hoffmeister, Jens Werner, Heiko Witt, Markus M Lerch, and Joachim Mössner. 2013. 'Chronic pancreatitis—definition, etiology, investigation and treatment', *Deutsches Ärzteblatt international*, 110: 387.
- Moniaux, N., S. Nollet, N. Porchet, P. Degand, A. Laine, and J. P. Aubert. 1999. 'Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin', *Biochem J*, 338 ( Pt 2): 325-33.
- Moremen, Kelley W, Michael Tiemeyer, and Alison V Nairn. 2012. 'Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function', *Nature reviews Molecular cell biology*, 13: 448-62.
- Munkley, J., and D. J. Elliott. 2016. 'Hallmarks of glycosylation in cancer', *Oncotarget*, 7: 35478-89.
- Munkley, Jennifer. 2016. 'The role of sialyl-Tn in cancer', *International journal of molecular sciences*, 17: 275.
- Nanashima, Atsushi, Hiroyuki Yamaguchi, Tohru Nakagoe, Seiji Matsuo, Yoriyoshi Sumida, Takashi Tsuji, Terumitsu Sawai, Eiichirou Yamaguchi, Toru Yasutake, and Hiroyoshi Ayabe. 1999. 'High serum concentrations of sialyl Tn antigen in carcinomas of the biliary tract and pancreas', *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 6: 391-95.
- Napoleitano, C., C. Steentoff, F. Battisti, Z. Ye, H. Rahimi, I. G. Zizzari, M. Dionisi, B. Cerbelli, F. Tomao, D. French, G. d'Amati, P. B. Panici, S. Vakhrushev, H. Clausen, M. Nuti, and A. Rughetti. 2020. 'Investigating Patterns of Immune Interaction in Ovarian Cancer: Probing the O-glycoproteome by the Macrophage Galactose-Like C-type Lectin (MGL)', *Cancers (Basel)*, 12.
- Nath, S., and P. Mukherjee. 2014. 'MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression', *Trends Mol Med*, 20: 332-42.
- Ness, PM, G Garratty, PA Morel, and HA Perkins. 1979. 'Tn polyagglutination preceding acute leukemia', *Blood*, 54: 30-34.
- Nesvaderani, M., G. D. Eslick, D. Vagg, S. Faraj, and M. R. Cox. 2015. 'Epidemiology, aetiology and outcomes of acute pancreatitis: A retrospective cohort study', *Int J Surg*, 23: 68-74.

- Nishiyama, Tsutomu, Yoh Matsumoto, Hisami Watanabe, Michio Fujiwara, and Shotaro Sato. 1987. 'Detection of Tn antigen with *Vicia villosa* agglutinin in urinary bladder cancer: its relevance to the patient's clinical course', *Journal of the national cancer institute*, 78: 1113-18.
- Nogimori, K., T. Hori, K. Kawaguchi, T. Fukui, S. Mii, H. Nakada, Y. Matsumoto, Y. Yamauchi, M. Takahashi, K. Furukawa, O. Tetsuya, K. Yokoi, Y. Hasegawa, and K. Furukawa. 2016. 'Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis', *Int J Oncol*, 49: 1369-76.
- Novak, J., B. A. Julian, M. Tomana, and J. Mesteck. 2001. 'Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy', *J Clin Immunol*, 21: 310-27.
- Ogata, Shunichiro, Peter J Maimonis, and Steven H Itzkowitz. 1992. 'Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity', *Cancer Res*, 52: 4741-46.
- Omary, M Bishr, Aurelia Lugea, Anson W Lowe, and Stephen J Pandol. 2007. 'The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases', *The Journal of clinical investigation*, 117: 50-59.
- Onitsuka, Koji, Kazunori Shibao, Yoshifumi Nakayama, Noritaka Minagawa, Keiji Hirata, Hiroto Izumi, Ken-ichi Matsuo, Naoki Nagata, Kenji Kitazato, and Kimitoshi Kohno. 2003. 'Prognostic significance of UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-3 (GalNAc-T3) expression in patients with gastric carcinoma', *Cancer science*, 94: 32-36.
- Ørntoft, Torben F, Niels Harving, and Niels C Langkilde. 1990. 'O-linked mucin-type glycoproteins in normal and malignant colon mucosa: lack of T-antigen expression and accumulation of Tn and sialosyl-Tn antigens in carcinomas', *International journal of cancer*, 45: 666-72.
- Oruc, N., and D. C. Whitcomb. 2004. 'Theories, mechanisms, and models of alcoholic chronic pancreatitis', *Gastroenterol Clin North Am*, 33: 733-50, v-vi.
- Osako, Masahiko, Suguru Yonezawa, Bader Siddiki, Jian Huang, Jenny JL Ho, Young S Kim, and Eiichi Sato. 1993. 'Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors', *Cancer*, 71: 2191-99.
- Ozaki, Hidenori, Hideki Matsuzaki, Hidenobu Ando, Hiroyuki Kaji, Hayao Nakanishi, Yuzuru Ikehara, and Hisashi Narimatsu. 2012. 'Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAc on a gastric cancer cell line in a mouse model', *Clinical & experimental metastasis*, 29: 229-38.
- Pan, Sheng, Ru Chen, Beth Ann Reimel, David A Crispin, Hamid Mirzaei, Kelly Cooke, Joshua F Coleman, Zhaoli Lane, Mary P Bronner, and David R Goodlett. 2009. 'Quantitative proteomics investigation of pancreatic intraepithelial neoplasia', *Electrophoresis*, 30: 1132-44.
- Pan, Sheng, Ru Chen, Tyler Stevens, Mary P Bronner, Damon May, Yasuko Tamura, Martin W McIntosh, and Teresa A Brentnall. 2011. 'Proteomics portrait of archival lesions of chronic pancreatitis', *PLoS one*, 6: e27574.
- Pandol, S. J., A. Lugea, O. A. Mareninova, D. Smoot, F. S. Gorelick, A. S. Gukovskaya, and I. Gukovsky. 2011. 'Investigating the pathobiology of alcoholic pancreatitis', *Alcohol Clin Exp Res*, 35: 830-7.
- Petrou, Georgia, and Thomas Crouzier. 2018. 'Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials', *Biomaterials science*, 6: 2282-97.
- Phelan, Catherine M, Ya-Yu Tsai, Ellen L Goode, Robert A Vierkant, Brooke L Fridley, Jonathan Beesley, Xiao Qing Chen, Penelope M Webb, Stephen Chanock, and Daniel W Cramer. 2010. 'Polymorphism in the GALNT1 gene and epithelial ovarian cancer in non-Hispanic white women: the Ovarian

- Cancer Association Consortium', *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 19: 600-04.
- Pihl, E., A. Peura, W. R. Johnson, F. T. McDermott, and E. S. Hughes. 1985. 'T-antigen expression by peanut agglutinin staining relates to mucosal dysplasia in ulcerative colitis', *Dis Colon Rectum*, 28: 11-7.
- Pillai, K., M. H. Pourgholami, T. C. Chua, and D. L. Morris. 2015. 'MUC1 as a potential target in anticancer therapies', *Am J Clin Oncol*, 38: 108-18.
- Piller, V., F. Piller, and J. P. Cartron. 1990. 'Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins', *Eur J Biochem*, 191: 461-6.
- Pinho, Andreia V, Lorraine Chantrill, and Ilse Rooman. 2014. 'Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer', *Cancer letters*, 345: 203-09.
- Pinho, S., N. T. Marcos, B. Ferreira, A. S. Carvalho, M. J. Oliveira, F. Santos-Silva, A. Harduin-Lepers, and C. A. Reis. 2007. 'Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells', *Cancer Lett*, 249: 157-70.
- Pinho, S. S., and C. A. Reis. 2015. 'Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications', *Nat Rev Cancer*, 15: 540-55.
- Pirro, Martina, Yoann Rombouts, Alexandre Stella, Olivier Neyrolles, Odile Bulet-Schiltz, Sandra J van Vliet, Arnoud H de Ru, Yassene Mohammed, Manfred Wuhrer, and Peter A van Veelen. 2020. 'Characterization of Macrophage Galactose-type Lectin (MGL) ligands in colorectal cancer cell lines', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1864: 129513.
- Popa, C. C., D. C. Badiu, O. C. Rusu, V. T. Grigorean, S. I. Neagu, and C. R. Strugaru. 2016. 'Mortality prognostic factors in acute pancreatitis', *J Med Life*, 9: 413-18.
- Rademacher, TW, RB Parekh, and RA Dwek. 1988. 'Glycobiology', *Annu Rev Biochem*, 57: 785-838.
- Radhakrishnan, P., S. Dabelsteen, F. B. Madsen, C. Francavilla, K. L. Kopp, C. Steentoft, S. Y. Vakhrushev, J. V. Olsen, L. Hansen, E. P. Bennett, A. Woetmann, G. Yin, L. Chen, H. Song, M. Bak, R. A. Hlady, S. L. Peters, R. Opavsky, C. Thode, K. Qvortrup, K. T. Schjoldager, H. Clausen, M. A. Hollingsworth, and H. H. Wandall. 2014. 'Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: E4066-75.
- Ræder, Helge, Stefan Johansson, Pål I Holm, Ingfrid S Haldorsen, Eric Mas, Véronique Sbarra, Ingrid Nermoen, Stig Å Eide, Louise Grevle, and Lise Bjørkhaug. 2006. 'Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction', *Nature genetics*, 38: 54.
- Rajewsky, Klaus, Hua Gu, R Kühn, Ulrich Ak Betz, W Müller, Jurgen Roes, and Frieder Schwenk. 1996. 'Conditional gene targeting', *The Journal of clinical investigation*, 98: 600-03.
- Rebours, Vinciane, Marie Christine Boutron-Ruault, Matthieu Schnee, Claude Férec, Cédric Le Maréchal, Olivia Hentic, Frédérique Maire, Pascal Hammel, Philippe Ruszniewski, and Philippe Lévy. 2008. 'The natural history of hereditary pancreatitis: a national series', *Gut*.
- Reis, Celso A, Hugo Osorio, Luisa Silva, Catarina Gomes, and Leonor David. 2010. 'Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection', *Journal of clinical pathology*, 63: 322-29.
- Resta, N., D. Pierannunzio, G. M. Lenato, A. Stella, R. Capocaccia, R. Bagnulo, P. Lastella, F. C. Susca, C. Bozzao, D. C. Loconte, C. Sabba, E. Urso, P. Sala,

- M. Fornasarig, P. Grammatico, A. Piepoli, C. Host, D. Turchetti, A. Viel, L. Memo, L. Giunti, V. Stigliano, L. Varesco, L. Bertario, M. Genuardi, E. Lucci Cordisco, M. G. Tibiletti, C. Di Gregorio, A. Andriulli, and M. Ponz de Leon. 2013. 'Cancer risk associated with STK11/LKB1 germline mutations in Peutz-Jeghers syndrome patients: results of an Italian multicenter study', *Dig Liver Dis*, 45: 606-11.
- Roman, T. S., A. F. Marvelle, M. P. Fogarty, S. Vadlamudi, A. J. Gonzalez, M. L. Buchkovich, J. R. Huyghe, C. Fuchsberger, A. U. Jackson, Y. Wu, M. Civelek, A. J. Lusis, K. J. Gaulton, P. Sethupathy, A. J. Kangas, P. Soininen, M. Ala-Korpela, J. Kuusisto, F. S. Collins, M. Laakso, M. Boehnke, and K. L. Mohlke. 2015. 'Multiple Hepatic Regulatory Variants at the GALNT2 GWAS Locus Associated with High-Density Lipoprotein Cholesterol', *Am J Hum Genet*, 97: 801-15.
- Rottger, S, Jamie White, Hans H Wandall, Jean-Christophe Olivo, Annika Stark, Eric P Bennett, Caroline Whitehouse, Eric G Berger, Henrik Clausen, and Tommy Nilsson. 1998. 'Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus', *Journal of cell science*, 111: 45-60.
- Rudd, Pauline M, Tim Elliott, Peter Cresswell, Ian A Wilson, and Raymond A Dwek. 2001. 'Glycosylation and the immune system', *Science*, 291: 2370-76.
- Saeland, Eirikur, Sandra J van Vliet, Malin Bäckström, Venice CM van den Berg, Teunis BH Geijtenbeek, Gerrit A Meijer, and Yvette van Kooyk. 2007. 'The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56: 1225-36.
- Safi, Farouk, Wolfgang Schlosser, Gert Kolb, and Hans G Beger. 1997. 'Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms', *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 1: 106-12.
- Sah, R. P., and A. Saluja. 2011. 'Molecular mechanisms of pancreatic injury', *Curr Opin Gastroenterol*, 27: 444-51.
- Sakuraba, Hitoshi, Fumiko Matsuzawa, Sei-ichi Aikawa, Hirofumi Doi, Masaharu Kotani, Hiroshi Nakada, Tomoko Fukushima, and Tamotsu Kanzaki. 2004. 'Structural and immunocytochemical studies on  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase deficiency (Schindler/Kanzaki disease)', *Journal of human genetics*, 49: 1-8.
- Sankaran, Sharanya J, Amy Y Xiao, Landy M Wu, John A Windsor, Christopher E Forsmark, and Maxim S Petrov. 2015. 'Frequency of progression from acute to chronic pancreatitis and risk factors: a meta-analysis', *Gastroenterology*, 149: 1490-500. e1.
- Sauer, Brian, and Nancy Henderson. 1988. 'Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1', *Proceedings of the national academy of sciences*, 85: 5166-70.
- Saulsbury, F. T. 1997. 'Alterations in the O-linked glycosylation of IgA1 in children with Henoch-Schonlein purpura', *J Rheumatol*, 24: 2246-9.
- Schietinger, Andrea, Mary Philip, Barbara A Yoshida, Parastoo Azadi, Hui Liu, Stephen C Meredith, and Hans Schreiber. 2006. 'A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen', *Science*, 314: 304-08.
- Sellers, Thomas A, Yifan Huang, Julie Cunningham, Ellen L Goode, Rebecca Sutphen, Robert A Vierkant, Linda E Kelemen, Zachary S Fredericksen, Mark Liebow, and V Shane Pankratz. 2008. 'Association of single nucleotide polymorphisms in glycosylation genes with risk of epithelial ovarian cancer', *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17: 397-404.



- Shah, A. U., A. Sarwar, A. I. Orabi, S. Gautam, W. M. Grant, A. J. Park, A. U. Shah, J. Liu, P. K. Mistry, D. Jain, and S. Z. Husain. 2009. 'Protease activation during in vivo pancreatitis is dependent on calcineurin activation', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 297: G967-73.
- Shi, C., M. K. Washington, R. Chaturvedi, Y. Drosos, F. L. Revetta, C. J. Weaver, E. Buzhardt, F. E. Yull, T. S. Blackwell, B. Sosa-Pineda, R. H. Whitehead, R. D. Beauchamp, K. T. Wilson, and A. L. Means. 2014. 'Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction', *Lab Invest*, 94: 409-21.
- Shi, Chanjuan, Ralph H Hruban, and Alison P Klein. 2009. 'Familial pancreatic cancer', *Archives of pathology & laboratory medicine*, 133: 365-74.
- Shimodaira, K., J. Nakayama, N. Nakamura, O. Hasebe, T. Katsuyama, and M. Fukuda. 1997. 'Carcinoma-associated expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of O-glycans in tumor progression', *Cancer Res*, 57: 5201-6.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal. 2016. 'Cancer statistics, 2016', *CA Cancer J Clin*, 66: 7-30.
- Silverman, Debra T, Janet A Dunn, Robert N Hoover, Mark Schiffman, Keith D Lillemo, Janet B Schoenberg, Linda M Brown, Raymond S Greenberg, Richard B Hayes, and G Marie Swanson. 1994. 'Cigarette Smoking and pancreas cancer: a case—control study based on direct interviews', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86: 1510-16.
- Singhi, Aatur D, and Anirban Maitra. 2017. 'The Molecular Pathology of Precursor Lesions of Pancreatic Cancer', *Pancreatic Cancer*: 1-30.
- . 2018. 'The Molecular Pathology of Precursor Lesions of Pancreatic Cancer', *Pancreatic Cancer*: 147-76.
- Skutelsky, E., R. Lotan, N. Sharon, and D. Danon. 1977. 'Distribution of the T-antigen on erythroid cell surfaces. Studies with peanut agglutinin, an anti-T specific lectin', *Biochim Biophys Acta*, 467: 165-74.
- Slawson, C., and G. W. Hart. 2011. 'O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology', *Nat Rev Cancer*, 11: 678-84.
- Springer, Georg F. 1984. 'T and Tn, general carcinoma autoantigens', *Science*, 224: 1198-206.
- . 1997. 'Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy', *Journal of molecular medicine*, 75: 594-602.
- Springer, Georg F, Parimal R Desai, M Ghazizadeh, and Herta Tegtmeier. 1995. 'T/Tn pancarcinoma autoantigens: fundamental, diagnostic, and prognostic aspects', *Cancer detection and prevention*, 19: 173-82.
- Springer, GF, PR Desai, and I Banatwala. 1974. 'Blood group MN specific substances and precursors in normal and malignant human breast tissues', *Naturwissenschaften*, 61: 457-58.
- Sun, X., T. Ju, and R. D. Cummings. 2018. 'Differential expression of Cosmc, T-synthase and mucins in Tn-positive colorectal cancers', *BMC Cancer*, 18: 827.
- Sun, Z., H. Xue, Y. Wei, C. Wang, R. Yu, C. Wang, S. Wang, J. Xu, M. Qian, Q. Meng, and G. Li. 2019. 'Mucin O-glycosylating enzyme GALNT2 facilitates the malignant character of glioma by activating the EGFR/PI3K/Akt/mTOR axis', *Clin Sci (Lond)*, 133: 1167-84.
- Sutherland, M. E., I. Nishimori, T. Caffrey, E. P. Bennett, H. Hassan, U. Mandel, D. Mack, T. Iwamura, H. Clausen, and M. A. Hollingsworth. 1997. 'Expression of three UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide GalNAc N-

- acetylgalactosaminyltransferases in adenocarcinoma cell lines', *Cancer Res*, 57: 4744-8.
- Takehara, Sachiko, Masaki Yanagishita, Katarzyna Anna Podyma-Inoue, and Yoko Kawaguchi. 2013. 'Degradation of MUC7 and MUC5B in human saliva', *PLoS one*, 8: e69059.
- Tamura, Fumito, Yasushi Sato, Masahiro Hirakawa, Makoto Yoshida, Michihiro Ono, Takahiro Osuga, Yutaka Okagawa, Naoki Uemura, Yohei Arihara, and Kazuyuki Murase. 2016. 'RNAi-mediated gene silencing of ST6GalNAc I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells', *Gastric cancer*, 19: 85-97.
- Taucher, V, and Johannes Haybaeck. 2017. 'Pancreatic Carcinogenesis.' in, *Mechanisms of Molecular Carcinogenesis—Volume 2* (Springer).
- Terada, T., and Y. Nakanuma. 1996. 'Expression of mucin carbohydrate antigens (T, Tn and sialyl Tn) and MUC-1 gene product in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas', *Am J Clin Pathol*, 105: 613-20.
- Terasawa, K., H. Furumoto, M. Kamada, and T. Aono. 1996. 'Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells', *Cancer Res*, 56: 2229-32.
- Therkildsen, Marianne H, Ulla Mandel, Maria Christensen, and Erik Dabelsteen. 1993. 'Simple mucin-type Tn and sialosyl-Tn carbohydrate antigens in salivary gland carcinomas', *Cancer*, 72: 1147-54.
- Thomas, D., S. Sagar, X. Liu, H. R. Lee, J. A. Grunkemeyer, P. M. Grandgenett, T. Caffrey, K. A. O'Connell, B. Swanson, L. Marcos-Silva, C. Steentoft, H. H. Wandall, H. C. Maurer, X. L. Peng, J. J. Yeh, F. Qiu, F. Yu, R. Madiyalakan, K. P. Olive, U. Mandel, H. Clausen, M. A. Hollingsworth, and P. Radhakrishnan. 2020. 'Isoforms of MUC16 activate oncogenic signaling through EGF receptors to enhance the progression of pancreatic cancer', *Mol Ther*.
- Tian, E, and Kelly G Ten Hagen. 2009. 'Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation', *Glycoconjugate journal*, 26: 325-34.
- Tollefsen, S. E., and R. Kornfeld. 1983. 'The B4 lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine residues alpha-linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins', *J Biol Chem*, 258: 5172-6.
- Tsuchiya, Atsuo, Masahiko Kanno, Takanori Kawaguchi, Yoshiyuki Endo, Guo-Jun Zhang, Tohru Ohtake, and Izo Kimijima. 1999. 'Prognostic relevance of Tn expression in breast cancer', *Breast Cancer*, 6: 175.
- Vaidyanathan, K., and L. Wells. 2014. 'Multiple tissue-specific roles for the O-GlcNAc post-translational modification in the induction of and complications arising from type II diabetes', *J Biol Chem*, 289: 34466-71.
- Vajaria, Bhairavi N, and Prabhudas S Patel. 2017. 'Glycosylation: a hallmark of cancer?', *Glycoconjugate journal*, 34: 147-56.
- Van den Steen, P., P. M. Rudd, R. A. Dwek, and G. Opdenakker. 1998. 'Concepts and principles of O-linked glycosylation', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 33: 151-208.
- Varki, A., and J. B. Lowe. 2009. 'Biological Roles of Glycans.' in nd, A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler (eds.), *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press
- The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.: Cold Spring Harbor (NY)).
- Vincent, Audrey, Joseph Herman, Rich Schulick, Ralph H Hruban, and Michael Goggins. 2011. 'Pancreatic cancer', *The Lancet*, 378: 607-20.

- Voet, D., J.G. Voet, A. Beck-Sickinger, and C.W. Pratt. 2010. *Lehrbuch der Biochemie* (VCH [Imprint]).
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits, and J. L. Bos. 1988. 'Genetic alterations during colorectal-tumor development', *N Engl J Med*, 319: 525-32.
- Walling, A., and R. Freelove. 2017. 'Pancreatitis and Pancreatic Cancer', *Prim Care*, 44: 609-20.
- Wandall, Hans H, Helle Hassan, Ekaterina Mirgorodskaya, Anne K Kristensen, Peter Roepstorff, Eric P Bennett, Peter A Nielsen, Michael A Hollingsworth, Joy Burchell, and Joyce Taylor-Papadimitriou. 1997. 'Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1,-T2, and-T3', *Journal of Biological Chemistry*, 272: 23503-14.
- Wang, Bao-Le, Georg F Springer, and Sheila C Carlstedt. 1997. 'Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen–Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma', *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45: 1393-400.
- Wang, M., J. Zhu, D. M. Lubman, and C. Gao. 2019. 'Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey', *Clin Chem Lab Med*, 57: 407-16.
- Wang, Yingchun, Tongzhong Ju, Xiaokun Ding, Baoyun Xia, Wenyi Wang, Lijun Xia, Miao He, and Richard D Cummings. 2010. 'Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation', *Proceedings of the national academy of sciences*, 107: 9228-33.
- Wei, H., Z. Cheng, C. Ouyang, Y. Zhang, Y. Hu, S. Chen, C. Wang, F. Lu, J. Zhang, Y. Wang, and X. Liu. 2016. 'Glycoprotein screening in colorectal cancer based on differentially expressed Tn antigen', *Oncol Rep*, 36: 1313-24.
- Welinder, C., B. Baldetorp, C. Borrebaeck, B. M. Fredlund, and B. Jansson. 2011. 'A new murine IgG1 anti-Tn monoclonal antibody with in vivo anti-tumor activity', *Glycobiology*, 21: 1097-107.
- Werther, JL, S Rivera-MacMurray, H Bruckner, M Tatematsu, and SH Itzkowitz. 1994. 'Mucin-associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome', *British journal of cancer*, 69: 613.
- White, Thayer, Eric Paul Bennett, Koji Takio, Tina Sørensen, Nina Bonding, and Henrik Clausen. 1995. 'Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 270: 24156-65.
- Wilentz, Robb E, Joseph Geradts, Robert Maynard, G Johan A Offerhaus, Myungsa Kang, Michael Goggins, Charles J Yeo, Scott E Kern, and Ralph H Hruban. 1998. 'Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression', *Cancer Res*, 58: 4740-44.
- Witz, I. P. 2008. 'The selectin-selectin ligand axis in tumor progression', *Cancer Metastasis Rev*, 27: 19-30.
- Wolters-Eisfeld, G., B. Mercanoglu, B. T. Hofmann, T. Wolpers, C. Schnabel, S. Harder, P. Steffen, K. Bachmann, B. Steglich, J. Schrader, N. Gagliani, H. Schluter, C. Gungor, J. R. Izbicki, C. Wagener, and M. Bockhorn. 2018. 'Loss of complex O-glycosylation impairs exocrine pancreatic function and induces MODY8-like diabetes in mice', *Exp Mol Med*, 50: 133.
- Wu, Albert M, June H Wu, and F-shiun Shen. 1994. 'Interaction of a Novel Tn (GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ ) Ser/Thr) Glycoprotein with Gal, GalNAc and GlcNAc Specific Lectins', *Biochemical and biophysical research communications*, 198: 251-56.

- Wu, Yao-Ming, Chiung-Hui Liu, Rey-Heng Hu, Miao-Juei Huang, Jian-Jr Lee, Chi-Hau Chen, John Huang, Hong-Shiee Lai, Po-Huang Lee, and Wen-Ming Hsu. 2011. 'Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor', *Cancer Res*.
- Xi, H. Q., K. C. Zhang, J. Y. Li, J. X. Cui, P. Zhao, and L. Chen. 2017. 'Expression and clinicopathologic significance of TUFM and p53 for the normal-adenoma-carcinoma sequence in colorectal epithelia', *World J Surg Oncol*, 15: 90.
- Xia, Lijun, Tongzhong Ju, Andrew Westmuckett, Guangyu An, Lacramioara Ivanciu, J Michael McDaniel, Florea Lupu, Richard D Cummings, and Rodger P McEver. 2004. 'Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans', *The Journal of Cell Biology*, 164: 451-59.
- Xiao, X., G. Jones, W. A. Sevilla, D. B. Stolz, K. E. Magee, M. Haughney, A. Mukherjee, Y. Wang, and M. E. Lowe. 2016. 'A Carboxyl Ester Lipase (CEL) Mutant Causes Chronic Pancreatitis by Forming Intracellular Aggregates That Activate Apoptosis', *J Biol Chem*, 291: 23224-36.
- Xu, Chengchao, and Davis TW Ng. 2015. 'Glycosylation-directed quality control of protein folding', *Nature reviews Molecular cell biology*, 16: 742-52.
- Xu, S., C. Chheda, Y. Ouhaddi, H. Benhaddou, M. Bourhim, P. J. Grippo, D. R. Principe, E. Mascarinas, B. DeCant, H. Tsukamoto, S. J. Pandol, and M. Edderkaoui. 2015. 'Characterization of Mouse Models of Early Pancreatic Lesions Induced by Alcohol and Chronic Pancreatitis', *Pancreas*, 44: 882-7.
- Xu, Z., X. Li, S. Zhou, W. Xie, J. Wang, L. Cheng, S. Wang, S. Guo, Z. Xu, X. Cao, M. Zhang, B. Yu, H. Narimatsu, S. C. Tao, and Y. Zhang. 2017. 'Systematic identification of the protein substrates of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T1/T2/T3 using a human proteome microarray', *Proteomics*, 17.
- Yadav, Dhiraj, Marsha L Eigenbrodt, Margaret J Briggs, D Keith Williams, and Eve J Wiseman. 2007. 'Pancreatitis: prevalence and risk factors among male veterans in a detoxification program', *Pancreas*, 34: 390-98.
- Yadav, Dhiraj, and Albert B Lowenfels. 2013. 'The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer', *Gastroenterology*, 144: 1252-61.
- Yamamoto, F., H. Clausen, T. White, J. Marken, and S. Hakomori. 1990. 'Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system', *Nature*, 345: 229-33.
- Yamashita, M. S. A., and E. O. Melo. 2018. 'Mucin 2 (MUC2) promoter characterization: an overview', *Cell Tissue Res*, 374: 455-63.
- Yang, X., and K. Qian. 2017. 'Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 452-65.
- Ying, Haoqiang, Prasenjit Dey, Wantong Yao, Alec C Kimmelman, Giulio F Draetta, Anirban Maitra, and Ronald A DePinho. 2016. 'Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Genes & development*, 30: 355-85.
- Yu, Xiaofeng, Zhenzhen Du, Xuhong Sun, Chuanqin Shi, Huaixiang Zhang, and Tao Hu. 2015. 'Aberrant Cosmc genes result in Tn antigen expression in human colorectal carcinoma cell line HT-29', *International journal of clinical and experimental pathology*, 8: 2590.
- Zhong, Z., D. Shi, M. Xiao, D. Fu, S. Feng, Q. Kong, J. Li, and Z. Li. 2021. 'Expression profile of Fc receptor-like molecules in patients with IgA nephropathy', *Hum Immunol*, 82: 186-92.
- Zhu, Y., X. Shan, S. A. Yuzwa, and D. J. Vocadlo. 2014. 'The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease', *J Biol Chem*, 289: 34472-81.
- Zurawski Jr, Vincent R, Harald Orjaseter, Aage Andersen, and Egil Jellum. 1988. 'Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia:

relevance for early detection of ovarian cancer', *International journal of cancer*, 42: 677-80.

## 11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki und Prof. Dr. med. Maximilian Bockhorn für die Überlassung des spannenden Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gerrit Wolters-Eisfeld für die ausgezeichnete, freundliche Betreuung und jahrelange Unterstützung sowie Dr. med. Baris Mercanoglu für die kompetente Beratung und praktische Hilfestellung im wissenschaftlichen Arbeiten. Ich hätte mir kein besseres Betreuerenteam vorstellen können und freue mich sehr über die großartige, zurückliegende Zusammenarbeit.

Ebenfalls bedanke ich mich bei dem gesamten Mitarbeiterenteam des Labors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf für die stetige Hilfsbereitschaft und Anleitung im experimentellen Arbeiten.

Meiner geliebten Familie sowie meinen geschätzten Freunden danke ich von Herzen für die großartige Unterstützung, den unerschütterlichen Glauben an meine Fähigkeiten und die überaus hilfreiche Motivation beim Verfassen der Arbeit.

## 12 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: .....