

# **Biosynthese von TFF3 im humanen Gastrointestinaltrakt**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**von Dipl.-Biol. Timo Albert**

geboren am 13.03.1979 in Hamm

Gutachter: **Prof. Dr. Werner Hoffmann, Universität Magdeburg**  
**Prof. Dr. Friedrich Paulsen, Universität Erlangen-Nürnberg**

eingereicht am: 28.02.2012

verteidigt am: 23.07.2012

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:**

**TIMO K. ALBERT**, WERNER LAUBINGER, STEFAN MÜLLER, FRANZ-GEORG HANISCH, THOMAS KALINSKI, FRANK MEYER, WERNER HOFFMANN **(2010)** Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *J. Proteome Res.* 9:3108-3117

## Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, dem Institutsdirektor Herrn Univ.-Prof. Dr. Werner Hoffmann, für die Bereitstellung des Themas, die exzellente fachliche Betreuung, die immer offene Tür sowie für die Korrektur der Arbeit. Auch danke ich ihm, für den einen oder anderen Rat, der nicht immer unbedingt etwas mit dem Entstehen dieser Arbeit zu tun haben musste.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Besonders meiner Mutter Helga und bei dem Josef für ihre Unterstützung in jeglicher Art und ihr unendliches Vertrauen. Besonderer Dank gilt auch meinem Bruder Michael der mir dabei geholfen hat, die Welt aus einer anderen Perspektive kennen zu lernen. Besonderer Dank gilt meiner geliebten Freundin Julia die immer zu mir gehalten hat, immer einen guten Rat hatte, wenn ich nicht weiter wusste und meine bessere Hälfte ist. Ohne euch wäre diese Arbeit wohl nie entstanden.

Bei der Gelegenheit möchte ich mich auch sehr herzlich bei dem gesamten Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Jana Reising für ihre technische Unterstützung. Weiter danke ich Herrn René Stürmer für die Unterstützung im täglichen Laboralltag, besonders für die zahlreichen Affinitätsreinigungen der Antikörper. Frau Voß danke ich für ihre guten Ratschläge am PC und darüber hinaus. Zudem bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. Werner Laubinger für die praktische Einführung zu Beginn meiner Doktorarbeit.

Meinen beiden Kolleginnen Frau Eva Znalesniak und Frau Ting Fu danke ich für die offenen fachlichen Diskussionen. Auch danke ich ihnen für ein Ventil, worüber ich so manchen Frust ablassen konnte. Auch bedanke ich mich bei Herrn Hubert Ragge und Herrn Jens Weste für die doch sehr aufschlussreichen Mittagspausen.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn OA Prof. Dr. Frank Meyer für die Bereitstellung der Gewebeproben und Herrn OA PD Dr. Thomas Kalinski für die histopathologischen Diagnosen derselben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Univ.- Prof. Dr. Franz-Goerg Hanisch und Herrn Dr. Stefan Müller für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1	Struktur der TFF-Peptide .....	9
1.2	Synthese der TFF-Peptide.....	10
1.3	Funktion der TFF-Peptide.....	11
1.4	Pathophysiologische Betrachtung von TFF3 .....	12
1.5	TFF-Peptide und Muzine .....	13
1.6	Aufbau der Mukusschicht im Kolon .....	13
1.7	Ziele der Dissertation.....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien.....	18
2.1.1	Chemikalien .....	18
2.1.2	Gewebe .....	18
2.1.3	Antikörper und rekombinantes TFF3.....	19
2.1.4	Datenbanken .....	19
2.2	Biochemische Methoden .....	19
2.2.1	Proteinextraktion aus humanem gastrointestinalem Gewebe .....	19
2.2.2	Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) .....	20
2.2.3	Proteinreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie .....	21
2.2.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	21
2.2.5	SDS-Agarose-Gelelektrophorese (SDS-AgGE) .....	24
2.2.6	Western Blot .....	25
2.2.6.1	Immundetektion .....	27
2.2.6.2	Semiquantitative Westernblotanalyse.....	29
2.2.7	Silberfärbung .....	29
2.2.8	Coomassie-Brilliantblau-Färbung.....	30
2.2.9	Immunpräzipitation (IP) mit immobilisiertem Antikörper .....	31
2.2.10	LC-ESI-MS/MS-Analyse von aus PAA-Gelen digerierten Proteinen .....	32
2.2.11	Behandlung des TFF3-FCGBP-Heteromers mit Schwefelwasserstoff... ..	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Reinigung von humanen intestinalen TFF3-immunreaktiven Proteinen ...	35
3.1.1	Berechnung des Stoffmengenverhältnisses von TFF3 und FCGBP .....	38
3.2	Charakterisierung des TFF3-Heteromers durch LC-ESI-MS/MS-Analyse	38
3.3	Charakterisierung des TFF3-Heteromers durch Westernblot-Analyse .....	40
3.4	Immunpräzipitation (IP) mit immobilisierten Antikörpern.....	41
3.5	Reduktion des TFF3-FCGBP-Heteromers durch H <sub>2</sub> S.....	41
3.6	Vorkommen des TFF3-FCGBP-Heteromers im humanen Gastrointestinaltrakt.....	43
3.7	Charakterisierung niedermolekularer TFF3-Formen.....	43
3.8	Veränderungen der TFF3-Biosynthese in Kolonkarzinomen .....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1	TFF3 bildet mit FCGBP ein hochmolekulares Disulfid-verknüpftes Heteromer.....	46
4.2	Proteolytische Spaltung von FCGBP .....	49

4.3	Generierung des TFF3-Monomers und TFF3-Dimers – mögliche funktionelle Konsequenzen für die intestinale Restitution.....	51
4.4	Mögliche Funktionen des TFF3-FCGBP-Heteromers für den Aufbau der intestinalen Mukusschicht.....	52
4.5	Ausblick .....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>54</b>
5.1	Abstract .....	55
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>64</b>
7.1	Charakterisierung des TFF3-Heteromers durch LC-ESI-MS/MS-Analyse	64
7.2	Detaillierter Proteinreport der Analyse der SwissProt 56.9 Datenbank.....	65
7.2.1	Zuordnung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide zur FCGBP-Primärsequenz .....	80
7.3	Vorkommen des TFF3-FCGBP-Heteromers im Gastrointestinaltrakt.....	96
7.4	Prozessierung von FCGBP.....	97

## Abkürzungsverzeichnis

®	eingetragenes Warenzeichen
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A2MG	$\alpha$ -2-Macroglobulin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AgGE	Agarose-Gelelektrophorese
AGR2	Anterior gradient homolog 2
anti-h	anti-human
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B	Bande
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovines Serumalbumin
CBS	Center for biological sequence analysis
CCD	Charge-coupled Device
cDNA	complementary DNA
CLCA1	calcium-activated chloride channel regulator 1
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Da	Dalton
deion.	deionisiertes, gereinigtes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran-Natriumsulfat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
EU	endotoxin units
ExPASy	Expert Protein Analysis System
Fc	Fc-Fragment
FCGBP	Fc gamma binding protein bzw. IgG Fc binding protein
FIM	Frog integumentary mucin
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GKN2	Gastrokin-2
H-K-ATPase	Protonen-Kalium-ATPase
HPR	Horseradish peroxidase
IC	Ionenaustausch-Chromatographie
IgG (H+L)	Immunglobulin G (heavy + light chain)
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LBD	large biliary duct (großer Gallengang)

LC	Liquid Chromatography
$M_r$	relative Molekülmasse
MS	mass spectrometry
MS/MS	Tandem-MS
MUC2	Mucin-2
MUC5AC	Mucin-5AC
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR	nicht reduzierende Bedingungen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS-Färbung	„Periodic-Acid-Schiff“-Färbung
PBG	peribiliary gland (peribiliäre Drüsen)
PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline tween 20
R	reduzierende Bedingungen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SBD	small biliary duct (kleiner Gallengang)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMC	surface mucous cell (Oberflächenepithelzellen)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TBS-T	Trisgepufferte Salzlösung + Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFF	Trefoil Factor Family
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TOC	total organic carbon
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UniProtKB	universal protein database Knowledgebase
UPR	unfolded protein response
v/v	Volumenprozent
WB	Western Blot
w/v	Massenprozent
xg	x-fache Erdbeschleunigung

# 1 Einleitung

## 1.1 Struktur der TFF-Peptide

TFF3, ursprünglich "intestinal trefoil factor" oder hP1.B genannt (Suemori *et al.* 1991, Hauser *et al.* 1993), ist ein Vertreter der „trefoil factor family“ (TFF). Bis heute sind drei humane sezernierte TFF-Peptide (kurz TFFs) bekannt. Neben TFF3 existieren noch TFF1 (früher pS2) und TFF2 (früher spasmodic peptide, SP) (Wong *et al.* 1999, Hoffmann *et al.* 2001, Hoffmann & Jagla 2002, Taupin & Podolsky 2003, Hoffmann 2005). Die einheitliche Namensgebung dieser Peptidfamilie bei Säugern wurde auf einem Kongress 1997 (*Conférence Philippe Laudat*) beschlossen (Wright *et al.* 1997). Allen drei Peptiden ist die TFF-Domäne (früher P-Domäne) gemein, in der die konservierte Anordnung von sechs Cysteinresten zur Bildung von drei Disulfidbrücken (Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6) führt. Die an ein Kleeblatt erinnernde Struktur gibt den TFFs ihren Namen (Thim 1989, Podolsky *et al.* 1993). Sie bestehen dabei aus einer (TFF1, TFF3) oder zwei (TFF2) TFF-Domänen. Die komplexe Anordnung der Disulfidbrücken ist vermutlich ein Grund für die Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau, speziell im Magen (Thim und May 2005, Kjellv 2009). Jedoch konnten im Magensaft verkürzte TFF3-Formen nachgewiesen werden (Kouznetsova *et al.* 2004). Humanes TFF3 stellt ein sezerniertes, 59 Aminosäurereste langes Polypeptid dar (Hauser *et al.* 1993). Die Primärstruktur von TFF3 enthält sieben Cysteinreste. Bei der Herstellung von rekombinantem TFF3 konnte ein über Cystein-57 Disulfid-verknüpftes TFF3-Homodimer beobachtet werden (Chinery *et al.* 1995, Thim *et al.* 1995, Kinoshita *et al.* 2000, May *et al.* 2003) (Abb. 1).

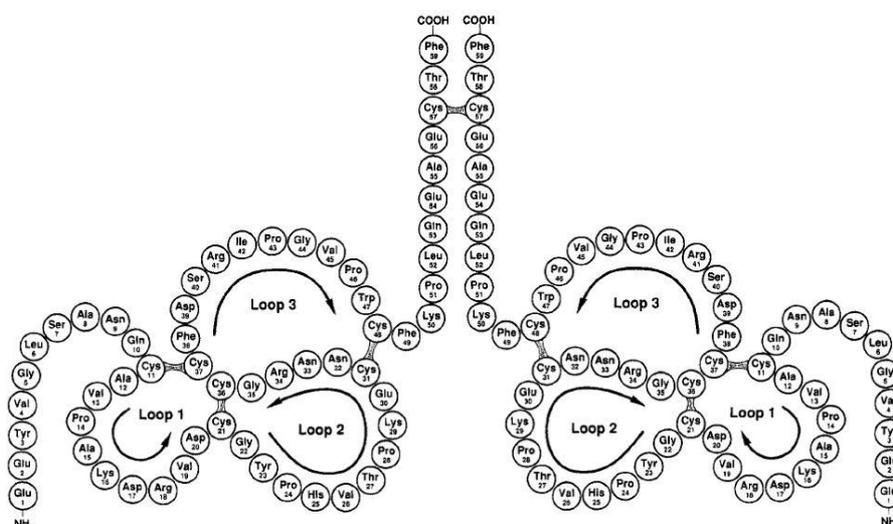


Abb. 1: Sekundärstruktur vom TFF3-Homodimer (aus Thim *et al.* 1995).

Der N-terminale Glutamatrest von humanem TFF1 sowie von rekombinantem TFF2 aus Hefen, ist nicht zyklisiert um einen Pyroglutamatrest zu bilden (Thim und May 2005). Außerdem wurden die 3D-Strukturen von rekombinantem TFF3-Monomer und dem TFF3-Homodimer ermittelt (Lemerclinier *et al.* 2001, Muskett *et al.* 2003).

## **1.2 Synthese der TFF-Peptide**

Alle drei TFF-Gene liegen als Cluster innerhalb eines 54,5 kb großen Abschnitts auf Chromosom 21q22.3 in der Anordnung tel-TFF1-TFF2-TFF3-cen. Die Transkription aller drei Gene verläuft in Richtung des Centromers (Gött *et al.* 1996; Seib *et al.* 1997). Die TFFs werden alle über Vorstufen synthetisiert, welche abspaltbare N-terminale Signalsequenzen typisch für sezernierte Proteine enthalten (Thim und May 2005). Die TFFs werden in unterschiedlichen Mengen von allen Teilen des humanen Verdauungstraktes sezerniert (Tab. 1). TFF3 scheint dabei das „Standard“-TFF-Peptid zu repräsentieren, welches in allen Organen des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen werden kann. TFF1 und TFF2 werden dagegen vorwiegend im Magen exprimiert. Die TFF synthetisierenden Gewebe des Verdauungstraktes beginnen in der oralen Mukosa. Dort konnten TFF1, TFF2 und TFF3 in der Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis) und der Lippendrüse (Glandulae labiales) nachgewiesen werden. Das vorherrschende TFF-Peptid ist dort TFF3 (sezerniert aus Glandula submandibularis) und bildet einen wichtigen Teil des Speichels (Jagla *et al.* 1999, Hoffmann 2012). Auch im Ösophagus ist TFF3, als Sekretionsprodukt submukosaler Drüsen, das dominierende TFF-Peptid (Kouznetsova *et al.* 2007, Hoffmann 2012). Eine komplexe Verteilung der TFF-Expression findet sich im Magen wieder; dort werden größere Mengen aller TFFs synthetisiert (Kouznetsova *et al.* 2011). Im Magen findet eine TFF3-Expression nur in den Grenzbereichen des Magens, in der Cardia- und Antrumregion, statt (Kouznetsova *et al.* 2004, 2007, 2011). An der antroduodenalen Übergangszone kommt es zu einer Veränderung der TFF-Expression. TFF1 lässt sich im Darm auf Proteinebene nicht nachweisen, wohingegen TFF2 von den Brunner-Drüsen gebildet wird. TFF3 wird sowohl in den Brunner-Drüsen als auch in den Becherzellen des Dünn- und Dickdarms synthetisiert (Hoffmann 2012). Des Weiteren können signifikante Mengen an TFF3 auch im humanen Mekonium nachgewiesen werden (Yu *et al.* 2004).

**Tab. 1: Verteilung der TFF-Synthese und Co-Expression der sekretorischen Muzine im humanen Verdauungstrakt (nach Hoffmann 2012)**

Organ	Zelle	TFF-Peptid	sekretorische Muzine
Speicheldrüsen	Glandula submandibularis	(TFF1, TFF2), TFF3	MUC5B, MUC7, MUC19
	Glandulae labiales	(TFF1, TFF2), TFF3	MUC5B, MUC7, MUC19
Oesophagus	Submuköse Drüsen	TFF3	MUC5B
Magen	SMCs der Cardia- und Antrumregion	TFF1, TFF3	MUC5AC
	Corpus SMCs	TFF1	MUC5AC
	Nebenzellen	TFF2	MUC6
	Antrumdrüsenzellen	TFF2	MUC6
Darm	Brunner-Drüsen	TFF2, TFF3	MUC6
	Becherzellen	TFF3	MUC2
Ampulla Vateri	Becherzellen	TFF3	MUC5AC, MUC5B
Pankreas	Ausführgänge, Langerhans-Inseln	(TFF1), TFF3	(MUC6)
Leber	LBDs, SBDs, PBGs	TFF1, (TFF2), TFF3	MUC6
Gallenblase	Epithelzellen	(TFF1), (TFF2), TFF3	MUC5B, MUC6

Geringe Mengen in Klammern angegeben; SMC=surface mucous cell (Oberflächenepithelzellen), LBD=large biliary duct (großer Gallengang), SBD=small biliary duct (kleiner Gallengang), PBG=peribiliary gland (peribiliäre Drüsen)

Neben seinem Hauptsyntheseort in intestinalen Becherzellen (Hauser et al. 1993, Podolsky et al. 1993) findet man TFF3 auch in anderen humanen Organen wie z.B. im endokrinen Anteil des Pankreas (Jackerott et al. 2006), in der Ampulla Vateri (Paulsen et al. 2005), im Respirationstrakt (Wiede et al. 1999), im Uterus (Wiede et al. 2001), in der Vagina (Madsen et al. 2007), im Harntrakt (Rinnert et al. 2010), in der Bindehaut (Langer et al. 1999), im efferenten Tränennasengang (Paulsen et al. 2002), in verwundeten Cornea-Bereichen der äußeren Augenhaut (Paulsen et al. 2008) und im Hypothalamus (Jagla et al. 2000).

### **1.3 Funktion der TFF-Peptide**

Trotz intensiver Forschung ist die molekulare Funktion von TFF3 bis heute nicht abschließend geklärt. Dieses Peptid ist an unterschiedlichen mukosalen Schutz- und Reparaturprozessen beteiligt und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Integrität muköser Epithelien (Übersichtsartikel: Wong et al. 1999, Taupin & Podolsky 2003, Hoffmann 2006). Beispielsweise fördert TFF3 eine schnelle Reparatur mittels Zellmigration, einem Prozess der „Restitution“ genannt wird und der als schnelle Antwort auf Mikroläsionen eines mukösen Epithels zu betrachten ist (Übersicht: Hoffmann 2005). TFF3 stimuliert dabei die Zellmigration durch Chemotaxis (Chwieralski et al. 2004). Der motogene Effekt wurde auch in unterschiedlichen *in vitro* Wundheilungsmodellen gezeigt (Dignass et al. 1994, Paulsen et al. 2008). Darüber hinaus wurden in unterschiedlichen *in vivo* Studien protektive und

regenerative Effekte präsentiert (Übersicht: Hoffmann und Jagla, 2002). Ergebnisse im Colitis-Modell zeigen klar, dass nur eine luminale, jedoch nicht die systemische Verabreichung von rekombinantem TFF3 protektiv wirkt (Poulsen *et al.* 2005). Außerdem stabilisiert eine ektopische Expression von TFF3 im Jejunum die Mukosa gegen gesundheitsschädigende Stoffe (Marchbank *et al.* 2001). Ferner schützt die Sekretion von TFF3 durch einen genetisch modifizierten *Lactococcus lactis*-Stamm effektiv vor Dextran-Natriumsulfat (DSS)-induzierter Colitis (Vandenbroucke *et al.* 2004). Dagegen zeigen TFF3-KO-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit im DSS-Colitis-Modell (Mashimo *et al.* 1996). Interessanterweise wurde gezeigt, dass nur TFF3-Dimere und nicht TFF3-Monomere vor experimentell-induzierter Colitis schützen, wenn sie luminal verabreicht wurden. Im Gegensatz dazu erhöhte eine systemische Applikation des TFF3-Mono- und -Dimers die Wahrscheinlichkeit einer Colitis (Poulsen *et al.* 2005). Dennoch zeigten beide TFF3-Formen *in vitro* motogene Effekte (Kinoshita *et al.* 2000, Oertel *et al.* 2001). Zudem gibt es Berichte, dass für einen Schutz gegen Apoptose *in vitro* das TFF3-Dimer benötigt wird (Kinoshita *et al.* 2000). Auch zeigen aktuelle Studien sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften von TFF3 (Rösler *et al.* 2010, Taupin *et al.* 2000). Allerdings sind hierbei die von TFF3 ausgelösten Signalwege der motogenen und antiapoptotischen Wirkung von unterschiedlicher Herkunft (Kinoshita *et al.* 2000). Zudem nimmt das TFF3-Dimer *in vitro* in der humanen bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B Einfluss auf die Entzündungsreaktion durch Regulation der Interleukine IL-6 und IL-8, welche mittels Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-Stimulation sezerniert wurden (Graness *et al.* 2002). Bis heute wurden noch keine spezifischen TFF-Rezeptoren charakterisiert, was die Suche nach der molekularen Funktion von TFF3 deutlich erschwert. Ein potentieller Kandidat könnte der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) sein (Hoffmann 2009). So aktiviert zum Beispiel TFF2 CXCR4 in epithelialen und lymphozytischen Krebszelllinien (Dubeykovskaya *et al.* 2009).

#### **1.4 Pathophysiologische Betrachtung von TFF3**

Eine TFF3-Expression mit pathologischem Hintergrund findet man in entzündlichen Vorgängen muköser Epithelien, besonders in der sogenannten „Ulcer-assoziierten Zelllinie“ (Hauser *et al.* 1993) aber auch im Knorpelgewebe während Arthritis (Rösler *et al.* 2010). Ferner ist die TFF3-Expression während der mehrstufigen Kolonkarzinogenese Veränderungen unterworfen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei der adenomatösen Polyposis zu einer Senkung der TFF3-Expression

kommt, während die TFF3-Expression in Adenomen dann wieder auf einen physiologischen Wert ansteigt. In mukoiden Adenokarzinomen steigt die TFF3-Expression wieder an, wohingegen es bei stark invasiven Karzinomzellen zu einer signifikanten Senkung der TFF3-Expression kommt (John *et al.* 2007). Eine erhöhte TFF3-Expression konnte in einigen neoplastischen Geweben wie zum Beispiel im mukösen Hautkarzinom (Hanby *et al.* 1998), im Mammakarzinom (Theisinger *et al.* 1996, Poulson *et al.* 1997, May und Westley 1997), im Magenkarzinom (Leung *et al.* 2002, Kirikoshi und Katoh 2002, Aikou *et al.* 2011) und im Kolonkarzinom (Taupin *et al.* 1996, Efstathiou *et al.* 1998) nachgewiesen werden.

### **1.5 TFF-Peptide und Muzine**

Üblicherweise wird TFF3, wie auch die anderen TFF-Peptide, als typischer Bestandteil der gastrointestinalen Mukusschicht in unterschiedlichen Muzin-sezernierenden Zellen exprimiert (Hoffmann und Jagla 2002, Hoffmann 2012) (Tab. 1). Als Teil des intestinalen Sekretionssystems werden sie nach der üblichen Synthese und Prozessierung am Endoplasmatischen Retikulum (ER) im Golgiapparat in Mukusgranula verpackt und gemeinsam mit den Muzinen sezerniert. Zusammen mit dem Gel-bildenen Muzin MUC2 bildet TFF3 einen Bestandteil des intestinalen Mukus (Podolsky *et al.* 1993). Die Beschaffenheit der intestinalen Mukusschicht ist maßgeblich durch die Synthese und Sekretion von MUC2 durch Becherzellen geprägt (Johansson *et al.* 2008, 2010, Kim und Ho 2010, Gouyer *et al.* 2011). Allerdings werden TFF3 und MUC2 in intestinalen Becherzellen unterschiedlich reguliert (Matsuoka *et al.* 1999).

### **1.6 Aufbau der Mukusschicht im Kolon**

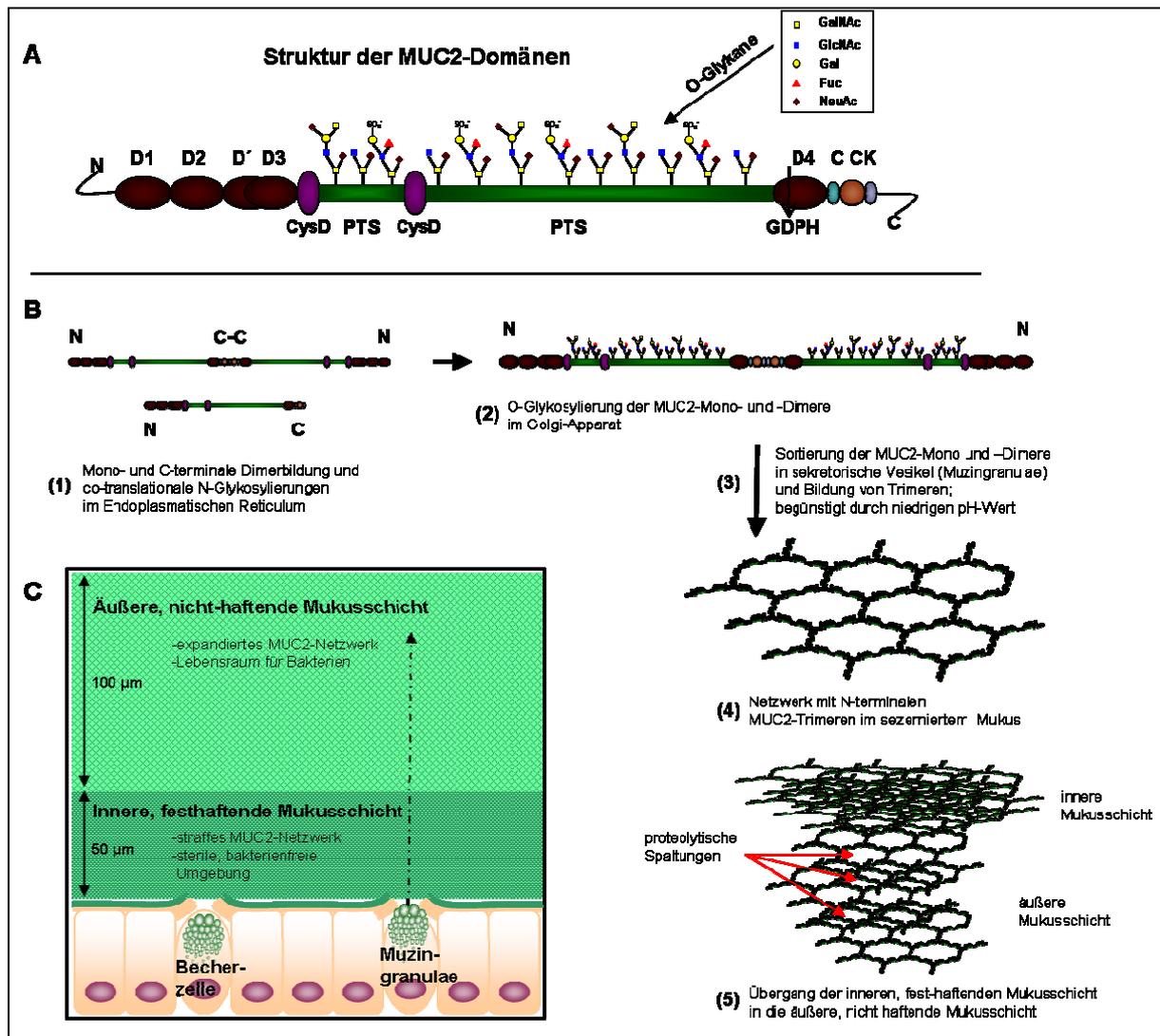
Der Hauptsyntheseort von TFF3 sind intestinale Becherzellen (Hauser *et al.* 1993, Podolsky *et al.* 1993). TFF3 bildet zusammen mit dem Muzin MUC2 einen charakteristischen Teil der Mukusschicht.

Aktuelle Studien zeigen zudem ein neues Bild der Mukusschicht im Kolon. Sie bedeckt die Oberflächenepithelzellen nicht nur einfach, sondern ist dabei in zwei Schichten organisiert. Atuma *et al.* zeigten 2001 durch Studien am gastrointestinalen Trakt der Ratte, dass zwischen einer inneren, festhaftenden und einer äußeren, nicht-haftenden Mukusschicht unterschieden werden muss. Detailliertere Studien an der Maus verdeutlichen eine Schichtdicke von 50 µm für die innere und 100 µm für die äußere Mukusschicht (Abb. 2C). Beide Schichten werden hauptsächlich durch

das gelbildende Mucin MUC2 geformt. Dabei wurde auch deutlich, dass die innere Mukusschicht nicht durch Bakterien kolonisiert ist und somit als effektive bakterielle Barriere anzusehen ist (Johansson *et al.* 2008). Anschließend konnte gezeigt werden, dass symbiotische Mikroorganismen nur in der äußeren Mukusschicht leben (Johansson *et al.* 2010, Hansson und Johansson 2010).

MUC2 ist ein hochglykosyliertes Glykoprotein, das aus 5179 Aminosäureresten besteht (UniProtKB/Swiss-Prot Accession Q02817). Die multiplen O-Glykosylierungsstellen befinden sich in repetitiven Prolin-, Threonin- und Serinreichen Domänen (PTS-Domänen) und verleihen Muzinen eine charakteristische langgestreckte Struktur (Abb. 2A). Die zwei PTS-Domänen im MUC2-Protein werden durch zwei CysD-Domänen unterbrochen (Abb. 2A). Die CysD-Domäne, welche durch intramolekulare Disulfidbrücken mit MUC2 verbunden ist, bildet nicht kovalent-verknüpfte Dimere, und führt somit zu einer Quervernetzung von MUC2 (Ambort *et al.* 2011). Am N- und C-Terminus von MUC2 befinden sich große cysteinreiche Domänen in denen von Willebrand-Domänen (Typ C und D) dominieren (Gum *et al.* 1994) (Abb. 2A). Bei der Biosynthese wird MUC2 zunächst im Endoplasmatischen Reticulum (ER) co-translational N-glykosyliert und anschließend direkt durch intermolekulare Disulfidbrücken an den C-terminalen „Cysteinknoten“ (CK)-Domänen dimerisiert (Asker *et al.* 1995, Asker *et al.* 1998). Die Faltung und Dimerisierung von MUC2 verlangt zusätzliche Unterstützung durch eine Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) wie Anterior gradient homolog 2 (AGR2) (Park *et al.* 2009). Nachdem das MUC2-Dimer die Qualitätskontrolle im ER passiert hat, gelangt es in den Golgi-Apparat, um dort an den Serin- und Threoninresten der PTS-Domänen O-glykosyliert zu werden (Asker *et al.* 1998; Axelsson *et al.* 1998). Dabei enthält der größte Teil der O-Glykane die Core-Region 3 (GalNAc, NeuAc, GlcNAc) (Abb. 2A). Bei einem Vergleich der MUC2-O-Glykan-Strukturen und deren Vorkommen bei 25 gesunden Menschen konnten relativ einheitliche Muster beobachtet werden, was im Kontrast zum polymorphen Profil bei der Blutgruppenbestimmung steht (Johansson *et al.* 2010). Nachdem die MUC2-Dimere in die sekretorischen Vesikel sortiert wurden, aggregiert MUC2 am N-Terminus weiter zu MUC2-Trimeren (Godl *et al.* 2002). Dieser intermolekulare Vorgang wird zudem durch den niedrigen pH-Wert der sekretorischen Vesikel unterstützt. Eine zusätzliche Trimerisierung scheint wichtig für die Ausbildung der typischen netzartigen Struktur von MUC2-Trimeren zu sein (Abb. 2B). Durch die nicht-kovalente Wechselwirkung der CysD-Domänen werden

zusätzliche Querverbindungen innerhalb des MUC2-Gels gebildet. Diese spielen vermutlich eine wichtige Rolle beim Aufbau des Mukus und wirken sich auf Eigenschaften, wie z.B. der Porengröße der Mukusschicht, aus (Ambort *et al.* 2011). Die MUC2-Trimere liegen nun stark komprimiert in den Muzingranulae innerhalb der Becherzellen gespeichert vor (Abb. 2C). Während der Exozytose werden diese Granulae entleert und das MUC2-Netzwerk kann sich im Volumen wahrscheinlich um das Hundertfache entfalten (Verdugo 1990).



**Abb. 2:** Biosynthese und Struktur der MUC2-Domänen: **(A)** Struktur der MUC-2-Domänen. MUC2 besitzt vier vollständige und eine unvollständige von Willebrand D-Domänen (D1-D4; D') und zusätzlich cysteinreiche N- und C-terminale Bereiche (CCK-Domäne am C-Terminus). Die Serin-, -Threonin- und Prolinhaltigen, zentralen PTS-Domänen werden O-glykosyliert und durch zwei CysD-Domänen unterbrochen. **(B)** Co- bzw. post-translationale Modifizierung und Sekretion des MUC2-Netzwerkes aus den Becherzellen. Durch intermolekulare Disulfidbrücken bildet MUC2 im Endoplasmatischen Retikulum C-terminale Dimere und wird N-glykosyliert (1). Anschließend wird es im Golgi-Apparat O-glykosyliert (2) und in sekretorische Vesikel sortiert, wo MUC2 am N-Terminus weiter zu Trimeren aggregiert (3) und sezerniert wird (4). Die innere Mukusschicht wird durch proteolytische Spaltungen in die äußere Mukusschicht umgewandelt, wodurch es zu einer Volumenzunahme der äußeren Mukusschicht kommt (5). **(C)** Aufbau und Biosynthese der inneren und äußeren Mukusschichten. Die entstandenen Muzin-Granulae werden, bevor sie sezerniert werden, in den Becherzellen gespeichert (nach Hansson und Johansson, 2010; Johansson *et al.* 2010).

Intrazellulär werden Muzine durch Anlagerung hoher  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -Konzentrationen komprimiert, wodurch abstoßende Kräfte der negativen Ladungen an den anionischen Zuckerketten der Muzine abgeschirmt werden (Verdugo 1991, Perez-Vilar 2007). Vermutlich kommt es nach Entleerung der Granulae zur schnellen Dissoziation dieser  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -Ionen durch Anlagerung an Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ). Die abstoßenden intramolekularen Kräfte der dann exponierten negativ geladenen Zuckerketten führen somit zur schnellen Expansion der Muzin-Moleküle (Garcia *et al.* 2009). Die innere, festhaftende Mukusschicht wird durch die Sekretionsleistung der Becherzellen konstant erneuert, wobei die geschichteten inneren Mukusschichten nach außen wandern und letztlich in die äußere, nicht-haftende Mukusschicht übergehen (Abb. 2C). Proteolytische Aktivitäten scheinen diesen Prozess dabei zu unterstützen, ohne jedoch das polymere MUC2-Netzwerk aus intermolekularen Disulfidbrücken vollständig zu zerstören. Eine zusätzliche Wasserbindung an die Glykanseitenketten der Muzine könnte, durch Zunahme des hydrodynamischen Radius, ein zusätzliches Aufquellen der äußeren Mukusschicht begünstigen. Der dazugehörige Mechanismus für diese Neugestaltung der äußeren, nicht-haftenden Mukusschicht ist bis jetzt jedoch noch nicht geklärt (Hansson und Johansson, 2010).

### **1.7 Ziele der Dissertation**

Bislang gibt es keine proteinchemischen Untersuchungen von nativem TFF3, das aus humanen Gewebeproben extrahiert wurde. Bis jetzt wurde lediglich in Hefen produziertes rekombinantes TFF3 proteomanalytisch charakterisiert (Thim *et al.* 1995). Alle Informationen zur TFF3-Biosynthese bzw. zur Funktion basieren lediglich auf vorhergesagten cDNA-Sequenzen rekombinanter Proteine und anti-TFF3-Antikörpern z.B. gegen synthetische Peptide. Zudem wurden die meisten proteinbiochemischen Analysen überwiegend unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen durchgeführt, wodurch eine Charakterisierung der Biosynthese und möglicher Protein-Wechselwirkungen von TFF3 nur bedingt möglich sind. Vereinzelt berichten Studien über ein mögliches Vorhandensein von TFF1-TFF3-Heterodimeren sowie TFF3-Monomere in Dünndarmproben eines Patienten mit Morbus Crohn (Chinery *et al.* 1995). Westley *et al.* (2005) haben jedoch gezeigt, dass TFF1 Disulfid-verknüpfte Heterodimere mit Gastrokin-2 (GKN2) bildet. Zudem liegen bislang nur unbefriedigende Ergebnisse bezüglich der motogenen Eigenschaften von TFF3 vor. Auch wenn motogene Effekte in unterschiedlichen *in vitro* Wundheilungsmodellen

gezeigt werden konnten (Dignass *et al.* 1994, Paulsen *et al.* 2008), sind diese Effekte mit denen anderer motogener Signalpeptide, wie z.B. dem Epidermalen Wachstumsfaktor EGF, (epidermal growth factor) nicht vergleichbar. Deutlich wird dies vor allem daran, dass zur Erzielung ähnlicher motogener Effekte die 400fache Menge an rekombinantem TFF-3-Dimer eingesetzt werden musste (siehe Dürer *et al.* 2007). Die Gründe dafür könnten sein, dass alle bisherigen Experimente mit rekombinantem TFF3-Monomer und -Homodimer durchgeführt wurden. Darüber hinaus zeigen *in vivo* Studien deutlichere protektive und regenerative Effekte von TFF3 (Mashimo *et al.* 1996, Marchbank *et al.* 2001, Übersicht: Hoffmann und Jagla 2002, Vandenbroucke *et al.* 2004). Folglich ist die Aufklärung von Form und Struktur nativer TFF3-Formen wichtig, um Rückschlüsse auf die Funktion ziehen zu können. Dabei könnten posttranslationale Modifikationen (z.B. S-Sulhydrierungen durch Freisetzung, Mustafa *et al.* 2009) oder N-terminale Verkürzungen von Bedeutung sein. Verkürzte TFF3-Formen konnten im Magensaft nachgewiesen werden (Kouznetsova *et al.* 2004). Zudem ist es wichtig, Erkenntnisse über mögliche Bildungen von Homodimeren oder Heteromeren mit Partnerproteinen zu gewinnen. Da TFF-Peptide generell mit Muzinen assoziiert sind, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun das aus humanen Kolonproben isolierte TFF3 proteinbiochemisch charakterisiert werden, um weitere Erkenntnisse zur Biosynthese von TFF3 zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien in analysereiner Qualität (p.a.) stammen von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Riedel-de-Haën (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland). Lieferanten anderer Chemikalien werden gesondert im Text angegeben. Zur Anfertigung von Lösungen wurde deionisiertes gereinigtes Wasser verwendet (Ultra Clear TWF Reinstwassersystem, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) (Tab. 2).

**Tab. 2: Systemdaten des Ultra Clear TWF Reinstwassersystems**

Produktwasserleistung	1,8	[L/min]
Leitfähigkeit bei 25°C	0,055	[ $\mu$ S/cm]
Widerstand bei 25°C	18,2	[M $\Omega$ · cm]
TOC Gehalt	< 1	[ppb]
Bakterien	< 1	[KbE/mL]
Endotoxine	< 0,001	[EU/mL]
Partikel > 0,1 $\mu$ m	< 1	[Stk./mL]
Permeat Leitfähigkeit	< 0,2	[ $\mu$ S/cm]

#### 2.1.2 Gewebe

Alle Untersuchungen folgten den Grundsätzen der Erklärung von Helsinki und wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg genehmigt. Zur Probengewinnung wurde humanes Gewebe, speziell der Bereich der Tunica mucosa und Tela submucosa, aus dem Antrum, Duodenum und Kolon resektiert. Die chirurgischen Eingriffe wurden unter Leitung von Prof. Dr. med. Frank Meyer (Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Magdeburg) durchgeführt. Die Tunica muscularis wurde dabei gezielt entfernt. Die Gewebeproben wurden nur dann in die Untersuchungen eingeschlossen, wenn die formelle histopathologische Überprüfung der Proben durch PD OA Dr. med. Thomas Kalinski (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg) neoplastische Veränderungen ausschloss. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

### 2.1.3 Antikörper und rekombinantes TFF3

Für den immunologischen Nachweis von TFF3 wurde ein affinitätsgereinigter polyklonaler Primär-Antikörper (anti-hTFF3-3) verwendet (Tab. 3). Dieser Antikörper wurde gegen das Peptid FKPLQEAECTF generiert (Aminosäurereste 49-59 von hTFF3), das für die Immunisierung an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt wurde (Wiede *et al.* 1999). Für den Nachweis von humanem *IgG Fc binding protein* (FCGBP) wurde ein kommerzielles polyklonales Antiserum gegen humanes FCGBP (HPA003564, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) verwendet (Tab. 3). Beide Antikörper wurden im Kaninchen generiert. Als Sekundär-Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG (H+L) (PI-1000, Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.) in einer 1:4000 Verdünnung verwendet. Als Referenzprotein wurde rekombinantes TFF3-Dimer aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, welches freundlicherweise von Dr. L. Thim (Novo Nordisk A/S, Maaloev, Denmark) zur Verfügung gestellt wurde.

**Tab. 3: Verwendete Antikörper**

Name	Peptid	Kopplung	Verdünnung	Literatur
anti-hTFF3-3	FKPLQEAECTF (AS 49-59)	KLH	1:1000	Wiede <i>et al.</i> 1999
anti-hFCGBP	AS-Reste 289-417 (UniProtKB/Swiss-Prot Q9Y6R7)	-	1:2000	Sigma-Aldrich (HPA003564)
anti-Kaninchen (H+L)	-	Peroxidase	1:4000	Vector Laboratories (PI-1000)

### 2.1.4 Datenbanken

Zur Literatursuche und Analyse von Proteinsequenzen wurden die aufgeführten Datenbanken im Internet benutzt:

NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide>)

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

UniProt (Universal Protein Resource; <http://www.uniprot.org>)

ExPASy (**Expert Protein Analysis System**; <http://www.expasy.ch>)

CBS (Center for biological sequence analysis; <http://www.cbs.dtu.dk>)

## 2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.1 Proteinextraktion aus humanem gastrointestinalem Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die mechanische Lyse zurückgegriffen. Dabei werden im Rahmen einer Schüttelmethode Scherkräfte verursacht, die zu einer Fragmentierung der Zellen im Gewebe führen. Pro Ansatz wurden 0,5 - 0,8 g

Gewebe für analytische Aufreinigungen und 2,5 - 3,5 g Gewebe für präparative Aufreinigungen aufgeschlossen. Zum Gewebeaufschluss wurde das Gewebe gekühlt, mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit dem 4-fachen Volumen (w/v) Extraktionspuffer (Tab. 4) und 50 µL/mL Proteaseinhibitor-Mix (Complete, EDTA-free; Roche, Mannheim, Germany) in entsprechende 2 mL Reaktionsgefäße gefüllt. Nach Abkühlung in flüssigem Stickstoff wurde die Suspension mit dem Homogenisator Precellys 24 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) aufgeschlossen (2x20 s, 6800 rpm, 30 s Pause). Anschließend wurde die Suspension bei 16.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der entstandene Überstand zur Entfernung interferierender unpolarer Substanzen mit der gleichen Menge Chloroform versetzt und kurz geschüttelt. Daraufhin wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand als Extrakt für die anschließenden Analysen abgenommen.

**Tab. 4: Zusammensetzung des Extraktionspuffers (500mL)**

1 M Tris/HCl pH 8,0	10	[mL]
4 M NaCl	3,75	[mL]
deion. Wasser	ad 500	[mL]

vor Auffüllen mit deion. Wasser pH auf 8,0 mit HCl eingestellt

### 2.2.2 Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Der entstandene Proteinextrakt wurde anschließend nach Molekulargewichtsunterschieden getrennt. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einem stationären Sephadexgel und dem umgebenden Medium. Entscheidend dabei ist der hydrodynamische Radius („Stokesradius“) des Moleküls in Lösung. Dazu wurden für analytische Trennungen 2 mL Extrakt über eine Sephadex G-200 (Fluka, Taufkirchen, Germany) Glas-Säule (270x15 mm, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei 4°C fraktioniert. Als Elutionspuffer dienten 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 30 mM NaCl, 0,5 mM Benzamidin-Hydrochlorid, 0,1 mM Pefabloc SC und 1 µg/mL Leupeptin (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland). Die von der peristaltischen Schlauchpumpe Ismatec REGLO Digital MS-2/6 (IDEX Health and Science GmbH, Wertheim, Deutschland) erzeugte Fließgeschwindigkeit betrug 0,15 mL/min, der Fraktionssammler Modell 2110 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde auf 9 min/Fraktion eingestellt. Das Elutionsprofil wurde mit Hilfe des EM-1 Econo UV-Monitors (Sensibilität 0,2; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei 280 nm verfolgt und mit dem Schreiber Rec 111

(0,2 mm/min, GE Healthcare, München, Deutschland) dokumentiert. Die Fraktionen (je 1,35 mL) wurden gesammelt und für weitere Analysen bei -20°C gelagert. Für präparative Trennungen wurden auf eine größere Säule (280x50 mm) zurückgegriffen, auf der 10-15 mL Extrakt aufgetragen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,752 mL/min fraktioniert wurde (9 min/Fraktion). Die Fraktionen (je 6,8 mL) wurden aliquotiert und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

### **2.2.3 Proteinreinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie**

Das Grundprinzip der Ionenaustausch-Chromatographie (IC) beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung der Ladungen an der Oberfläche von Proteinen in Lösung mit den entgegengesetzten Ladungen der Säulenmatrix. Die Matrix trägt positiv (Anionenaustauscher) oder negativ geladene Gruppen (Kationenaustauscher). Das Ausmaß und die Stärke der Bindung eines Proteins an dem Ionenaustauscher hängen von pH und Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen auf der Matrix ab (Rossomando 1990, Choudhary und Horvath 1996).

Die nach der Größenausschlusschromatographie mittels Westernblot identifizierten TFF3-positiven Fraktionen wurden im nächsten Schritt mit Hilfe des ÄKTA™-FPLC Systems (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) weiter gereinigt. Dazu wurde eine Resource Q6 Säule (16x30 mm, Anionenaustauscher; Amersham Biosciences) benutzt. Die injizierte Probe wurde mit einem Salzgradienten von 20 mM Tris/HCl pH 8.0 (Puffer A) auf 20 mM Tris/HCl pH 8.0 + 1 M NaCl (Puffer B) getrennt. Dabei betrug die Fließgeschwindigkeit 6 mL/min. Das Elutionsprofil wurde konstant durch Absorptionsmessungen bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen (je 1 mL) wurden für die folgenden Analysen gesammelt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

### **2.2.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE gehört zu den elektrophoretischen Verfahren. Dabei wandern geladene Teilchen in einem elektrischen Feld. Die unterschiedlichen Ladungen und Größen der Teilchen sind für die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit verantwortlich. Als Matrix dient das Polyacrylamidgel (PAA-Gel). Die Wanderung der Teilchen wird in dieser porösen Matrix je nach ihrer Größe unterschiedlich verzögert, sodass die Auftrennung letztlich von der Größe und Ladung des Teilchens abhängig ist. Dieser Vorgang wird auch als Molekularsiebeffekt bezeichnet.

SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) stellt ein anionisches Detergens dar, welches die (negativen) Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit (1,4 g SDS/g Protein) gebildet werden. Zur Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS gekocht, sodass die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen denaturiert wird. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen können durch Zugabe von reduzierenden Thiol-Verbindungen wie Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgespalten werden, wodurch jedoch auch Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbunden werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). So entstehen SDS-Proteinkomplexe, deren stark negative Ladungen dem Molekulargewicht von Proteinen proportional sind. Der entstandene Komplex wandert im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem „Stokesradius“ und somit etwa nach ihrer relativen Molekülmasse ( $M_r$ ) auftrennt.

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer  $M_r$  wurde die vertikale, diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli (1970) durchgeführt. Dabei besteht das Gel aus zwei Abschnitten: dem grobporigen Sammelgel (Tab. 5), das die Proteine fokussiert und dem feinporigen Trenngel (Tab. 6). Zusätzlich werden verschiedene Puffer (Sammelgel- und Trenngelpuffer) mit unterschiedlichen pH-Werten miteinander kombiniert. Der pH-Wert des Sammelgelpuffers liegt mit 6,8 sehr nahe am isoelektrischen Punkt von Glycin im Elektrophoresepuffer, wodurch es zu Beginn der Elektrophorese eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität besitzt und als Folge-Ion fungiert. Die Chlorid-Ionen in den Gelpuffern haben hingegen eine sehr hohe Mobilität und fungieren als Leit-Ionen. Trägt man nun das zu analysierende Proteingemisch auf das grobporige Sammelgel auf, liegen die elektrophoretischen Mobilitäten der Protein-Ionen zwischen denen der Leit- und Folge-Ionen. Legt man in diesem diskontinuierlichen System ein elektrisches Feld an, beginnen alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern, ein Prozess der als Isotachophorese bezeichnet wird (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Zur Herstellung des Elektrophorese- (Tab. 8) und Probenpuffers (Tab. 7) und der Sammel- und Trenngele wurden die in den entsprechenden Tabellen aufgeführten Zusammensetzungen benutzt. Zur praktischen Durchführung wurden ein vertikales Elektrophoresesystem (Mini-Protean<sup>®</sup> 3, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und ein Netzgerät zur Stromversorgung (Heinzinger Economy Line

LNG 35006, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) benutzt. Für die Herstellung der Gele wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen (ca. 4,5 cm Höhe) und mit etwa 200 µL Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel aufgegossen (ca. 0,5 cm). Durch die Zugabe von Isopropanol wird eine noch schärfere Trennung zwischen Sammel- und Trenngel gewährleistet. Zu beachten ist auch, dass die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) erst kurz vor dem Gießen der Gele erfolgt. Da Sauerstoff zum Kettenabbruch der Polymerisation führt, ist das Gießen der Gele in einem vertikalen System notwendig. Zur Probenvorbereitung wurden entweder 10 µL Rohextrakt oder 37,5 µL einer Fraktion nach einer chromatographischen Trennung mit 12,5 µL reduzierendem bzw. nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt und wenn nötig mit Extraktionspuffer auf 50 µL aufgefüllt. Als Molekulargewichtsmarker wurden der peqGOLD Protein-Marker I (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland, 116,0 kDa ( $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli*), 66,2 kDa (Serumalbumin aus Rinderblut), 45,0 kDa (Ovalbumin aus Hühnereiern), 35,0 kDa (Laktat-Dehydrogenase aus Schweinemuskeln), 25,0 kDa (*Bsp 98I* aus *E. coli*), 18,4 kDa ( $\beta$ -Laktoglobulin aus Kuhmilch) und 14,4 kDa (Lysozym aus Hühnereiern)) oder der All Blue-Marker (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa) verwendet. Ein gleichmäßiges Volumen in allen aufgetragenen Fraktionen ist Grundvoraussetzung für eine gleichmäßige elektrophoretische Mobilität der Proben. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung für 5 min in einem Wasserbad gekocht, sofort auf Eis gestellt und vor dem Auftragen kurz abzentrifugiert. Der Gellauf wurde zunächst bei 85 V gestartet bis die Proteine sich am Beginn des Trenngels gesammelt hatten. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht und solange durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel für den Nachweis und die Quantifizierung der getrennten Proteine verwendet.

**Tab. 5: Zusammensetzung des Sammelgels für 2 Gele**

<b>Sammelgel</b>	<b>6%</b>	
deion. Wasser	9,00	[mL]
4 x Sammelgelpuffer	3,125	[mL]
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	3,125	[mL]
20% SDS (w/v)	0,125	[mL]
TEMED	12,5	[ $\mu$ L]
20% APS (w/v)	125	[ $\mu$ L]

4 x Sammelgelpuffer (500 mL): 60,57 g Tris (1 M); auf pH 6,8 mit HCl eingestellt

**Tab. 6: Zusammensetzung des Trenngels für 2 Gele (20 mL)**

<b>Trenngel</b>	<b>15%</b>	<b>7,5%</b>	
deion. Wasser	6,2	11,2	[mL]
4 x Trenngelpuffer	3,8	3,8	[mL]
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	10,0	5,0	[mL]
TEMED	8	8	[ $\mu$ L]
20% APS (w/v)	80	80	[ $\mu$ L]

4 x Trenngelpuffer (500 mL): 90,86 g Tris (1,5 M) + 10 mL 10%iges (w/v) SDS; vor SDS Zugabe auf pH 8,8 mit HCl eingestellt; Zugabe von TEMED und APS erfolgt unmittelbar vor dem Gießen

**Tab. 7: Zusammensetzung des reduzierenden Probenpuffers (10 mL)**

0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,5	[mL]
Glycerol	2,0	[mL]
10% SDS (w/v)	4,0	[mL]
0,1% Bromphenolblau (w/v)	0,5	[mL]
2-Mercaptoethanol	0,5	[mL]
deion. Wasser	0,5	[mL]

Für nicht reduzierenden Probenpuffer wird anstatt 2-Mercaptoethanol 0,5 mL deion. Wasser verwendet

**Tab. 8: Elektrophoresepuffer nach Lämmli**

Tris	3,03	[g]
Glycin	14,25	[g]
20% SDS (w/v)	5	[mL]
deion. Wasser	ad 1000	[mL]

### 2.2.5 SDS-Agarose-Gelelektrophorese (SDS-AgGE)

Für die Trennung hochmolekularer Proteine unter nicht denaturierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurden horizontale Agarosegele verwendet. Diese sind relativ großporig und ideal zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 500 kDa (Lottspeich und Zorbas, 1998). Da vor allem Glykoproteine erfahrungsgemäß nicht optimal in Agarosegelen laufen und so genannte „Schlieren“ hinterlassen, hat sich die Zugabe von geringen SDS-Konzentrationen (0,1% SDS) bewährt. Die Methode wurde nach Thornton *et al.* (1994) durchgeführt. Zur praktischen Durchführung der Elektrophorese wurde ein horizontales Gelsystem (Agagel Maxi, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) und ein Netzgerät zur Stromversorgung (Heinzinger Economy Line LNG 35006,

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verwendet. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2,5 g Agarose in 250 mL Laufpuffer (Tab. 9) vorsichtig in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg, Deutschland) erwärmt, ohne die Suspension überkochen zu lassen. Zur Vermeidung von Bläschenbildung wurde die Suspension etappenweise in der Mikrowelle erhitzt und anschließend, nach kurzer Abkühlung auf dem Taumelschüttler (Heidolph Polymax 1040, Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland), in der horizontalen Gelkammer erstarren gelassen. Zur Probenvorbereitung wurden 22,5 µL von TFF3-positiven Fraktionen der voran gegangenen chromatographischen Trennungen mit Probenpuffer (Laufpuffer (Tab. 9) mit 30% Glycerin und etwas Bromphenolblau) auf 30 µL aufgefüllt und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde der All Blue-Marker (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) verwendet. Nach Befüllen der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (Tab. 9) wurde das erstarrte Agarosegel mit den Proben beladen und die Elektrophorese bei 40 V für 6,5 h durchgeführt. Anschließend wurden die im Gel getrennten Proteine mittels Kapillarwirkung auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 79, Whatman, Dassel, Deutschland) transferiert und durch Western-Blot immundetektiv visualisiert (siehe Kap. 2.2.6).

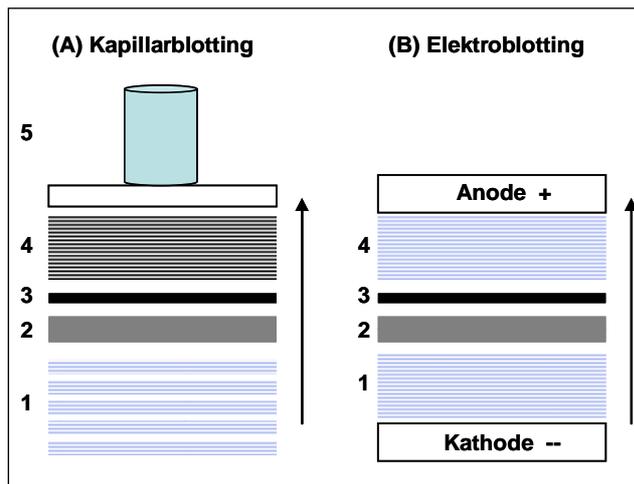
**Tab. 9: Zusammensetzung des Laufpuffers der SDS-AgGE (2000 mL)**

Tris	9,7	[g]
EDTA	0,74	[g]
20% SDS (w/v)	10	[mL]
deion. Wasser	ad 2000	[mL]

Vor Zugabe von SDS wurde der pH-Wert mit Eisessig auf 8,0 eingestellt

### 2.2.6 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung der zu untersuchenden Proteine wurden die auf Nitrocellulose transferierten Proteine immundetektiv visualisiert. Der Begriff „Western Blot“ bezieht sich auf ironische Art und Weise auf eine 1971 von E. Southern erfundene Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit anschließender Hybridisierung, dem sogenannten Southern-Blot. In Anlehnung an diesen Namen entstand für die Auftrennung von RNA-Fragmenten der Begriff Northern-Blotting und für den Proteintransfer mit anschließender Immundetektion der Begriff des Western-Blotting. Diese Methode wurde 1979 von Towbin und Renard eingeführt (Lottspeich und Zorbas, 1998).



**Abb. 3** (nach Lottspeich und Zorbas, 1998): Methoden für den Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen. **(A):** Kapillarblotting (1): Ein mit Transferpuffer getränkter Filterpapierstapel, der auch in einer Wanne mit Puffer liegen kann; (2): Gel mit aufgetrennten Proteinen; (3): Nitrocellulosemembran, auf welche die Proteine durch den kapillaren Sog des nicht feuchtigkeitsgesättigten Filterpapierstapels in (4) transferiert werden. (5): Das Gewicht auf einer Glasplatte sorgt für gleichmäßigen Kontakt. **(B):** Elektroblootting (1): Kathode mit in Transferpuffer getränktem Filterpapier; (2) und (3): wie beim Kapillarblotting; (4): Anode mit in Transferpuffer getränktem Filterpapier.

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektroblootting, die durch die SDS-AgGE aufgetrennten Proteine wurden durch Kapillarblotting auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 79, Whatman<sup>®</sup>, Dassel, Deutschland) transferiert und durch anschließende Fixierung auf der Membran immobilisiert. Ein Schema zur Veranschaulichung beider Methoden ist in Abb. 3 dargestellt. Für das Elektroblootting wurde ein 20x20 cm Semi-Dry-Blotter mit einer Platin beschichteten Titan-Anode und einer rostfreien Edelstahl-Kathode (biostep<sup>®</sup> GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) verwendet, wobei die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern und an der Nitrocellulosemembran durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Bei der „semi-dry“-Blotting-Methode liegen Gel und Membran zwischen puffergetränkten Filterpapieren, wobei der Aufbau selbst nicht von Puffer umgeben ist. Für das Kapillarblotting wurde eine Anordnung entsprechend a verwendet und die Übertragung der aufgetrennten Proteine über Nacht in Transferpuffer (Tab. 10) durchgeführt. Hier beruht der Protein-Transfer auf den entstehenden Kapillarkräften. Für beide Methoden wurde als Filterpapier das Gel-Blotting-Papier BF2 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) verwendet. Für das Elektroblootting wurden drei Lagen in Transferpuffer (Tab. 11) getränktes Filterpapier und die mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran auf die Titan-Anode gelegt. Das Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei so auf der Membran positioniert, dass bei der Übertragung die Proteine auf der Membran in derselben geometrischen Anordnung erscheinen, wie sie nach Auftrennung im Gel vorliegen. Auf das Gel wurden wieder drei in Transferpuffer getränkte Blätter Filterpapier gelegt und die Apparatur durch Auflegen der Edelstahl-Kathode geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte für 1-1,5 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Zur Kontrolle der Übertragungseffizienz der Proteine wurde die Membran kurz mit Ponceau S-Lösung (Tab. 12) behandelt. Dabei

handelt es sich um einen Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen bindet und leicht mit Wasser abwaschbar ist. Die gleichmäßige Verteilung der Proteinbanden qualifizierte die Membran zur Immundetektion. Zusätzlich konnten die Proteinmarkerbanden gekennzeichnet und die Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten werden.

**Tab. 10: Zusammensetzung des Transferpuffers für den Kapillarblot (2000 mL)**

NaCl	70,13	[g]
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	35,29	[g]
deion. Wasser	ad 2000	[mL]

**Tab. 11: Zusammensetzung des Transferpuffers für den Elektrobplot (2000 mL)**

Tris	11,62	[g]
Glycin	5,86	[g]
20% SDS (w/v)	3,7	[mL]
abs. Methanol	400	[mL]
deion. Wasser	ad 2000	[mL]

ergibt pH-Wert von ca. 8,8

**Tab. 12: Zusammensetzung der Ponceau S-Lösung**

Ponceau S	1,0	[g]
Trichloressigsäure	15	[g]
deion. Wasser	ad 500	[mL]

### 2.2.6.1 Immundetektion

Zur Identifikation eines elektrophoretisch aufgetrennten Proteins wurde ein immunologischer Nachweis mittels einer spezifischen Antikörperreaktion angewendet. Dabei bindet zuerst ein antigenspezifischer Primärantikörper das entsprechende antigene Epitop des Proteins. Anschließend bindet der Enzymgekoppelte Sekundärantikörper an die Fc-Region des primären Antikörpers und ermöglicht eine visualisierende Detektion. Dabei wird durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HPR, horseradish peroxidase) eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Bei der Chemilumineszenz gehen Atome in den angeregten Zustand über und geben bei Rückführung in den Grundzustand Energie in Form von Lichtquanten ab. Durch Reaktion einer alkalischen Luminollösung mit Wasserstoffperoxid entsteht Stickstoff sowie das Aminophthalat-Dianion im angeregten Zustand, welches unter Abgabe von Licht wieder in den Grundzustand übergeht. Bei der Umsetzung von Luminol katalysiert die HPR die Umsetzung in seine oxidierte Form, bei der die Lumineszenz detektiert werden kann. Die bei der Reaktion emittierten Wellenlängen bei ~428 nm können dann mit einer CCD („Charge-coupled Device“) Kamera detektiert werden. Diese

Methode wird auch als ECL-Färbung (enhanced chemiluminescence) oder chemiluminometrische Detektion bezeichnet.

Dazu wurden zuerst die durch den Western Blot auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine auf der Membran durch Behandlung mit 0,2% Glutaraldehyd in 1x PBS (Tab. 13) für 30 min fixiert (immobilisiert). Nachdem die Membran für 2x5 min in 1x PBS-T (Tab. 14) und 1x5 min in 1x TBS-T (Tab. 15) gewaschen wurde, erfolgte die Blockierung möglicher unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran mit 1% Rinder-Serum-Albumin (BSA) und 1% Trockenmilch in 1x TBS-T für 60 min. Anschließend wurde die Membran für 60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Tab. 3) in 7,5 mL TBS-T inkubiert. Nach erneuten Waschschritten für 3x5 min in 1x TBS-T wurde die Membran für 1 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in 7,5 mL 1x TBS-T inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut für 2x10 min in 1x TBS-T gewaschen und für die ECL-Färbung vorbereitet. Dazu wurden pro Membran 2,5 mL ECL-Lösung 1 mit 2,5 mL ECL-Lösung 2 (Tab. 16) vermischt und für 2 min auf die Membran aufgetragen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die nun Licht emittierenden Proteinbanden mit dem Geldokumentationsgerät GeneGnome (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) visualisiert. Dabei wurden Expositionszeiten von 5x2 min eingesetzt.

**Tab. 13: Zusammensetzung von 1xPBS (2000 mL)**

Dinatriumphosphat	2,3	[g]
Kaliumdihydrogenphosphat	0,5	[g]
Natriumchlorid	18,0	[g]
deion. Wasser	ad 2000	[mL]

Kaliumdihydrogenphosphat zuletzt lösen; pH-Wert-Einstellung auf 7,4 mit NaOH vor Auffüllen auf 2000 mL

**Tab. 14: Zusammensetzung von 1xPBS-T (1000 mL)**

1x PBS	999	[mL]
Tween 20	1	[mL]

**Tab. 15: Zusammensetzung von 1xTBS-T (2000 mL)**

Tris	4,84	[g]
Natriumchlorid	17,52	[g]
Tween 20	2	[mL]
deion. Wasser	ad 2000	[mL]

pH-Wert-Einstellung auf 7,2 mit HCl vor Tween 20 Zugabe und Auffüllen auf 2000 mL

**Tab. 16: Zusammensetzung der ECL-Lösungen (je 10 mL)**

Lösung 1	250 mM Luminol (44,29 g/L)	100	[ $\mu$ L]
	90 mM p-Cumarsäure (14,77 g/L)	44	[ $\mu$ L]
	1 M Tris/HCl pH 8,5	1000	[ $\mu$ L]
	deion. Wasser	8856	[ $\mu$ L]
Lösung 2	30% Wasserstoffperoxid (w/v)	6,1	[ $\mu$ L]
	1 M Tris/HCl pH 8,5	1000	[ $\mu$ L]
	deion. Wasser	8993,9	[ $\mu$ L]

### 2.2.6.2 Semiquantitative Westernblotanalyse

Nach densitometrischer Analyse der Westernblots erfolgte die semiquantitative Auswertungen mit Hilfe der GeneTools Gel-Analyse-Software (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England). Dazu wurde die Quantifizierung der visualisierten Bandenintensitäten der untersuchten Fraktionen in Bezug zu einer Referenzprobe gestellt und graphisch dargestellt.

### 2.2.7 Silberfärbung

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteinbanden wurde die Silberfärbung eingesetzt. Dieser sehr sensitive Proteinnachweis (Nachweisgrenze ca. 0,1-1 ng/Bande) wurde nach der SDS-PAGE im Polyacrylamidgel durchgeführt. Dabei werden die Proteine mit 10% Essigsäure und 30% Ethanol im Gel fixiert und mit Silbernitratlösung behandelt. Bei der Silberfärbung bildet das  $\text{Ag}^+$ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine.

**Tab. 17: Protokoll zur Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987)**

Schritt	Lösung	Dauer
Fixierung	40% Ethanol, 10% Eisessig, 50% deion. Wasser (400 mL abs. Ethanol + 100 mL Eisessig; ad 1000 mL mit deion. Wasser)	>1 h
Waschen	30% Ethanol, 70% deion. Wasser (300 mL abs. Ethanol, ad 1000 mL mit deion. Wasser)	2x20 min
Waschen	deion. Wasser	1x20 min
Sensibilisierung	0,02% Natriumthiosulfat (200 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ , ad 1000 mL mit deion. Wasser)	1 min
Waschen	deion. Wasser	3x20 s
Färbung (Silber)	0,2% Silbernitrat, 0,02% Formaldehyd (37%) (2 g $\text{AgNO}_3$ + 0,2 mL Formaldehyd (37%); ad 1000 mL mit deion. Wasser)	20 min
Waschen	deion. Wasser	3x20 s
Entwicklung	3% Natriumcarbonat, 0,05% Formaldehyd (37%), 0,0005% Natriumthiosulfat (30 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$ + 0,5 mL Formaldehyd (37%) + 5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ; ad 1000 mL mit deion. Wasser)	3-5 min
Abstoppen	analog Fixierung	5 min
Waschen	deion. Wasser	3x10 min

Die Zugabe von alkalischem Formaldehyd reduziert die Komplexe zu elementarem Silber, welches als dunkle Verfärbung sichtbar wird. Das Gel wurde nach einem von Blum *et al.* (1987) beschriebenen Protokoll (Tab. 17) durchgeführt. Alle Lösungen, außer der Fixier- und Waschlösung, wurden frisch angesetzt. Das Gel wurde mit jeweils 50 mL der entsprechenden Lösung behandelt.

### **2.2.8 Coomassie-Brilliantblau-Färbung**

Coomassie-Brilliantblau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der unspezifisch an kationische und nicht-polare, hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Dabei sind die Wechselwirkungen mit den Arg-Resten, weniger die mit Lys-, His- und Trp-Resten von Bedeutung. Durch die Anlagerung kommt es vermutlich zur Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten anionischen Sulfonat-Form durch eine Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblaus in Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu von 465 zu 595 nm (Lottspeich und Zorbas 1998). Die im Vergleich zur Silberfärbung deutlich unempfindlichere Coomassiefärbung (Nachweisgrenze ca. 100 ng/Bande) wurde speziell zur Visualisierung aufgetrennter Proteinbanden verwendet, die zur massenspektrometrischen Analyse verwendet wurden. Dabei führt eine höhere Proteinkonzentration zu einer höheren Wahrscheinlichkeit das zu identifizierende Protein nachweisen zu können. Aufgrund dessen wurden die für die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung verwendeten Proben mittels Zentrifugal-Ultrafiltration konzentriert und das entstandene Retentat (Konzentrat) für die Färbung verwendet. Dazu wurden Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren mit Polyethersulfon (PES) Membranen (MWCO 3 kDa oder 100 kDa; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) unter Einsatz der Zentrifuge Universal 320R (Andreas Hettich GmbH und Co.KG Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Die Färbung wurde mit der vorgemischten Bio-Safe Coomassie G250-Färbung (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Dabei sind die benötigten Chemikalien bereits in der Lösung enthalten. Die Färbung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel zunächst in deion. Wasser gewaschen und anschließend mit der vorgemischten Bio-Safe Coomassie-Lösung behandelt, wodurch sowohl Fixierung als auch Färbung gewährleistet wurden. Zur Entfärbung wurde das Gel erneut in deion. Wasser gewaschen, wobei die Zugabe von Zellstoff die Entfärbungseffizienz

deutlich erhöhte und zu einem stärkerem Kontrast zwischen den Proteinbanden und dem unspezifisch angefärbten Hintergrund führte.

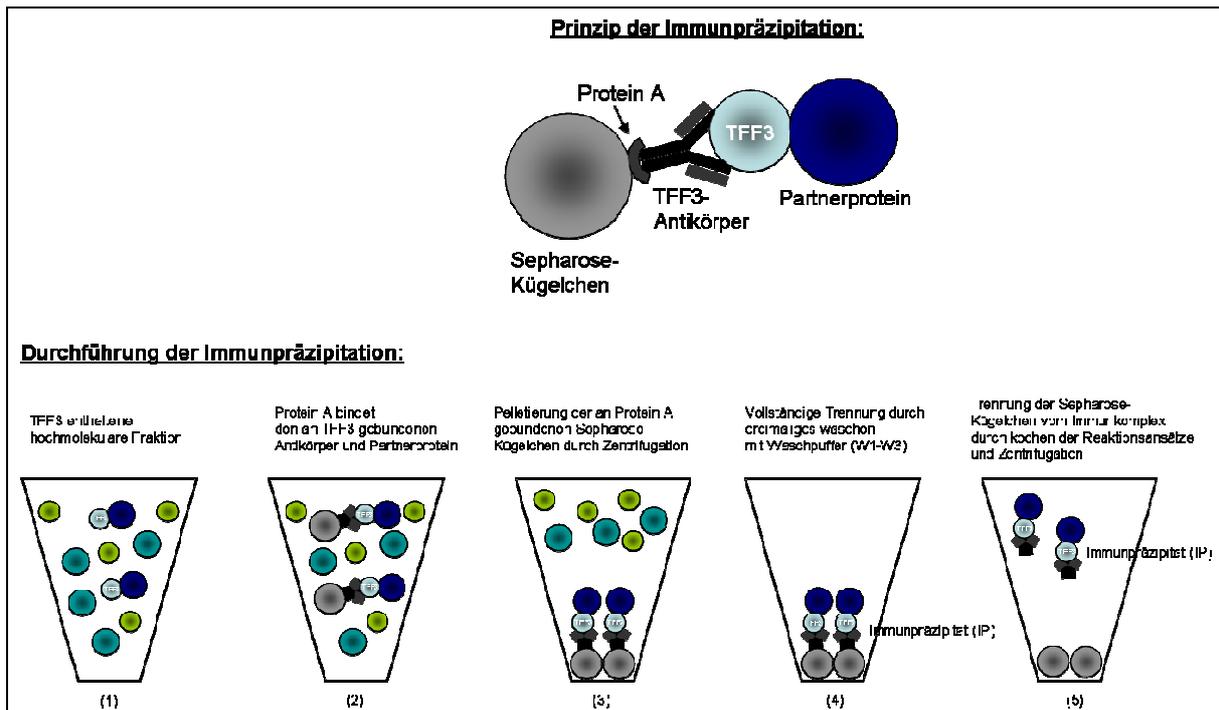
### 2.2.9 Immunpräzipitation (IP) mit immobilisiertem Antikörper

Bei der Immunpräzipitation (IP) wird der Antikörper an ein festes Substrat (z.B. Sepharosekügelchen) gekoppelt und bindet das Protein zusammen mit seinen Interaktionspartnern (Copräzipitate). Mit dieser Methode können ganze Proteinkomplexe präzipitiert und dann weiter untersucht werden.

Für die IP wurden Fraktionen verwendet, die nach der Größenausschlusschromatographie mittels Westernblot und anschließender Immundetektion positiv auf hochmolekulares TFF3 getestet wurden. Dazu wurden zunächst jeweils 0,5 mL der vereinten Fraktionen mit 1,5  $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L und 3,5  $\mu$ L affinitätsgereinigtem, polyklonalem Primär-Antikörper (anti-hTFF3-3) über Nacht bei 4°C im Mischrotor (Mischrotor 19-22 mm, Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland) inkubiert, anschließend mit 0,2 mL Protein-A Sepharose-Kügelchen (15 mg/mL) und 50  $\mu$ L/mL EDTA-freiem Proteaseinhibitor-Mix Complete versetzt und erneut über Nacht bei 4°C im Mischrotor inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz bei 16.000 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand (W1) zur Kontrolle der Bindungskapazität mittels Westernblot entnommen und das Immunpräzipitat (IP) anschließend zum Waschen erneut mit 0,6 mL Waschpuffer (Tab. 18) versetzt, leicht gevortext (Vortex-Genie<sup>®</sup> 1, Scientific Industrie Si), erneut zentrifugiert und der Überstand entnommen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt (W2-W3) und durch Westernblot kontrolliert. Anschließend wurde das gewaschene Immunpräzipitat mit 0,2 mL Inkubationspuffer (Tab. 18) versetzt und zum Lösen der Sepharose-Kügelchen von dem entstandenen Immunkomplex für 5 min gekocht. Nach kurzem Vortexen wurden die Sepharose-Kügelchen durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 1 min bei 4°C vom eigentlichen Immunpräzipitat getrennt und durch anschließenden Westernblot mit Immundetektion analysiert. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 4.

**Tab. 18: Zusammensetzung des Inkubations- und Waschpuffers (500 mL)**

1 M Tris/HCl pH 8,0	10	[mL]
4 M NaCl	3,75	[mL]
deion. Wasser	ad 500	[mL]



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der durchgeführten Immunpräzipitation

### 2.2.10 LC-ESI-MS/MS-Analyse von aus PAA-Gelen digerierten Proteinen

Die massenspektrometrischen Analysen zur Protein-Identifizierung wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch am Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln in der Abteilung Zentrale Bioanalytik durchgeführt. Die Reinigung der untersuchten Proteine habe ich am Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie (IMMC; Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg) dagegen selbst durchgeführt.

Protokoll der massenspektrometrischen Analyse:

Zur Probenvorbereitung wurden zunächst die mit Coomassie-Brilliantblau angefärbten Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße dreimal mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke mit reinem Acetonitril entwässert, in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  rehydriert und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zu den getrockneten Gelstücken wurden 10 mM Dithiothreitol in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  hinzugefügt und die Reduktion erfolgte dann für 45 min bei 56°C. Um reduzierte Cysteinreste zu alkylieren, wurde die restliche Flüssigkeit entfernt, ein 1:1-Gemisch aus 50 mM Iodacetamid in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  hinzugefügt und für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Die Gelstücke wurden nun erneut, wie oben beschrieben, gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden die Gelstücke in einer eiskalten 10 ng/ $\mu\text{L}$  Trypsin

(Sequenziergrad, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) in 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung rehydriert. Die überschüssige Trypsinlösung wurde nach 20 min auf Eis gegen 20  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung ausgetauscht und der Ansatz über Nacht bei 37°C verdaut. Der Trypsin-Verdau wurde durch die Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  10% Ameisensäure gestoppt und die entstandenen Peptide für 30 min bei 37°C extrahiert. Die Daten der Flüssigkeits-Chromatographie (LC-MS) wurden mit einem HCT ETD II Ion-Trap Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) erzeugt, welches mit einer Nano Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) ausgerüstet ist. Zur Probeninjektion wurde ein EASY nano-LC System verwendet. Das verwendete entgaste Säulensystem umfasste eine 0,1x20 mm Trap-Säule und eine 0,075x100 mm Analytik-Säule, welche beide mit ReproSil-Pur C18-AQ 5  $\mu\text{m}$  Säulenmaterial (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) vorgepackt waren. Zur Analyse wurden 5-18  $\mu\text{L}$  der Probe in die Probenschleife injiziert und die Trap-Säule mit 25  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  beladen. Zur Beladung wurde 0,1% Ameisensäure verwendet. Die Elution der Peptide erfolgte mit einem Acetonitril-Gradienten von 0-35% in 1% Ameisensäure für 20 min bei einer Säulendurchflussgeschwindigkeit von 300 nL/min. Anschließend wurde die Acetonitrilkonzentration auf der Säule für 2 min auf 100% angehoben und für zusätzliche 8 min mit 100% Acetonitril regeneriert. Die Datenerfassung der MS und Tandem-MS (MS/MS) Spektren wurde durch die Software Compass 3.0 kontrolliert. Die MS1 Scans wurden im Standard Enhanced Modus durchgeführt, wobei zunächst zur Prüfung des Systems fünf Einzelmessungen im Massenbereich von m/z 400 bis m/z 1400 durchgeführt wurden. Bis zu drei doppelt und dreifach geladene Ionen wurden für die MS/MS-Experimente als Grenzwert ausgewählt. Für die Erfassung von MS2-Scans im Massenbereich von m/z 100 bis m/z 1600 wurde der Ultrascan Modus mit drei zusätzlichen Einzelmessungen verwendet. Der Wert zur Kontrolle der Ionenladung wurde für alle Scan-Typen auf 250.000 gesetzt. Die Spektrogramme wurden mit Hilfe des Data Analysis Software Moduls (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) anhand der gewonnenen Messdaten generiert.

Zur Identifizierung der Proteine wurde mit den erhaltenen Daten ein Datenbankabgleich gestartet. Dazu wurde die SwissProt 56.9 Datenbank mit Hilfe von MASCOT 2.2 (Matrix Science Ltd., London, England) durchsucht. Die Recherchen wurden durch Proteinscape 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen,

Deutschland) übermittelt. Dazu wurden folgende Parameter eingestellt: Enzym "semi-trypsin", Species "human", festgelegte Modifikationen "carbamidomethyl", zusätzliche Modifikationen "Methionine oxidation" und fehlgeschlagene Spaltungen "1". Die Massentoleranz wurde auf 0,4 Da für Peptide und Fragmentspektren eingestellt.

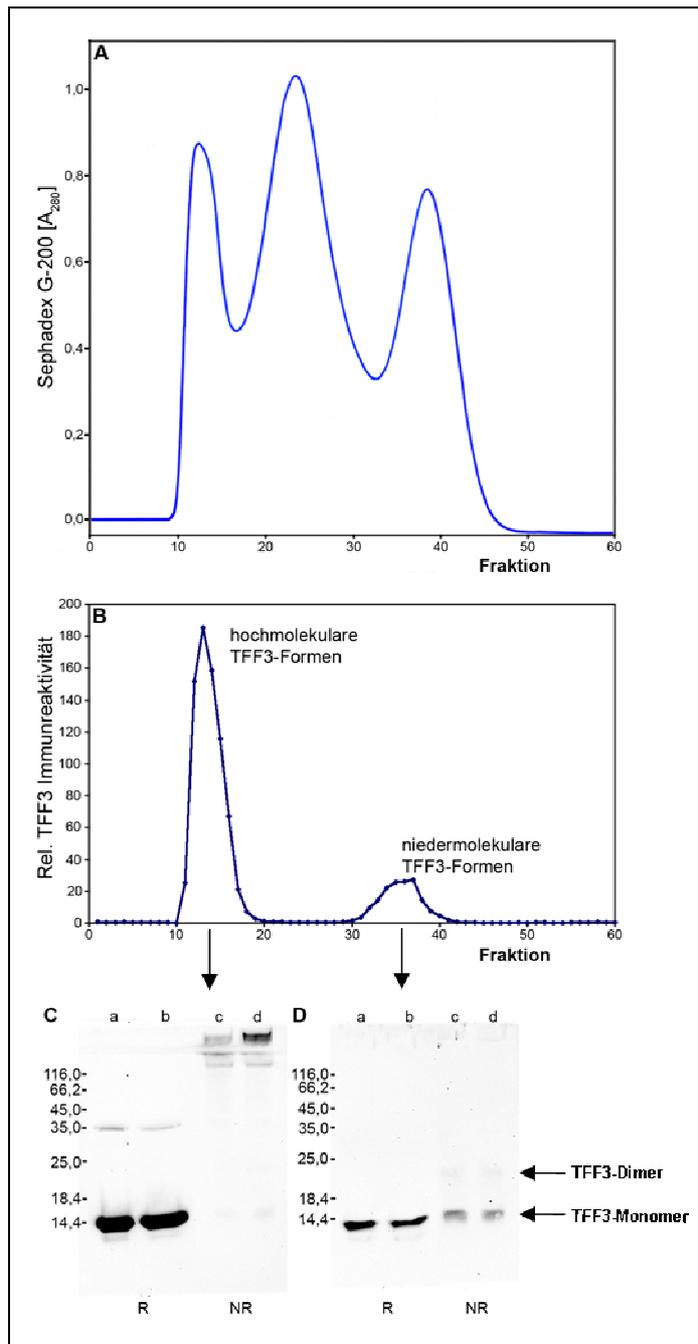
### **2.2.11 Behandlung des TFF3-FCGBP-Heteromers mit Schwefelwasserstoff**

Zum Nachweis einer möglichen reduktiven Freisetzung von TFF3 aus FCGBP durch Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) wurde das gereinigte Heteromer mit *in vitro* generiertem H<sub>2</sub>S behandelt. H<sub>2</sub>S wurde mit Hilfe eines selbst konstruierten Kipp'schen Apparats aus Eisen(II)-sulfid (FeS) und Salzsäure hergestellt. Über eine Glaskapillare wurde das Heteromer für 10 min bei Raumtemperatur mit H<sub>2</sub>S begast und anschließend für 10, 30, 60 und 120 min im Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte dann durch SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen und anschließendem Westernblot. Die Proben wurden dabei ohne vorheriges Kochen aufgetragen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 *Reinigung von humanen intestinalen TFF3-immunreaktiven Proteinen*

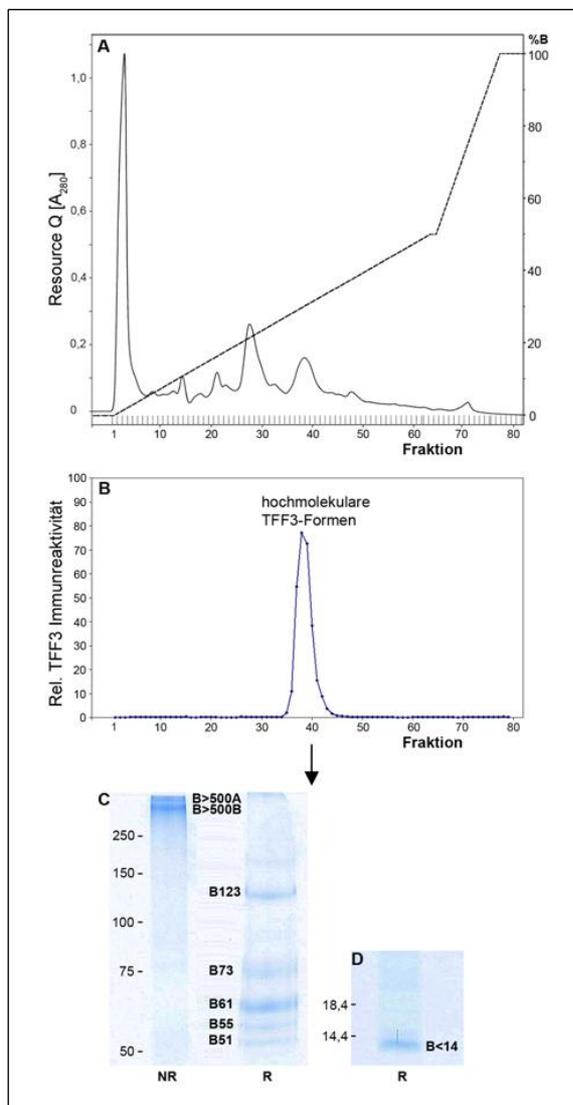
Die Proteinextrakte humaner Gewebeproben aus dem Bereich des *Colon sigmoideum* zeigten nach der Größenfraktionierung durch Größenausschlusschromatographie (Sephadex G200) unter nicht reduzierenden Bedingungen eine charakteristische Molekulargewichtsverteilung. Es konnten im Wesentlichen drei Gruppen von Proteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten fraktioniert werden. Der erste Peak kann unter anderem der hochmolekularen Muzinfraktion und die beiden folgenden Peaks den niedermolekularen Proteinen zugeordnet werden (Abb. 5A). In der anschließenden Untersuchung der einzelnen Fraktionen durch semi-quantitative Westernblotanalyse bezüglich der TFF3-Immunreaktivitäten waren zwei unterschiedliche TFF3-Formen zu erkennen (Abb. 5B). Der größte Teil der TFF3-Immunreaktivität war mit den hochmolekularen Fraktionen 11-16 (81,7%) assoziiert und nur eine kleine Menge zeigte sich in den niedermolekularen Fraktionen 31-37 (18,3%). Eine vergleichende SDS-PAGE der TFF3-enthaltenen hochmolekularen Fraktionen unter nicht reduzierenden Bedingungen und der darauf folgende Westernblot ließen eine unerwartet große relative Molekülmasse ( $M_r$ ) ( $\geq 100$  kDa) der TFF3-immunreaktiven Bande erkennen (Abb. 5C/NR). Zudem ließ sich durch Reduktion eindeutig das TFF3-Monomer freisetzen (Abb. 5C/R). Dies wies klar darauf hin, dass TFF3 hauptsächlich ein Disulfid-verknüpftes Heteromer mit einem hochmolekularen Partnerprotein bildet. Die TFF3-Immunreaktivität in den niedermolekularen Fraktionen zeigte unter nicht reduzierenden Bedingungen dagegen hauptsächlich eine dem TFF3-Monomer entsprechende Bande (Abb. 5D/NR) sowie eine schwache, dem TFF3-Dimer entsprechende Bande (Abb. 5D/NR). Der Fokus dieser Arbeit lag in der Reinigung und Identifizierung des hochmolekularen Partnerproteins von TFF3. Deshalb wurde im nächsten Schritt eine weitere Reinigung der hochmolekularen TFF3 enthaltenen Fraktionen mittels Ionenaustausch-Chromatographie (IC) durchgeführt. Um dabei mögliche vorhandene Disulfidverknüpfungen nicht zu zerstören, erfolgte die Trennung unter nicht reduzierenden Bedingungen. Ein charakteristisches Elutionsprofil der dazu verwendeten Resource Q6-Säule ist in Abb. 6A dargestellt.



**Abb.5:** Größenausschlusschromatographie humaner Kolonextrakte und anschließende Westernblot-Analyse. **(A)** Elutionsprofil bezüglich der Absorption bei 280 nm nach Gelfiltration (Sephadex G-200, 270x15 mm) eines humanen Kolonextrakts. **(B)** Verteilung der TFF3-Immunreaktivität nach semi-quantitativer Auswertung der Bandenintensitäten der Westernblot-Analyse. **(C)** 15% SDS-PAGE und anschließender Westernblot der hochmolekularen Fraktionen 13 (Spur a und c) und 14 (Spur b und d) unter reduzierenden (R) bzw. nicht reduzierenden (NR) Bedingungen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben. **(D)** 15% SDS-PAGE und anschließender Westernblot der niedermolekularen Fraktionen 35 (Spur a und c) und Fraktion 36 (Spur b und d) unter reduzierenden (R) und nicht reduzierenden (NR) Bedingungen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben.

Die Fraktionen, welche das TFF3-Heteromer enthielten, wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (R) mit anschließender semiquantitativer Westernblot-Analyse identifiziert (Abb. 6B). Die TFF3 enthaltenden Fraktionen nach IC zeigten nach Auftrennung mittels 7,5%iger SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen (NR) und anschließender Coomassie-Färbung zwei Banden im hochmolekularem Bereich (bezeichnet als B>500A und B>500B, Abb. 6C). Beide Banden wurden für eine Proteomanalyse aus dem Gel exzidiert. Des Weiteren wurden die TFF3 enthaltenden Fraktionen nach IC auch unter reduzierenden Bedingungen (R) mittels 7,5%iger und 15%iger SDS-PAGE getrennt, um TFF3 von seinem Partnerprotein freizusetzen. Dabei konnten mehrere Banden mit einer  $M_r$

zwischen 50.000 und 150.000 nach Trennung durch eine 7,5%ige SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung beobachtet werden (Abb. 6C). Dabei zeigten sich Banden mit  $M_r$  von etwa 123.000, 73.000, 61.000, 55.000 und 51.000. Des Weiteren konnte nach Trennung durch eine 15%ige SDS-PAGE eine Bande mit einem  $M_r$  von weniger als 14.000 detektiert werden (Abb. 6D). Auch diese sechs, durch Reduktion vom TFF3-Heteromer freigesetzten Proteinbanden (hier beschrieben als B123, B73, B61, B55, B51, and B<14) wurden für anschließende Proteomanalysen mittels LC-ESI-MS/MS-Analyse aus dem Gel exzidiert.



**Abb. 6:** Reinigung des hochmolekularen TFF3-Heteromers (F13-F14 nach Gelfiltration) durch Ionenaustauschchromatographie (IC) und SDS-PAGE. **(A)** Elutionsprofil bezüglich der Absorption bei 280 nm nach Resource Q6 Säulentrennung des TFF3-Heteromers mit einem Salzgradienten (gestrichelte Linie) von 20 mM Tris/HCl pH 8,0 (Puffer A) auf 20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 1 M NaCl (Puffer B). Der Prozentanteil von Puffer B ist rechts angegeben. **(B)** Verteilung der TFF3-Immunreaktivität nach IC nach semi-quantitativer Auswertung der Bandenintensitäten nach Westernblot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen in einer 15%igen SDS-PAGE. **(C)** Trennung des gereinigten TFF3-Heteromers durch 7,5%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden (NR) oder reduzierenden (R) Bedingungen mit anschließender Coomassie-Färbung. Die markierten Banden (B>500A, B>500B, B123, B73, B61, B55, and B51) wurden zur anschließenden LC-ESI-MS/MS-Analyse exzidiert. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben. **(D)** Trennung der TFF3-Heteromer enthaltenen IC-Fractionen durch 15%ige SDS-PAGE unter reduzierenden (R) Bedingungen mit anschließender Coomassie-Färbung. Die markierte Bande (B<14) wurde zur anschließenden LC-ESI-MS/MS-Analyse exzidiert. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben.

### 3.1.1 Berechnung des Stoffmengenverhältnisses von TFF3 und FCGBP

Zur Berechnung des molaren Verhältnisses von TFF3 und FCGBP wurde zuerst das Gesamtprotein beider Proteine in drei IC-gereinigten Fraktionen bestimmt, welche das TFF3-FCGBP-Heteromer enthielten. Dazu wurde zur Bestimmung der TFF3-Gesamtproteinmenge ( $1,006 \times 10^{-8}$  g;  $0,777 \times 10^{-8}$  g;  $0,57 \times 10^{-8}$  g) eine semiquantitative Auswertung in Bezug zu rekombinantem TFF3-Dimer durchgeführt. Zur Bestimmung der FCGBP-Gesamtproteinmenge ( $2,06 \times 10^{-6}$  g;  $1,99 \times 10^{-6}$  g;  $1,69 \times 10^{-6}$  g) wurden Proteinbestimmungen nach der BCA-Methode (BCA: bicinchoninic acid; Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit, Fisher Scientific) durchgeführt. Mit Hilfe der relativen Molekülmasse ( $M_r$ ) von TFF3 (theoretische  $M_r$  6.580) und FCGBP (theoretische  $M_r$  600.000) konnten nun die jeweiligen Stoffmengen (n) in den drei untersuchten Fraktionen berechnet werden. Anschließend konnte das Stoffmengenverhältnis (Stoffmenge von TFF3/ Stoffmenge FCGBP) und der Mittelwert berechnet werden. Das Stoffmengenverhältnis von TFF3/FCGBP ergab 0,37.

### 3.2 Charakterisierung des TFF3-Heteromers durch LC-ESI-MS/MS-Analyse

Die zwei aus dem nicht reduzierten Gel (B>500A and B>500B) sowie die sechs aus dem reduzierten Gel (B123, B73, B61, B55, B51 und B<14) exzidierten Banden wurden im Labor von Herrn Univ.-Prof. Dr. Hanisch einem tryptischen Verdau unterzogen und die enthaltenen Proteine anschließend durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifiziert. Die Daten wurden mit der SwissProt 56.9 Datenbank abgeglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 19 wieder, eine ausführliche Liste aller identifizierten Peptidfragmente findet sich in Tab. 20 (Anhang) wieder. Zusätzlich befindet sich im Anhang ein detaillierter Proteinreport mit den Ergebnissen der SwissProt 56.9 Datenbanksuche (siehe Kap. 7.2). Das in den zwei nicht reduzierten Banden (B>500A and B>500B) identifizierte Protein mit der höchsten Trefferquote (Score) war *IgG Fc binding protein* (FCGBP) mit einer nominellen Masse von ~600.000 (Harada *et al.* 1997), welches wie TFF3 ein Sekretionsprodukt der intestinalen Becherzellen ist. Dies ist der erste Hinweis, dass FCGBP das hochmolekulare Partnerprotein von TFF3 ist. Des Weiteren konnte das von intestinalen Becherzellen sezernierte Muzin MUC2 nachgewiesen werden.

Tab. 19: Durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine

Proteinbande	Identifiziertes Protein	UniProtKB/ Swiss-Prot	nom. Masse (kDa)	Score	Identifizierte Peptide
B>500A	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	3125,79	58
	A2MG	P01023	163,19	923,22	18
	MUC2	Q02817	539,96	497,78	13
B>500B	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	3570,85	69
	A2MG	P01023	163,19	611,12	13
	MUC2	Q02817	539,96	115,58	3
B123	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	1794,45	35
	K2C1	P04264	66,00	165,04	4
B73	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	1103,64	21
	CLCA1	A8K714	100,11	309,54	8
B61	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	1050,36	22
	IGHA1	P01876	37,63	351,70	7
B55	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	1922,25	35
	K1C10	P13645	58,79	257,27	5
B51	FCGBP	Q9Y6R7	571,64	1551,10	30
	IGHG1	P01857	36,08	148,67	5
B<14	TFF3	Q07654	8,64	137,13	3

Signifikanzwert  $P \leq 0,05$ ; FCGBP=IgG Fc binding protein; A2MG=  $\alpha$ -2-macroglobulin; MUC2=Mucin-2; K2C1=Keratin, type II cytoskeletal 1; CLCA1=Calcium-activated chloride channel regulator 1; IGH A1=Ig alpha-1 chain C region; K1C10=Keratin, type I cytoskeletal 10; IGHG1=Ig gamma-1 chain C region; TFF3=Trefoil factor 3; identifizierte Peptide siehe Kap. 7.2

Zudem wurde  $\alpha$ -2-macroglobulin (A2MG), ein von der Leber (Mäck *et al.* 2001), aber auch von Makrophagen und Fibroblasten (Bonner 1994) produziertes Plasmaprotein, identifiziert, welches vermutlich eine Kontamination der Probe darstellt.

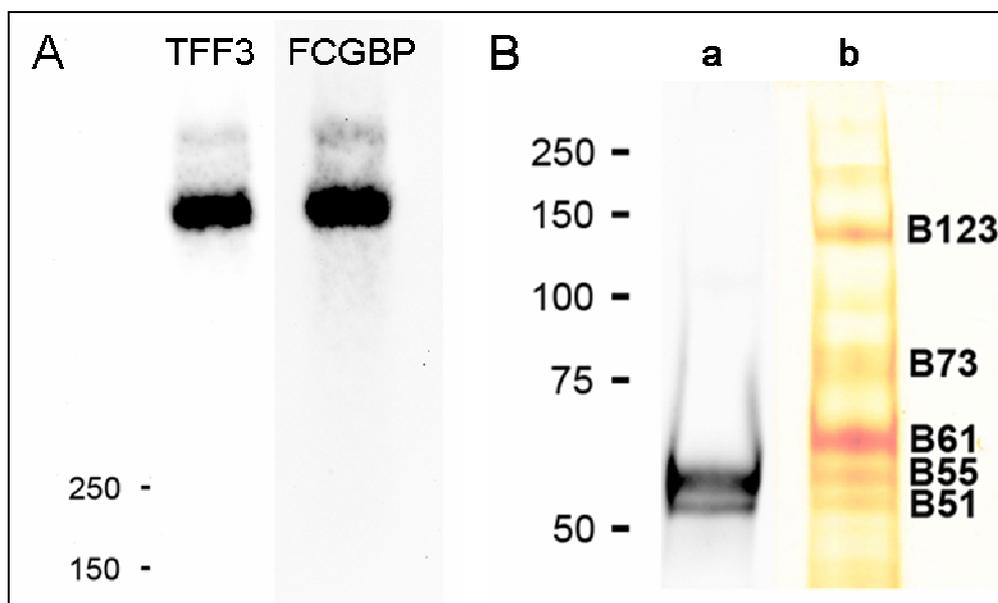
Die Analyse der sechs aus dem reduzierten Gel isolierten Proteinbanden ergab, dass nur die kleinste Bande (B<14) TFF3 Sequenzen enthielt (Score 137,13). Dagegen konnte FCGBP eindeutig mit den höchsten Trefferquoten in allen anderen Banden (B123, B73, B61, B55 und B51) identifiziert werden. Dies deutet wiederum darauf hin, dass FCGBP als hochmolekularer Partner in Frage kommt. Da die kleineren  $M_r$  der Proteinbanden B123, B73, B61, B55 und B51 nicht der  $M_r$  der vollständigen FCGBP-Sequenz entsprechen, repräsentieren diese Banden lediglich Fragmente von FCGBP. Die Lokalisation der einzelnen Banden bzw. der identifizierten Fragmente innerhalb der FCGBP-Sequenz ist in Kap. 7.2.1 dargestellt. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Bande B123 vorwiegend C-terminale FCGBP-Sequenzen, die Banden B73 und B61 interne Sequenzen und B55 sowie B51 hauptsächlich N-terminale FCGBP-Sequenzen enthält. Darüber hinaus konnte in Bande B73 zusätzlich CLCA1 (calcium-activated chloride channel regulator 1) identifiziert werden (Score 309,54), welches wahrscheinlich eine sekretorische metallabhängige Hydrolase repräsentiert, die ein Bestandteil von Muzingranulae intestinaler Becherzellen ist (Gruber *et al.* 1998, Pawlowski *et al.* 2006). Die meisten analysierten

Banden enthielten zusätzlich Fragmente unterschiedlicher Isoformen von Cytokeratinen, welche typische Kontaminationen darstellen.

### 3.3 Charakterisierung des TFF3-Heteromers durch Westernblot-Analyse

Um herauszufinden, ob FCGBP das Disulfid-verknüpfte Partnerprotein von TFF3 ist, wurde mit FPLC-gereinigtem TFF3-Heteromer eine SDS-Agarose-Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen mit anschließender Westernblot-Analyse durchgeführt. Dabei reagierten sowohl der anti-hTFF3 als auch der anti-hFCGBP Antikörper mit identischen Proteinbanden mit einer  $M_r$  von weit über 250.000. Dieses Ergebnis weist klar darauf hin, dass TFF3 und FCGBP ein hochmolekulares Heteromer bilden (Abb. 7A).

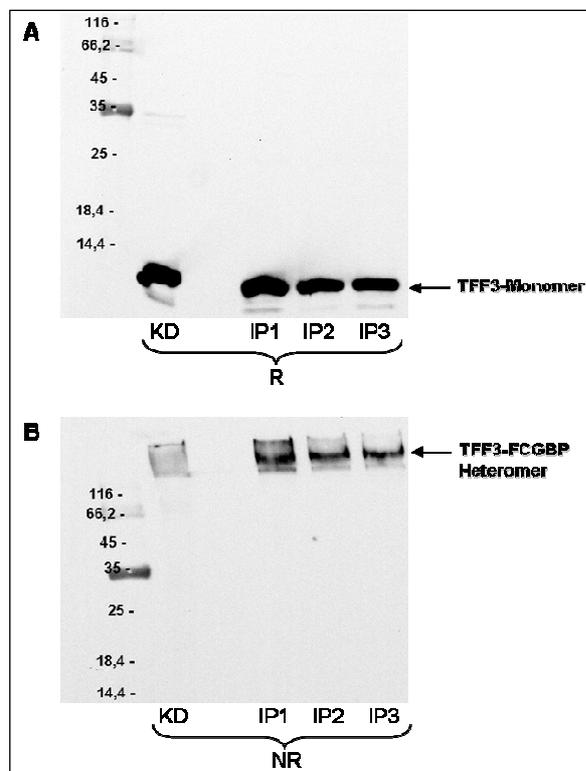
Darüber hinaus wurde das gereinigte TFF3-Heteromer einer reduzierenden SDS-PAGE und unter Verwendung des anti-hFCGBP Antikörpers einem anschließenden Westernblot unterzogen. Dabei erkannte der Antikörper sehr spezifisch zwei Banden, welche über eine vergleichende Silberfärbung als B51 und B55 identifiziert werden konnten (Abb. 7B).



**Abb. 7:** Charakterisierung des gereinigten TFF3-Heteromers. **(A)** Trennung des TFF3-FCGBP-Heteromers durch 1% SDS-Agarose-Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3-Antiserums sowie des kommerziellen anti-hFCGBP-Antiserums (HPA003564). **(B)** Spur a: Trennung des TFF3-FCGBP-Heteromers durch 7,5%ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des anti-hFCGBP Antiserums (HPA003564). Spur b: Silberfärbung einer Parallelbahn. Die im Vorfeld durch LC-ESI-MS/MS-Analyse charakterisierten Banden B123, B73, B61, B55 und B51 (siehe Tab. 19) sind gekennzeichnet. Der Molekulargewichtsstandard ist jeweils links angegeben.

### 3.4 Immunpräzipitation (IP) mit immobilisierten Antikörpern

Zur Verifizierung der Präsenz des TFF3-FCGBP-Heteromers im Kolon konnte aus hochmolekularen Fraktionen nach Gelfiltration TFF3 mit Partner immunpräzipitiert werden. Nach Trennung der Immunpräzipitate durch SDS-PAGE und anschließender Westernblot-Analyse konnte sowohl das TFF3-Monomer als auch das TFF3-Heteromer nachgewiesen werden (Abb. 8). Dazu wurden jeweils drei Reaktionsansätze analysiert. Die entstandenen Immunpräzipitate (IP1-3) zeigten nach der Westernblot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen die Präsenz des TFF3-Monomers (Abb. 8A). Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte das TFF3-Heteromer nachgewiesen werden (Abb. 8B).

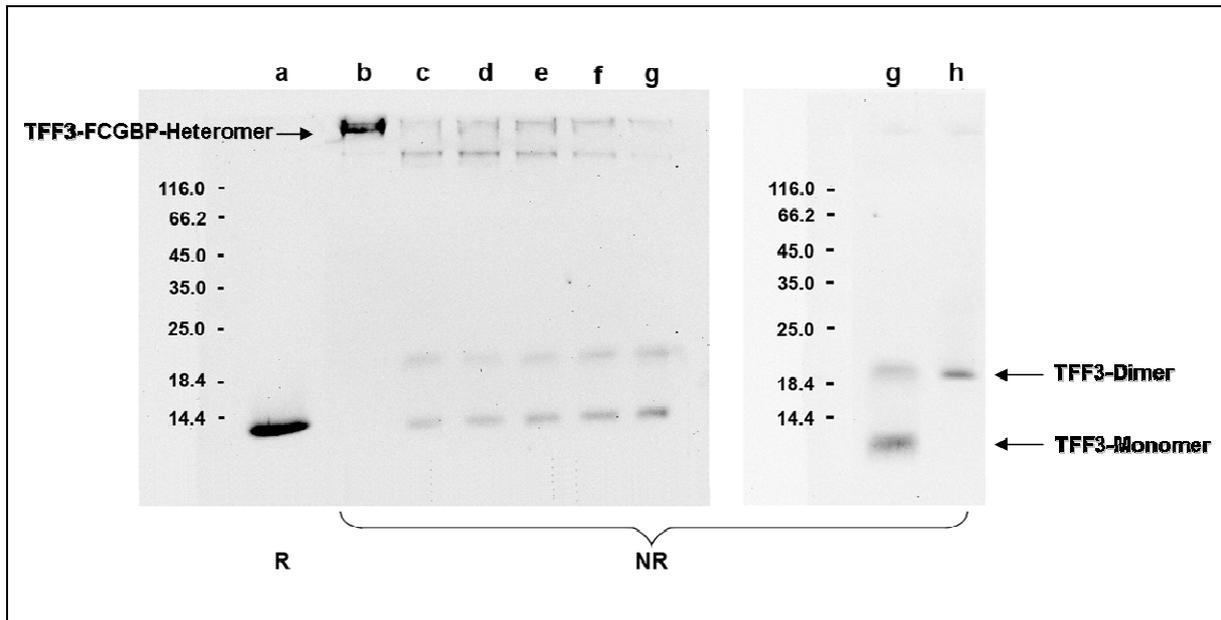


**Abb. 8:** Immunpräzipitation hochmolekularer Fraktionen nach Gelfiltration mit Hilfe des affinitätsgereinigten polyklonalen Primär-Antikörpers anti-hTFF3-3. **(A)** Trennung der Immunpräzipitate (IP1-3) unter reduzierenden (R) Bedingungen durch 15%ige SDS-PAGE mit anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3 Antiserums. **(B)** Trennung der Immunpräzipitate (IP1-3) durch 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden (NR) Bedingungen mit anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3 Antiserums. Zur Kontrolle ist jeweils ein Kolonextrakt (KD) mit aufgetragen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben.

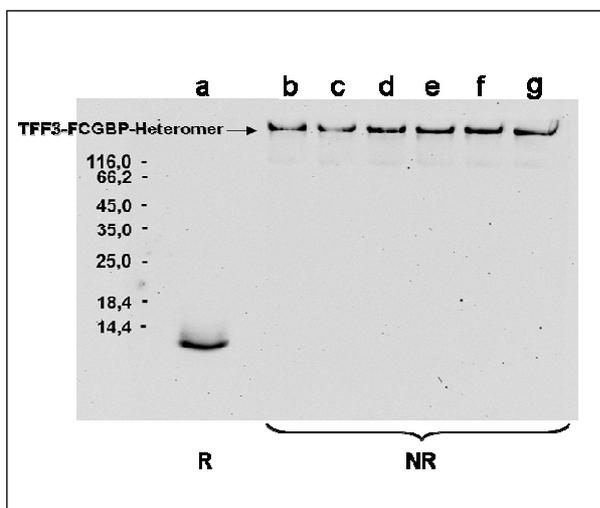
### 3.5 Reduktion des TFF3-FCGBP-Heteromers durch H<sub>2</sub>S

Im Kolon herrschen hohe Konzentrationen an H<sub>2</sub>S (Wallace *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurde gereinigtes TFF3-FCGBP-Heteromer für unterschiedliche Zeiten mit H<sub>2</sub>S behandelt, um zu prüfen, ob TFF3 auf diese Weise freigesetzt werden kann. Nach Trennung der Reaktionsansätze durch SDS-PAGE und anschließender Westernblot-Analyse konnte hauptsächlich das TFF3-Monomer nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten mit zunehmender Inkubationszeit auch geringe Mengen

an TFF3-Dimer nachgewiesen werden (Abb. 9). Demgegenüber wurde das TFF3-FCGBP-Heteromer kontinuierlich degradiert.



**Abb. 9:** Reduktion des gereinigten TFF3-FCGBP-Heteromers durch  $H_2S$ . Trennung des mit  $H_2S$  behandelten Heteromers durch 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden (NR) Bedingungen mit anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3 Antiserums. Zur Kontrolle und Darstellung des TFF3-Monomers ist die unbehandelte Ausgangsprobe unter reduzierenden Bedingungen gezeigt (Spur a). Gezeigt wird die nicht mit  $H_2S$  behandelte Ausgangsprobe (Spur b), sowie mit  $H_2S$  behandelte Proben: die bei Raumtemperatur für 10 min mit  $H_2S$  behandelte Ausgangsprobe (Spur c), sowie die mit  $H_2S$  behandelte Ausgangsprobe mit anschließender Inkubation bei  $37^\circ C$  für 10 min (Spur d), 30 min (Spur e), 60 min (Spur f) und 120 min (Spur g). Zusätzlich ist zum Vergleich 20 ng rekombinantes humanes TFF3-Homodimer aufgetragen (Spur h). Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben.

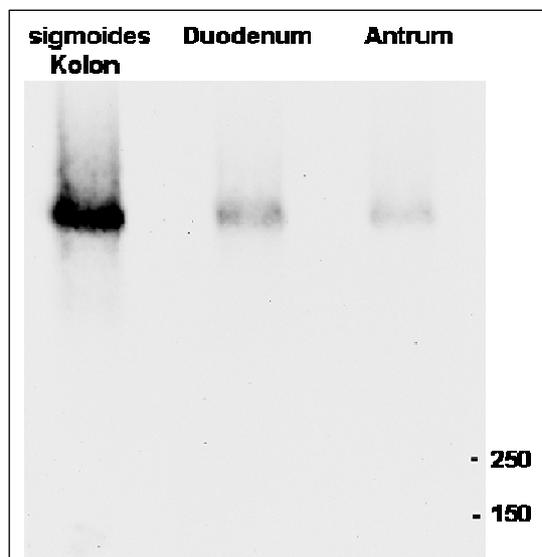


**Abb. 10:** Inkubation des gereinigten TFF3-FCGBP-Heteromers ohne vorangehende  $H_2S$ -Behandlung. Trennung des unbehandelten Heteromers durch 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden (NR) Bedingungen mit anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3 Antiserums. Zur Kontrolle und Darstellung des TFF3-Monomers ist die unbehandelte Ausgangsprobe unter reduzierenden Bedingungen gezeigt (Spur a). Gezeigt wird die unbehandelte Ausgangsprobe (Spur b), sowie die unbehandelte Ausgangsprobe mit anschließender Inkubation bei  $37^\circ C$  für 10 min (Spur c), 30 min (Spur d), 60 min (Spur e), 120 min (Spur f) und 720 min (Spur g). Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben.

Zur Kontrolle wurde das gereinigte Heteromer ohne vorherige H<sub>2</sub>S-Behandlung für unterschiedliche Zeiten bei 37°C inkubiert. Dabei konnte keine TFF3-Freisetzung beobachtet werden (Abb. 10).

### 3.6 Vorkommen des TFF3-FCGBP-Heteromers im humanen Gastrointestinaltrakt

Um herauszufinden, ob das TFF3-FCGBP-Heteromer auch in anderen typischen TFF3 sezernierenden Geweben des Gastrointestinaltrakts präsent ist, wurden auch Bereiche des Magens (Antrum) und des Duodenums untersucht. Dabei konnte auch im Antrum und im Duodenum das TFF3-FCGBP-Heteromer nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde das bereits charakterisierte TFF3-FCGBP-Heteromer einer Kolonprobe verwendet (Abb. 11). Auffällig hierbei ist, dass die Konzentration des TFF3-FCGBP-Heteromers etwa mit der Populationsdichte an Becherzellen korreliert. Auch im Rektum konnte das TFF3-FCGBP-Heteromer eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit aus 16 Kolon-, 8 Antrum- und 5 Duodenum-Gewebeproben sowohl das TFF3-FCGBP-Heteromer, als auch niedermolekulare TFF3-Formen nachgewiesen werden (Übersicht siehe Kap. 7.3; Tab. 21).

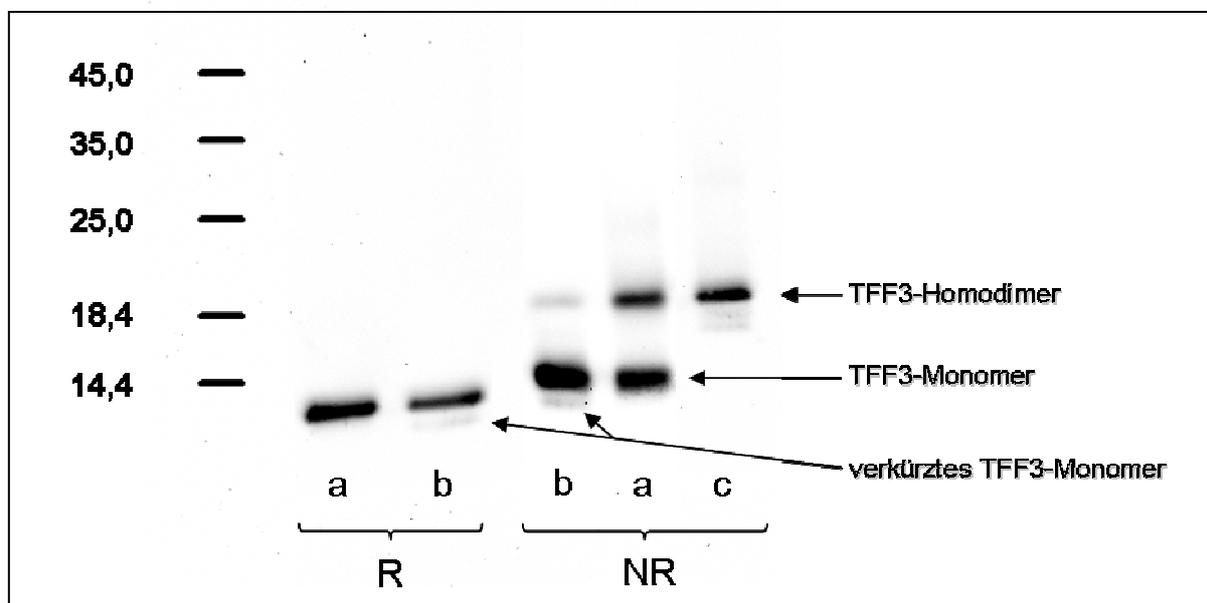


**Abb. 11:** Vorkommen des TFF3-Heteromers in unterschiedlichen Geweben. Trennung des TFF3-FCGBP-Heteromers nach Gelfiltration und 1% SDS-Agarosegelelektrophorese mit anschließendem Westernblot unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3 Antiserums. Der Molekulargewichtsstandard ist rechts angegeben.

### 3.7 Charakterisierung niedermolekularer TFF3-Formen

Nach der Identifizierung von FCGBP als Disulfid-verknüpftes hochmolekulares Partnerprotein von TFF3 konnte die TFF3-Immunreaktivität in den niedermolekularen Fraktionen hauptsächlich einer dem TFF3-Monomer entsprechenden Bande zugeordnet werden (Siehe Abb. 5D). Außerdem war noch eine sehr schwache, dem

TFF3-Dimer entsprechende Bande, zu erkennen (Abb. 5D). Zusätzlich wird im reduzierten Zustand (R) noch eine kleinere TFF3-Bande sichtbar, die eine verkürzte Form des TFF3-Monomers darstellen dürfte (Abb. 12; Spur b). Zudem zeigt die dem TFF3-Monomer entsprechende Bande im nicht reduzierten Zustand (NR) eine etwas andere  $M_r$  als das reduzierte TFF3-Monomer (Abb. 12/NR; Spur b). Zur Kontrolle wurden Westernblots angefertigt, welche die nativen, aus Kolonextrakten gereinigten, niedermolekularen TFF3-Formen (Abb. 12; Spur b) mit rekombinanten TFF3-Formen (Abb. 12; Spur a/c) vergleichen. Dabei zeigten sowohl der Vergleich des aus dem gereinigten TFF3-FCGBP-Heteromer freigesetzten TFF3-Dimers (Abb. 12/NR; Spur b), als auch der Vergleich des reduzierten TFF3-Monomers (Abb. 12/R; Spur b) identische  $M_r$  mit den rekombinanten TFF3-Formen (Abb. 12; Spur a/c).

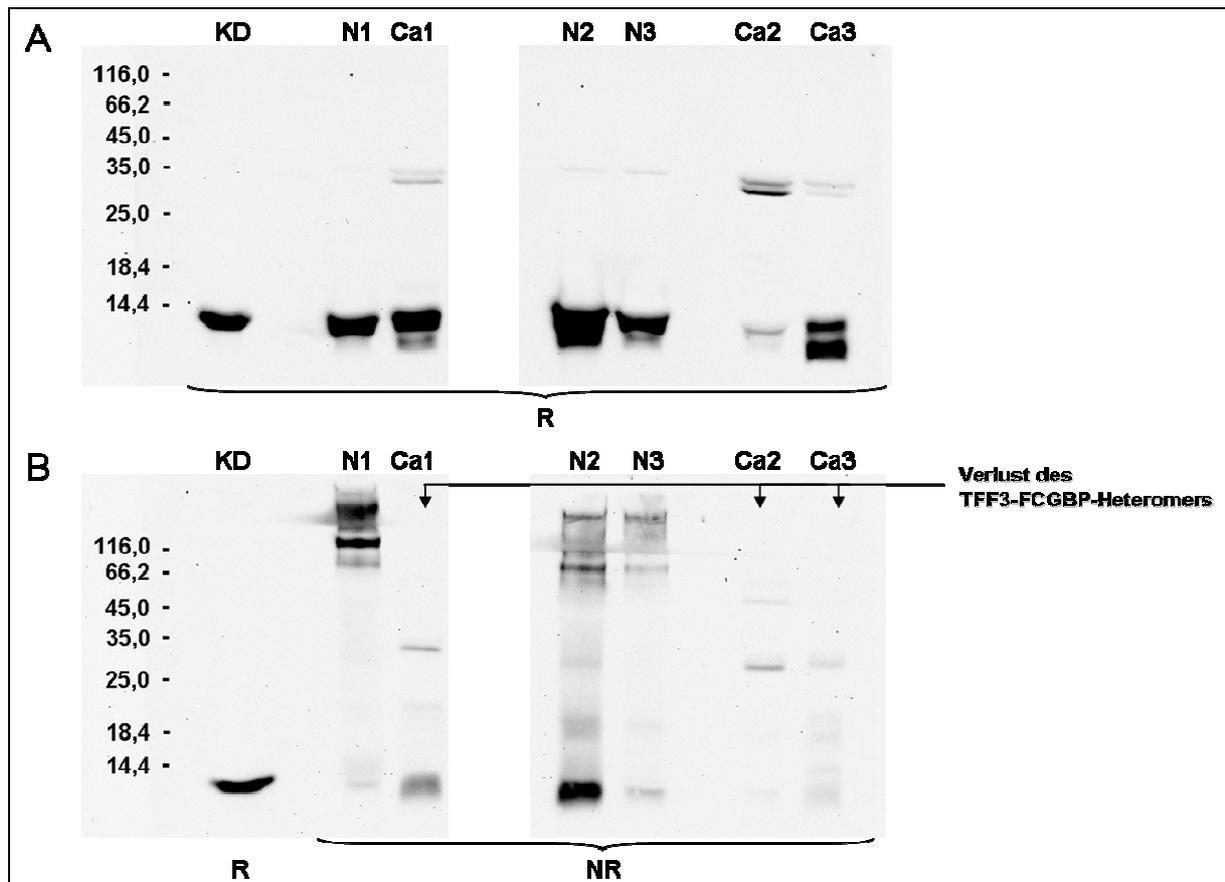


**Abb. 12:** Charakterisierung der niedermolekularen TFF3-Formen. 15% SDS-PAGE und anschließender Westernblot einer niedermolekularen TFF3-enhaltenden Fraktion nach Gelfiltration (Spur b) unter reduzierenden (R) und nicht reduzierenden (NR) Bedingungen. Das aus dem gereinigten TFF3-FCGBP-Heteromer freigesetzte TFF3-Mono und -Dimer (Spur b) im Vergleich mit 30 ng rekombinanten humanen TFF3-Monomer (Spur a) und 7,5 ng rekombinanten humanen TFF3-Dimer (Spur c). Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben.

### 3.8 Veränderungen der TFF3-Biosynthese in Kolonkarzinomen

Erste Vergleiche von tumornahen aber histopathologisch karzinomfreien Kolongewebeproben mit Kolonkarzinomgewebeproben (im Tumor) von jeweils demselben Patienten zeigten ein stark verändertes Mengenverhältnis von hochmolekularen und niedermolekularen TFF3-Formen. Auffällig ist der Verlust des hochmolekularen TFF3-Heteromers in den Karzinomproben und einer relativen vermehrten Freisetzung der niedermolekularen TFF3-Formen in diesen Proben.

Besonders deutlich wird dies an den Vergleichsproben N1 und Ca1 durch das Fehlen des hochmolekularen TFF3-Heteromers in nicht reduzierenden Gelen (Abb. 13/NR).



**Abb. 13:** Trennung von Kolonextrakten durch 15%ige SDS-PAGE (A) unter reduzierenden (R) und (B) nicht reduzierenden (NR) Bedingungen mit anschließender Westernblot-Analyse unter Verwendung des affinitätsgereinigten anti-hTFF3-3 Antiserums. Vergleich von Karzinom-freiem Kolongewebe (N1-3) und Kolon-Karzinomgewebe (Ca1-3). Zur Kontrolle ist jeweils ein Kolonextrakt ohne Tumorindikation (KD) mit aufgetragen.

## 4 Diskussion

Das Hauptergebnis meiner Arbeit liegt darin, dass gezeigt wurde, dass intestinales TFF3 hauptsächlich als Teil eines hochmolekularen Heteromers vorliegt. Dabei konnte FCGBP als Disulfid-verknüpftes Partnerprotein identifiziert werden. Zudem konnten aber auch niedermolekulare TFF3-Formen identifiziert werden. Zusätzlich konnten verschiedene Fragmente von FCGBP nach Reduktion identifiziert werden. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch CLCA1 Teil des intestinalen TFF3-FCGBP-Komplexes ist. Die Bestätigung dieser Hinweise ist jedoch nicht Teil der in meiner Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

### **4.1 TFF3 bildet mit FCGBP ein hochmolekulares Disulfid-verknüpftes Heteromer**

Das hochmolekulare Protein FCGBP (*IgG Fc binding protein*) wird in intestinalen Becherzellen synthetisiert und ist vor allem im Kolon Teil des Mukus (Kobayashi *et al.* 2002), wobei es auch in den Faeces der Maus nachgewiesen wurde (Oleksiewicz *et al.* 2005). FCGBP ist, vermutlich über N-terminale Fragmente, kovalent mit dem Muzin MUC2 verbunden (Johansson *et al.* 2009). Auf alle Fälle unterscheidet sich FCGBP gänzlich von Fc $\gamma$  Rezeptoren (Kobayashi *et al.* 1991). Demzufolge ist zu erwarten, dass es sich um ein typisches sezerniertes Protein mit einer abspaltbaren, N-terminalen Signalsequenz handelt; dies steht durchaus in Einklang mit dem berichteten merokrinen Sekretionsmechanismus von FCGBP in der Ratte (Groos *et al.* 1999). Allerdings wurde in der Vergangenheit keine entsprechende Signalsequenz für FCGBP beschrieben (Harada *et al.* 1997). Mit Hilfe bioinformatischer Analysen unter Verwendung des SignalP 3.0 Servers (CBS, Technical University of Denmark; [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) erscheint jedoch eine Spaltung durch Signalpeptidase nach den Aminosäuren G-19 oder T-21 oder A-24 als sehr wahrscheinlich (Abb. 14; Kap. 7.2.1). Die Spaltung nach T-21 könnte, nach Zyklisierung von Q-22, zur Bildung eines N-terminalen Pyroglutaminsäurerestes im maturen FCGBP führen, ähnlich wie dies bei einigen anderen sezernierten Proteinen (z.B. Caerulein) beobachtet werden konnte (Hoffmann *et al.* 1983). Die Vorstufe Prä-FCGBP umfasst 5.405 Aminosäurereste. Die mature Form bindet spezifisch an die Fc-Region von IgG (Harada *et al.* 1997) und inhibiert folglich die vom Komplementsystem vermittelte Hämolyse roter Blutkörperchen *in vitro* (Kobayashi *et al.* 2002). Kennzeichnend für FCGBP ist der tandemartige Aufbau, bestehend aus 12

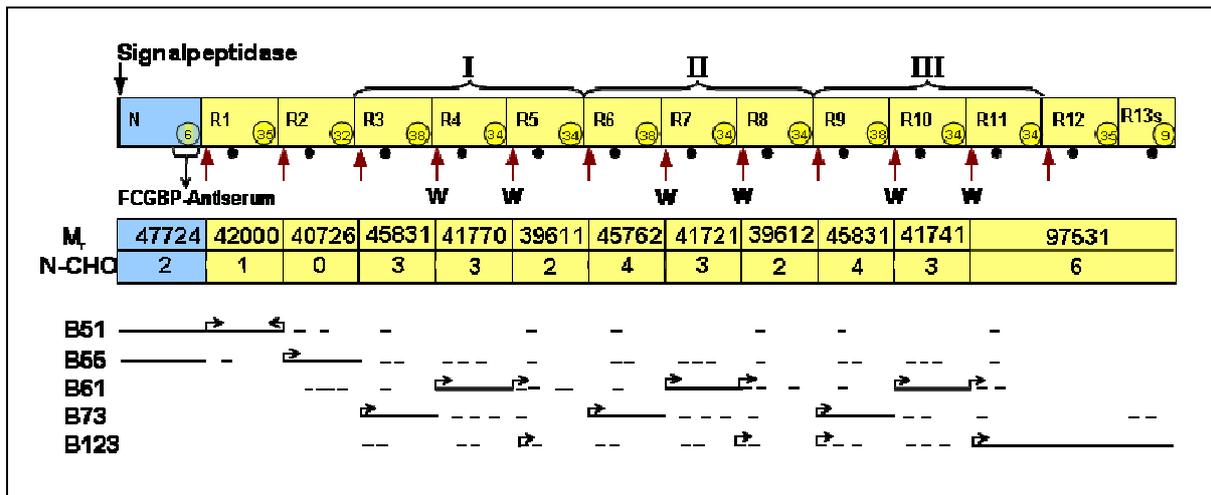
vollständigen und einer verkürzten cysteinreichen repetitiven Einheit (Abb. 14; Details Abb. 15 im Anhang). Jede dieser Einheiten besteht aus etwa 400 Aminosäureresten (8% Cysteinreste), wobei jede der repetitiven Einheiten das CXXC-Motiv (CGLCGN oder CGACGN) beinhaltet, als typische Konsensus-Sequenz für Thioredoxin und Thioredoxin-Domänen ( $\alpha$ -Typ) wie z.B. in der Protein-Disulfid-Isomerase-Familie (Harada *et al.* 1997, Riemer *et al.* 2009). Des Weiteren enthalten die repetitiven Einheiten R1-R11 die Spaltsequenz GD/PHY, die vermutlich durch autokatalytische Spaltung zwischen Aspartat- und Prolinresten prozessiert wird, ähnlich wie sie in den Muzinen MUC2 und MUC5AC auftritt (Lidell *et al.* 2003, Lidell und Hansson 2006, Johansson *et al.* 2009). Zudem ist FCGBP hoch glykosyliert. So enthält es eine unüblich große Anzahl an Serin- und Threoninresten (12,3%) zur O-Glykosylierung (Harada *et al.* 1997) und 33 potentielle N-Glykosylierungsstellen (Abb. 14).

Die Expression von FCGBP ist in *Colitis ulcerosa* gesteigert (Kim *et al.* 2006), was in Einklang mit einer durch IL-13 (Zhen *et al.* 2007) und IL-9 (Steenwinckel *et al.* 2009) verursachten Induktion von FCGBP stehen könnte. Dagegen wird die FCGBP-Expression, sowohl im Menschen (Lee *et al.* 2006) als auch im Mausmodell (Yasui und Tanaka 2009), im Laufe der Entwicklung von normalen Adenokarzinomen verringert. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Verlust des TFF3-FCGBP-Heteromers in Kolonkarzinomproben (siehe Kap. 3.8). Durch den Verlust des TFF3-FCGBP-Heteromers liegt TFF3 vorwiegend als Monomer vor und könnte so als freigesetztes Motogen Einfluss auf die Kolonkarzinogenese nehmen. Dies könnte die erhöhte TFF3-Expression in mukoiden Adenokarzinomen (siehe John *et al.* 2007), besonders im Kolonkarzinom (siehe Taupin *et al.* 1996, Efstathiou *et al.* 1998), aber auch in einigen anderen neoplastischen Geweben (siehe Hanby *et al.* 1998, Theisinger *et al.* 1996, Poulsom *et al.* 1997, May und Westley 1997, Leung *et al.* 2002, Kirikoshi und Katoh 2002, Aikou *et al.* 2011) erklären. Generell wird spekuliert, dass FCGBP, vor allem im Darm aber auch in anderen mukosalen Oberflächen, vom Komplementsystem vermittelten schädlichen Reaktionen vorbeugt (Kobayashi *et al.* 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen klar, dass TFF3 über eine Disulfidbrücke mit FCGBP verknüpft ist. Die Bildung eines hochmolekularen Disulfid-verknüpften TFF3-Heteromers würde die vorläufigen Daten anderer Arbeitsgruppen erklären (Taupin *et al.* 1996, Moro *et al.* 2001). FCGBP enthält die ungerade Anzahl von 435 Cysteinresten; dies ist ein starker Hinweis darauf, dass

FCGBP zumindest eine intermolekulare Disulfidbrücke, mit z.B. TFF3, ausbildet. Die entsprechenden oxidativen Bedingungen im Endoplasmatischen Reticulum fördern dabei die Bildung von Disulfidbrücken in sezernierten Proteinen (Riemer *et al.* 2009). Interessanterweise enthalten nahezu alle unterschiedlichen FCGBP-Domänen (N-terminale Domäne und R2-R11) eine gerade Anzahl von Cysteinresten (Abb. 14; Details siehe Abb. 15 im Anhang). Nur R1 und R12 enthalten einen zusätzlichen Cysteinrest in der mit der von Willebrand Faktor (vWF) D-Domäne homologen Region (R1 und R12 enthalten somit jeweils 35 Cysteinreste). In R13s hingegen fehlt ein konservierter Cysteinrest, wofür ein anderer Cysteinrest neu eingefügt wird. Zudem ist die R13s-Domäne C-terminal auf eine ungerade Anzahl an Cysteinresten (9 Cysteinreste) verkürzt (Abb. 14; Details siehe Abb. 15 im Anhang). Demnach repräsentieren die Domänen R1, R12 und R13s Regionen, welche potentiell für eine Bindung von TFF3 in Frage kommen. Theoretisch könnten auch andere Proteine mit ungerader Anzahl an Cysteinresten zusätzlich an FCGBP gebunden werden. Die Bildung eines TFF3-FCGBP-Heterodimers könnte damit z.B. über eine Disulfidbrücke zwischen C-57 von TFF3 und C-5403 von FCGBP (R13s) stattfinden. Die Hypothese, dass nur ein TFF3-Molekül mit FCGBP verknüpft ist, steht in Einklang mit einer semi-quantitativen Analyse zur Bestimmung der Stoffmengenverhältnisse von aus FCGBP freigesetztem TFF3 (0,37; siehe Kap. 3.1.1). Bei der durchgeführten semi-quantitativen Analyse ist zu beachten, dass es sich dabei lediglich um eine Annäherung an das exakte Mengenverhältnis handelt. Jedoch zeigt dies, dass maximal ein Molekül TFF3 pro Molekül TFF3-FCGBP-Heteromer gebunden ist. Die Ausbildung eines Disulfid-verknüpften TFF3-FCGBP-Heteromers ist mit der Heterodimer-Bildung von TFF1 und Gastrokin 2 (GKN2) vergleichbar (Westley *et al.* 2005). Allerdings ist das TFF3-FCGBP-Heteromer Mukus-assoziiert, während das TFF1-GKN2-Heterodimer nicht mit der hochmolekularen Muzin-Fraktion nach Gelfiltration assoziiert ist (Kouznetsova *et al.* 2007).

Das TFF3-Monomer konnte *in vitro* unter reduzierenden Bedingungen freigesetzt werden (siehe Abb. 5C/R) und die LC-ESI-MS/MS-Analyse der entsprechenden Bande (B<14; Abb. 6D/R) zeigte, dass TFF3 mit dem vorhergesagten N-Terminus beginnt (Glutamatrest) (siehe Kap. 7.2/Bande B<14). Demnach bildet der N-Terminus von TFF3 im TFF3-FCGBP-Heteromer keinen zyklischen Pyroglutaminrest. Dies steht in Einklang mit der Analyse von rekombinantem TFF3 (Thim *et al.* 1995) und ist analog zu TFF1 (Literatur siehe Hauser *et al.* 1993).



**Abb. 14:** Schematische Darstellung und proteolytische Spaltung von FCGBP. Gezeigt wird die schematische Struktur der FCGBP-Vorstufe. (Signalsequenz, N-terminale Domäne, 13 repetitive Einheiten R1-R12 und R13s; basierend auf NCBI Accession Nummer NP\_003881.2). Die Anzahl der in den jeweiligen Domänen enthaltenen Cysteinreste ist in gelb eingekreist dargestellt. Die repetitiven Einheiten R3-R5, R6-R8 und R9-R11 sind Teil von übergeordneten Wiederholungen (I, II und III). Vorhergesagte proteolytische Spaltungen durch Signalpeptidasen bzw. vermutliche autokatalytische Schnittstellen in den Aminosäuresequenzen GD/PHY sind durch dunkelrote Pfeile gekennzeichnet. Autokatalytische Schnittstellen in den Aminosäuresequenzen WGD/PHY sind zusätzlich durch ein W markiert. Die Sequenz-Motive CXXC, typisch für Thioredoxin und Thioredoxin-Domänen, werden durch schwarze Punkte angedeutet. Außerdem ist das vom kommerziellen anti-FCGBP Antiserum (HPA003564) erkannte Epitop angegeben. Zusätzlich wird die M<sub>r</sub> der unterschiedlichen FCGBP-Fragmente und die Anzahl potentieller N-Glykosylierungsstellen angegeben. Des Weiteren ist die Lokalisation der Banden B51, B55, B61, B73 und B123 innerhalb der FCGBP-Sequenz eingezeichnet, so wie sie durch Proteomanalyse bestimmt wurde (detailliertere Darstellung in Kap. 7.2.1). Dabei werden Regionen mit der höchsten Sequenzübereinstimmung mit Hilfe durchgezogener Linien angedeutet, wobei die Ergebnisse der beiden vorherrschenden Banden B61 und B123 fett gedruckt gezeigt werden. Die kleinen horizontalen schwarzen Pfeile markieren die identifizierten Peptide, welche entweder den N- oder den C-terminalen Bereich der GD/PHY-Schnittstellen enthalten.

## 4.2 Proteolytische Spaltung von FCGBP

Humanes FCGBP wird in unterschiedliche Polypeptide gespalten (>200k, 70-80k), welche aber noch immer über Disulfidbrücken verbunden sind (Harada *et al.* 1997). Als weiteres Indiz für eine proteolytische Spaltung wurden vier FCGBP-Fragmente (M<sub>r</sub> ca. 150kDa, 85kDa, 75kDa, 65kDa) mit unerwartet hoher Abundanz in den Faeces von Mäusen charakterisiert (Oleksiewicz *et al.* 2005). Erst kürzlich sind elf autokatalytische Spaltungen vorgeschlagen worden, welche zwischen dem Aspartat- und Prolinrest in der GD/PHY Sequenz innerhalb der repetitiven Einheiten R1-R11 präsent sind (Abb. 14) (Johansson *et al.* 2009). In MUC2 und MUC5AC konnten ähnliche Stellen gefunden werden, die bei pH < 6 bzw. bei einem neutralen pH-Wert gespalten werden (Lidell *et al.* 2003, Lidell und Hansson 2006). Eine interessante Erkenntnis wurde in Atp12a<sup>-/-</sup>-Mäusen gewonnen, bei denen das Fehlen der H-K-ATPase zu einer Erhöhung des pH-Werts im Prostata-Sekret führte; damit verbunden war eine veränderte Prozessierung von FCGBP (Pestov *et al.* 2006). Hinweise auf

solch einen autokatalytischen Mechanismus werden durch Ergebnisse N-terminaler Sequenzierungen der 155 kDa-, 60 kDa- und 55 kDa-Fragmente eines N-glykosylierten IgG binding Protein aus dem Prostata-Sekret der Ratte unterstützt, die eine hohe Ähnlichkeit zum humanem FCGBP zeigen (Wilhelm *et al.* 2002). Durch die postulierte Prozessierung von humanem FCGBP an elf GD/PHY Schnittstellen, könnten ein N-terminales Fragment mit einer  $M_r$  von etwa 47.724, zehn repetitive Einheiten mit einer kalkulierten  $M_r$  von 39.611 bis 45.831 und ein C-terminales Fragment mit einer  $M_r$  von 97.531 entstehen (Abb. 14). Darüber hinaus könnten die meisten dieser Fragmente noch durch N- und O-Glykosylierungen modifiziert werden.

Die Ergebnisse der LC-ESI-MS/MS-Analyse der Banden B123, B73, B61, B55 und B51 (präsentiert in Kap. 7.2.1) stehen in voller Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen autokatalytischen Prozessierung von FCGBP an den elf GD/PHY Schnittstellen. In Abb. 14 sind diese Ergebnisse schematisch dargestellt. Proteomanalysen identifizierten eindeutig den N-terminalen Teil der Schnittstellen mit der Startsequenz PHY in den Repeats R1-R11. Darüber hinaus wurde auch die vorhergesagte C-terminale Sequenz in Repeat R1 identifiziert. Zusammengefasst besteht B51 hauptsächlich aus der N-terminalen FCGBP Domäne und Repeat R1, wohingegen B55 hauptsächlich die N-terminale Domäne und R2, aber auch Sequenzen aus den Repeats R4, R7 und R10 enthält. Dies ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Glykoformen im N-Terminus von FCGBP (B51 und B55). Diese Erkenntnis deckt sich mit dem Ergebnis der Westernblot-Analyse mit dem N-terminalen FCGBP-Antiserum, welches ausschließlich die Banden B51 und B55 erkennt (Abb. 7B; und Abb. 14). Die Bande B55 enthält zusätzlich Sequenzen aus R2; dabei könnten auch zusätzliche O-Glykosylierungen die aberrante  $M_r$  erklären. Die detektierte Bande B73 besteht hauptsächlich aus Sequenzen, die aus den repetitiven Einheiten R3, R6 und R9 freigesetzt wurden. Im Gegensatz dazu besteht die Bande B61, welche die Hauptbande nach reduzierter SDS-Page darstellt (Abb. 6C; Abb. 7B/Spur b), hauptsächlich aus den repetitiven Einheiten R4, R7 und R10. Die Dominanz der Banden B61 und B123 (Abb. 6C; Abb. 7B/Spur b) könnte somit durch eine bevorzugte Spaltung an den WGD/PHY-Sequenzen erklärt werden (Abb. 14; Abb. 15 im Anhang). Im Gegensatz dazu fehlt in allen anderen GD/PHY-Sequenzen dieser charakteristische Tryptophanrest. Interessanterweise enthalten alle bekannten Schnittstellen in MUC2 und MUC5AC

ebenfalls diesen charakteristischen Tryptophanrest (Lidell *et al.* 2003, Lidell und Hansson 2006). Dies lässt vermuten, dass dieser Tryptophanrest (im Vergleich zu den an homologer Stelle sonst gefundenen Glutamin- und Serinresten) die Spaltung beschleunigt und so für die Generierung der dominierenden Banden B61 und B123 verantwortlich ist (Abb. 14).

### **4.3 Generierung des TFF3-Monomers und TFF3-Dimers – mögliche funktionelle Konsequenzen für die intestinale Restitution**

Neben dem TFF3-FCGBP-Heteromer existiert TFF3 *in vivo* auch in niedermolekularen Formen, vermutlich als TFF3-Monomer und in einer geringeren Menge als TFF3-Dimer (Abb. 5/B). Diese Ergebnisse sind unerwartet im Vergleich zu rekombinantem TFF3 aus *Saccharomyces cerevisiae*; hier ist nämlich das TFF3-Dimer die vorherrschende Form (Thim *et al.* 1995). Die Reinigung und anschließende LC-ESI-MS/MS-Analyse dieser niedermolekularen TFF3-Formen detektierten TFF3 Sequenzen, die ebenfalls einen N-terminalen Glutamatrest enthielten (Kap. 7.2/Bande B<14).

Theoretisch könnte TFF3 durch eine Disulfid-Isomeraseaktivität aus dem TFF3-FCGBP-Heteromer freigesetzt werden. Dabei könnten die in FCGBP konservierten CXXC-Motive in den Repeats R1-R13s (Abb. 14, Abb. 15 im Anhang) eine wichtige Rolle spielen. Zum Beispiel spielt bei der Quervernetzung von Fibronectin in der extrazellulären Matrix ein enthaltenes CXXC-Motiv eine entscheidende Rolle (Langenbach und Sottile 1999). Dabei ist zu erwarten, dass die CXXC-Motive in R12 und R13, aufgrund der benachbarten basischen Aminosäurereste, eine höhere Aktivität besitzen (Abb. 15 im Anhang).

In Anbetracht der hohen exogenen H<sub>2</sub>S-Konzentrationen im Lumen des Kolons (Wallace *et al.* 2009) könnte dadurch *in vivo* TFF3-Monomer und -Dimer freigesetzt werden. Diese Hypothese steht in Einklang mit der Freisetzung des TFF3-Monomers und kleiner Mengen des TFF3-Dimers aus FPLC-gereinigtem TFF3-FCGBP-Heteromer nach Behandlung mit H<sub>2</sub>S *in vitro* (Abb. 9/Spur g und h). Interessanterweise verläuft dieser Prozess bei 37°C nur relativ langsam und könnte so eine kontinuierliche Freisetzung von geringen Mengen an TFF3 ermöglichen. Bei einer Freisetzung auf diese Weise ist besonders zu beachten, dass TFF3 durch H<sub>2</sub>S möglicherweise durch S-Sulfhydrylierung posttranslational modifiziert werden könnte, (Mustafa *et al.* 2009) und dadurch auch die Funktion der niedermolekularen TFF3-Formen beeinflussen könnte.

Als wesentlicher Bestandteil der Mukusschicht würde sich das TFF3-FCGBP-Heteromer als Reservoir für TFF3 eignen, aus dem es durch H<sub>2</sub>S freigesetzt werden könnte. In der Folge könnte es z.B. als Motogen die schnelle mukosale Wundheilung unterstützen. Interessanterweise ist die endogene H<sub>2</sub>S Produktion während der Entzündungsreaktion merklich gesteigert (Wallace *et al.* 2009). Jedoch schlugen alle Versuche fehl, eine direkte motogene Aktivität des gereinigten TFF3-FCGBP-Heteromers zu demonstrieren (Znalesniak, Albert und Hoffmann, Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wird postuliert, dass das TFF3-FCGBP-Heteromer bezüglich der Restitution als biologisch inaktive Speicherform von TFF3 fungiert. Deshalb ist es für die Zukunft von großer Bedeutung, die biologische Aktivität der *in vivo* freigesetzten niedermolekularen TFF3-Formen (TFF3-Monomer und -Dimer) zu untersuchen.

#### **4.4 Mögliche Funktionen des TFF3-FCGBP-Heteromers für den Aufbau der intestinalen Mukusschicht**

Das TFF3-FCGBP-Heteromer ist ein wichtiger struktureller Bestandteil der intestinalen Mukusschicht. Als sezernierte Barriere enthält sie auch das Muzin MUC2, Immunoglobuline, antimikrobielle Peptide, Phospholipide, Galektine und Proteaseinhibitoren (McGuckin *et al.* 2009). Neben der Bindung an Immunoglobuline, könnte das TFF3-FCGBP-Heteromer teilweise über kovalente (Johansson *et al.* 2009) und nicht-kovalente Bindungen mit dem Muzin MUC2 interagieren. Eine Interaktion könnte hypothetisch auch durch Wechselwirkungen zwischen TFF3 und MUC2 zustande kommen, was zu einem verknüpften Netzwerk führen würde. Nicht-kovalente Wechselwirkungen der TFF-Domänen mit Muzinen wurden bereits in der Vergangenheit vorgeschlagen (Hoffmann und Hauser 1993, Hoffmann und Joba 1995) weil mehrfach TFF-Domänen als cysteinreiche Module in den Froschhaut-Muzinen FIM-A.1 und FIM-C.1 entdeckt wurden (Hoffmann 1988, Hauser *et al.* 1990, Hauser und Hoffmann 1992). Wechselwirkungen dieser Art könnten die rheologischen Eigenschaften der intestinalen Mukusschicht modulieren. Zudem könnte es entscheidend zum Schutz von fragilen apokrinen Blasen („Aposomen“) beitragen, welche als Folge der apokrinen Sekretion in Becherzellen beobachtet wurden (Aumüller *et al.* 1999, Wilhelm *et al.* 2002). Darüber hinaus könnte das TFF3-FCGBP-Heteromer eine Rolle bei der Faltung von MUC2 spielen. Die Protein-Disulfid-Isomerase AGR2 ist für die Produktion des intestinalen Mukus essentiell (Park *et al.* 2009), zudem verursacht ein aberranter Aufbau von MUC2 im

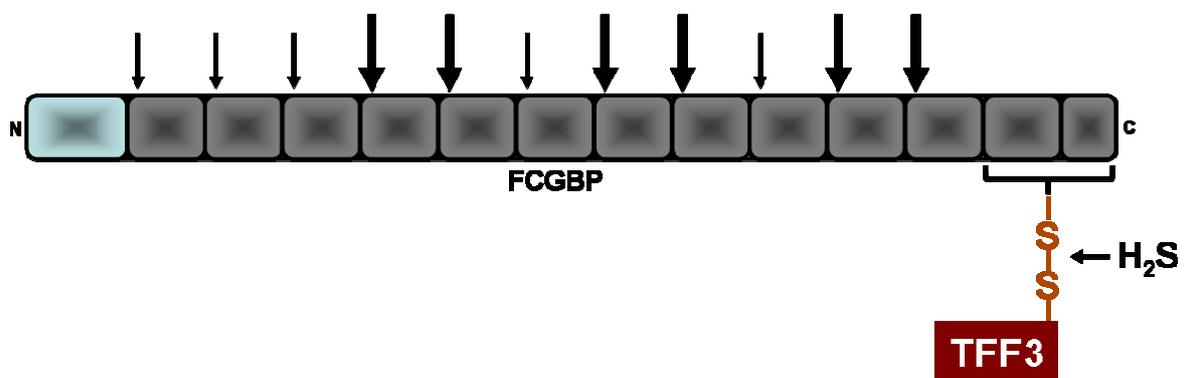
Endoplasmatischen Retikulum Stress und spontane Kolitis (Heazlewood *et al.* 2008). Eine Funktion bei der korrekten Ausbildung von Disulfidbrücken, besonders in MUC2, könnte den beobachteten Phänotyp von Tff3<sup>-/-</sup>-Mäusen erklären, die anfälliger für experimentell induzierte Colitis sind (Mashimo *et al.* 1996). Dieser Phänotyp ist mit dem von Agr2<sup>-/-</sup>-Mäusen (Park *et al.* 2009) und Mäusen mit einem Defekt in der „unfolded protein response“ (UPR) (Kaser *et al.* 2008) vergleichbar. Bemerkenswert sind auch Berichte über Tff1<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche falsch gefaltete Proteine im Endoplasmatischen Retikulum akkumulieren und ER-Stress zeigen (erhöhte UPR-Aktivität) (Torres *et al.* 2002).

#### **4.5 Ausblick**

Diese Arbeit identifiziert TFF3 als Teil eines Disulfid-verknüpften Heteromers mit FCGBP, das einen integralen Bestandteil der intestinalen Mukusschicht darstellt. Zusätzlich konnte die Prozessierung von FCGBP im Kolon geklärt werden. Dies ist auch die erste Arbeit, welche die Mukusschicht als ein mögliches Reservoir für ein biologisch aktives Peptid darstellt, das dann seinerseits nach Reduktion mit H<sub>2</sub>S freigesetzt werden könnte. Folglich ist für die Zukunft die molekulare und funktionelle Charakterisierung der niedermolekularen TFF3-Formen (TFF3-Monomer/Dimer), speziell bei pathologischen Zuständen, von enormer Bedeutung. Dabei könnten z.B. postranslationale Modifizierungen für die motogenen Eigenschaften von TFF3 eine wichtige Rolle spielen; diese Annahme könnte dann durch funktionelle Tests bestätigt werden.

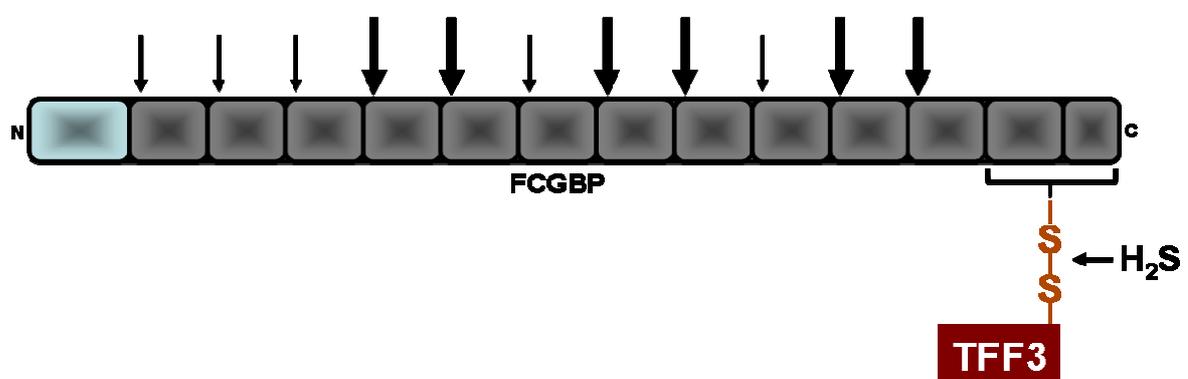
## 5 Zusammenfassung

Humanes TFF3, ein Vertreter der „trefoil factor family“ (TFF), stellt ein sezerniertes, 59 Aminosäurereste langes Polypeptid dar, welches über sieben Cysteinreste verfügt. Es wird vorwiegend in intestinalen Becherzellen synthetisiert, ist an unterschiedlichen mukosalen Schutz- und Reparaturprozessen beteiligt und spielt eine wichtige Rolle für die Integrität muköser Epithelien. Im Verlauf dieser Arbeit konnte humanes TFF3 hauptsächlich als hochmolekulares Heteromer nachgewiesen werden. Die Reinigung und anschließende LC-ESI-MS/MS-Analyse, sowie Immundetektionen, identifizierten *IgG Fc binding protein* (FCGBP) als Disulfid-verknüpftes Partnerprotein von TFF3. FCGBP wird in intestinalen Becherzellen synthetisiert und ist Bestandteil des intestinalen Mukus. Zudem konnten auch geringe Mengen niedermolekularer TFF3-Formen nachgewiesen werden (TFF3-Monomer sowie TFF3-Dimer). Diese niedermolekularen Formen konnten auch durch Reduktion mit  $H_2S$  aus dem TFF3-FCGBP-Heteromer freigesetzt werden. Dieser Mechanismus ist in Anbetracht der hohen exogenen  $H_2S$ -Konzentrationen im Lumen des Kolons auch *in vivo* vorstellbar. So könnte der intestinale Mukus ein Reservoir für biologisch aktives TFF3 darstellen. Außerdem konnten proteolytische Spaltungen von FCGBP beobachtet werden, die in Übereinstimmung mit den bereits von Johansson *et al.* (2009) postulierten multiplen autokatalytischen Spaltstellen stehen. Bei der Untersuchung von Kolonkarzinomproben konnte kein TFF3-FCGBP-Heteromer nachgewiesen werden, aber dafür ein relativ vermehrtes Auftreten niedermolekularer TFF3-Formen. Außerdem ergaben sich erste Hinweise auf mögliche posttranslationale Modifikationen der niedermolekularen TFF3-Formen. Dies könnte neue Aspekte zur physiologischen und pathologischen Funktion von TFF3 eröffnen.



## 5.1 Abstract

Human TFF3 is a secretory peptide belonging to the trefoil factor family with a predicted size of 59 amino acid residues including seven cysteine residues. It is predominantly expressed in intestinal goblet cells where it plays a key role in mucosal regeneration and repair processes. Thus, TFF3 is an important factor for the maintenance of the surface integrity of mucous epithelia. In the course of these studies, it was demonstrated that human colonic TFF3 exists mainly as a high molecular weight heteromer. Purification of this heteromer and characterization by LC-ESI-MS/MS analysis identified the *IgG Fc binding protein* (FCGBP) as the partner of TFF3. TFF3 and FCGBP are covalently linked via disulfide bridges. FCGBP is a constituent of intestinal mucus secreted by goblet cells. Furthermore, low amounts of TFF3/monomer and only little TFF3/dimer were detected in human colonic extracts. These TFF3 forms could also be released *in vitro* from the purified TFF3-FCGBP heteromer by reduction with hydrogen sulfide ( $H_2S$ ). Such a mechanism would be in line with the high  $H_2S$  concentrations reported to be present in the lumen of the colon. Consequently, these findings suggest the intestinal mucus to be a reservoir for biologically active TFF3. Furthermore, proteolytic processing of FCGBP was observed which is in line with multiple autocatalytic cleavages as proposed previously by Johansson et al. (*J. Proteome Res.* 2009;8:3549-3557). Of special note, the TFF3-FCGBP heteromer was absent in colon carcinoma samples, where mainly low molecular weight forms of TFF3 were detected. There are further indications for posttranslational modifications of these forms which open up new aspects concerning the physiological as well as pathological function of TFF3.



## 6 Literaturverzeichnis

- AIKOU, S.; OHMOTO, Y.; GUNJI, T.; MATSUHASHI, N.; OHTSU, H.; MIURA, H.; KUBOTA, K.; YAMAGATA, Y.; SETO, Y.; NAKAJIMA, A.; GOLDENRING, J. R.; KAMINISHI, M.; NOMURA, S. (2011) Test for serum levels of trefoil factor family proteins can improve gastric cancer screening. *Gastroenterology* 141: 837-845
- AMBORT D., VAN DER POST S., JOHANSSON M. E. V., MAC KENZIE J., THOMSSON E., KRENGEL U., HANSSON, G. C. (2011) Function of the CysD domain of gel-forming MUC2 mucin. *Biochem. J.* 436: 61-70
- ASKER N., AXELSSON M.A.B., OLOFSSON S.O., HANSSON G. C. (1998) Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 273: 18857-18863
- ASKER N., BAECKSTROM D., AXELSSON M.A.B., CARLSTEDT I., HANSSON G.C. (1995) The human MUC2 mucin apoprotein appears to dimerize before O-glycosylation and shares epitopes with the 'insoluble' mucin of rat small intestine. *Biochem. J.* 308: 873-880
- ATUMA C, STRUGULA V, ALLEN A, HOLM L (2001) The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol* 280: G922–G929
- AUMÜLLER, G.; WILHELM, B.; SEITZ, J. (1999) Apocrine secretion - fact or artifact? *Ann. Anat.* 181, 437-446
- AXELSSON M.A.B., ASKER N., HANSSON G.C. (1998) O-glycosylated MUC2 monomer and dimer from LS 174T cells are water-soluble, whereas larger MUC2 species formed early during biosynthesis are insoluble and contain nonreducible intermolecular bonds. *J. Biol. Chem.* 273: 18864-18870
- BLUM *et al.* (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels *Electrophoresis* 8: 93-99
- BONNER J. C. (1994) Regulation of platelet-derived growth factor (PDGF) and alveolar macrophage-derived PDGF by alpha 2-macroglobulin. *Ann N Y Acad Sci.* 737: 324-338
- CHINERY, R.; BATES, P. A.; DE, A.; FREEMONT, P. S. (1995) Characterisation of the single copy trefoil peptides intestinal trefoil factor and pS2 and their ability to form covalent dimers. *FEBS Lett.* 357: 50-54
- CHWIERALSKI, C. E.; SCHNURRA, I.; THIM, L.; HOFFMANN, W. (2004) Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31: 528-537
- DIGNASS, A., LYNCH-DEVANEY, K., KINDON, H., THIM, L., AND PODOLSKY, D. K. (1994) Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J. Clin. Invest.* 94: 376-383
- DUBEYKOVSKAYA, Z.; DUBEYKOVSKIY, A.; SOLAL-COHEN, J.; WANG, T.C. (2009) Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 284: 3650-3662
- DÜRER, U.; HARTIG, R.; BANG, S; THIM, L.; HOFFMANN, W. (2007) TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. *Cell Physiol. Biochem.* 20: 329-346
- EFSTATHIOU, J. A., NODA M.; ROWAN A.; DIXON C.; CHINERY R.; JAWHARI A.; HATTORI T.; WRIGHT N. A.; BODMER W. F.; PIGNATELLI M. (1998) Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis colicatenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95(6): 3122–3127

- GARCIA M.A., YANG N., QUINTON P.M. (2009) Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J. Clin. Invest.* 119: 2613-2622
- GODL K., JOHANSSON M.E.V., LIDELL M.E., MÖRGELIN M., KARLSSON H., OLSON F.J., GUM J.R. JR., KIM Y.S., HANSSON G.C. (2002) The N-termini of the MUC2 mucin form trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *J. Biol. Chem.* 277: 47248-47256
- GÖTT P., BECK S., MACHADO J.C., CARNEIRO F., SCHMITT H., BLIN N. (1996) Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur. J. Hum. Genet.* 4(6): 308-315
- GOUYER V.; GOTTRAND F.; DESSEYN J.L. (2011) The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One* 6(4): e18761
- GRANESS, A.; CHWIERALSKI, C. E.; REINHOLDS, D.; THIM, L.; HOFFMANN, W. (2002) Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J. Biol. Chem.* 277: 18440-18446
- GROOS, S.; WILHELM, B.; RENNEBERG, H.; RIVA, A.; REICHEL, R.; SEITZ, J.; AUMÜLLER, G. (1999) Simultaneous apocrine and merocrine secretion in the rat coagulating gland. *Cell. Tissue Res.* 295(3): 495-504
- GRUBER, A. D.; ELBLE, R. C.; JI, H.-L.; SCHREUR, K. D.; FULLER, C. M.; PAULI, B. U. (1998) Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel proteins. *Genomics* 54: 200-214
- GUM JR JR., HICKS J.W., TORIBARA N.W., SIDDIKI B., KIM Y.S. (1994) Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 269: 2440-2446
- HANBY A. M.; MCKEE P.; JEFFERY M.; GRAYSON W.; DUBLIN E.; POULSOM R.; MAGUIRE B. (1998) Primary mucinous carcinomas of the skin express TFF1, TFF3, estrogen receptor, and progesterone receptors. *Am. J. Surg. Pathol.* 22(9): 1125-1131
- HANSSON G. C.; JOHANSSON M. E. V. (2010) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. Article Addendum *Gut Microbes* 1: 51-54
- HARADA, N.; IJIMA, S.; KOBAYASHI, K.; YOSHIDA, T.; BROWN, W. R.; HIBI, T.; OSHIMA, A.; MORIKAWA, M. (1997) Human IgGFc binding protein (Fc $\gamma$ BP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J. Biol. Chem.* 272: 15232-15241
- HAUSER, F.; GERTZEN, E.-M.; HOFFMANN, W. (1990) Expression of spasmodysin (FIM-A.1): an integumentary mucin from *Xenopus laevis*. *Exp. Cell. Res.* 189(2): 157-162
- HAUSER, F.; HOFFMANN, W. (1992) P-domains as shuffled cysteine-rich modules in integumentary mucin C.1 (FIM-C.1) from *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 267(34): 24620-24624
- HAUSER, F.; POULSOM, R.; CHINERY, R.; ROGERS, L. A.; HANBY, A. M.; WRIGHT, N. A.; HOFFMANN, W. (1993) hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6961-6965
- HEAZLEWOOD, C. K.; COOK, M. C.; ERI, R.; PRICE, G. R.; TAURO, S. B.; TAUPIN, D.; THORNTON, D. J.; PNG, C. W.; CROCKFORD, T. L.; CORNALL, R. J.; ADAMS, R.; KATO, M.; NELMS, K. A.; HONG, N. A.; FLORIN, T. H. J.; GOODNOW, C. C.; MCGUCKIN, M. A. (2008) Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 5(3): e54
- HOFFMANN, W. (1988) A new repetitive protein from *Xenopus laevis* skin highly homologous to pancreatic spasmodolytic polypeptide. *J. Biol. Chem.* 263(16): 7686-7690

- HOFFMANN, W. (2005) TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2932-2938
- HOFFMANN, W. (2006) TFF (trefoil factor family) peptides. In *Handbook of Biologically Active Peptides*, 1<sup>st</sup> ed.; Kastin, A.J., Ed.; Elsevier: San Diego, CA, pp. 1147-1154
- HOFFMANN, W. (2009) Trefoil factor family (TFF) peptides and chemokine receptors: a promising relationship. *J. Med. Chem.* 52: 6505-6510
- HOFFMANN, W. (2012) TFF (Trefoil Factor Family ) Peptides. *in Druck*
- HOFFMANN, W.; BACH, T. C.; SELIGER, H.; KREIL, G. (1983) Biosynthesis of caerulein in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequences of precursors as deduced from cDNA clones. *EMBO J.* 2(1): 111-114
- HOFFMANN, W.; HAUSER, F. (1993) Biosynthesis of frog skin mucins: cysteine-rich shuffled modules, polydispersities and genetic polymorphism. *Comp. Biochem. Physiol.* 105(3-4): 465-472
- HOFFMANN, W.; JAGLA, W. (2002) Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int. Rev. Cytol.* 213: 147-181
- HOFFMANN, W.; JAGLA, W.; WIEDE, A. (2001) Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol. Histopathol.* 1.: 319-334
- HOFFMANN, W.; JOBA, W. (1995) Biosynthesis and molecular architecture of gel-forming mucins: implications from an amphibian model system. *Biochem. Soc. Trans.* 23(4): 805-810
- JACKEROTT, M.; LEE, Y. C.; MOLLGARD, K.; KOFOD, H.; JENSEN, J.; ROHLEDER, S.; NEUBAUER, N.; GAARN, L. W.; LYKKE, J.; DODGE, R.; DALGAARD, L. T.; SOSTRUP, B.; JENSEN, D. B.; THIM, L.; NEXO, E.; THAMS, P.; BISGAARD, H. C.; NIELSEN, J. H. (2006) Trefoil factors are expressed in human and rat endocrine pancreas: differential regulation by growth hormone. *Endocrinol.* 147: 5752-5759
- JAGLA, W., WIEDE, A., HINZ, M., DIETZMANN, K., GÜLICHER, D., GERLACH, K.L., AND HOFFMANN, W. (1999) Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell Tissue Res.* 298: 161-166
- JAGLA, W.; WIEDE, A.; DIETZMANN, K.; RUTKOWSKI, K.; HOFFMANN, W. (2000) Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. *FASEB J.* 14: 1126-1131
- JOHANSSON M. E. V., LARSSON J. M., HANSSON G. C. (2010) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 Suppl 1: 4659-4665
- JOHANSSON M. E. V., PHILLIPSON M., PETERSSON J., VELCICH A., HOLM L., HANSSON, G. C. (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15064-15069
- JOHANSSON, M. E. V.; THOMSSON, K. A.; HANSSON, G. C. (2009) Proteomic analysis of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J. Proteome Res.* 8(7): 3549-3557
- JOHN, R.; EL-ROUBY, N. M.; TOMASETTO, C.; RIO, M.-C.; KARAM, S. M. (2007) Expression of TFF3 during multistep colon carcinogenesis. *Histol. Histopathol.* 22: 743-751
- KASER, A.; LEE, A.-H.; FRANKE, A.; GLICKMAN, J. N.; ZEISSIG, S.; TILG, H.; NIEUWENHUIS, E. E. S., HIGGINS, D. E.; SCHREIBER, S.; GLIMCHER, L. H.; BLUMBERG, R. R. (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134(5): 743-756
- KIM Y.S.; HO S.B.; (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12(5): 319-330

- KIM, M.; LEE, S.; YANG, S.-K.; SONG, K.; LEE, I. (2006) Differential expression in histologically normal crypts of ulcerative colitis suggests primary crypt disorder. *Oncol. Rep.* 16(4): 663-670
- KINOSHITA, K.; TAUPIN, D. R.; ITOH, H.; PODOLSKY, D. K. (2000) Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4680-4690
- KIRIKOSHI, H.; KATOH, M. (2002) Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* 21: 655-659
- KJELLEV, S. (2009) The Trefoil factor family – small peptides with multiple functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 1350-1369
- KOBAYASHI, K.; HAMADA, Y.; BLASER, M. J.; BROWN, W. R. (1991) The molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium. *J. Immunol.* 146(1): 68-74
- KOBAYASHI, K.; OGATA, H.; MORIKAWA, M.; IJIMA, S.; HARADA, N.; YOSHIDA, T.; BROWN, W. R.; INOUE, N.; HAMADA, Y.; ISHII, H.; WATANABE, M.; HIBI, T. (2002) Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *Gut* 51(2): 169-176
- KOUZNETSOVA, I., PEITZ, U., VIETH, M., MEYER, F., VESTERGAARD, E.M., MALFERTHEINER, P., ROESSNER, A., LIPPERT, H., AND HOFFMANN, W. (2004) A gradient of TFF3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa. *Cell Tissue Res.* 316: 155-165
- KOUZNETSOVA, I.; KALINSKI, T.; MEYER, F.; HOFFMANN, W. (2011) Self-renewal of the human gastric epithelium: new insights from expression profiling using laser microdissection. *Mol. BioSyst.* 7: 1105-1112
- KOUZNETSOVA, I.; KALINSKI, T.; PEITZ, U.; MÖNKEMÜLLER, K. E.; KALBACHER, H.; VIETH, M.; MEYER, F.; ROESSNER, A.; MALFERTHEINER, P.; LIPPERT, H.; HOFFMANN, W. (2007) Localization of TFF3 peptide in human esophageal submucosal glands and gastric cardia: differentiation of two types of gastric pit cells along the rostro-caudal axis. *Cell. Tissue Res.* 328: 365-374
- KOUZNETSOVA, I.; LAUBINGER, W.; KALBACHER, H.; KALINSKI, T.; MEYER, F.; ROESSNER, A.; HOFFMANN, W. (2007) Biosynthesis of gastrokine-2 in the human gastric mucosa: restricted spatial expression along the antral gland axis and differential interaction with TFF1, TFF2 and mucins. *Cell. Physiol. Biochem.* 20(6): 899-908
- LÄMMLI, U.K.; Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LANGENBACH, K. J.; SOTTILE, J. (1999) Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin. *J. Biol. Chem.* 274(11): 7032-7038
- LANGER, G., JAGLA, W., BEHRENS-BAUMANN, W., WALTER, S., AND HOFFMANN, W. (1999) Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40: 2220-2224
- LEE, S.; BANG, S.; SONG, K.; LEE, I. (2006) Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep.* 16(4): 747-754
- LEMERCINIER, X.; MUSKETT, F. W.; CHEESEMAN, B.; MCINTOSH, P. B.; THIM, L.; CARR, M. D. 2001 High-resolution solution structure of human intestinal trefoil factor and functional insights from detailed structural comparisons with the other members of the trefoil family of mammalian cell motility factors. *Biochemistry* 40: 9552-9559
- LEUNG, W. K.; YU, J.; CHAN, F.K.; TO, K. F.; CHAN, M. W.; EBERT, M. P.; NQ, E. K.; CHUNG, S. C.; MALFERTHEINER, P.; SUNG, J.J. (2002) Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia and non-neoplastic gastric tissues. *J. Pathol.* 197: 582-588

- LIDELL, M. E., HANSSON, G. C. (2006) Cleavage in the GDHP sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin. *Biochem. J.* 399(1): 121-129
- LIDELL, M. E.; JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. (2003) An autocatalytic cleavage in the C-terminus of the human MUC2 mucin occurs at the low PH of the late secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 278(16): 13944-13951
- LOTTSPEICH F., ZORBAS H. (1998) Bioanalytik (1. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag
- MÄCK, C.; JUNGERMANN, K.; GÖTZE, O.; SCHIEFERDECKER, H. L.; (2001) Anaphylatoxin C5a actions in rat liver: synergistic enhancement by C5a of lipopolysaccharide-dependent alpha(2)-macroglobulin gene expression in hepatocytes via IL-6 release from Kupffer cells. *J Immunol.* 167(7): 3972-3979
- MADSEN, J.; NIELSEN, O.; TORNOE, I.; THIM, L.; HOLMSKOV, U. (2007) Tissue localization of human trefoil factors 1, 2 and 3. *J. Histochem. Cytochem.* 55: 505-513
- MARCHBANK, T.; COX, H. M.; GOODLAD, R. A.; GIRAUD, A. S.; MOSS, S. F.; POULSOM, R.; WRIGHT, N. A.; JANKOWSKI, J.; PLAYFORD, R. J. (2001) Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 276: 24088-24096
- MASHIMO, H.; WU, D.-C.; PODOLSKY, D. K.; FISHMAN, M. C. (1996) Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274: 262-265
- MATSUOKA, Y.; PASCALL, J. C.; BROWN, K. D. (1999) Quantitative analysis reveals differential expression of mucin (MUC2) and intestinal trefoil factor mRNAs along the longitudinal axis of rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 1489: 336-344
- MAY F. E. B.; WESTLEY B. R.; (1997) Expression of human intestinal trefoil factor in malignant cells and its regulation by oestrogen in breast cancer cells. *J.Pathol.* 182: 404–413
- MAY, F. E. B.; CHURCH, S. T.; MAJOR, S.; WESTLEY, B. R. (2003) The closely related estrogen-regulated trefoil proteins TFF1 and TFF3 have markedly different hydrodynamic properties, overall charge, and distribution of surface charge. *Biochemistry* 42: 8250-8259
- MCGUCKIN, M. A.; SIMMS, L. A.; FLORIN, T. H. J.; RADFORD-SMITH, G. (2009) Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel. Dis.* 15(1): 100-113
- MORO, F.; LEVENEZ, F.; DURUAL, S.; PLAISANCIÉ, P.; THIM, L.; GIRAUD, A. S.; CUBER, J.-C. (2001) Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul. Peptides* 101(1-3): 35-41
- MUSKETT, F. W.; MAY, F. E. B.; WESTLEY, B. R.; FEENEY, J. (2003) Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil factor (TFF3): the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry* 42: 15139-15147
- MUSTAFA, A. K.; GADALLA, M. M.; SEN, N.; KIM, S.; MU, W.; GAZI, S. K.; BARROW, R. K.; YANG, G.; WANG, R.; SNYDER, S. H. (2009) H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulphydration. *Sci. Signal.* 2(96): ra72
- OERTEL, M.; GRANESS, A.; THIM, L.; BÜHLING, F.; KALBACHER, H.; HOFFMANN, W. (2001) Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25: 418-424
- OLEKSIEWICZ, M. B.; KJELDAL, H. O.; KLENO, T. G. (2005) Identification of stool proteins in C57BL/6J mice by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Biomarkers* 10(1): 29-40
- PARK, S.-W.; ZHEN, G.; VERHAEGHE, C.; NAKAGAMI, Y.; NGUYENVU, L. T.; BARCZAK, A. J.; KILLEEN, N.; ERLE, D. J. (2009) The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 6950-6955

- PAULSEN, F. P., WOON, C.-W., VAROGA, D., JANSEN, A., GARREIS, F., JÄGER, K., AMM, M., PODOLSKY, D. K., STEVEN, P., BARKER, N. P., AND SEL, S. (2008) Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J. Biol. Chem.* 283: 13418-13427
- PAULSEN, F. P.; HINZ, M.; SCHAUDIG, U.; THALE, A. B.; HOFFMANN, W. (2002) TFF peptides in the human efferent tear ducts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 3359-3364
- PAULSEN, F.; VAROGA, D.; PAULSEN, A.; TSOKOS, M. (2005) Trefoil factor family (TFF) peptides of normal Vater's ampulla. *Cell. Tissue Res.* 321: 67-74
- PAWLOWSKI, K.; LEPISTÖ, M.; MEINANDER, N.; SIVARS, U.; VARGA, M.; WIESLANDER, E. (2006) Novel conserved hydrolase domain in the CLCA family of alleged calcium-activated chloride channels. *Proteins* 63: 424-439
- PEREZ-VILAR, J. (2007) Mucin granule intraluminal organization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 36(2): 183-190
- PESTOV, N. B.; KORNEENKO, T. V.; SHAKHPARANOV, M. I.; SHULL, G. E.; MODYANOV, N. N. (2006) Loss of acidification of anterior prostate fluids in *Atp12a*-null mutant mice indicates that nongastric H-K-ATPase functions as proton pump in vivo. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291(2): C366-C374
- PODOLSKY, D. K.; LYNCH-DEVNEY, K.; STOW, J. L.; OATES, P.; MURGUE, B.; DEBEAUMONT, M.; SANDS, B. R.; MAHIDA, Y. R. (1993) Identification of human intestinal trefoil factor. *J. Biol. Chem.*, 268: 6694-6702
- POULSEN, S. S.; KISSOW, H.; HARE, K.; HARTMANN, B.; THIM, L. (2005) Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul. Peptides* 126: 163-171
- POULSON R.; HANBY A. M.; LALANI E. N.; HAUSER F.; HOFFMANN W.; STAMP G. W. H. (1997) Intestinal trefoil factor (TFF3) and pS2 (TFF2), but not spasmodic polypeptide (TFF2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J. Pathol.* 183: 30-38
- RIEMER, J.; BULLEID, N.; HERRMANN, J. M. (2009) Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science* 324: 1284-1287
- RINNERT, M.; HINZ, M.; BUHTZ, P.; REIHER, F.; LESSEL, W.; HOFFMANN, W. (2010) Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine. *Cell Tissue Res.* 339: 639-647
- RÖSLER, S.; HAASE, T.; CLAASSEN, H.; SCHULZE, U.; SCHICHT, M.; RIEMANN, D.; BRANDT, J.; WOHLRAB, D.; MÜLLER-HILKE, B.; GOLDRING, M.B.; SEL, S.; VAROGA, D.; GARREIS, F.; PAULSEN, F.P. (2010) Trefoil factor 3 is induced during regenerative and inflammatory joint disease, activates matrix metalloproteinases, and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 62: 815-825
- SEIB T.; BLIN N.; HILGERT K.; SEIFERT M.; THEISINGER B.; ENGEL M.; DOOLEY S.; ZANG K.D.; WELTER C. (1997) The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 40(1): 200-202
- STEENWINCKEL, V.; LOUAHED, J.; LEMAIRE, M. M.; SOMMEREYNS, C.; WARNIER, G.; MCKENZIE, A.; BROMBACHER, F.; VAN SNICK, J.; RENAULD, J.-C. (2009) IL-9 promotes IL-13-dependent paneth cell hyperplasia and up-regulation of innate immunity mediators in intestinal mucosa. *J. Immunol.* 182(8): 4737-4743
- SUEMORI, S.; LYNCH-DEVANEY, K.; PODOLSKY, D. K. (1991) Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue- and cell specific member of the trefoil protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 11017-11021

- TAUPIN D.; OOI K.; YEOMANS N.; GIRAUD A. (1996) Conserved expression of intestinal trefoil factor in the human colonic adenoma-carcinoma sequence. *Lab. Invest.* 75: 25–32
- TAUPIN, D. R.; KINOSHITA, K.; PODOLSKY, D. K. (2000) Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 799-804
- TAUPIN, D.; OOI, K.; YEOMANS, N.; GIRAUD, A. (1996) Conserved expression of intestinal trefoil factor in the human colonic adenoma-carcinoma sequence. *Lab. Invest.* 75(1): 25-32
- TAUPIN, D.; PODOLSKY, D.K. (2003) Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 721-732
- THEISINGER, B.; SEITZ G.; DOOLEY S.; WELTER C. (1996) A second trefoil protein, ITH/hP1.B, is transcribed in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 38: 145–151
- THIM, L. (1989) A new family of growth factor-like peptides. Trefoil disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS1), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* 250: 85-90
- THIM, L.; MAY F.E.B. (2005) Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2956-2973
- THIM, L.; WÖLDIKE, H. F.; NIELSEN, P. F.; CHRISTENSEN, M.; LYNCH-DEVANEY, K.; PODOLSKY, D. K. (1995) Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry* 34: 4757-4764
- THIM, L.; WÖLDIKE, H. F.; NIELSEN, P. F.; CHRISTENSEN, M.; LYNCH-DEVANEY, K.; PODOLSKY, D. K. (1995) Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry* 34(14): 4757-4764
- THORNTON, D., J.; CARLSTEDT, I.; SHEEHAN, J., K. (1994) Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels. *Methods Mol. Biol.* 32: 119-128
- THORNTON, D., J.; DEVINE, P., L.; HANSKI, C.; HOWARD, M.; SHEEHAN, J., K. (1994) Identification of two major populations of mucins in respiratory secretions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 823-832
- TORRES, L.-F.; KARAM, S. M.; WENDLING, C.; CHENARD, M.-P.; KERSHENOBICH, D.; TOMASETTO, C.; RIO, M.-C. (2002) Trefoil factor 1 (TFF1/pS2) deficiency activates the unfolded protein response. *Mol. Med.* 8(5): 273-282
- VANDENBROUCKE K., HANS W., VAN HUYSSSE J., NEIRYNCK S., DEMETTER P., REMAUT E., ROTTIERS P., STEIDLER L. (2004) Active delivery of Trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127: 502-513
- VERDUGO, P. (1990) Goblet Cells Secretion and Mucogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 52: 157-176
- VERDUGO, P. (1991) Mucin Exocytosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144(3 Pt 2): S33-37
- WALLACE, J. L.; VONG, L.; MCNIGHT, W.; DICAY, M.; MARTIN, G. R. (2009) Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology* 137(2): 569-578
- WESTLEY, B. R.; GRIFFIN, S. M.; MAY, F. E. B. (2005) Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry* 44: 7967-7975
- WIEDE A., HINZ M., CANZLER E., FRANKE K., QUEDNOW C., AND HOFFMANN W. (2001) Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res.* 303: 109-115

- WIEDE A.; JAGLA W.; WELTE T.; KÖHNLEIN T.; BUSK H.; HOFFMANN W. (1999) Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159: 1330-1335
- WILHELM, B.; KEPPLER, C.; HENKELER, A.; SCHILLI-WESTERMANN, M.; LINDER, D.; AUMÜLLER, G.; SEITZ, J. (2002) Identification and characterization of an IgG binding protein in the secretion of the rat coagulating gland. *Biol. Chem.* 383(12): 1959-1965
- WONG W.M.; POULSOM R.; WRIGHT, N.A. (1999) Trefoil peptides. *Gut* 44: 890-895
- WRIGHT N.A.; HOFFMANN W.; OTTO W.R.; RIO M.C.; THIM L. (1997) Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett.* 408(2): 121-123
- YASUI, Y.; TANAKA, T. (2009) Protein expression analysis of inflammation-related colon carcinogenesis. *J. Carcinogen.* 8:10 DOI: 10.4103/1477-3163.51851
- YU K., JIANG S.F., LIN M.F., WU J.B., LIN J. (2004) Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Lab. Invest.* (84)3: 390-392
- ZHEN, G.; PARK, S. W.; NGUYENVU, L. T.; RODRIGUEZ, M. W.; BARBEAU, R. (2007) IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 36(2): 244-253

## 7 Anhang

### 7.1 Charakterisierung des TFF3-Heteromers durch LC-ESI-MS/MS-Analyse

Tab. 20: Vollständige Liste der durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierten Proteine

Proteinbande	Identifiziertes Protein	SwissProt Accession	Lokalisation	Nom. Mass (kDa)	Score	identifizierte Peptide	Sequenz-übereinstimmung
B>500A	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	3125.79	58	13.28%
	A2MG	P01023	SEC	163.19	923.22	18	14.86%
	MUC2	Q02817	SEC	539.96	497.78	13	2.92%
B>500B	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	3570.85	69	15.39%
	A2MG	P01023	SEC	163.19	611.12	13	12.35%
	MUC2	Q02817	SEC	539.96	115.58	3	0.93%
B123	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	1794.45	35	7.42%
	K2C1	P04264	IC	66.00	165.04	4	6.37%
B73	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	1103.64	21	4.11%
	CLCA1	A8K714	SEC	100.11	309.54	8	11.38%
B61	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	1050.36	22	4.33%
	IGHA1	P01876	SEC	37.63	351.70	7	17.56%
B55	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	1922.25	35	8.18%
	K1C10	P13645	SEC	58.79	257.27	5	9.59%
B51	FCGBP	Q9Y6R7	SEC	571.64	1551.10	30	6.35%
	IGHG1	P01857	SEC	36.08	148.67	5	18.18%
B<14	K2C1	P04264	IC	66.00	1258.03	20	39.91%
	K1C9	P35527	IC	62.03	1107.73	21	40.61%
	K2C6B	P04259	IC	60.03	481.26	7	13.65%
	K2C6A	P02538	IC	60.01	390.04	1	10.99%
	K1C14	P02533	IC	51.53	255.95	5	10.38%
	K1C16	P08779	IC	51.24	250.34	1	10.15%
	K2C5	P13647	IC	62.34	222.49	3	12.54%
	K1C10	P13645	IC	58.79	194.48	2	6.85%
	TFF3	Q07654	SEC	8.64	137.13	3	56.25%

Signifikanzwert  $P \leq 0.05$ ; SEC, sekretorisches Protein; IC, intrazelluläres Protein

## 7.2 Detaillierter Proteinreport der Analyse der SwissProt 56.9 Datenbank

### Proteinbande B>500A

**Protein 1:** IgGFC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3

**Accession:** FCGBP\_HUMAN

**Score:** 3125.79

**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)

**MW:** 571.64 kDa

**Database Date:** 2009-03-05

**pl:** 5.03

**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation

**Sequence Coverage:** 13.28 %

**No. of unique Peptides:** 58

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
254	1	706.8893	20.737	2	18.87	82.63	0	263-275	R.YDLAFVVASQATKL	
70	1	638.2994	-41.124	2	11.96	75.49	0	276-287	K.LTYNHGGITGSR.G	
354	1	958.0697	-88.086	3	22.89	64.01	0	325-349	R.NEVTYDPYLVLPDVAAYCPAYVVK.S	Carbamidomethyl: 19
209	1	807.8988	-38.15	2	17.04	68.72	0	350-365	K.SVPGCEGVALVWAQTK.A	Carbamidomethyl: 5
93	1	613.2229	-	2	13.08	78.94	0	423-434	K.AIGYATAADCGR.T	Carbamidomethyl: 10
130	1	731.5624	-	3	14.27	52.31	0	435-454	R.TVLSPEVCEGMQCAAGQR.C	Carbamidomethyl: 10, 15; Oxidation: 13
64	1	640.7324	-89.467	2	11.73	88.77	0	462-473	K.AGCVAESTAVCR.A	Carbamidomethyl: 3, 11
170	1	416.9255	15.723	3	15.70	33.08	1	524-534	R.RVSYVGLVTVR.A	
212	1	546.8665	77.312	2	17.14	90.54	0	525-534	R.VSYVGLVTVR.A	
218	1	666.8466	-3.537	2	17.34	102.32	0	545-556	R.GEVGFVLVDNQR.S	
120	1	600.7976	-67.895	2	13.94	55.29	1	557-567	R.SRLPVSLSSEGR.L	
25	1	522.1623	-	3	9.57	35.17	0	824-836	R.CTCNGATHQVTCR.D	Carbamidomethyl: 1, 3, 12
313	1	938.0379	-67.515	3	21.19	33.35	0	880-904	R.FDFMGTCYLLVSGCGQNAALPAFR.V	Carbamidomethyl: 7, 15; Oxidation: 4
31	1	498.2384	-57.545	2	10.00	44.06	0	905-912	R.VLVENEHR.G	
32	1	392.1982	18.782	2	10.01	33.99	0	907-912	L.VENEHR.G	
48	1	499.6781	-	2	10.85	49.28	0	913-921	R.GSQTVSYTR.A	
297	1	961.3692	-74.653	3	20.60	63.19	0	991-1017	K.VPSSYAEALCGLGNFNGDPADDLALR.G	Carbamidomethyl: 10, 13
62	1	428.2285	-21.68	2	11.69	22.01	0	1082-1089	K.LDPQGAVER.D	
235	1	780.8950	-5.78	2	18.21	104.45	0	1291-1304	R.FAVLQENVAWGNGR.V	
54	1	489.6892	-	2	11.17	51.50	0	1329-1337	K.VTVNGVDMK.L	Oxidation: 8
216	1	713.7005	-50.667	3	17.29	44.22	1	1329-1348	K.VTVNGVDMKLPVVLANGQIR.A	Oxidation: 8
195	1	590.3579	-10.413	2	16.53	86.62	0	1338-1348	K.LPVVLANGQIR.A	
215	1	915.8895	-68.968	2	17.21	105.48	0	1349-1365	R.ASQHGSVDVIETDFGLR.V	
247	1	630.8130	-34.539	2	18.59	83.21	0	1366-1375	R.VAYDLVYVVR.V	
173	1	884.3141	-77.106	3	15.80	41.55	0	1376-1398	R.VTVPGNYQQMCGLCGNYNGDPK.D	Carbamidomethyl: 12, 15; Oxidation: 11
208	1	842.3724	-30.577	3	16.95	55.21	1	1455-1476	K.YQKEEFCGLSSPTGPLSSCHK.L	Carbamidomethyl: 7, 20
45	1	372.4966	-23.687	3	10.79	25.32	0	1679-1687	D.PHYHSFDGR.K	
23	1	415.1544	-	3	9.43	22.03	1	1679-1688	D.PHYHSFDGRK.F	
89	1	481.7588	5.104	2	12.89	57.88	0	1725-1733	R.GNPAVSYVR.V	
227	1	608.2906	-	3	17.72	38.14	1	1754-1771	K.VRVNGVLTALPVSADGR.I	
240	1	784.4603	21.092	2	18.28	75.55	0	1756-1771	R.VNGVLTALPVSADGR.I	
46	1	445.7298	-46.942	2	10.72	61.67	0	1772-1780	R.ISVTQGASK.A	
280	1	831.3099	-42.702	2	20.12	85.31	0	1846-1858	R.APGWDPLCWDECR.G	Carbamidomethyl: 8, 12
176	1	680.9502	-29.819	3	15.87	32.59	1	1904-1921	K.GCVLDVCMGGGDRDILCK.A	Carbamidomethyl: 2, 7, 17; Oxidation: 8
316	1	1075.4441	-87.852	2	21.28	115.53	0	1922-1941	K.ALASYAACQAAGVVIDWRA	Carbamidomethyl: 9
65	1	398.8666	-13.525	3	11.78	42.43	0	2078-2087	D.PHYVTLDGHR.F	
47	1	484.6968	-96.197	2	10.80	62.43	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
234	1	980.0572	-76.573	3	17.93	71.28	1	2197-2223	R.LRVPAAYAGSLCGLCGNYNQDPADLKA	Carbamidomethyl: 12, 15
38	1	430.7020	-	2	10.39	61.23	0	4174-4182	R.ISVAQGASK.A	
242	1	985.0686	268.545	3	18.32	43.21	1	4599-4625	R.LRVPAAYAASLCGLCGNYNQDPADLKA	Carbamidomethyl: 12, 15
52	1	544.1775	-	3	11.09	55.97	0	4841-4855	R.LEDGVQACHATGCGR.C	Carbamidomethyl: 8, 13
196	1	830.4030	-17.116	2	16.51	50.83	0	4856-4870	R.CLANGGIHYITLDR.V	Carbamidomethyl: 1
33	1	422.6723	-	2	10.13	38.41	0	4902-4909	K.NAAGDLQR.L	
22	1	444.1843	-	2	9.14	30.77	1	4943-4950	R.VRVTAEGRN	

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
87	1	467.6897	-139.501	2	12.72	37.18	0	4951-4958	R.NMVLQTTK.G	
42	1	475.6973	-115.836	2	10.58	25.10	0	4951-4958	R.NMVLQTTK.G	Oxidation: 2
274	1	1134.9221	-102.95	2	19.72	99.24	0	5055-5074	R.NPQGFATCQAVLSPSEYFR.Q	Carbamidomethyl: 9
233	1	697.6956	-3.898	3	17.96	55.05	0	5093-5112	R.SLAAYTAACQAAGVAVKPWR.T	Carbamidomethyl: 9
162	1	950.8270	-96.89	2	15.36	97.43	0	5133-5150	R.TCQGSCAALSGLTGCTTR.C	Carbamidomethyl: 2, 6, 15
141	1	712.7844	-98.25	2	14.59	73.93	0	5251-5264	R.GATTSPGVYELSSR.C	
245	1	752.8888	22.433	2	18.44	61.75	0	5265-5276	R.CPGLQNTIPWYR.V	Carbamidomethyl: 1
78	1	413.8852	-8.353	3	12.26	26.67	0	5277-5287	R.VVAEVQICHGK.T	Carbamidomethyl: 8
183	1	450.7669	23.862	2	16.15	42.17	0	5310-5317	K.GVWVNGLR.V	
81	1	386.2141	-4.884	2	12.59	29.90	0	5318-5324	R.VDLPAAEK.L	
143	1	479.2588	-27.175	2	14.68	76.00	0	5333-5341	R.TPDGSLLR.Q	
157	1	485.9228	-36.236	3	15.14	31.62	1	5342-5355	R.QKAGVQVWLGANGK.V	
200	1	600.3312	1.658	2	16.68	82.08	0	5344-5355	K.AGVQVWLGANGK.V	
60	1	605.3047	-46.659	2	11.44	70.27	0	5356-5367	K.VAVIVSNDHAGK.L	

**Protein 2: Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=2**

**Accession:** A2MG\_HUMAN

**Score:** 923.22

**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.11.fasta)

**MW:** 163.19 kDa

**Database Date:** 2009-12-03

**pi:** 5.98

**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation

**Sequence Coverage:** 14.86 %

**No. of unique Peptides:** 18

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
273	1	924.9088	-37.823	2	19.60	54.40	0	189-204	K.QFSFPLSSEPFQGSYK.V	
253	1	836.9353	3.121	2	18.80	43.91	0	215-228	R.TEHPFTVEEFVLPK.F	
148	1	633.9194	-72.031	3	14.81	27.54	0	290-305	K.FSGQLNSHGCFYQVQK.T	Carbamidomethyl: 10
28	1	380.6751	-40.374	2	9.84	30.49	0	355-360	K.VDSHFR.Q	
307	1	922.9670	-59.624	2	20.95	83.20	0	540-557	R.LLIYAVLPTGDVIGDSAK.Y	
118	1	636.8101	-47.075	2	13.84	85.62	0	587-598	R.VTAAPQSVCALR.A	Carbamidomethyl: 9
151	1	638.2821	-8.218	2	14.95	68.70	0	705-715	R.VGFYESDVMGR.G	Oxidation: 9
230	1	509.8311	60.578	2	17.77	37.05	0	812-820	K.ATVLNLYPK.C	
161	1	558.8003	-10.256	2	15.32	50.76	0	854-863	R.QTVSWAVTPK.S	
160	1	628.2903	-55.416	2	15.28	64.20	0	1004-1014	K.AIGYLNTGYQR.Q	
102	1	709.7588	-61.151	2	13.38	43.55	0	1020-1031	K.HYDGSYSTFGER.Y	
321	1	746.4143	17.339	2	21.48	71.66	0	1035-1047	R.NQGNTWLTAFVLK.T	
397	1	796.7511	-13.511	3	24.34	41.68	0	1054-1073	R.AYIFIDEAHITQALIWLSQR.Q	
158	1	552.2762	-54.671	2	15.16	64.01	0	1082-1092	R.SSGSLLNNAIK.G	
302	1	783.4254	7.215	2	20.86	79.82	0	1148-1162	K.ALLAYAFALAGNQDK.R	
29	1	509.2390	-85.196	2	9.91	29.22	1	1169-1177	K.SLNEEAVKK.D	
97	1	443.7388	32.205	2	13.21	52.27	0	1264-1271	K.YGAATFTR.T	
58	1	503.6959	-84.924	2	11.36	49.45	0	1290-1297	K.FQVDNNRLL	

**Protein 3: Mucin-2 OS=Homo sapiens GN=MUC2 PE=1 SV=2**

**Accession:** MUC2\_HUMAN **Score:** 497.78  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 539.96 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 5.43  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 2.92 %  
**No. of unique Peptides:** 13

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
35	1	460.1657	-134.528	2	10.18	21.42	0	21-28	G.SELQTEGR.T	
189	1	478.7490	45.434	2	16.31	37.00	0	47-54	K.TFDGDFVFR.F	
305	1	887.0830	37.733	3	20.83	45.18	1	47-68	K.TFDGDFVFRPGLCDYNFASDCR.G	Carbamidomethyl: 13, 21
391	1	943.4704	-37.932	3	24.14	40.19	1	81-107	R.GPGQAEAPAGVESILLTKDDTIYLTR.H	
246	1	594.2595	-68.704	3	18.54	64.87	0	541-558	K.TASGLVEATGAGFANTWKA	
66	1	468.2276	-49.742	2	11.81	26.15	1	593-600	K.KTETPFGR.C	
264	1	510.8291	139.538	2	19.28	57.97	0	643-650	K.GVMLWGWR.E	Oxidation: 3
63	1	537.7463	-70.551	2	11.67	73.06	0	754-763	R.LIGQSCCTAPK.I	Carbamidomethyl: 6
27	1	429.1909	-26.283	3	9.76	34.52	0	942-952	R.DEGHHVAYTTR.E	
122	1	498.1968	-44.255	3	14.03	20.65	0	986-998	K.GTVCGLCGNFDHR.S	Carbamidomethyl: 4, 7
50	1	477.6625	-114.949	2	11.01	45.02	0	999-1006	R.SNNDFTTR.D	
115	1	576.2700	-16.178	2	13.73	42.84	0	1056-1065	K.SSVFSICHSK.V	Carbamidomethyl: 7
211	1	512.7453	16.004	2	17.07	37.14	0	1105-1112	K.EGACVFWRT	Carbamidomethyl: 4

**Protein 4: Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6**

**Accession:** K2C1\_HUMAN **Score:** 314.59  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 66.00 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pl:** 8.82  
**Sequence Coverage:** 12.73 %  
**No. of unique Peptides:** 7

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
265	1	978.1258	-52.296	3	19.38	41.29	1	200-223	R.FLEQQNQVLQTKWELLQQVDSTR.T	
295	1	717.3834	26.897	3	20.50	30.42	1	224-240	R.THNLEPYFESFINLR.R	
169	1	633.3704	76.04	2	15.63	21.76	0	278-288	R.TNAENEFVTIK.K	
116	1	465.2384	-22.586	3	13.79	36.12	1	278-289	R.TNAENEFVTIKK.D	
310	1	651.9198	89.896	2	21.09	90.31	0	344-355	R.SLDLDSIAEVK.A	
77	1	533.2491	-28.309	2	12.23	50.01	0	356-364	K.AQYEDIAQK.S	
152	1	487.2857	33.695	2	14.99	55.32	0	396-403	K.IEISELNR.V	

**Protein 5: Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3**

**Accession:** IGHM\_HUMAN **Score:** 177.85  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 49.28 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pl:** 6.36  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 10.84 %  
**No. of unique Peptides:** 4

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
146	1	625.2789	-68.161	2	14.78	82.28	0	132-142	K.LICQATGFSPR.Q	Carbamidomethyl: 3
103	1	431.7723	14.954	2	13.34	24.56	0	178-185	K.VTSTLTIK.E	
368	1	819.4565	-14.899	2	23.37	49.93	0	224-238	R.VFAIPPSFASIFLTK.S	
85	1	808.8272	-78.252	2	12.79	27.59	0	377-391	K.YVTSAPMPERQAPGR.Y	Oxidation: 7

**Protein 6: Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6**

**Accession:** K1C10\_HUMAN **Score:** 143.83  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.11.fasta) **MW:** 58.79 kDa  
**Database Date:** 2009-12-03 **pl:** 5.00  
**Sequence Coverage:** 7.36 %  
**No. of unique Peptides:** 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
367	1	1018.1219	-90.41	3	23.30	50.74	1	202-228	K.TIDLKNQILNLTDDANILLQIDNAR.L	
117	1	404.2565	131.345	2	13.78	34.01	0	229-235	R.LAADDLRL	
190	1	516.2862	-32.132	2	16.36	65.59	0	258-266	R.VLDELTLTK.A	

**Protein 7: Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2**

**Accession:** K22E\_HUMAN **Score:** 125.03  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.7.fasta) **MW:** 65.39 kDa  
**Database Date:** 2009-09-03 **pl:** 8.85  
**Sequence Coverage:** 3.13 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
311	1	665.4092	63.95	2	21.12	74.21	0	342-353	R.NLDLDSIAEVK.A	

**Proteinbande B>500B****Protein 1: IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3****Accession:** FCGBP\_HUMAN**Score:** 3570.85**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)**MW:** 571.64 kDa**Database Date:** 2009-03-05**pl:** 5.03**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation**Sequence Coverage:** 15.39 %**No. of unique Peptides:** 69

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
116	1	600.2626	-76.828	3	14.45	32.95	0	214-231	K.VTASSPVAVLSGHSCAQK.H	Carbamidomethyl: 15
221	1	706.9033	40.542	2	18.85	75.09	0	263-275	R.YDLAFVVASQATK.L	
57	1	638.3261	0.704	2	11.86	54.14	0	276-287	K.LTYNHGGITGSR.G	
330	1	958.0872	-69.821	3	22.92	59.72	0	325-349	R.NEVTYDPYLVLPDVAAYCPAYVVK.S	Carbamidomethyl: 19
179	1	807.9511	26.583	2	16.93	58.53	0	350-365	K.SVPGCEGVALVVAQTK.A	Carbamidomethyl: 5
81	1	613.2069	-127.57	2	12.98	79.00	0	423-434	K.AIGYATAADCGR.T	Carbamidomethyl: 10
143	1	726.2751	-76.934	3	15.46	39.97	0	435-454	R.TVLSPEVPSCEGMQCAAGQR.C	Carbamidomethyl: 10, 15
111	1	731.5742	-	3	14.28	56.35	0	435-454	R.TVLSPEVPSCEGMQCAAGQR.C	Carbamidomethyl: 10, 15; Oxidation: 13
			120.845							
51	1	640.7388	-79.479	2	11.60	85.45	0	462-473	K.AGCVAESTAVCR.A	Carbamidomethyl: 3, 11
148	1	624.8654	-15.01	2	15.63	73.79	1	524-534	R.RVSYVGLVTVR.A	
55	1	560.7591	-56.727	2	11.80	63.48	0	535-544	R.AYSHSVSLTR.G	
188	1	666.8259	-34.578	2	17.32	93.28	0	545-556	R.GEVGFVLVDNQR.S	
13	1	522.1800	-73.976	3	9.51	21.95	0	624-636	R.CTCNGATHQVTCR.D	Carbamidomethyl: 1, 3, 12
162	1	819.8671	-5.71	2	16.24	97.26	0	847-860	R.CSVQNLGLGCYDPR.F	Carbamidomethyl: 1, 10
20	1	498.2318	-70.791	2	10.10	51.76	0	905-912	R.VLVENEHR.G	
21	1	392.1951	10.877	2	10.05	30.46	0	907-912	L.VENEHR.G	
34	1	499.6792	-	2	10.76	39.15	0	913-921	R.GSQTVSYTR.A	
			139.096							
271	1	961.3936	-49.274	3	20.52	81.68	0	991-1017	K.VPSSYAEALCGLCGNFNGDPADDLALR.G	Carbamidomethyl: 10, 13
50	1	428.2194	-42.93	2	11.61	32.80	0	1082-1089	K.LDPQGAVR.D	
203	1	780.8833	-20.763	2	18.01	101.40	0	1291-1304	R.FAVLQENVAWGNR.V	
41	1	489.7138	-73.644	2	11.18	67.83	0	1329-1337	K.VTVNGVDMK.L	Oxidation: 8
187	1	713.7590	31.296	3	17.30	53.37	1	1329-1348	K.VTVNGVDMKLPVVLANGQIR.A	Oxidation: 8
171	1	590.3602	-6.517	2	16.58	81.26	0	1338-1348	K.LPVLVLANGQIR.A	
185	1	915.9349	-19.402	2	17.14	116.15	0	1349-1365	R.ASQHGSDVVIETDFGLR.V	
216	1	630.8520	27.284	2	18.55	77.85	0	1366-1375	R.VAYDLVYYVR.V	
28	1	372.4702	-94.558	3	10.51	33.24	0	1679-1687	D.PHYHSFDGR.K	
11	1	415.1886	-36.475	3	9.32	20.55	1	1679-1688	D.PHYHSFDGRK.F	
249	1	899.8625	-86.62	4	19.80	39.55	1	1688-1720	R.KFDFQGTCTNYVLATTGCPGVSTQGLTPFTVTTK.N	Carbamidomethyl: 8, 17
282	1	868.1284	243.903	4	20.81	31.38	0	1689-1720	K.FDFQGTCTNYVLATTGCPGVSTQGLTPFTVTTK.N	Carbamidomethyl: 7, 16
78	1	481.7495	-14.2	2	12.89	59.71	0	1725-1733	R.GNPAVSYYR.V	
80	1	395.2093	-37.467	2	12.99	48.64	0	1727-1733	N.PAVSYVR.V	
197	1	608.3818	44.431	3	17.70	38.83	1	1754-1771	K.VRVNGVLTALPVSADGR.I	
209	1	784.4991	70.554	2	18.30	61.33	0	1756-1771	R.VNGVLTALPVSADGR.I	
32	1	445.7079	-96.073	2	10.66	62.49	0	1772-1780	R.ISVTQGASK.A	
265	1	554.5746	15.462	3	20.31	39.23	0	1846-1858	R.APGWDPLCWDECR.G	Carbamidomethyl: 8, 12
19	1	589.6671	-	2	9.98	47.80	0	1859-1868	R.GSCPTCPEDR.L	Carbamidomethyl: 3, 6
			109.847							
151	1	680.9560	-21.301	3	15.78	48.48	1	1904-1921	K.GCVLDVCMGGDRDILCK.A	Carbamidomethyl: 2, 7, 17; Oxidation: 8
378	5	1075.4519	-80.6	2	24.69	116.73	0	1922-1941	K.ALASYVAACQAAGVVIEDWR.A	Carbamidomethyl: 9
52	1	398.8736	4.024	3	11.70	44.75	0	2078-2087	D.PHYVTLDGHR.F	
33	1	484.6852	-	2	10.70	71.09	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
			120.127							
202	1	980.1125	-20.152	3	17.89	65.95	1	2197-2223	R.LRVAAYAGSLCGLGNYNQDPADLKA	Carbamidomethyl: 12, 15
254	1	874.0437	-17.674	3	19.95	36.67	0	2577-2599	R.VTPGNYQLMCLGCGNYNGDPK.D	Carbamidomethyl: 12, 15
42	1	410.8608	2.273	3	11.21	36.49	0	3660-3669	D.PHYTTFDGHR.F	
26	1	430.7145	-71.834	2	10.37	58.02	0	4174-4182	R.ISVAQGASK.A	

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
246	1	988.3699	-79.394	2	19.69	96.14	0	4800-4815	R.YYPLGEVFPYGPPECER.R	Carbamidomethyl: 14
215	1	711.2869	-67.685	3	18.51	34.08	1	4800-4816	R.YYPLGEVFPYGPPECER.C	Carbamidomethyl: 14
40	1	679.4404	-	4	11.08	43.43	0	4817-4840	R.CECGPGGHVTCQEGAACGPHEECR.L	Carbamidomethyl: 1, 3, 11, 17, 23
38	1	815.7629	-	2	11.03	74.58	0	4841-4855	R.LEDGVQACHATGCGR.C	Carbamidomethyl: 8, 13
170	1	830.3750	-50.834	2	16.49	71.37	0	4856-4870	R.CLANGGIHYITLDGR.V	Carbamidomethyl: 1
22	1	422.7379	48.931	2	10.15	36.57	0	4902-4909	K.NAAGDLQRL	
10	1	444.2165	-90.057	2	9.21	29.79	1	4943-4950	R.VRVTAEGR.N	
74	1	467.7332	-46.504	2	12.70	30.39	0	4951-4958	R.NMVLQTTK.G	
31	1	475.6979	-	2	10.57	36.86	0	4951-4958	R.NMVLQTTK.G	Oxidation: 2
300	1	1022.9961	-33.008	2	21.59	63.31	0	4962-4979	R.LLFDGDAHLLMSIPSPFR.G	Oxidation: 11
244	1	1134.9183	-	2	19.59	111.25	0	5055-5074	R.NPQGFATCQAVLSPSEYFR.Q	Carbamidomethyl: 9
110	1	642.7384	-79.027	2	14.24	56.24	0	5075-5084	R.QCVYDLCQK.G	Carbamidomethyl: 2, 7
140	1	950.8755	-45.887	2	15.34	99.31	0	5133-5150	R.TCQGSAAALSGLTGCTTR.C	Carbamidomethyl: 2, 6, 15
67	1	700.5429	-	3	12.35	33.58	0	5198-5217	R.CSCSSSGLTCQAAGCPPGR.V	Carbamidomethyl: 1, 3, 11, 16
12	1	354.5103	-22.997	3	9.32	25.36	1	5218-5226	R.VCEVKAER.N	Carbamidomethyl: 2
119	1	712.8006	-75.524	2	14.57	66.28	0	5251-5264	R.GATTSPGVYELSSR.C	
213	1	752.8402	-42.12	2	18.45	71.95	0	5265-5276	R.CPGLQNTIPWYR.V	Carbamidomethyl: 1
64	1	413.8992	25.473	3	12.21	24.06	0	5277-5287	R.VVAEQICHGK.T	Carbamidomethyl: 8
159	1	450.7895	74	2	16.15	36.24	0	5310-5317	K.GVWVNGLR.V	
63	1	386.2120	-10.321	2	12.25	32.12	0	5318-5324	R.VDLPAEK.L	
120	1	479.2625	-19.454	2	14.78	70.87	0	5333-5341	R.TPDGSLVLR.Q	
133	1	728.3903	-22.892	2	15.07	47.14	1	5342-5355	R.QKAGVQVWLGANGK.V	
173	1	600.3016	-47.648	2	16.63	78.90	0	5344-5355	K.AGVQVWLGANGK.V	
47	1	605.2833	-82.011	2	11.46	67.81	0	5356-5367	K.VAVIVNDHAGK.L	
91	1	1042.6651	-89.978	3	13.50	43.53	0	5368-5394	K.LCGACGNFDGQDQNDWHDSQEKPAEK.W	Carbamidomethyl: 2, 5; Oxidation: 25

**Protein 2: Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=2**

**Accession:** A2MG\_HUMAN **Score:** 611.12  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.11.fasta) **MW:** 163.19 kDa  
**Database Date:** 2009-12-03 **pl:** 5.98  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 12.35 %  
**No. of unique Peptides:** 13

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
316	1	825.7539	9.975	3	22.37	61.38	0	72-93	R.SLFTDLEAENDVLHCVAFAVPK.S	Carbamidomethyl: 15
49	1	745.2099	-	3	11.54	34.50	1	271-289	R.KYSDASDCHGEDSQAFCEK.F	Carbamidomethyl: 8, 17
286	1	923.0064	-16.938	2	20.96	74.65	0	540-557	R.LLIYAVLPTGDVIGDSAK.Y	
100	1	636.8263	-21.637	2	13.85	82.62	0	587-598	R.VTAAPQSVCALR.A	Carbamidomethyl: 9
126	1	638.2810	-9.941	2	14.81	68.98	0	705-715	R.VGFYEDVMGR.G	Oxidation: 9
61	1	515.9153	-45.635	3	12.07	32.83	0	720-732	R.LVHVEEPHTETVR.K	
139	1	558.8601	96.758	2	15.30	22.62	0	854-863	R.QTVSWAVTPK.S	
138	1	628.3397	23.206	2	15.23	49.51	0	1004-1014	K.AIGYLNTGYQR.Q	
87	1	709.7597	-59.883	2	13.29	31.44	0	1020-1031	K.HYDGSYSTFGER.Y	
372	1	796.7652	29.287	3	24.37	35.92	0	1054-1073	R.AYIFIDEAHITQALIWLSQLR.Q	
134	1	552.3007	-10.311	2	15.12	59.48	0	1082-1092	R.SSGSLLNNAIK.G	
280	1	783.4408	26.872	2	20.89	47.08	0	1148-1162	K.ALLAYAFALAGNQDK.R	
84	1	443.6988	-57.941	2	13.12	45.55	0	1254-1271	K.YGAATFTR.T	

**Protein 3: Mucin-2 OS=Homo sapiens GN=MUC2 PE=1 SV=2**

**Accession:** MUC2\_HUMAN **Score:** 115.58  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 539.96 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 5.43  
**Modification(s):** Carbamidomethyl **Sequence Coverage:** 0.93 %  
**No. of unique Peptides:** 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
366	1	943.4677	-40.794	3	24.18	43.21	1	81-107	R.GPGQAEAPAGVESILLTIKDDTIYLTR.H	
17	1	429.1507	-	3	9.82	23.48	0	942-952	R.DEGHHVAYITTR.E	
97	1	576.2637	-27.11	2	13.68	60.22	0	1056-1065	K.SSVFSICHSK.V	Carbamidomethyl: 7

**Proteinbande B123****Protein 1: IgGFc-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3****Accession:** FCGBP\_HUMAN**Score:** 1794.45**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)**MW:** 571.64 kDa**Database Date:** 2009-03-05**pI:** 5.03**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation**Sequence Coverage:** 7.42 %**No. of unique Peptides:** 35

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	Z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
187	1	780.8814	-23.196	2	18.34	25.04	0	1291-1304	R.FAVLQENVAWGNR.V	
198	1	630.8578	36.478	2	18.89	81.96	0	1366-1375	R.VAYDLVYYVR.V	
64	1	481.7760	40.807	2	13.23	59.78	0	1725-1733	R.GNPAVSIVR.V	
193	1	784.4050	-49.403	2	18.85	38.97	0	1756-1771	R.VNGVLTALPVSVADGR.I	
38	1	597.7998	-7.618	2	11.96	53.52	0	2078-2087	D.PHYVTLDGHR.F	
14	2	484.7100	-68.966	2	10.83	71.01	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
27	1	410.8619	4.95	3	11.45	25.98	0	3660-3669	D.PHYTTFDGHR.F	
9	1	430.7357	-22.617	2	10.46	40.24	0	4174-4182	R.ISVAQGASK.A	
192	1	984.7404	-64.719	3	18.61	77.37	1	4599-4625	R.LRVPAAAYAASLCGLCGNYNQDPADLK.A	Carbamidomethyl: 12, 15
189	1	895.1087	36.82	3	18.50	66.52	0	4601-4625	R.VPAAYAASLCGLCGNYNQDPADLK.A	Carbamidomethyl: 10, 13
219	1	988.4044	-44.49	2	20.11	77.00	0	4800-4815	R.YYPLGEVFYPGPECER.R	Carbamidomethyl: 14
195	1	711.3281	-9.766	3	18.74	38.59	1	4800-4816	R.YYPLGEVFYPGPECER.C	Carbamidomethyl: 14
21	1	815.8039	-64.672	2	11.27	66.18	0	4841-4855	R.LEDGVQACHATGCGR.C	Carbamidomethyl: 8, 13
149	1	830.4208	4.319	2	16.89	64.93	0	4856-4870	R.CLANGGIHITLDGR.V	Carbamidomethyl: 1
5	2	422.7260	20.78	2	10.07	61.91	0	4902-4909	K.NAAGDLQR.L	
1	1	444.2502	-14.2	2	3.40	36.96	1	4943-4950	R.VRVTAEGR.N	
60	1	467.7026	-	2	12.94	37.05	0	4951-4958	R.NMVLQTTK.G	
10	1	475.7382	-29.868	2	10.64	35.29	0	4951-4958	R.NMVLQTTK.G	Oxidation: 2
242	1	1022.9752	-53.437	2	21.70	84.87	0	4962-4979	R.LLFDGDAHLLMSIPSPFR.G	Oxidation: 11
218	1	1134.9550	-73.964	2	19.82	87.45	0	5055-5074	R.NPQGFATCQAVLSPSEYFR.Q	Carbamidomethyl: 9
90	1	642.7699	-30.022	2	14.45	48.94	0	5075-5084	R.QCVYDLCAQK.G	Carbamidomethyl: 2, 7
54	1	483.7467	3.681	2	12.68	28.56	1	5085-5092	K.GDKAFLCR.S	Carbamidomethyl: 7
181	1	697.7475	70.49	3	18.11	60.69	0	5093-5112	R.SLAAYTAACQAAGVAVKPWR.T	Carbamidomethyl: 9
118	1	950.8929	-27.589	2	15.55	88.96	0	5133-5150	R.TCQGSAAALSGLTGCTTR.C	Carbamidomethyl: 2, 6, 15
35	1	674.1340	-	2	11.83	53.20	0	5151-5160	R.CFEGCECDDR.F	Carbamidomethyl: 1, 5, 7
98	2	712.8196	-48.871	2	14.78	78.61	0	5251-5264	R.GATTSPGVYELSSR.C	
194	1	752.8593	-16.75	2	18.70	66.70	0	5265-5276	R.CPGLQNTIPWYR.V	Carbamidomethyl: 1
53	1	620.3469	28.296	2	12.58	59.67	0	5277-5287	R.VVAEVQICHGK.T	Carbamidomethyl: 8
138	1	450.7689	28.299	2	16.33	37.90	0	5310-5317	K.GVWVNGLR.V	
182	1	826.9366	-27.778	2	18.16	39.13	1	5310-5324	K.GVWVNGLRVLDPAEK.L	
52	1	386.2450	75.123	2	12.57	34.08	0	5318-5324	R.VDPAEK.L	
100	1	479.2733	3.06	2	14.88	81.68	0	5333-5341	R.TPDGSLVLR.Q	
151	1	600.3284	-3.006	2	16.87	71.94	0	5344-5355	K.AGVQVWLGANGK.V	
33	1	605.2979	-57.892	2	11.67	70.38	0	5356-5367	K.VAVIVNDHAGK.L	
77	1	1042.6738	-81.635	3	13.81	40.65	0	5368-5394	K.LCGACGNFDGQNTDWHDSQEKPAEK.W	Carbamidomethyl: 2, 5; Oxidation: 25

**Protein 2: Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6**

**Accession:** K2C1\_HUMAN **Score:** 165.04  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 66.00 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pI:** 8.82  
**Sequence Coverage:** 6.37 %  
**No. of unique Peptides:** 4

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
127	1	633.3036	-29.435	2	15.82	34.80	0	278-288	R.TNAENEFVTIK.K	
238	1	651.8684	11.045	2	21.44	83.14	0	344-355	R.SLDLDSIAEVK.A	
50	1	533.2687	8.446	2	12.46	30.50	0	356-364	K.AQYEDIAQK.S	
67	1	517.2523	-18.082	2	13.35	24.99	0	484-492	R.TLLEGEESRLM	

**Protein 3: Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3**

**Accession:** K1C9\_HUMAN **Score:** 60.53  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.7.fasta) **MW:** 62.03 kDa  
**Database Date:** 2009-09-03 **pI:** 5.00  
**Sequence Coverage:** 3.21 %  
**No. of unique Peptides:** 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
139	1	530.7765	-16.571	2	16.31	26.66	0	225-233	K.TLLDIDNTR.M	
108	1	579.2530	-79.581	2	15.09	39.55	0	251-261	R.QGVDADINGLR.Q	

**Proteinbande B73****Protein 1: IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3**

**Accession:** FCGBP\_HUMAN **Score:** 1103.64  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 571.64 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pI:** 5.03  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 4.11 %  
**No. of unique Peptides:** 21

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
50	1	547.2752	33.795	2	12.49	48.14	0	478-486	D.PHYTTFDGR.R	
161	1	780.8980	-1.939	2	18.16	114.94	0	1291-1304	R.FAVLQENVAWGNGR.V	
27	1	489.7178	-65.477	2	11.25	58.28	0	1329-1337	K.VTVNGVDMK.L	Oxidation: 8
147	1	1070.0343	-62.663	2	17.54	65.00	1	1329-1348	K.VTVNGVDMKLPVVLANGQIR.A	Oxidation: 8
128	1	590.3624	-2.79	2	16.91	83.32	0	1338-1348	K.LPVVLANGQIR.A	
145	1	915.8819	-77.266	2	17.44	110.57	0	1349-1365	R.ASQHGSDVVIETDFGLR.V	
175	2	630.8416	10.798	2	18.74	80.41	0	1366-1375	R.VAYDLVYYVR.V	
135	1	842.4018	4.323	3	16.95	66.89	1	1455-1476	K.YQKEEFCGLLSPTGPLSSCHK.L	Carbamidomethyl: 7, 20
156	1	702.6671	11.241	3	17.91	22.53	0	1458-1476	K.EEFCGLLSPTGPLSSCHK.L	Carbamidomethyl: 4, 17
71	1	483.7882	7.509	2	13.90	36.27	0	1477-1485	K.LVDPQGPK.D	
76	1	541.2932	-8.939	2	14.21	25.66	1	1477-1486	K.LVDPQGPK.C	
12	1	922.7949	-108.964	2	10.31	28.09	0	1643-1657	K.DPCHGVTCRPQETCK.E	Carbamidomethyl: 3, 8, 14
62	1	481.7646	17.143	2	13.17	62.84	0	1725-1733	R.GNPAVSYVR.V	
21	1	445.7674	37.41	2	10.78	39.41	0	1772-1780	R.ISVTQGASK.A	
203	1	631.3137	-38.131	2	20.40	39.15	0	1846-1858	R.APGWDPLCWDECR.G	Carbamidomethyl: 8, 12
23	1	484.7354	-16.567	2	10.81	64.87	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
199	1	674.0735	16.42	3	20.06	44.86	0	2577-2599	R.VTPGNYYQLMCLCGNYNGDPK.D	Carbamidomethyl: 12, 15
30	1	410.8726	30.993	3	11.32	39.37	0	3660-3669	D.PHYTTFDGHR.F	
16	1	430.7389	-15.188	2	10.50	32.38	0	4174-4182	R.ISVAQGASK.A	
90	1	712.8131	-57.989	2	14.80	70.86	0	5251-5264	R.GATTPGVYELSSR.C	
93	1	479.3184	97.181	2	14.90	73.04	0	5333-5341	R.TPDGSLVLR.Q	

**Protein 2: Calcium-activated chloride channel regulator 1 OS=Homo sapiens GN=CLCA1 PE=1 SV=2**

**Accession:** CLCA1\_HUMAN **Score:** 309.54  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.4.fasta) **MW:** 100.11 kDa  
**Database Date:** 2009-01-19 **pI:** 5.94  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 11.38 %  
**No. of unique Peptides:** 8

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
198	1	642.3621	-14.692	2	19.97	43.78	0	76-86	K.NVAILIPETWK.T	
43	1	495.7533	-1.005	2	12.14	48.88	0	144-152	K.LAEYGPQGR.A	
102	1	548.2660	-0.394	2	15.34	55.71	0	222-230	K.GCEFVLQSR.Q	Carbamidomethyl: 2
195	1	782.0145	-71.439	3	19.67	27.56	0	285-305	K.TTPMTTQPPNPTFSLQIGQR.I	Oxidation: 4
103	1	397.2444	31.29	2	15.39	29.81	0	391-397	R.SAFTVIR.K	
192	1	817.0765	-31.961	3	19.40	22.72	0	427-450	K.QSGAIHTVALGPSAAQEELELSK.M	
171	1	644.9234	99.88	2	18.48	61.82	0	624-636	R.ASVTALIESVNGK.T	
77	1	619.2496	-45.593	2	14.24	36.62	0	661-670	R.YFTTYDYNTRY	

**Protein 3: Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3**

**Accession:** IGHM\_HUMAN **Score:** 207.00  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 49.28 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pI:** 6.36  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 12.61 %  
**No. of unique Peptides:** 6

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
104	1	450.7913	50.092	2	15.49	40.32	0	113-120	K.VSVFVPPR.D	
94	1	625.3357	22.673	2	14.94	76.90	0	132-142	K.LICQATGFSPR.Q	Carbamidomethyl: 3
68	1	431.7637	41.358	2	13.56	23.84	0	178-185	K.VTSTLTIK.E	
259	1	819.4625	-7.577	2	23.68	39.31	0	224-238	R.VFAIPPSFASIFLTK.S	
86	1	800.8232	-87.203	2	14.58	20.06	0	377-391	K.YVTSAPMPEPQAPGR.Y	
57	1	808.8379	-65.024	2	12.96	33.14	0	377-391	K.YVTSAPMPEPQAPGR.Y	Oxidation: 7

**Protein 4: Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6**

**Accession:** K2C1\_HUMAN **Score:** 97.49  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 66.00 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pI:** 8.82  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 3.26 %  
**No. of unique Peptides:** 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
218	1	651.8904	44.795	2	21.37	72.68	0	344-355	R.SLDLDSIIAEVK.A	
64	1	517.2451	-32.002	2	13.32	30.36	0	484-492	R.TLLEGEESR.M	

**Protein 5: Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3**

**Accession:** K1C9\_HUMAN **Score:** 59.25  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.7.fasta) **MW:** 62.03 kDa  
**Database Date:** 2009-09-03 **pI:** 5.00  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 1.44 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
47	1	533.2340	-36.203	2	12.29	62.09	0	155-163	K.STMQELNSR.L	

**Proteinbande B61****Protein 1: IgGfc-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3**

**Accession:** FCGBP\_HUMAN **Score:** 1050.36  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 571.64 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 5.03  
**Modification(s):** Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage:** 4.33 %  
**No. of unique Peptides:** 22

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
18	1	498.2386	-57.144	2	10.23	40.32	0	905-912	R.VLVENEHR.G	
233	1	961.4374	-3.717	3	20.72	37.72	0	991-1017	K.VPSSYAEALCGLCGNFNGDPADDLALR.G	Carbamidomethyl: 10, 13
43	1	428.2509	30.627	2	11.89	26.73	0	1082-1089	K.LDPQGAVR.D	
184	1	630.8458	17.456	2	18.83	69.37	0	1366-1375	R.VAYDLVYYVR.V	
29	1	558.2025	-93.142	2	10.82	32.52	0	1679-1687	D.PHYHSFDGR.K	
58	2	481.7268	-61.32	2	13.03	70.34	0	1725-1733	R.GNPAVSYVR.V	
60	1	396.1857	-97.03	2	13.13	48.56	0	1727-1733	N.PAVSYVR.V	
159	1	608.3748	32.925	3	17.90	64.51	1	1754-1771	K.VRVNGVLTALPVSADGR.I	
174	1	523.6187	612.344	3	18.53	69.42	0	1756-1771	R.VNGVLTALPVSADGR.I	
175	1	800.4219	-5.238	1	18.54	24.51	0	1764-1771	L.PVSVADGR.I	
30	1	445.7137	-83.061	2	10.86	68.98	0	1772-1780	R.ISVTQGASKA	
136	1	803.3687	5.139	3	17.12	22.06	0	1799-1820	R.VDVTLPSSYHGAVCGLCGNMDR.N	Carbamidomethyl: 14, 17
122	1	808.6667	-36.491	3	16.49	43.53	0	1799-1820	R.VDVTLPSSYHGAVCGLCGNMDR.N	Carbamidomethyl: 14, 17; Oxidation: 20
218	1	831.3400	-6.495	2	20.28	84.89	0	1846-1858	R.APGWDPLCWDECR.G	Carbamidomethyl: 8, 12
16	1	589.6716	-	2	9.92	49.84	0	1859-1868	R.GSCTCPEDR.L	Carbamidomethyl: 3, 6
140	1	1012.8745	-79.138	2	17.24	38.93	1	1904-1921	K.GCVLDVCMGGGDRDILCK.A	Carbamidomethyl: 2, 7, 17
112	1	1020.9086	-42.627	2	16.02	42.73	1	1904-1921	K.GCVLDVCMGGGDRDILCK.A	Carbamidomethyl: 2, 7, 17; Oxidation: 8
257	1	1075.4698	-63.957	2	21.52	98.35	0	1922-1941	K.ALASYAACQAAGVIEDWRA	Carbamidomethyl: 9
45	1	597.7460	-97.614	2	11.96	50.16	0	2078-2087	D.PHYVTLDGHR.F	
31	1	484.7076	-73.917	2	10.91	65.14	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
160	1	890.3921	-13.208	3	18.00	104.78	0	2199-2223	R.VPAAYAGSLCGLCGNYNDPADDLK.A	Carbamidomethyl: 10, 13
23	1	430.7186	-62.315	2	10.53	55.51	0	4174-4182	R.ISVAQGASKA	

**Protein 2: Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2**

**Accession:** IGHAI\_HUMAN **Score:** 351.70  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 37.63 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 6.08  
**Modification(s):** Carbamidomethyl **Sequence Coverage:** 17.56 %  
**No. of unique Peptides:** 7

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
154	1	770.8600	-9.788	2	17.70	79.93	0	154-168	R.DASGVFTWTPSSGK.S	
22	1	470.7277	-36.818	2	10.46	43.01	0	169-177	K.SAVQGPPEP.D	
67	1	688.3057	-11.419	2	13.73	54.94	0	201-212	K.TFTCTAAYPESK.T	Carbamidomethyl: 4
103	1	607.3687	80.457	2	15.65	74.10	0	264-273	R.WLQGSQELPR.E	
97	1	577.3240	35.241	2	15.10	22.13	1	274-282	R.EKYLWASR.Q	
108	1	448.7768	93.424	2	15.89	42.62	0	276-282	K.YLTWASR.Q	
57	1	409.7094	8.822	2	12.84	39.23	0	300-306	R.VAAEDWK.K	

**Protein 3: Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3**

**Accession:** IGHAI\_HUMAN **Score:** 314.33  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 36.50 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 5.68  
**Modification(s):** Carbamidomethyl **Sequence Coverage:** 18.24 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
127	1	756.8258	-34.478	2	16.68	76.77	0	141-155	R.DASGATFTWTPSSGK.S	

**Protein 4: Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3**

**Accession:** K1C9\_HUMAN **Score:** 263.34  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.7.fasta) **MW:** 62.03 kDa  
**Database Date:** 2009-09-03 **pl:** 5.00  
**Modification(s):** Oxidation **Sequence Coverage:** 11.40 %  
**No. of unique Peptides:** 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
46	1	616.7133	-144.681	2	12.06	76.88	0	14-29	R.SGGGGGGGLGSGGSIR.S	
38	1	618.2361	-51.593	2	11.24	81.23	0	47-59	R.FSSSSGYGGSSRLV	
17	1	541.2016	-90.832	2	10.07	53.49	0	155-163	K.STMQELNSR.L	Oxidation: 3
64	1	441.9138	40.959	3	13.60	24.90	1	241-250	R.IKFEMEQLNR.Q	Oxidation: 5
145	1	837.3399	-50.403	3	17.43	34.77	0	450-472	K.EIETYHNLLEGGQEDFESSGAGK.I	

**Protein 5: Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6**

**Accession:** K2C1\_HUMAN **Score:** 230.85  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 66.00 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pl:** 8.82  
**Sequence Coverage:** 6.52 %  
**No. of unique Peptides:** 4

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
94	1	738.3864	-13.371	2	14.96	49.19	0	200-211	R.FLEQQNQVLQTK.W	
252	1	651.8833	33.903	2	21.32	79.51	0	344-355	R.SLDLDSIAEVK.A	
99	1	590.2897	-23.975	2	15.34	68.30	0	377-386	K.YEELQITAGR.H	
98	1	487.2918	46.214	2	15.17	42.85	0	396-403	K.IEISELNR.V	

**Protein 6: Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2**

**Accession:** K1C17\_HUMAN **Score:** 55.31  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.4.fasta) **MW:** 48.08 kDa  
**Database Date:** 2009-01-19 **pl:** 4.82  
**Sequence Coverage:** 3.47 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
73	1	404.2243	51.682	2	13.95	34.91	0	164-170	R.LAADDFR.T	

**Proteinbande B55****Protein 1: IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3**

Accession: FCGBP\_HUMAN

Score: 1922.25

Database: SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)

MW: 571.64 kDa

Database Date: 2009-03-05

pI: 5.03

Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation

Sequence Coverage: 8.18 %

No. of unique Peptides: 35

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
251	1	808.4754	17.467	2	22.59	31.42	0	55-70	R.LLISLSSESPASVSIL.S	
10	1	368.1988	26.85	2	10.51	29.24	0	96-102	K.AEMIGSK.I	
173	1	1117.4897	-86.874	2	18.69	134.68	0	193-213	R.VTLQPYNVAQLQSSVDLSGSK.V	
90	1	899.9087	-56.383	2	14.72	100.58	0	214-231	K.VTASSPVAVLSGHSCAQK.H	Carbamidomethyl: 15
177	2	706.8765	2.629	2	18.93	107.37	0	263-275	R.YDLAFVVASQATK.L	
34	1	638.2750	-79.349	2	12.06	73.98	0	276-287	K.LTYNHGGITGSR.G	
263	1	1436.7190	-5.924	2	23.10	54.25	0	325-349	R.NEVTYDPYLVLPDVAAYCPAYVVK.S	Carbamidomethyl: 19
139	1	807.9119	-21.936	2	17.16	73.04	0	350-365	K.SVPGCEGVALVVAQTK.A	Carbamidomethyl: 5
98	1	705.3893	-2.396	2	15.16	44.03	0	366-380	K.AISGLTIDGHAVGAK.L	
222	1	774.9449	12.478	2	21.16	95.84	0	408-422	A.EATTNLGLLTFGLK.A	
56	1	613.2844	-1.201	2	13.10	76.05	0	423-434	K.AIGYATAADCGR.T	Carbamidomethyl: 10
107	1	1088.9463	-42.728	2	15.56	39.51	0	435-454	R.TVLSPEVPSCEGMQCAAGQR.C	Carbamidomethyl: 10, 15
84	1	731.5794	-	3	14.44	70.75	0	435-454	R.TVLSPEVPSCEGMQCAAGQR.C	Carbamidomethyl: 10, 15; Oxidation: 13
27	1	640.7426	-73.549	2	11.72	85.16	0	462-473	K.AGCVAESTAVCRA	Carbamidomethyl: 3, 11
148	1	666.8785	44.3	2	17.52	75.42	0	545-556	R.GEVGFVLVDNQ.R.S	
67	1	539.2883	53.874	2	13.60	39.50	0	870-878	D.PHYVSFDGR.R	
40	1	617.2472	-	2	12.31	21.13	1	870-879	D.PHYVSFDGR.R.F	
32	1	658.9409	-96.626	3	11.99	45.83	1	905-921	R.VLVENEHRGSQTVSYTR.A	
6	1	448.7409	17.904	2	9.67	26.16	0	906-912	V.LVENEHR.G	
5	1	392.2133	57.283	2	9.62	36.65	0	907-912	L.VENEHR.G	
11	1	499.7757	54.001	2	10.68	53.34	0	913-921	R.GSQTVSYTR.A	
307	1	1065.7655	208.424	3	25.01	31.77	0	937-964	R.EYPGQVLVDDVLQYLPFQAADGQVQVFR.Q	
212	1	961.4281	-13.39	3	20.69	83.30	0	991-1017	K.VPSSYAEALCGLCGNFNGDPADDLALR.G	Carbamidomethyl: 10, 13
76	1	435.7388	2.715	2	14.02	57.65	0	1010-1017	D.PADDLALR.G	
134	1	1130.7348	-87.363	3	16.88	23.86	0	1018-1050	R.GGGQAANALAFGNSWQEETRPCCGATEPGDCI.L	Carbamidomethyl: 23, 31
111	1	665.3547	-26.401	2	15.73	65.03	0	1051-1062	K.LDSLVAQQLQSK.N	
26	1	428.2111	-62.312	2	11.67	46.96	0	1082-1089	K.LDPQGAVR.D	
16	1	414.1658	-13.166	2	10.97	27.68	0	1090-1095	R.DCVYDR.C	Carbamidomethyl: 2
157	1	780.8848	-18.842	2	18.14	76.38	0	1291-1304	R.FAVLQENVAWGNGR.V	
175	1	630.8364	2.555	2	18.78	81.92	0	1366-1375	R.VAYDLVYYVR.V	
55	1	481.7538	-5.275	2	13.11	67.58	0	1725-1733	R.GNPAVSYVR.V	
169	1	784.4166	-34.616	2	18.54	55.77	0	1756-1771	R.VNGVLTALPVSVADGR.I	
229	1	1075.4562	-76.602	2	21.52	82.66	0	1922-1941	K.ALASYVAACQAAGVIEDWRA	Carbamidomethyl: 9
12	1	484.7425	-1.92	2	10.73	61.49	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
9	1	430.7539	19.636	2	10.40	42.48	0	4174-4182	R.ISSVAQGASK.A	

**Protein 2: Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6**

Accession: K1C10\_HUMAN

Score: 257.27

Database: SwissProt(SwissProt\_57.11.fasta)

MW: 58.79 kDa

Database Date: 2009-12-03

pI: 5.00

Sequence Coverage: 9.59 %

No. of unique Peptides: 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
141	1	854.3427	-55.019	2	17.27	69.88	0	41-59	K.GSLGGGFSSGGFSGGFSR.G	
81	1	691.2930	-50.224	2	14.28	79.58	0	166-177	R.ALEESNYELEGK.I	
64	1	404.2174	34.611	2	13.88	41.31	0	229-235	R.LAADDLRL	
126	1	516.3074	8.929	2	16.54	34.20	0	258-266	R.VLDELTLTK.A	
138	1	555.2542	10.183	2	17.07	41.06	0	335-343	K.DAEAWFNEK.S	

**Protein 3: Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6**

**Accession:** K2C1\_HUMAN **Score:** 255.56  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 66.00 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pl:** 8.82  
**Sequence Coverage:** 8.07 %  
**No. of unique Peptides:** 6

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
112	1	633.3433	33.25	2	15.72	29.96	0	278-288	R.TNAENEFVTIK.K	
75	1	697.3825	18.321	2	13.95	34.60	1	278-289	R.TNAENEFVTIKK.D	
51	1	500.1348	-	2	12.92	25.52	0	290-298	K.DVDGAYMTK.V	
			182.767							
224	1	651.9394	119.964	2	21.28	74.41	0	344-355	R.SLDLDSIAEVK.A	
100	1	590.2992	-7.881	2	15.27	66.14	0	377-386	K.YEELQITAGR.H	
58	1	517.2483	-25.815	2	13.26	36.45	0	484-492	R.TLLEGEESR.M	

**Protein 4: Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3**

**Accession:** K1C9\_HUMAN **Score:** 163.03  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.7.fasta) **MW:** 62.03 kDa  
**Database Date:** 2009-09-03 **pl:** 5.00  
**Sequence Coverage:** 5.30 %  
**No. of unique Peptides:** 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
18	1	618.2068	-98.983	2	11.07	97.96	0	47-59	R.FSSSSGYGGSSRV	
120	1	530.8167	59.166	2	16.17	33.98	0	225-233	K.TLLDIDNTR.M	
95	1	579.2724	-46.093	2	15.04	39.61	0	251-261	R.QGVDADINGLR.Q	

**Protein 5: Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3**

**Accession:** IGH A2\_HUMAN **Score:** 118.09  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 36.50 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 5.68  
**Sequence Coverage:** 7.35 %  
**No. of unique Peptides:** 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
129	1	756.8278	-31.836	2	16.70	57.60	0	141-155	R.DASGATFTWTPSSGK.S	
109	1	607.3239	6.69	2	15.64	63.33	0	251-260	R.WLQGSQELPR.E	

**Protein 6: Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1**

**Accession:** IGHG1\_HUMAN **Score:** 117.05  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 36.08 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 9.36  
**Sequence Coverage:** 13.64 %  
**No. of unique Peptides:** 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
137	1	593.8048	-37.323	2	17.06	37.62	0	5-16	K.GPSVFPLAPSSK.S	
219	1	603.3303	-16.656	3	21.04	27.54	0	185-200	R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E	
202	1	937.4227	-44.641	2	20.04	53.31	0	276-292	K.TTTPVLDSDGSSFFLYSK.L	

**Protein 7: Ig gamma-4 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG4 PE=1 SV=1**

**Accession:** IGHG4\_HUMAN **Score:** 47.83  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta) **MW:** 35.92 kDa  
**Database Date:** 2009-03-05 **pl:** 7.80  
**Modification(s):** Carbamidomethyl **Sequence Coverage:** 8.56 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
147	1	644.3561	41.52	2	17.50	21.71	0	5-16	K.GPSVFPLAPCSR.S	Carbamidomethyl: 10

**Proteinbande B51****Protein 1: IgGFC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3**

Accession: FCGBP\_HUMAN

Score: 1551.10

Database: SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)

MW: 571.64 kDa

Database Date: 2009-03-05

pI: 5.03

Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation

Sequence Coverage: 6.35 %

No. of unique Peptides: 30

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
143	1	816.3967	-45.725	3	19.95	56.94	0	55-78	R.LLISSLSESPASVSIQSADNTSK.K	
14	1	405.1974	-34.143	2	11.62	24.89	0	176-183	K.GSVTFNGK.F	
134	1	745.3978	5.61	3	18.72	39.58	0	193-213	R.VTLQPYNVAQLQSSVDLSGSK.V	
69	1	899.9489	-11.715	2	14.74	72.35	0	214-231	K.VTASSPVAVLSGHSCAQK.H	Carbamidomethyl: 15
137	1	706.8978	32.761	2	19.01	94.34	0	263-275	R.YDLAFVVASQATK.L	
24	1	638.2549	-	2	12.07	76.94	0	276-287	K.LTYNHGGITGSR.G	
165	1	958.1745	21.291	3	23.14	43.26	0	325-349	R.NEVTYDPYLVLPDVAAYCPAYVVK.S	Carbamidomethyl: 19
107	1	807.9172	-15.376	2	17.23	65.96	0	350-365	K.SVPGCEGVALVVAQTK.A	Carbamidomethyl: 5
77	1	705.3889	-2.963	2	15.42	74.32	0	366-380	K.AISGLTIDGHAVGAK.L	
44	1	613.2640	-34.465	2	13.15	83.03	0	423-434	K.AIGYATAADCGR.T	Carbamidomethyl: 10
63	1	731.5967	-90.093	3	14.46	50.62	0	435-454	R.TVLSPEVPSCEGMQCAAGQR.C	Carbamidomethyl: 10, 15; Oxidation: 13
17	1	640.7801	-15.027	2	11.77	85.38	0	462-473	K.AGCVAESTAVCR.A	Carbamidomethyl: 3, 11
31	1	547.2628	11.137	2	12.48	34.36	0	478-486	D.PHYTTFDGR.R	
8	1	625.2632	-38.478	2	11.34	28.09	1	478-487	D.PHYTTFDGR.R.Y	
83	1	624.8944	31.4	2	15.86	70.48	1	524-534	R.RVSYVGLVTVR.A	
108	1	546.8260	3.248	2	17.27	85.11	0	525-534	R.VSYVGLVTVR.A	
110	1	666.8205	-42.676	2	17.42	76.44	0	545-556	R.GEVGFVLVDNQR.S	
54	1	600.8403	3.173	2	14.11	56.01	1	557-567	R.SRLPVSLSEGR.L	
68	1	479.2970	52.53	2	14.68	65.18	0	559-567	R.LPVSLSEGR.L	
15	1	538.2749	-54.04	2	11.62	32.65	1	568-576	R.LRVYQSGPR.A	
3	1	403.7411	73.562	2	3.45	34.99	0	570-576	R.VYQSGPR.A	
7	1	419.7262	34.549	2	11.29	22.00	0	673-679	R.LCGMLTK.L	Carbamidomethyl: 2; Oxidation: 4
30	1	510.8561	-81.572	3	12.48	31.38	0	737-750	R.SPANCPLSPANSR.Y	Carbamidomethyl: 5, 9
92	2	819.8713	-0.588	2	16.37	105.51	0	847-860	R.CSVQNGLLGCYPDR.F	Carbamidomethyl: 1, 10
122	1	850.0180	-10.008	3	17.83	43.89	1	847-869	R.CSVQNGLLGCYPDRFGTCQSGSD.P	Carbamidomethyl: 1, 10, 18
6	1	499.7466	-4.228	2	10.78	27.80	0	913-921	R.GSQTVSYTR.A	
81	1	665.3689	-5.059	2	15.76	59.66	0	1051-1062	K.LDSLVAQQLQSK.N	
52	1	558.7846	23.747	2	13.90	56.21	0	1063-1072	K.NECGILADPK.G	Carbamidomethyl: 3
136	1	630.8306	-6.639	2	18.82	49.39	0	1366-1375	R.VAYDLVYYVR.V	
5	1	484.7636	41.608	2	10.78	43.76	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	

**Protein 2: Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1**

Accession: IGHG1\_HUMAN

Score: 148.67

Database: SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)

MW: 36.08 kDa

Database Date: 2009-03-05

pI: 9.36

Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation

Sequence Coverage: 18.18 %

No. of unique Peptides: 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
102	1	593.8654	64.727	2	16.98	36.78	0	5-16	K.GPSVFPLAPSSK.S	
87	1	661.3242	-27.9	2	15.98	24.28	0	17-30	K.STSGGTAALGCLVK.D	Carbamidomethyl: 11
47	1	426.2200	4.216	2	13.29	34.64	0	132-138	K.DTLMISR.T	Oxidation: 4
100	1	581.3390	35.353	2	16.81	31.38	0	244-253	K.NQVSLTCLVK.G	Carbamidomethyl: 7
145	1	937.4271	-39.947	2	20.02	24.43	0	276-292	K.TTPPVLDSDGSFFLYSK.L	

**Protein 3: Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2**

Accession: IGHG2\_HUMAN

Score: 141.38

Database: SwissProt(SwissProt\_56.9.fasta)

MW: 35.88 kDa

Database Date: 2009-03-05

pI: 8.80

Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation

Sequence Coverage: 18.10 %

No. of unique Peptides: 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
111	1	644.3379	13.274	2	17.46	25.50	0	5-16	K.GPSVFPLAPCSR.S	Carbamidomethyl: 10
89	1	712.3606	2.95	2	16.23	33.41	0	17-30	R.STSESTAALGCLVK.D	Carbamidomethyl: 11
51	1	640.9514	-50.707	3	13.81	20.12	1	224-239	R.EPQVYTLPPSREEMTK.N	Oxidation: 14

**Proteinbande B<14**

**Protein 1:** Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6  
**Accession:** K2C1\_HUMAN **Score:** 1258.03  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 66.00 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pi:** 8.82  
**Sequence Coverage:** 39.91 %  
**No. of unique Peptides:** 20

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
94	1	605.2649	-62.689	3	14.93	47.35	1	13-30	R.SGGGFSSGSAGIINYQRR.T	
230	1	982.5325	-6.188	2	19.90	28.93	0	159-175	N.QSLLQLPLNVEIDPEIQK.V	
210	1	819.9214	-14.823	2	19.16	69.28	1	186-199	K.SLNNQFASFDKVR.F	
122	1	361.5464	23.364	3	15.90	23.76	1	191-199	Q.FASFDKVR.F	
217	1	978.4278	256.442	3	19.48	45.29	1	200-223	R.FLEQQNQVLQTKWELLQQVDTSTR.T	
270	1	997.4750	-17.007	2	21.47	108.11	0	224-239	R.THNLEPYFESFINLR.R	
132	1	650.7466	-33.594	2	16.35	56.66	0	258-267	K.NMQDMVEDYR.N	
115	1	633.3168	-8.593	2	15.70	89.21	0	278-288	R.TNAENEFVTIK.K	
67	1	697.3375	-46.207	2	13.96	72.00	1	278-289	R.TNAENEFVTIKK.D	
42	1	500.2002	-52.026	2	12.91	64.91	0	290-298	K.DVDGAYMTK.V	
267	2	651.8668	8.591	2	21.31	121.55	0	344-355	R.SLDLDSIIAEVK.A	
347	1	783.7705	33.408	3	23.84	72.09	1	344-364	R.SLDLDSIIAEVKAQYEDIAQK.S	
15	1	670.8403	3.046	2	11.65	80.34	1	365-376	K.SKAEASLYQSK.Y	
105	1	590.3363	54.968	2	15.32	71.22	0	377-386	K.YEELQITAGR.H	
70	1	651.7894	-99.471	2	14.04	62.21	1	393-403	R.NSKIIEISLNR.V	
98	1	487.2825	27.128	2	15.09	55.43	0	396-403	K.IEISLNR.V	
151	1	490.6405	43.139	3	17.01	28.17	1	396-407	K.IEISLNRVIQRL.L	
44	1	517.2804	36.242	2	13.13	38.19	0	484-492	R.TLLEGEESR.M	
25	1	795.2521	-88.056	3	12.18	85.98	0	519-549	R.GGGGGYGGSSYSGGGSSYSGGGGGGGG.G	
39	1	1104.6674	-96.694	3	12.75	70.23	0	550-588	R.GSYGSGGGSSYSGGGSSYSGGGGGGGHGSY.G	

**Protein 2:** Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3  
**Accession:** K1C9\_HUMAN **Score:** 1107.73  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.7.fasta) **MW:** 62.03 kDa  
**Database Date:** 2009-09-03 **pi:** 5.00  
**Modification(s):** Oxidation **Sequence Coverage:** 40.61 %  
**No. of unique Peptides:** 21

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
88	1	537.7030	-	2	14.69	25.52	0	5-13	R.QFSSSYLSR.S	
4	1	492.5828	1.966	3	10.44	24.61	1	12-29	L.SRSGGGGGGLGSGGSIR.S	
17	1	616.7857	-27.301	2	11.75	107.84	0	14-29	R.SGGGGGGGLGSGGSIR.S	
27	1	733.5951	-78.979	3	12.23	60.71	1	35-59	R.FSSSGGGGGGRFSSSSYGGGSSR.V	
6	1	618.2536	-23.288	2	10.82	57.15	0	47-59	R.FSSSSYGGGSSR.V	
24	1	533.2565	5.991	2	12.09	52.72	0	155-163	K.STMQELNSR.L	
129	1	530.7817	-6.774	2	16.20	46.10	0	225-233	K.TLLDIDNTR.M	
145	1	449.2636	118.479	2	16.78	37.45	0	234-240	R.MTLDDFR.I	
112	1	654.3650	34.455	2	15.57	51.40	1	241-250	R.IKFEMEQLNR.Q	
57	1	441.9050	21.045	3	13.56	20.53	1	241-250	R.IKFEMEQLNR.Q	Oxidation: 5
95	1	579.2804	-32.283	2	14.99	76.81	0	251-261	R.QGVADADINLR.Q	
303	1	777.1007	45.432	3	22.54	26.55	1	251-271	R.QGVADADINLRQLVLDNLTMEK.S	
120	1	595.8176	16.258	2	15.84	53.46	0	262-271	R.QVLDNLTMEK.S	
253	1	767.0494	6.099	3	20.91	23.19	1	272-290	K.SDLEMQYETLQEELMALKK.N	
193	1	926.4352	-34.432	2	18.52	53.15	1	322-336	K.TLNDMRQYEYQLIAK.N	
14	1	643.9812	7.354	3	11.57	27.87	0	351-368	T.QIEHEVSSSGQEVQSSAK.E	
204	1	919.4654	-22.782	2	18.88	124.38	0	375-390	R.HGVQLEIEIQSLSK.K	
180	1	983.4681	-66.829	2	18.02	84.19	1	375-391	R.HGVQLEIEIQSLSK.K	
162	1	837.3855	-31.774	3	17.42	90.55	0	450-472	K.EIETHNLLLEGQEDFESSGAGK.I	
23	1	450.9114	23.923	3	12.09	33.03	1	473-487	K.IGLGRRGGSSYGR.G	
37	1	1074.9882	-	3	12.70	90.54	0	580-619	R.GSGGGSHGGSGFGGSGGSSYGGGEEASGS(.S)	

**Protein 3:** Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5  
**Accession:** K2C6B\_HUMAN **Score:** 481.26  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 60.03 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pi:** 8.89  
**Sequence Coverage:** 13.65 %  
**No. of unique Peptides:** 7

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
91	1	513.7618	-4.989	2	14.82	70.45	0	31-40	R.SGFSSISVSR.S	
154	1	880.4907	8.658	2	17.08	23.39	1	190-204	K.VLDTKWTLLEQGGTK.T	
150	1	602.2954	-44.237	2	16.94	31.43	0	195-204	K.WTLLEQGGTK.T	
232	1	704.3678	11.988	2	19.97	77.32	0	288-299	K.ADTLTDEINFLR.A	
268	1	665.3877	31.637	2	21.32	68.35	0	327-338	R.NLGLDSIIAEVK.A	
362	1	806.7676	15.35	3	24.33	79.60	1	327-347	R.NLGLDSIIAEVKAQYEEIAQR.S	
40	1	554.2559	-34.631	2	12.79	49.35	0	339-347	K.AQYEEIAQR.S	

**Protein 4: Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3**

**Accession:** K2C6A\_HUMAN **Score:** 390.04  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.4.fasta) **MW:** 60.01 kDa  
**Database Date:** 2009-01-19 **pI:** 8.89  
**Sequence Coverage:** 10.99 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
59	1	506.7383	-35.99	2	13.63	71.83	0	31-40	R.SGFSSVSVSR.S	

**Protein 5: Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4**

**Accession:** K1C14\_HUMAN **Score:** 255.95  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 51.53 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pI:** 4.94  
**Sequence Coverage:** 10.38 %  
**No. of unique Peptides:** 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
62	1	713.3244	-38.778	2	13.77	104.90	0	42-56	R.APSTYGGGLSVSSSR.F	
56	1	518.7591	-20.593	2	13.55	21.39	1	147-153	K.IRDWYQR.Q	
63	2	404.2171	33.869	2	13.75	40.67	0	195-201	R.LAADDRFR.T	
148	1	515.2991	-2.875	2	16.87	73.50	0	224-232	R.VLDELTLARA	
55	1	719.8532	-0.255	2	13.51	21.63	1	283-293	R.ILNEMRDQYEK.M	

**Protein 6: Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4**

**Accession:** K1C16\_HUMAN **Score:** 250.34  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.4.fasta) **MW:** 51.24 kDa  
**Database Date:** 2009-01-19 **pI:** 4.84  
**Sequence Coverage:** 10.15 %  
**No. of unique Peptides:** 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
64	1	669.8275	-12.761	2	13.88	101.16	0	42-55	R.APSTYGGGLSVSSR.F	

**Protein 7: Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3**

**Accession:** K2C5\_HUMAN **Score:** 222.49  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_56.4.fasta) **MW:** 62.34 kDa  
**Database Date:** 2009-01-19 **pI:** 8.61  
**Sequence Coverage:** 12.54 %  
**No. of unique Peptides:** 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
49	1	547.7689	-59.109	2	13.29	33.03	1	64-73	R.SLYNLGGSKR.I	
99	1	556.2976	12.323	2	15.16	37.84	0	74-84	R.ISISTSGGSFR.N	
100	1	720.3351	-34.41	2	15.16	21.09	0	560-576	R.GLVGVFGSGGGSSSVK.F	

**Protein 8: Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6**

**Accession:** K1C10\_HUMAN **Score:** 194.48  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.11.fasta) **MW:** 58.79 kDa  
**Database Date:** 2009-12-03 **pI:** 5.00  
**Sequence Coverage:** 6.85 %  
**No. of unique Peptides:** 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
159	1	854.3322	-67.308	2	17.25	116.63	0	41-59	K.GSLGGGFSSGGFSGGSFSR.G	
45	1	631.7855	-26.441	2	13.04	42.27	0	451-464	R.SLLEGESSGGGGR.G	

**Protein 9: Trefoil factor 3 OS=Homo sapiens GN=TFF3 PE=1 SV=1**

**Accession:** TFF3\_HUMAN **Score:** 137.13  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 8.64 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pI:** 5.61  
**Modification(s):** Carbamidomethyl **Sequence Coverage:** 56.25 %  
**No. of unique Peptides:** 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
96	1	868.3223	-	2	15.00	56.11	0	22-37	A.EEYVGLSANQCAVPAK.D	Carbamidomethyl: 11
30	1	636.8058	0.149	2	12.38	36.58	0	40-50	R.VDCGYPHVTPK.E	Carbamidomethyl: 3
290	1	1089.9704	-46.592	2	22.12	44.44	0	63-80	R.IPGVWCFKPLQEAECTF.-	Carbamidomethyl: 7, 16

**Protein 10: Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2**

**Accession:** HBA\_HUMAN **Score:** 93.66  
**Database:** SwissProt(SwissProt\_57.3.fasta) **MW:** 15.25 kDa  
**Database Date:** 2009-06-03 **pl:** 9.44  
**Modification(s):** Oxidation **Sequence Coverage:** 16.90 %  
**No. of unique Peptides:** 2

**Alias proteins:**

Accession	Name	Description
HBA_PANPA	SwissProt(SwissProt_57.3.fasta)	Hemoglobin subunit alpha OS=Pan paniscus GN=HBA1 PE=1 SV=2
HBA_PANTR	SwissProt(SwissProt_57.3.fasta)	Hemoglobin subunit alpha OS=Pan troglodytes GN=HBA1 PE=1 SV=2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	$\Delta$ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
54	1	510.5818	-2.252	3	13.48	51.93	0	18-32	K.VGAHAGEYGAEALER.M	
173	1	544.2533	-45.86	2	17.82	43.15	0	33-41	R.MFLSFPTTK.T	Oxidation: 1

## 7.2.1 Zuordnung der massenspektrometrisch identifizierten Peptide zur FCGBP-Primärsequenz

Im Folgenden wird die Lokalisation der durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierten Peptide innerhalb der FCGBP-Primärsequenz (NCBI Accession NP\_003881.2) angegeben. In diesem Zusammenhang wurden die Peptide die nach tryptischen Verdau aus den Banden B51, B55, B61, B73 und B123 (siehe Anhang 7.2) generiert wurden, charakterisiert. Dabei werden Peptide die nur einer Lokalisation innerhalb der FCGBP-Primärsequenz zugeordnet werden können rot gekennzeichnet, während Peptide welche mehrfach lokalisiert werden konnten in gelb angegeben werden. Die schwarzen langen Pfeile markieren dabei potentielle Spaltstellen der Signalpeptidase, schwarze kurze Pfeile hingegen deuten vorhergesagte autokatalytische Spaltstellen innerhalb der GD/PHY-Sequenz an. Zusätzlich werden die Startpositionen der repetitiven Untereinheiten R1-R13s angedeutet.

### In Proteinbande B51 identifizierte Peptide

```

      ↓ ↓ ↓
001 MGALWSWIL WAGATLLWGL TQEASVDLKN TGREEFLTAF LQNYQLAYSK AYPRLLISSL
061 SESPASVSIL SQADNTSKKV TVRPGESVMV NISAKAEMIG SKIFQHAVVI HSDYAISVQA
121 LNAKPDTAEL TLLRPIQALG TEYFVLTPPG TSARNVKEFA VVAGAAGASV SVTLKGSVTF
181 NGKFYPAGDV LRVTLQPYNV AQLQSSVDLS GSKVTASSPV AVLSGHSCAQ KHTTCNHVVE
241 QLLPTSAGT HYVPTLASQ SRYDLAFVVA SQATKLTYNH GGITGSRGLQ AGDVVEFEVR
301 PSWPLYLSAN VGIQVLLFGT GAIRNEVTYD PYLVLIPDVA AYCPAYVVKS VPGCEGVALV
361 VAQTKAISGL TIDGHAVGAK LTWEAVPGSE FSYAEVELGT ADMIHTAEAT TNLGLLTFGL
421 AKAIGYATAA DCGRTVLSPV EPSCEGMQCA AGQRCQVVG KAGCVAESTA VCRAQGDPHY
481 TTFDGRRYDM MGTCSYTMVE LCSEDDTLPA FSVEAKNEHR GSRRVSYVGL VTVRAYSHSV
541 SLTRGEVGFV LVDNQSRLP VSLSEGRLRV YQSGPRAVVE LVFGLVVTYD WDCQLALSLP
  
```

601 ARFQDQVCGL CGNYNGDPAD DFLTPDGALA PDAVEFASSW KLDDGDYLCE DGCQNNCPAC  
 661 TPGQAQHYEG DR**LCGMLTKL** DGPFAVCHDT LDPRPFLEQC VYDLCVVGGE RLSLCRGLSA  
 721 YAQACLELGI SVGDWR**SPAN CPLSCPANSR** YELCGPACPT SCNGAAAPSN CSGRPCVEGC  
 781 VCLPGFVASG GACVPASSCG CTFQGLQLAP GQEVWADELQ QRRCTCNGAT HQVTCRDKQS  
 841 CPAGER**CSVQ NGLLGCPDR FGTCQGS**↓**DP** HYVSFDGRRF DFMGTCTYLL VGSCGQNAAL  
 ↪ **R2**  
 901 PAFRVLVENE HR**GSQTVSYT RAVRVEARGV** KVAVRREYPG QVLVDDVLQY LPFQAADGQV  
 961 QVFRQGRDAV VRTDFGLTVT YDWNARVTAK VPSSYAEALC GLCGNFNGDP ADDLALRGGG  
 1021 QAANALAFGN SWQEETRPGC GATEPGDCPK **LDSLVAQQLQ SKNECGILAD PK**↓**GPFRECHS**  
 1081 KLDPQGAVRD CVYDRCLLPG QSGPLCDALA TYAAACQAAG ATVHPWRSEE LCPLSCPPhS  
 1141 HYEACSYGCP LSCGDLFVPG GCGSECHEGC VCDEGFALSG ESCLPLASCG CVHQGTYHPP  
 1201 GQTFYPPGPGC DSLCHCQEGG LVSCSSSSCG PHEACQPSGG SLGCVAVGSS TCQASGD**PHY**↓  
 ↪ **R3**  
 1261 **TTFDGRR**FD F MGTCVYVLAQ TCGTRPGLHR FAVLQENVAW GNDRVSVTRV ITVQVANFTL  
 1321 RLEQRQWKVT VNGVDMKLPV VLANGQIRAS QHGSDVVIET DFGLR**VAYDL VYYVR**VTVP  
 1381 NYYQQMCGLC GNYNGDPKDD FQKPNQSAG NANEFNGSWE EVVPDSPCLP PTPCPPGSED  
 1441 CIPSHKCPPE LEKKYQKEEF CGLLSSPTGP LSSCHKLVDP QGPLKDCIFD LCLGGGNLSI  
 1501 LCSNIHAYVS ACQAAGGHVE PWRTEFCPM ECPPNSHYEL CADTCSLGC ALSAPPQCQD  
 1561 GCAEGCQCD GFLYNGQACV PIQQCGCYHN GVYYEPEQTV LIDNCRQOCT CHAGKGMVCQ  
 1621 EHSCKPGQVC QPSGGILSCV TKDPCHGVTC **RPQETCKEQG**↓**GQGVCLPNYE ATCWLWGD**PH  
 ↪ **R4**  
 1681 YHSFDGRKFD FQGTCNYVLA TTGCPGVSTQ GLTPFTVTTK NQNRGNPAVS YVRVVTVAAL  
 1741 GTNISIHKDE IGKVRVNGVL TALPVSVADG RISVTQGASK ALLVADDFGLQ VSYDWNWRVD  
 1801 VTLPSSYHGA VCGLCGNMDR NPNDQVFPN GTLAPSIPIW GGSWRAPGWD PLCWDECRGS  
 1861 CPTCPEDRLE QYEGPGFCGP LAPGTGGPFT TCHAHVPPEF FFKGCVLVDC MGGGDRDILC  
 1921 KALASYVAAC QAAGVVIDW RAQVGCETC PENSHYEVCG SPCPASCPS APLTTPAVCE  
 1981 GPCVEGCQCD AGFVLSADRC VPLNNGCGW ANGTYHEAGS EFWADGTCSQ WCRGPGGGS  
 2041 LVCTPASCGL **GEVCGLLPSG**↓**QHGCPVSTA ECQAWGD**PHY VTLDGHRFNF QGTCEYLLSA  
 ↪ **R5**  
 2101 PCHGPPLGAE NFTVTVANEH **RSQAVSYTR** SVTLQIYNHS LTL SARWPRK LQVDGVFVTL  
 2161 PFQLDSSLHA HLSGADVVT TTSGLSLAFD GDSFVRLRVP AAYAGSLCGL CGNYNQDPAD  
 2221 DLKAVGGKPA GWQVGAQGC GECVSKPCPS PCTPEQQESF GGPDACGVIS ATDGPLAPCH  
 2281 GLVPPAQYFQ GCLLDACQVQ GHPGGLCPAV ATYVAACQAA GAQLREWRRP DFCPFQCPAH  
 2341 SHYELCGDSC PGSCPSLSAP EGCE SACREG CVCDAGFVLS GDTCVPVQC GCLHDDRYYP  
 2401 LGQTFYPPGPG CDSLRCREG GEVSCEPSSC **GPHETCRPSG**↓**GSLGCVAVGS TTCQASGD**PH  
 ↪ **R6**  
 2461 **YTTFDGRR**FD FMGTCVYVLA QTCGTRPGLH RFAVLQENVA WGNDRVSVTR VITVQVANFT  
 2521 LRLEQRQWKV TVNGVDMKLP VVLANGQIRA SQHGSDVIE TDFGLR**VAYD LVYYVR**VTVP  
 2581 GNYQLMCGC CGNYNGDPKD DFQKPNQSA GNANEFNGSW EEVVPDSPCL PPPTCPPGSE  
 2641 GCIPSEECPP ELEKKYQKEE FCGLLSSPTG PLSSCHKLVDP PQLKDCIF DLCLGGGNLS

2701 ILCSNIHAYV SACQAAGQV EPWRNETFCP MECPQNSHYE LCADTCSLGC SALSAPLQCP  
 2761 DGCAEGCQCD SGFLYNGQAC VPIQQCGCYH NGAYYEPEQT VLIDNCRQQC TCHVGKVVVC  
 2821 QEHSCKPGQV CQPSGGILSC VNKDPCHGVT CRPQETCKEQ GGQGVCLPNY EATCWLWGD<sup>↓</sup>  
 2881 HYHSFDGRKF DFQGTCTNYVL ATTGCPGVST QGLTPFTVTT KNQNRGNPAV SYVRVVTVA  
 2941 LGTNISIHKD EIGKVRVNGV LTALPVSAD GRISVTQGAS KALLVADFGL QVSYDWNWRV  
 3001 DVTLPSSYHG AVCGLCGNMD RNPNDQVFP NGTLAPSIPI WGGSWRAPGW DPLCWDECRG  
 3061 SCPTCPEDRL EQYEGPGFCG PLAPGTGGPF TTCHAHVPE SFFKGCVLVD CMGGGDRDIL  
 3121 CKALASYVAA CQAAGVVID WRAQVGCEIT CPENSHYEV GPPCPASCPS PAPLTTPAVC  
 3181 EGPCVEGCQC DAGFVLSADR CVPLNNGCGC WANGTYHEAG SEFWADGTCS QWCRCGPGG  
 3241 SLVCTPASC<sup>←</sup> LGEVCGLLPS GQHGCQPVST AECQAWGDPH YVTLDGHRFD FQGTCEYLLS  
 3301 APCHGPPLGA ENFTVTVANE HRGSQAVSYT RSVTLQIYNH SLTLSARWPR KLQVDGVFVT  
 3361 LPFQLDSLH AHLGADV VTTTSGLSLAF DGDSFVRLRV PAAYAGSLCG LCGNYNQDPA  
 3421 DDLKAVGGKP AGWQVGAQ GCECVSKPCP SPCTPEQES FGGPDACGVI SATDGPLAPC  
 3481 HGLVPPAQYF QGCLLDACQV QGHPGGLCPA VATYVAACQA AGAQLREWRR PDFCFQCPA  
 3541 HSHYELCGDS CPGSCPSLSA PEGCESACRE GCVCDAGFVL SGDTCPVVGQ CGCLHDDRY<sup>↓</sup>  
 3601 PLGQTFYPGP GCDSLCRCRE GGEVSCEPSS CGPHETCRPS GGLGCVAVG STTCQASGD<sup>↓</sup>  
 3661 HYTFDGHFRF DFMGTCVYVL AQTCTGTRPGL HRFVAVLQENV AWNGRVSVT RVITVQVANF  
 3721 TLRLEQRQWK VTVNGVDMKL PVVLANGQIR ASQHGS DVVI ETD<sup>↓</sup>FGLRVAY DLVYYRVTV  
 3781 PGNYYQLMCG LCGNYNGDPK DDFQKPNQSQ AGNANEFNS WEEVVPD<sup>↓</sup>SPC LPPPTCPPGS  
 3841 AGCIPSDKCP PELEKKYQKE EFCGLLSSPT GPLSSCHKLV DPQGPLKDCI FDLCLGGN<sup>↓</sup>L  
 3901 SILCSNIHAY VSACQAAGGH VEPWRNETFC PMECPQNSHY ELCADTCSLG CSALSAPLQCP  
 3961 PDGCAEGCQC DSGFLYNGQA CVPIQQCGCY HNGVYYEPEQ TVLIDNCRQQ CTCHVGKVVV  
 4021 CQEHSCKPGQ VCQPSGGILS CVTKDPCHGV TCRPQETCKE QGGQGVCLPN YEATCWLWGD<sup>↓</sup>  
 4081 PHYHSFDGRK FDFQGTCTNYV LATGCPGVST TQGLTPFTVT TKNQNRGNPA VSYVRVVTVA  
 4141 ALGTNISIHK DEIGKVRVNG VLTALPVSVA DGRISVAQGA SKALLVADFG LQVSYDWNWR  
 4201 VDVTLPSSYH GAVCGLCGNM DRNPNDQVFP PNGTLAPSIP IWGGSWRAPG WDPLCWDECR  
 4261 GSCPTCPEDR LEQYEGPGFC GPLSSGTGGP FTTCHAHVPP ESFFKGCVLVD VCMGGGDRDI  
 4321 LCKALASYVA ACQAAGVIE DWRAQVGCEI TCPENSHYEV CGPPCPASC SPAPLTTPAV  
 4381 CEGPCVEGCQ CDAGFVLSAD RCVPLNNGCG CWANGTYHEA GSEFWADGTC SQWCRCGPGG  
 4441 GSLVCTPASC GLGEVCGLLP SQQHGCQPVST TAECQAWGDP<sup>↓</sup> HYVTLDGHRF DFQGTCEYLL  
 4501 SAPCHGPPLG AENFTVTVAN EHRGSQAVSY TRSVTLQIYN HSLTLSARWP RKLQVDGVFV  
 4561 ALPFQLDSLH HAHLSGADV VTTTSGLSLA FDGDSFVRLR VPAAYAASLC GLCGNYNQDP  
 4621 ADDLKAVGGK PAGWQVGAQ GCECVSKPC PSPCTPEQES SFGGPDACGV ISATDGPLAP  
 4681 CHGLVPPAQY FQGCLLDACQ VQHPGGLCP AVATYVAACQ AAGAQLGEWR RPDFCPLQCP  
 4741 AHSYELCGD SCPVSCPSLS APEGCESACR EGCVC DAGFV LSGDTCPVVG QCGCLHDGRY

4801 YPLGEVFYYPG PECERRCECG PGGHVTCQEG AACGPHEECL LEDGVQACHA TGCGRCLANG  
4861 GIHYITLDGR VYDLHGSCSY VLAQVCHPKP GDEDFSIVLE KNAAGDLQRL LVTVAGQVVS  
4921 LAQGQQVTVD GEVALPVAV GRVRVTAEGR NMVLQTTKGL RLLFDGDAHL LMSIPSPFRG  
4981 RLCGLCGNFN GNWSDDFVLP NGSAAASSVET FGAAWRAPGS SKGCGEGCGP QGCPVCLAE  
5041 TAPYESNEAC GQLRNPQGP ATCQAVLSPS EYFRQCVYDL CAQKGDKAFL CRSLAAYTAA  
5101 CQAAGVAVKP WRTDSFCPLH CPAHSHYSIC TRTCQGSAA LSGLTGCTTR CFEGCECDDR  
5161 FLLSQVCIP VQDCGCTHNG RYLPVNSSL TSDCSERCSC SSSSGLTCQA AGCPPGRVCE  
5221 VKAEARNCWA TRGLCVLSVG ANLTTFDGAR GATTSPGVYE LSSRCPLQN TIPWYRVVAE  
5281 VQICHGKTEA VGQVHIFQD GMVTLTPNKG VWVNGLRVDL PAEKLASVSV SRTPDGSLLV  
5341 RQKAGVQVWL GANGKVAVIV SNDHAGKLCG ACGNFDGDQT NDWHDSQEKP AMEKWRAQDF  
5401 SPCYG

**In Proteinbande B55 identifizierte Peptide**

001 MGALWSWIL WAGATLLWGL TQEASVDLKN TGREEFLTAF LQNYQLAYSQ AYPRLLISSL  
 061 **SESPASVSII** SQADNTSKKV TVRPGESVMV NISAKA**EMIG SK**IFQHAVVI HSDYAISVQA  
 121 LNAKPDTAEL TLLRPIQALG TEYFVLTTPG TSARNVKEFA VVAGAAGASV SVTLKGSVTF  
 181 NGKFYPAGDV LR**VTLPQYNV AQLQSSVDLS GSKVTASSPV AVLSGHSCAQ** KHTTCNHVVE  
 241 QLLPTSAGWT HYVVPTLASQ SRY**DLAFVVA SQATKLTYNH GGITGSR**GLQ AGDVVEFEVR  
 301 PSWPLYLSAN VGIQVLLFGT GAIR**NEVTYD PYLVLLIPDVA AYCPAYVVKS VPGCEGVALV**  
 361 **VAQTKAISGL TIDGHAVGAK** LTWEAVPGSE FSYAEVELGT ADMIHTA**EAT** **TNLGLLTFGL**  
 421 **AKAIGYATAA DCGRTVLSPV EPSCEGMQCA AGQR**CQVVGG **KAGCVAESTA VCR**AQGDPHY  
 481 TTFDGRRYDM MGTCSYTMVE LCSEDDTLPA FSVEAKNEHR GSRRVSYVGL VTRAYSHSV  
 541 SLTRGEVGFV **LVDNQR**SRLP VSLSEGLRV YQSGPRAVVE LVFGLVVTYD WDCQLALSLP  
 601 ARFQDQVCGL CGNYNGDPAD DFLTPDGALA PDAVEFASSW KLDDGDYLCE DGCQNNCPAC  
 661 TPGQAQHYEG DRLCGMLTKL DGPFVAVCHDT LDPRPFLEQC VYDLCVVGGE RLSLCRGLSA  
 721 YAQACLELGI SVGDWRSPAN CPLSCPANSR YELCGPACPT SCNGAAAPSN CSGRPCVEGC  
 781 VCLPGFVASG GACVPASSCG CTFQGLQLAP GQEVWADELQ QRRCTCNGAT HQVTCRDKQS  
 841 CPAGERCSVQ NGLLGCYPDR FGTCQGSQDP **HYVSFDGRR**F DFMGTCTYLL VGSCGQNAAL  
 901 PAFR**VLVENE HRGSQTVSYT RAVRVEARGV** KVAVR**EYPG QVLVDDVLQY** LPFQAADQV  
 961 **QVFR**QGRDAV VRTDFGLTVT YDWNARVTAK **VPSSYAEALC** GLCGNFNGDP **ADDLALRGGG**  
 1021 **QAANALAFGN SWQEETRPGC GATEPGDCPK LDSLVAQQLQ SK**NECGILAD PKGPFRECHS  
 1081 **KLDPQGAVRD CVYDR**CLLPQ QSGPLCDALA TYAAACQAAG ATVHPWRSEE LCPLSCPPHS  
 1141 HYEACSYGCP LSCGDLVPVG GCGSECHEGC VCDEGFALSG ESCLPLASCG CVHQGTYHPP  
 1201 GQTFYPGPGC DSLCHCQEGG LVSCNESSCG PHEACQPSGG SLGCVAVGSS TCQASGDPHY  
 1261 TTFDGRRFDF MGTCVYVLAQ TCGTRPGLHR **FAVLQENVAW GNGR**VSVTRV ITVQVANFTL  
 1321 RLEQRQWKVT VNGVDMKLPV VLANGQIRAS QHGS DVVIET DFGLR**VAYDL VYYVR**VTVPG  
 1381 NYYQQMCGLC GNYNGDPKDD FQKPNGSQAG NANEFNGSWE EVVPDSPCLP PTPCPPGSED  
 1441 CIPSHKCPPE LEKKYQKEEF CGLLSSPTGP LSSCHKLVDP QGPLKDCIFD LCLGGGNLSI  
 1501 LCSNIHAYVS ACQAAGGHVE PWRTEFCPM ECPPNSHYEL CADTCSLGS ALSAPPQCQD  
 1561 GCAEGCQCDG GFLYNGQACV PIQQCGCYHN GVYYEPEQTV LIDNCRQOCT CHAGKGMVCQ  
 1621 EHSCKPGQVC QPSGGILSCV TKDPCHGVTG RPQETCKEQG GQGVCLPNYE ATCWLWGDPH  
 1681 YHSFDGRKFD FQGTCTNYVLA TTGCPGVSTQ GLTPFTVTTK NQNR**GNPAVS YVR**VVTVAAL  
 1741 GTNISIHKDE IGKVR**VNGVL TALPVS**VADG RISVTQGASK ALLVADFGLQ VSYDWNWRVD  
 1801 VTLPSSYHGA VCGLCGNMDR NPNNDQVFPN GTLAPSIPIW GGSWRAPGWD PLCWDECRGS  
 1861 CPTCPEDRLE QYEGPGFCGP LAPGTGGPFT TCHAHVPPES FFKGCVLVDC MGGGDRDILC  
 1921 **KALASYVAAC QAAGV**IEDW RAQVGC EITC PENSHYEVCG SPCPASCPS APLTTPAVCE

1981 GPCVEGCQCD AGFVLSADRC VPLNNGCGCW ANGTYEAGS EFWADGTCSQ WRCRCPGGGS  
 2041 LVCTPASCGL GEVCGLLPSG QHGCQPVSTA ECQAWGDPHY VTLDGHRFNF QGTCEYLLSA  
 2101 PCHGPPLGAE NFTVTVANEH RGSQAVSYTR SVTLQIYNHS LTLSARWPRK LQVDGVFVTL  
 2161 PFQLDSSLHA HLSGADVVT TTSGLSLAFD GDSFVRLRVP AAYAGSLCGL CGNYNQDPAD  
 2221 DLKAVGGKPA GWQVGAQGC GECVSKPCPS PCTPEQQESF GPDACGVIS ATDGPLAPCH  
 2281 GLVPPAQYFQ GCLLDACQVQ GHPGGLCPAV ATYVAACQAA GAQLREWRRP DFCPFQCPAH  
 2341 SHYELCGDSC PGSCPSLSAP EGCESACREG CVCDAGFVLS GDTCVPVQGC GCLHDDRYYP  
 2401 LGQTFYPGPG CDSLRCREG GEVSCEPSSC GPHETCRPSG GSLGCVAVGS TTCQASGDPH  
 2461 YTTFDGRRFD FMGTVCYVLA QTCGTRPGLH RFAVLQENVA WGNRVSVTR VITVQVANFT  
 2521 LRLEQRQWKV TVNGVDMKLP VVLANGQIRA SQHGSDVIE TDFGLRVAYD LVYYVRVTVP  
 2581 GNYQLMCGC CGNYNGDPKD DFQKPNQSQA GNANEFNSW EEVVPDSPCL PPPTCPPGSE  
 2641 GCIPSEECPP ELEKKYQKEE FCGLLSSPTG PLSSCHKLVD PQGPLKDCIF DLCLGGGNLS  
 2701 ILCSNIHAYV SACQAAGQV EPWRNETFCP MECPQNSHYE LCADTCSLGC SALSAPLQCP  
 2761 DGCAEGCQCD SGFLYNGQAC VPIQQCGCYH NGAYYEPEQT VLIDNCRQQC TCHVGKVVVC  
 2821 QEHSCPKQV CQPSGGILSC VNKDPCHGVT CRPQETCKEQ GGQGVCLPNY EATCWLWGD  
 2881 HYHSFDGRKF DFQGTCNYVL ATTGCPGVST QGLTPFTVTT KNQNRGNPAV SYVRVVTVA  
 2941 LGTNISIHKD EIGKVRVNGV LTALPVSVD GRISVTQAS KALLVADFGL QVSYDWNWRV  
 3001 DVTLPSSYHG AVCGLCGNMD RNPNDQVFP NGTLAPSIPI WGSWRAPGW DPLCWDECRG  
 3061 SCPTCPEDRL EQYEGPGFCG PLAPGTGGPF TTCHAHVPPE SFFKGCVLVD CMGGGDRDIL  
 3121 CKALASYVAA CQAAGVVIED WRAQVGCET CPENSHYEVG GPPCPASCPS PAPLTTPAVC  
 3181 EGPCVEGCQC DAGFVLSADR CVPLNNGCGC WANGTYHEAG SEFWADGTCS QWCRCPGGG  
 3241 SLVCTPASCGL GEVCGLLPSG QHGCQPVSTA AECQAWGDPHY VTLDGHRFNF QGTCEYLLS  
 3301 APCHGPPLGA ENFTVTVANE HRSQAVSYTR SVTLQIYNH SLTLSARWPR KLQVDGVFVT  
 3361 LPFQLDSSLH AHLGADVVT TTSGLSLAF DGDSFVRLRV PAAYAGSLCG LCGNYNQDPA  
 3421 DDLKAVGGKP AGWQVGAQGC GECVSKPCP SPCTPEQQES FGGPDACGVI SATDGPLAPC  
 3481 HGLVPPAQYF QGCLLDACQV QHPGGLCPA VATYVAACQA AGAQLREWRR PDFCPFQCPA  
 3541 HSHYELCGDS CPGSCPSLSA PEGCESACRE GCVCDAFVLS GDTCVPVQGC GCLHDDRYYP  
 3601 PLGQTFYPGPG GDSLRCRE GGEVSCEPSS CGPHETCRPS GGLGCVAVG STTCQASGDP  
 3661 HYTTFDGHRF DFMGTVCYVLA AQTGTRPGL HRFVLQENV AWGNRVSVT RVITVQVANF  
 3721 TLRLEQRQWK VTVNGVDMKL PVVLANGQIR ASQHGSDVVI ETDGLRVAY DLVYYVRVTV  
 3781 PGNYQLMCG LCGNYNGDPK DDFQKPNQSQA GNANEFNSW WEEVVPDSPC LPPPTCPPGS  
 3841 AGCIPSDKCP PELEKKYQKE EFCGLLSSPT GPLSSCHKLVD DPQGPLKDCI FDLCLGGGNL  
 3901 SILCSNIHAY VSACQAAGGH VEPWRNETFC PMECPQNSHY ELCADTCSLG CSALSAPLQC  
 3961 PDGCAEGCQC DSGFLYNGQA CVPIQQCGCY HNGVYYPEQ TVLIDNCRQQ CTCHVGKVVV  
 4021 CQEHSCPKQ VCQPSGGILS CVTKDPCHGV TCRPQETCKE QGGQGVCLPN YEATCWLWGD

4081 PHYHSFDGRK FDFQGTTCNYV LATTGCPGVS TQGLTPFTVT TKNQNRGNPA VSYVRVVTVA  
 4141 ALGTNISIHK DEIGKVRVNG VLTALPVSVA DGRISVAQGA SKALLVADFG LQVSYDWNWR  
 4201 VDVTLPSSYH GAVCGLCGNM DRNPNNDQVF PNGTLAPSIP IWGGSWRAPG WDPLCWDECR  
 4261 GSCPTCPEDR LEQYEGPGFC GPLSSGTGGP FTTCHAHVPP ESFFKGCVLD VCMGGGDRDI  
 4321 LCKALASYVA ACQAAGVVIE DWR<sup>↓</sup>AQVGCEI TCPENSHYEV CGPPCPASCP SPAPLTTPAV  
 4381 CEGPCVEGCQ CDAGFVLSAD RCVPLNNGCG CWANGTYHEA GSEFWADGTC SQWCRCGPGG  
 4441 GSLVCTPASC GLGEVCGLLP SQQHGCQPVS TAECQAWGDP<sup>↓</sup> HYVTLDGHRF DFQGTCEYLL  
 4501 SAPCHGPPLG AENFTVTVAN EHRGSQAVSY TRSVTLQIYN HSLTLSARWP RKLQVDGVFV  
 4561 ALPFQLDSLH HAHLSGADV VTTTSGLSLA FDGDSFVRLR VPAAYAASLC GLCGNYNQDP  
 4621 ADDLKAVGGK PAGWQVGGAQ GCGECVSKPC PSPCTPEQQE SFGGPDACGV ISATDGPLAP  
 4681 CHGLVPPAQY FQGCLLDACQ VQGHPPGLCP AVATYVAACQ AAGAQLGEWR RPDFCPLQCP  
 4741 AHSHYELCGD SCPVSCPSLS APEGCESACR EGCVC DAGFV LSGDTCVPVG QCGCLHDGRY  
 4801 YPLGEVFYYPG PECERRCECG PGGHVTCQEG AACGPHEECP LEDGVQACHA TCGCRCLANG  
 4861 GIHYITLDGR VYDLHGSCSY VLAQVCHPKP GDEDFSIVLE KNAAGDLQRL LVTVAGQVVS  
 4921 LAQQQQVTVD GEAVALPVAV GRVRVTAAGR NMVLQTTKGL RLLFDGDAHL LMSIPSPFRG  
 4981 RLCGLCGNFN GNWSDDFVLP NGSAASSVET FGAAWRAPGS SKGCGEGCGP QGCPVCLAE  
 5041 TAPYESNEAC GQLRNPQGP ATCQAVLSPS EYFRQCVDYL CAQKGDKAFL CRSLAAYTAA  
 5101 CQAAGVAVKP WRTDSFCPLH CPAHSHYSIC TRTCQGSAA LSGLTGCTTR CFEGCECDDR  
 5161 FLLSQGVCIP VQDCGCTHNG RYLPVNSSL TSDCSERCSC SSSSGLTCQA AGCPPGRVCE  
 5221 VKAEARNCWA TRGLCVLSVG ANLTTFDGAR GATTSPGVYE LSSRCPLQN TIPWYRVVAE  
 5281 VQICHGKTEA VGQVHIFFQD GMVTLTPNKG VVWNGLRVDL PAEKLASVSV SRTPDGSLLV  
 5341 RQKAGVQVWL GANGKVAVIV SNDHAGKLCG ACGNFDGDQT NDWHDSQEKP AMEKWRAQDF  
 5401 SPCYG

R11

R12

R13s

**In Proteinbande B61 identifizierte Peptide**

001 MGALWSWIL WAGATLLWGL TQEASVDLKN TGREEFLTAF LQNYQLAYSK AYPRLLISSL  
 061 SESPASVSIL SQADNTSKKV TVRPGESVMV NISAKAEMIG SKIFQHAVVI HSDYAISVQA  
 121 LNAKPDTAEL TLLRPIQALG TEYFVLTPPG TSARNVKEFA VVAGAAGASV SVTLKGSVTF  
 181 NGKFYPAGDV LRVTLQPYNV AQLQSSVDLS GSKVTASSPV AVLSGHSCAQ KHTTCNHVVE  
 241 QLLPTSAGWT HYVVPTLASQ SRYDLAFVVA SQATKLTYNH GGITGSRGLQ AGDVVEFEVR  
 301 PSWPLYLSAN VGIQVLLFGT GAIRNEVTYD PYLVLIIPDVA AYCPAYVVKS VPGCEGVALV  
 361 VAQTKAISGL TIDGHAVGAK LTWEAVPGSE FSYAEVELGT ADMIHTAEAT TNLGLLTFGL  
 421 AKAIGYATAA DCGRTVLSPV EPSCEGMQCA AGQRCQVVGK KAGCVAESTA VCRAQGDPHY  
 481 TTFDGRRYDM MGTCSTYTMVE LCSEDDTLPA FSVEAKNEHR GSRRVSYVGL VTRAYSHSV  
 541 SLTRGEVGFV LVDNQSRSLP VSLSEGRRLV YQSGPRAVVE LVFGLVVITYD WDCQLALSPL  
 601 ARFQDQVCGL CGNYNGDPAD DFLTPDGALA PDAVEFASSW KLDDGDYLCE DGCQNNCPAC  
 661 TPGQAQHYEG DRLCGMLTKL DGPFVAVCHDT LDPRPFLEQC VYDLCVVGGE RLSLCRGLSA  
 721 YAQACLELGI SVGDWRSPAN CPLSCPANSR YELCGPACPT SCNGAAAPSN CSGRPCVEGC  
 781 VCLPGFVASG GACVPASSCG CTFQGLQLAP GQEVWADELQ QRRCTCNGAT HQVTCRDKQS  
 841 CPAGERCSVQ NGLLGCYPDR FGTCQGSQDP HYVSFDGRRF DFMGTCTYLL VGSCGQNAAL  
 901 PAFRVLVENE HRGSQTVSYT RAVRVEARGV KVAVRREYPG QVLVDDVLQY LPFQAADGQV  
 961 QVFRQGRDAV VRTDFGLTVT YDWNARVTAK VPSSYAEALC GLCGNFNGDP ADDLALRGGG  
 1021 QANALAFGN SWQEETRPGC GATEPGDCPK LDSLVAQQLQ SKNECGILAD PKGPFRECHS  
 1081 KLDPQGAVRD CVYDRCLLPQ QSGPLCDALA TYAAACQAAG ATVHPWRSEE LCPLSCPPHS  
 1141 HYEACSYGCP LSCGDLVPG GCGSECHEGC VCDEGFALSG ESCLPLASCG CVHQGTYPHP  
 1201 GQTFYPGPGC DSLCHCQEGG LVSCCESSCG PHEACQPSGG SLGCVAVGSS TCQASGDPHY  
 1261 TTFDGRRFDF MGTCVYVLAQ TCGTRPGLHR FAVLQENVAW GNGRVSVTRV ITVQVANFTL  
 1321 RLEQRQWKVT VNGVDMKLPV VLANGQIRAS QHGSQVVIET DFGLRVAYDL VYYVVRTVPG  
 1381 NYYQQMCGLC GNYNGDPKDD FQKPNGSQAG NANEFGNSWE EVVPDSPCLP PTPCPPGSED  
 1441 CIPSHKCPPE LEKKYQKEEF CGLLSSPTGP LSSCHKLVDP QGPLKDCIFD LCLGGGNLSI  
 1501 LCSNIHAYVS ACQAAGGHVE PWRTEFCPM ECPPNSHYEL CADTCSLQCS ALSAPPQCQD  
 1561 GCAEGCQCDG GFLYNGQACV PIQQCGCYHN GVYYEPEQTV LIDNCRQOCT CHAGKGMVCQ  
 1621 EHSCKPGQVC QPSGGILSCV TKDPCHGVTG RPQETCKEQG GQGVCLPNYE ATCWLWGDPH  
 1681 YHSFDGRKFD FQGTCTNYVLA TTGCPGVSTQ GLTPFTVTTK NQNRGNPAVS YVRVVTVAAL  
 1741 GTNISIHKDE IGKVRVNGVL TALPVSVDG RISVTQGASK ALLVADDFGLQ VSYDWNWRVD  
 1801 VTLPSSYHGA VCGLCGNMDR NPNNDQVFPN GTLAPSIPIW GGSWRAPGWD PLCWDECRGS  
 1861 CPTCPEDRLE QYEGPGFCGP LAPGTGGPFT TCHAHVPPES FFKGCVLDVC MGGGDRDILC  
 1921 KALASYVAAC QAAGVVIDW RAQVGCEITC PENSHYEVCG SPCPASCPSP APLTTPAVCE

1981 GPCVEGCQCD AGFVLSADRC VPLNNGCGCW ANGTYHEAGS EFWADGTCSQ WCRCPGGGS  
 2041 LVCTPASCGL GEVCGLLPSG QHGCQPVSTA ECQAWGD<sup>↓</sup>PHY VTLDGHRFNF QGTCEYLLSA  
     └─┬─┘ R5  
 2101 PCHGPPLGAE NFTVTVANEH RGSQAVSYTR SVTLQIYNHS LTLSARWPRK LQVDGVFVTL  
 2161 PFQLDSLHA HLSDGADVVT TTSGLSLAFD GDSFVRLR<sup>VP</sup> AAYAGSLCGL CGNYNQDPAD  
 2221 DLKAVGGKPA GWQVGAQGC GECVSKPCPS PCTPEQQESF GPDACGVIS ATDGPLAPCH  
 2281 GLVPPAQYFQ GCLLDACQVQ GHPGGLCPAV ATYVAACQAA GAQLREWRRP DFCPFQCPAH  
 2341 SHYELCGDSC PGSCPSLSAP EGCECAREG CVCDAGFVLS GDTCVPVQGC GCLHDDRYYP  
 2401 LGQTFYPGPG CDSLRCREG GEVSCEPSSC GPHETCRPSG GSLGCVAVGS TTCQASGDPH<sup>↓</sup>  
     └─┬─┘ R6  
 2461 YTTFDGRRFD FMGTCVYVLA QTCGTRPGLH RFAVLQENVA WNGRVSVTR VITVQVANFT  
 2521 LRLEQRQWKV TVNGVDMKLP VVLANGQIRA SQHGSDVIE TDFGLR<sup>VAYD</sup> LVYYVRVTVP  
 2581 GNYQLMCGL CGNYNGDPKD DFQKPNQSQA GNANEFNSW EEVVPDSCP PPPTCPPGSE  
 2641 GCIPSEECPP ELEKKYQKEE FCGLLSSPTG PLSSCHKLVD PQGPLKDCIF DLCLGGGNLS  
 2701 ILCSNIHAYV SACQAAGQV EPWRNETFCP MECPQNSHYE LCADTCSLGC SALSAPLQCP  
 2761 DGCAEGCQCD SGFLYNGQAC VPIQQCGCYH NGAYYEPEQT VLIDNCRQQC TCHVGKVVVC  
 2821 QEHSCPKQV CQPSGGILSC VNKDPCHGVT CRPQETCKEQ GGQGVCLPNY EATCWLWGD<sup>↓</sup>P  
     └─┬─┘ R7  
 2881 HYHSDGRKF DFQGTCTNYVL ATTGCPGVST QGLTPFTVTT KNQNR<sup>GNPAV</sup> SYVRVVTVA  
 2941 LGTNISIKD EIGK<sup>VRVNGV</sup> LTALPVSAD GRISVTQAS KALLVADFGL QVSYDWNWRV  
 3001 DVTLPSSYHG AVCGLCGNMD RNPNDQVFP NGTLAPSIPI WGSWRAPGW DPLCWDECRG  
 3061 SCPTCPEDRL EQYEGPGFCG PLAPGTGGPF TTCHAHVPPE SFFK<sup>GCVLDV</sup> CMGGGDRDIL  
 3121 CKALASYVAA CQAAGVVID WRAQVGCET CPENSHYEV GPPCPASCPS PAPLTPAVC  
 3181 EGPCVEGCQC DAGFVLSADR CVPLNNGCGC WANGTYHEAG SEFWADGTCS QWCRCPGGG  
 3241 SLVCTPASC LGEVCGLLPS GQHGCQPVST AECQAWGD<sup>↓</sup>PH YVTLDGHRFD FQGTCEYLLS  
     └─┬─┘ R8  
 3301 APCHGPPLGA ENFTVTVANE HRGSQAVSYT RSVTLQIYNH SLTLSARWPR KLQVDGVFVT  
 3361 LPFQLDSLH AHLSDGVV TTSGLSLAF DGDSFVRLRV<sup>PAAYAGSLCG</sup> LCGNYNQDPA  
 3421 DDLKAVGGKPA AGWQVGAQGC GECVSKPCP SPCTPEQQES FGGPDACGVI SATDGPLAPC  
 3481 HGLVPPAQYF QGCLLDACQV QHPGGLCPA VATYVAACQA AGAQLREWRR PDFCPFQCPA  
 3541 HSHYELCGDS CPGSCPSLSA PEGCESACRE GCVCAGFVLS GDTCVPVQGC CGCLHDDRYYP  
 3601 PLGQTFYPGPG GDSLRCRE GGEVSCEPSS CGPHETCRPS GGSLGCVAVG STTCQASGDP<sup>↓</sup>  
     └─┬─┘ R9  
 3661 HYTTFDGHRF DFMGTCVYVLA AQTGTRPGL HRF<sup>AVLQENV</sup> AWNGRVSVT RVITVQVANF  
 3721 TLRLEQRQWK VTVNGVDMKLP PVVLANGQIR ASQHGSDVVI ETD<sup>FGLR</sup>VAY DLVYYVRVTV  
 3781 PGNYQLMCG LCGNYNGDPK DDFQKPNQSQA GNANEFNSW WEEVVPDSCP LPPPTCPPGS  
 3841 AGCIPSDKCP PELEKKYQKE EFCGLLSSPT GPLSSCHKLV DPQGPLKDCI FDLCLGGGNL  
 3901 SILCSNIHAY VSACQAAGGH VEPWRNETFC PMECPQNSHY ELCADTCSLG CSALSAPLQC  
 3961 PDGCAEGCQC DSGFLYNGQA CVPIQQCGCY HNGVYYEPEQ TVLIDNCRQQ CTCHVGKVVV  
 4021 CQEHSCPKQ VCQPSGGILS CVTKDPCHGV TCRPQETCKE QGGQGVCLPN YEATCWLWGD<sup>↓</sup>  
     └─┬─┘ R10

4081 PHYHSFDGRK FDFQGTTCNYV LATTGCPGVS TQGLTPFTVT TKNQNRGNPA VSYVRVVTVA  
 4141 ALGTNISIHK DEIGKVRVNG VLTALPVSVA DGRISVAQGA SKALLVADFG LQVSYDWNWR  
 4201 VDVTLPPSSYH GAVCGLCGNM DRNPNNDQVF PNGTLAPSIP IWGGSWRAPG WDPLCWDECR  
 4261 GSCPTCPEDR LEQYEGPGFC GPLSSGTGGP FTTCHAHVPP ESFFKGCVLD VCMGGGDRDI  
 4321 LCKALASYVA ACQAAGVVIE DWRQAQVGCEI TCPENSHYEV CGPPCPASCP SPAPLTTPAV  
 4381 CEGPCVEGCQ CDAGFVLSAD RCVPLNNGCG CWANGTYHEA GSEFWADGTC SQWCRCGPGG  
 4441 GSLVCTPASC GLGEVCGLLP SQQHGCQPVV TAECQAWGDP HYVTLDGHRF DFQGTCEYLL  
 4501 SAPCHGPPLG AENFTVTVAN EHRGSQAVSY TRSVTLQIYN HSLTLSARWP RKLQVDGVFV  
 4561 ALPFQLDSLH HAHLSGADV VTTTSGLSLA FDGDSFVRLR VPAAYAASLC GLCGNYNQDP  
 4621 ADDLKAVGGK PAGWQVGGAQ GCGECVSKPC PSPCTPEQQE SFGGPDACGV ISATDGPLAP  
 4681 CHGLVPPAQY FQGCLLDACQ VQGHPPGLCP AVATYVAACQ AAGAQLGEWR RPDFCPLQCP  
 4741 AHSHYELCGD SCPVSCPSLS APEGCESACR EGCVCDAQFV LSGDTCVPVG QCGCLHDGRY  
 4801 YPLGEVFYYPG PECERRCECG PGGHVTCQEG AACGPHEECP LEDGVQACHA TCGRCLANG  
 4861 GIHYITLDGR VYDLHGSCSY VLAQVCHPKP GDEDFSIVLE KNAAGDLQRL LVTVAGQVVS  
 4921 LAQQQQVTVD GEVALPVAV GRVRVTAAGR NMVLQTTKGL RLLFDGDAHL LMSIPSPFRG  
 4981 RLCGLCGNFN GNWSDDFVLP NGSAASSVET FGAAWRAPGS SKGCGEGCGP QGCPVCLAE  
 5041 TAPYESNEAC GQLRNPQGP ATCQAVLSPS EYFRQCVDYL CAQKGDKAFL CRSLAAYTAA  
 5101 CQAAGVAVKP WRTDSFCPLH CPAHSHYSIC TRTCQGSAA LSGLTGCTTR CFEGCECDDR  
 5161 FLLSQGVCIP VQDCGCTHNG RYLPVNSSL TSDCSERCSC SSSSGLTCQA AGCPPGRVCE  
 5221 VKAEARNCWA TRGLCVLSVG ANLTTFDGAR GATTSPGVYE LSSRCPGLQN TIPWYRVVAE  
 5281 VQICHGKTEA VGQVHIFFQD GMVTLTPNKG VVWNGLRVDL PAEKLASVSV SRTPDGSLLV  
 5341 RQKAGVQVWL GANGKVAVIV SNDHAGKLCG ACGNFDGDQT NDWHDSQEKP AMEKWRAQDF  
 5401 SPCYG

R11  
 R12  
 R13s

**In Proteinbande B73 identifizierte Peptide**

001 MGALWSWIL WAGATLLWGL TQEASVDLKN TGREEFLTAF LQNYQLAYSK AYPRLLISSL  
 061 SESPASVSIL SQADNTSKKV TVRPGESVMV NISAKAEMIG SKIFQHAVVI HSDYAISVQA  
 121 LNAKPDTAEL TLLRPIQALG TEYFVLTPPG TSARNVKEFA VVAGAAGASV SVTLKGSVTF  
 181 NGKFYPAGDV LRVTLQPYNV AQLQSSVDLS GSKVTASSPV AVLSGHSCAQ KHTTCNHVVE  
 241 QLLPTSAGWT HYVPTLASQ SRYDLAFVVA SQATKLTYNH GGITGSRGLQ AGDVVEFEVR  
 301 PSWPLYLSAN VGIQVLLFGT GAIRNEVTYD PYLVLIIPDVA AYCPAYVVKS VPGCEGVALV  
 361 VAQTKAISGL TIDGHAVGAK LTWEAVPGSE FSYAEVELGT ADMIHTAEAT TNLGLLTFGL  
 421 AKAIGYATAA DCGRTVLSPV EPSCEGMQCA AGQRCQVVGG KAGCVAESTA VCRAQGD<sup>↓</sup>PHY  
 481 TTFDGRRYDM MGTCSTYTMVE LCSEDDTLPA FSVEAKNEHR GSRRVSYVGL VTVRAYSHSV  
 541 SLTRGEVGFV LVDNQSRSLP VSLSEGRRLV YQSGPRAVVE LVFGLVVTYD WDCQLALSLP  
 601 ARFQDQVCGL CGNYNGDPAD DFLTPDGALA PDAVEFASSW KLDDGDYLCE DGCQNNCPAC  
 661 TPGQAQHYEG DRLCGMLTKL DGPFVAVCHDT LDPRPFLEQC VYDLCVVGGE RLSLCRGLSA  
 721 YAQACLELGI SVGDWRSPAN CPLSCPANSR YELCGPACPT SCNGAAAPSN CSGRPCVEGC  
 781 VCLPGFVASG GACVPASSCG CTFQGLQLAP GQEVWADELQ QRRCTCNGAT HQVTCRDKQS  
 841 CPAGERCSVQ NGLLGCYPDR FGTCQGSQDP HYVSFDGRRF DFMGTCTYLL VGSCGQNAAL  
 901 PAFRVLVENE HRGSQTVSYT RAVRVEARGV KVAVRREYYPG QVLVDDVLQY LPFQAADGQV  
 961 QVFRQGRDAV VRTDFGLTVT YDWNARVTAK VPSSYAEALC GLCGNFNGDP ADDLALRGGG  
 1021 QAANALAFGN SWQEETRPGC GATEPGDCPK LDSLVAQQLQ SKNECGILAD PKGPFRECHS  
 1081 KLDPQGAVRD CVYDRCLLPG QSGPLCDALA TYAAACQAAG ATVHPWRSEE LCPLSCPPHS  
 1141 HYEACSYGCP LSCGDLPVPG GCGSECHEGC VCDEGFALSG ESCLPLASCG CVHQGTYHPP  
 1201 GQTFYPGPGC DSLCHCQEGG LVSCCESSCG PHEACQPSGG SLGCVAVGSS TCQASGD<sup>↓</sup>PHY  
 1261 TTFDGR<sup>↓</sup>RFD<sup>↓</sup>F MGTCVYVLAQ TCGTRPGLHR FAVLQENVAW GNGR<sup>↓</sup>VSVTRV ITVQVANFTL  
 1321 RLEQRQWKVT VNGVDMKLPV VLANGQIRAS QHGS<sup>↓</sup>SDVVIET DFGLRVAYDL VYYV<sup>↓</sup>RVTVPG  
 1381 NYYQQMCGLC GNYNGDPKDD FQKPNGSQAG NANEFNGSWE EVVPDSPCLP PTPCPPGSED  
 1441 CIPSHKCPPE LEKKYQKEEF CGLLSSPTGP LSSCHKLVDP QGPLKDCIFD LCLGGGNLSI  
 1501 LCSNIHAYVS ACQAAGGHVE PWRTE<sup>↓</sup>TFCPM ECPPNSHYEL CADTCSLGCS ALSAPPQCQD  
 1561 GCAEGCQCD<sup>↓</sup>S GFLYNGQACV PIQQCGCYHN GVYYEPEQTV LIDNCRQQCT CHAGKGMVCQ  
 1621 EHSCKPGQVC QPSGGILSCV TKDPCHGVTC RPQETCKEQG GQGVCLPNYE ATCWLWGD<sup>↓</sup>PH  
 1681 YHSFDGRKFD FQGT<sup>↓</sup>CNYVLA TTGCPGVSTQ GLTPFTV<sup>↓</sup>TTK NQNRGNPAVS YVRV<sup>↓</sup>VTVAAAL  
 1741 GTNISIHKDE IGKVRVNGVL TALPVS<sup>↓</sup>VADG RISVTQ<sup>↓</sup>GASK ALLVADFG<sup>↓</sup>LQ VSYDWN<sup>↓</sup>NRVD  
 1801 VTLPSSYHGA VCGLCGNMDR NPNNDQVFPN GTLAPSIPIW GGSWRAPGWD PLCWDECRGS  
 1861 CPTCPEDRLE QYEGPGFCGP LAPGTGGPFT TCHAHVPPES FFKGCVL<sup>↓</sup>DVC MGGGDRDILC  
 1921 KALASYVAAC QAAGVVIDW RAQVGCEITC PENSHYEVCG SPCPASCPS<sup>↓</sup>P APLTT<sup>↓</sup>PAVCE

1981 GPCVEGCQCD AGFVLSADRC VPLNNGCGCW ANGTYHEAGS EFWADGTCSQ WCRCGPGGGS  
 2041 LVCTPASCGL GEVCGLLPSG QHGCQPVSTA ECQAWGDPHY VTLDGHRFNF QGTCEYLLSA  
 2101 PCHGPPLGAE NFTVTVANEH RGSQAVSYTR SVTLQIYNHS LTLSARWPRK LQVDGVFVTL  
 2161 PFQLDSSLHA HLSGADVVT TTSGLSLAFD GDSFVRLRVP AAYAGSLCGL CGNYNQDPAD  
 2221 DLKAVGGKPA GWQVGAQGC GECVSKPCPS PCTPEQQESF GPDACGVIS ATDGPLAPCH  
 2281 GLVPPAQYFQ GCLLDACQVQ GHPGGLCPAV ATYVAACQAA GAQLREWRRP DFCPFQCPAH  
 2341 SHYELCGDSC PGSCPSLSAP EGCEASACREG CVCDAGFVLS GDTCVPVQGC GCLHDDRYYP  
 2401 LGQTFYPGPG CDSLRCREG GEVSCEPSSC GPHETCRPSG GSLGCVAVGS TTCQASGD<sup>↓</sup>PH  
 2461 YTTFDGR<sup>←</sup>RFD FMGTCVYVLA QTCGTRPGLH RFAVLQENVA WGNR<sup>←</sup>VSVTR VITVQVANFT  
 2521 LRLEQRQWKV TVNGVDMKLP VVLANGQIRA SQHGSDVVI E TDFGLRVAYD LVYYVRVTV<sup>↓</sup>P  
 2581 GNYYYQLMCGL CGNYNGDPKD DFQKPNQSQA GNANEFGNSW EEVVPDSPCL PPPTCPPGSE  
 2641 GCIPSEECPP ELEKKYQKEE FCGLLSSPTG PLSSCHKLVD PQGPLKDCIF DLCLGGGNLS  
 2701 ILCNSNIHAYV SACQAAGQV EPWRNETFCP MECPQNSHYE LCADTCSLGC SALSAPLQCP  
 2761 DGCAEGCQCD SGFLYNGQAC VPIQQCGCYH NGAYYEPEQT VLIDNCRQQC TCHVGKVVVC  
 2821 QEHSCKPGQV CQPSGGILSC VNKDPCHGVT CRPQETCKEQ GGQGVCLPNY EATCWLWGD<sup>↓</sup>P  
 2881 HYHSFDGRKF DFQGTCNYVL ATTGCPGVST QGLTPFTVTT KNQNRGNPAV SYVR<sup>←</sup>VVTVA  
 2941 LGTNISIHKD EIGKVRVNGV LTALPVSAD GRISVTQGAS KALLVADFGL QVSYDWNWRV  
 3001 DVTLPSSYHG AVCGLCGNMD RNPNDQVFP NGTLAPSIPI WGSWRAPGW DPLCWDECRG  
 3061 SCPTCPEDRL EQYEGPGFCG PLAPGTGGPF TTCHAHVPPE SFFKGCVLVDV CMGGGDRDIL  
 3121 CKALASYVAA CQAAGVVID WRAQVGCET CPENSHYEVG GPPCPASCPS PAPLTTPAVC  
 3181 EGPCVEGCQC DAGFVLSADR CVPLNNGCGC WANGTYHEAG SEFWADGTCS QWCRCGPGGG  
 3241 SLVCTPASCGL GEVCGLLPSG QHGCQPVSTA AECQAWGDPHY VTLDGHRFNF FQGTCEYLLS  
 3301 APCHGPPLGA ENFTVTVANE HRGSQAVSYT RSVTLQIYNH SLTLSARWPR KLQVDGVFVT  
 3361 LPFQLDSSLH AHLGADVVT TTSGLSLAF DGDSFVRLRV PAAYAGSLCG LCGNYNQDPA  
 3421 DDLKAVGGKP AGWQVGAQGC GECVSKPCP SPCTPEQQES FGGPDACGVI SATDGPLAPC  
 3481 HGLVPPAQYF QGCLLDACQV QHPGGLCPA VATYVAACQA AGAQLREWRR PDFCPFQCPA  
 3541 HSHYELCGDS CPGSCPSLSA PEGCESACRE GCVCDAFVLS GDTCVPVQGC CGCLHDDRYYP  
 3601 PLGQTFYPGPG GDSLRCRE GGEVSCEPSS CGPHETCRPS GSGLGCVAVG STTCQASGD<sup>↓</sup>P  
 3661 HYTTFDGHR<sup>←</sup>F DFMGTCVYVL AQTGTRPGL HRF<sup>←</sup>AVLQENV AWGNR<sup>←</sup>VSVT RVITVQVANF  
 3721 TLRLEQRQWK VTVNGVDMKL PVVLANGQIR ASQHGSDVVI E TDFGLRVAY DLVYYVRVTV<sup>↓</sup>P  
 3781 PGNYYYQLMCG LCGNYNGDPK DDFQKPNQSQA AGNANEFGNS WEEVVPDSPC LPPPTCPPGS  
 3841 AGCIPSDKCP PELEKKYQKE EFCGLLSSPT GPLSSCHKLVD DPQGPLKDCI FDLCLGGGNL  
 3901 SILCSNIHAY VSACQAAGGH VEPWRNETFC PMECPQNSHY ELCADTCSLG CSALSAPLQC  
 3961 PDGCAEGCQC DSGFLYNGQA CVPIQQCGCY HNGVYYEPEQ TVLIDNCRQQ CTCHVGKVVV  
 4021 CQEHSCKPGQ VCQPSGGILS CVTKDPCHGV TCRPQETCKE QGGQGVCLPN YEATCWLWGD<sup>↓</sup>P  
 R10

4081 PHYHSFDGRK FDFQGTGCNYV LATTGCPGVS TQGLTPFTVT TKNQNRGNPA VSYVRVVTVA  
 4141 ALGTNISIHK DEIGKVRVNG VLTALPVSVA DGRISVAQGA SKALLVADFG LQVSYDWNWR  
 4201 VDVTLPSSYH GAVCGLCGNM DRNPNDQVF PNGTLAPSIP IWGGSWRAPG WDPLCWDECR  
 4261 GSCPTCPEDR LEQYEGPGFC GPLSSGTGGP FTTCHAHVPP ESFFKGCVLD VCMGGGDRDI  
 4321 LCKALASYVA ACQAAGVVIE DWRAQVGCEI TCPENSHYEV CGPPCPASCP SPAPLTTPAV  
 4381 CEGPCVEGCQ CDAGFVLSAD RCVPLNNGCG CWANGTYHEA GSEFWADGTC SQWCRCGPGG  
 4441 GSLVCTPASC GLGEVCGLLP SGQHGCQPVV TAECQAWGDP↓  
 4501 SAPCHGPPLG AENFTVTVAN EHRGSQAVSY TRSVTLQIYN HSLTLSARWP RKLQVDGVFV  
 4561 ALPFQLDSLH HAHLSGADV VTTTSGLSLA FDGDSFVRLR VPAAYAASLC GLCGNYNQDP  
 4621 ADDLKAVGGK PAGWQVGGAQ GCGECVSKPC PSPCTPEQQE SFGGPDACGV ISATDGPLAP  
 4681 CHGLVPPAQY FQGCLLDACQ VQGHPPGLCP AVATYVAACQ AAGAQLGEWR RPDFCPLQCP  
 4741 AHSHYELCGD SCPVSCPSLS APEGCESACR EGCVCDAQFV LSGDTCVPVG QCGCLHDGRY  
 4801 YPLGEVFYYPG PECERRCECG PGGHVTCQEG AACGPHEECP LEDGVQACHA TCGCRCLANG  
 4861 GIHYITLDGR VYDLHGSCSY VLAQVCHPKP GDEDFSIVLE KNAAGDLQRL LVTVAGQVVS  
 4921 LAQQQQVTVD GEVALPVAV GRVRVTAAGR NMVLQTTKGL RLLFDGDAHL LMSIPSPFRG  
 4981 RLCGLCGNFN GNWSDDFVLP NGSAASSVET FGAAWRAPGS SKGCGEGCGP QGCPVCLAE  
 5041 TAPYESNEAC GQLRNPQGP ATCQAVLSPS EYFRQCVYDL CAQKGDKAFL CRSLAAYTAA  
 5101 CQAAGVAVKP WRTDSFCPLH CPAHSHYSIC TRTCQGSAA LSGLTGCTTR CFEGCECDDR  
 5161 FLLSQVCIP VQDCGCTHNG RYLPVNSSL TSDCSERCSC SSSSGLTCQA AGCPPGRVCE  
 5221 VKAEARNCWA TRGLCVLSVG ANLTTFDGAR GATTSPGVYE LSSRCPLQN TIPWYRVVAE  
 5281 VQICHGKTEA VGQVHIFFQD GMVTLTPNKG VVWNGLRVDL PAEKLASVSV SRTPDGSLLV  
 5341 RQKAGVQVWL GANGKVAVIV SNDHAGKLCG ACGNFDGDQT NDWHDSQEKP AMEKWRAQDF  
 5401 SPCYG

**In Proteinbande B123 identifizierte Peptide**

001 MGALWSWIL WAGATLLWGL TQEASVDLKN TGREEFLTAF LQNYQLAYSK AYPRLLISSL  
 061 SESPASVSIL SQADNTSKKV TVRPGESVMV NISAKAEMIG SKIFQHAVVI HSDYAISVQA  
 121 LNAKPDTAEL TLLRPIQALG TEYFVLTTPG TSARNVKEFA VVAGAAGASV SVTLKGSVTF  
 181 NGKFYPAGDV LRVTLQPINV AQLQSSVDLS GSKVTASSPV AVLSGHSCAQ KHTTCNHVVE  
 241 QLLPTSAGWT HYVPTLASQ SRYDLAFVVA SQATKLTYNH GGITGSRGLQ AGDVVEFEVR  
 301 PSWPLYLSAN VGIQVLLFGT GAIRNEVTYD PYLVLIIPDVA AYCPAYVVKS VPGCEGVALV  
 361 VAQTKAISGL TIDGHAVGAK LTWEAVPGSE FSYAEVELGT ADMIHTAEAT TNLGLLTFGL  
 421 AKAIGYATAA DCGRTVLSPV EPSCEGMQCA AGQRCQVVGK KAGCVAESTA VCRAQGDPHY  
 481 TTFDGRRYDM MGTCSTYTMVE LCSEDDTLPA FSVEAKNEHR GSRRVSYVGL VTRVAYSHSV  
 541 SLTRGEVGFV LVDNQSRSLP VSLSEGRRLV YQSGPRAVVE LVFGLVVITYD WDCQLALSPL  
 601 ARFQDQVCGL CGNYNGDPAD DFLTPDGALA PDAVEFASSW KLDDGDYLCE DGCQNNCPAC  
 661 TPGQAQHYEG DRLCGMLTKL DGPFVAVCHDT LDPRPFLEQC VYDLCVVGGE RLSLCRGLSA  
 721 YAQACLELGI SVGDWRSPAN CPLSCPANSR YELCGPACPT SCNGAAAPSN CSGRPCVEGC  
 781 VCLPGFVASG GACVPASSCG CTFQGLQLAP GQEVWADELQ QRRCTCNGAT HQVTCRDKQS  
 841 CPAGERCSVQ NGLLGCYPDR FGTCQGSQDP HYVSFDGRRF DFMGTCTYLL VGSCGQNAAL  
 901 PAFRVLVENE HRGSQTVSYT RAVRVEARGV KVAVRREYPG QVLVDDVLQY LPFQAADGQV  
 961 QVFRQGRDAV VRTDFGLTVT YDWNARVTAK VPSSYAEALC GLCGNFNGDP ADDLALRGGG  
 1021 QAANALAFGN SWQEETRPGC GATEPGDCPK LDSLVAQQLQ SKNECGILAD PKGPFRECHS  
 1081 KLDPQGAVRD CVYDRCLLPQ QSGPLCDALA TYAAACQAAG ATVHPWRSEE LCPLSCPPHS  
 1141 HYEACSYGCP LSCGDLPVPG GCGSECHEGC VCDEGFALSG ESCLPLASCG CVHQGTYPHP  
 1201 GQTFYPGPGC DSLCHCQEGG LVSCCESSCG PHEACQPSGG SLGCVAVGSS TCQASGDPHY  
 1261 TTFDGRRFDF MGTCVYVLAQ TCGTRPGLHR FAVLQENVAW GNGRVSVTRV ITVQVANFTL  
 1321 RLEQRQWKVT VNGVDMKLPV VLANGQIRAS QHGSQVVIET DFGLRVAYDL VYYVVRTVPG  
 1381 NYYQQMCGLC GNYNGDPKDD FQKPNGSQAG NANEFNGSWE EVVPDSPCLP PTPCPPGSED  
 1441 CIPSHKCPPE LEKKYQKEEF CGLLSSPTGP LSSCHKLVDP QGPLKDCIFD LCLGGGNLSI  
 1501 LCSNIHAYVS ACQAAGGHVE PWRTEFCPM ECPPNSHYEL CADTCSLGCS ALSAPPQCQD  
 1561 GCAEGCQCDG GFLYNGQACV PIQQCGCYHN GVYYEPEQTV LIDNCRQOCT CHAGKGMVCQ  
 1621 EHSCKPGQVC QPSGGILSCV TKDPCHGVTG RPQETCKEQG GQGVCLPNYE ATCWLWGDPH  
 1681 YHSFDGRKFD FQGTCTNYVLA TTGCPGVSTQ GLTPFTVTTK NQNRGNPAVS YVRVVTVAAL  
 1741 GTNISIHKDE IGKVRVNGVL TALPVSVADG RISVTQGASK ALLVADFGLQ VSYDWNWRVD  
 1801 VTLPSSYHGA VCGLCGNMDR NPNNDQVFPN GTLAPSIPIW GGSWRAPGWD PLCWDECRGS  
 1861 CPTCPEDRLE QYEGPGFCGP LAPGTGGPFT TCHAHVPPES FFKGCVLVDC MGGGDRDILC  
 1921 KALASYVAAC QAAGVVIDW RAQVGCETC PENSHYEVCG SPCPASCPSP APLTTPAVCE

1981 GPCVEGCQCD AGFVLSADRC VPLNNGCGCW ANGTYHEAGS EFWADGTCSQ WCRCPGGGS  
 2041 LVCTPASCGL GEVCGLLPSG QHGCQPVSTA ECQAWGD<sup>↓</sup>PHY VTLDGHRFNF QGTCEYLLSA  
     └─┬─ R5  
 2101 PCHGPPLGAE NFTVTVANEH RGSQAVSYTR SVTLQIYNHS LTLSARWPRK LQVDGVFVTL  
 2161 PFQLDSLLHA HLSGADVVT TTSGLSLAFD GDSFVRLRVP AAYAGSLCGL CGNYNQDPAD  
 2221 DLKAVGGKPA GWQVGGAQGC GECVSKPCPS PCTPEQQESF GGPDACGVIS ATDGPLAPCH  
 2281 GLVPPAQYFQ GCLLDACQVQ GHPGGLCPAV ATYVAACQAA GAQLREWRRP DFCPFQCPAH  
 2341 SHYELCGDSC PGSCPSLSAP EGCESACREG CVCDAGFVLS GDTCVPVQG CGLHDDRYYP  
 2401 LGQTFYFPGP CDSLRCREG GEVSCEPSSC GPHETCRPSG GSLGCVAVGS TTCQASGDPH<sup>↓</sup>  
     └─┬─ R6  
 2461 YTTFDGRRFD FMGTCVYVLA QTCGTRPGLH RFAVLQENVA WNGRVSVTR VITVQVANFT  
 2521 LRLEQRQWKV TVNGVDMKLP VVLANGQIRA SQHGS DVVIE TDFGLR<sup>↓</sup>VAYD LVYYVRVTVP  
 2581 GNYQLMCGL CGNYNGDPKD DFQKPNQSQA GNANEFNSW EEVVPDSPCL PPPTCPPGSE  
 2641 GCIPSEECPP ELEKKYQKEE FCGLLSSPTG PLSSCHKLVD PQGPLKDCIF DLCLGGGNLS  
 2701 ILCNSIHAYV SACQAAGQV EPWRNETFCP MECPQNSHYE LCADTCSLGC SALSAPLQCP  
 2761 DGCAEGCQCD SGFLYNGQAC VPIQQCGCYH NGAYYEPEQT VLIDNCRQQC TCHVGKVVVC  
 2821 QEHSCKPGQV CQPSGGILSC VNKDPCHGVT CRPQETCKEQ GGQGVCLPNY EATCWLWGD<sup>↓</sup>  
     └─┬─ R7  
 2881 HYHSDGRKF DFQGTCNYVL ATTGCPGVST QGLTPFTVTT KNQNR<sup>↓</sup>GNPAV SYVRVVTVA  
 2941 LGTNISIHKD EIGKVR<sup>↓</sup>VNGV LTALPVSVD GRISVTQAS KALLVADFGL QVSYDWNWRV  
 3001 DVTLPSSYHG AVCGLCGNMD RNPNDQVFP NGTLAPSIPI WGGSWRAPGW DPLCWDECRG  
 3061 SCPTCPEDRL EQYEGPGFCG PLAPGTGGPF TTCHAHVPPE SFFKGCVLVDV CMGGGDRDIL  
 3121 CKALASYVAA CQAAGVVID WRAQVGCET CPENSHYEVG GPPCPASCPS PAPLTTPAVC  
 3181 EGPCVEGCQC DAGFVLSADR CVPLNNGCGC WANGTYHEAG SEFWADGTCS QWCRCGPGGG  
 3241 SLVCTPASC LGEVCGLLPS GQHGCQPVST AECQAWGD<sup>↓</sup>PH YVTLDGHRFD FQGTCEYLLS  
     └─┬─ R8  
 3301 APCHGPPLGA ENFTVTVANE HRSQAVSYT RSVTLQIYNH SLTLSARWPR KLQVDGVFVT  
 3361 LPFQLDSLH AHLGADV VTTTSGLSLAF DGDSFVRLRV PAAYAGSLCG LCGNYNQDPA  
 3421 DDLKAVGGKP AGWQVGGAQG CGECVSKPCP SPCTPEQQES FGGPDACGVI SATDGPLAPC  
 3481 HGLVPPAQYF QGCLLDACQV QGHPGGLCPA VATYVAACQA AGAQLREWRR PDFCPFQCPA  
 3541 HSHYELCGDS CPGSCPSLSA PEGCESACRE GCVC DAGFVL SGDTCVPVQG CGCLHDDRY  
 3601 PLGQTFYFPGP GDSLRCRE GGEVSCEPSS CGPHETCRPS GSSLGCVAVG STTCQASGD<sup>↓</sup>  
     └─┬─ R9  
 3661 <sup>↓</sup>HYTTFDGHRF DFMGTCVYVL AQTGTRPGL HRF<sup>↓</sup>AVLQENV AWNGRVSVT RVITVQVANF  
 3721 TLRLEQRQWK VTVNGVDMKLP PVVLANGQIR ASQHGS DVVI ETD<sup>↓</sup>FGLRVAY DLVYYVRVTV  
 3781 PGNYQLMCG LCGNYNGDPK DDFQKPNQSQ AGNANEFNS WEEVVPDSPC LPPPTCPPGS  
 3841 AGCIPSDKCP PELEKKYQKE EFCGLLSSPT GPLSSCHKLV DPQGPLKDCI FDLCLGGGNL  
 3901 SILCSNIHAY VSACQAAGGH VEPWRNETFC PMECPQNSHY ELCADTCSLG CSALSAPLQC  
 3961 PDGCAEGCQC DSGFLYNGQA CVPIQQCGCY HNGVYYEPEQ TVLIDNCRQQ CTCHVGKVVV  
 4021 CQEHSCKPGQ VCQPSGGILS CVTKDPCHGV TCRPQETCKE QGGQGVCLPN YEATCWLWGD<sup>↓</sup>  
     └─┬─ R10

4081 PHYHSFDGRK FDFQGTTCNYV LATTGCPGVS TQGLTPFTVT TKNQNRGNPA VSYVRVVTVA  
 4141 ALGTNISIHK DEIGKVRVNG VLTALPVSVA DGRISVAQGA SKALLVADFG LQVSYDWNWR  
 4201 VDVTLPSSYH GAVCGLCGNM DRNPNDQVF PNGTLAPSIP IWGGSWRAPG WDPLCWDECR  
 4261 GSCPTCPEDR LEQYEGPGFC GPLSSGTGGP FTTCHAHVPP ESFFKGCVLD VCMGGGDRDI  
 4321 LCKALASYVA ACQAAGVVIE DWRAQVGCEI TCPENSHYEV CGPPCPASCP SPAPLTTPAV  
 4381 CEGPCVEGCQ CDAGFVLSAD RCVPLNNGCG CWANGTYHEA GSEFWADGTC SQWCRCGPGG  
 4441 GSLVCTPASC GLGEVCGLLP SQQHGCQPVV TAECQAWGDP HYVTLDGHRF DFQGTCEYLL  
 4501 SAPCHGPPLG AENFTVTVAN EHRGSQAVSY TRSVTLQIYN HSLTLSARWP RKLQVDGVFV  
 4561 ALPFQLDSSL HAHLGADV VTTTSGLSLA FDGDSFVRLR VPAAYAASLC GLCGNYNQDF  
 4621 ADDLKAVGGK PAGWQVGAQ GCGECVSKPC PSPCTPEQQE SFGGPDACGV ISATDGPLAP  
 4681 CHGLVPPAQY FQGCLLDACQ VQGHPPGLCP AVATYVAACQ AAGAQLGEWR RPDFCPLQCP  
 4741 AHSHYELCGD SCPVSCPSLS APEGCESACR EGCVC DAGFV LSGDTCVPVG QCGCLHDGRY  
 4801 YPLGEVFPYF PECERRCECG PGGHVTCQEG AACGPHEECR LEDGVQACHA TGCGRCLANG  
 4861 GIHYITLDGR VYDLHGSCSY VLAQVCHPKP GDEDFSIVLE KNAAGDLQRL LVTVAGQVVS  
 4921 LAQQQQVTVD GEAVALPVAV GRVVRTAAGR NMVLQTTKGL RLLFDGDAHL LMSIPSPFRG  
 4981 RLCGLCGNFN GNWSDDFVLP NGSAASSVET FGAAWRAPGS SKGCGEGCGP QGCPVCLAE  
 5041 TAPYESNEAC GQLRNPQGP ATCQAVLSPS EYFRQCVYDL CAQKGDKAFL CRSLAAYTAA  
 5101 CQAAGVAVKP WRTDSFCPLH CPAHSHYSIC TRTCQGSAA LSGLTGCTTR CFEGCECDDR  
 5161 FLLSQGVCIP VQDCGCTHNG RYLPVNSSL TSDCSERCSC SSSSGLTCQA AGCPPGRVCE  
 5221 VKAEARNCWA TRGLCVLSVG ANLTTFDGAR GATTSPGVYE LSSRCPLQN TIPWYRVVAE  
 5281 VQICHGKTEA VGQVHIFFQD GMVTLTPNKG VWVNGLRVDL PAEKLASVSV SRTPDGSLLV  
 5341 RQKAGVQVWL GANGKVAVIV SNDHAGKLCG ACGNFDGDQT NDWHDSQEKP AMEKWRAQDF  
 5401 SPCYG

### 7.3 Vorkommen des TFF3-FCGBP-Heteromers im Gastrointestinaltrakt

**Tab. 21: untersuchte Gewebeproben**

Gewebe	TFF3-FCGBP-Heteromer	Niedermolekulare TFF3-Formen
238-K <sub>s</sub> ; 262-K <sub>s</sub> ; 270-K <sub>s</sub> ; 289-K <sub>s</sub> ; 342-K <sub>s</sub> ; 302-K <sub>s</sub> ; 316-K <sub>s</sub> ; 319-K <sub>s</sub> ; 324-K <sub>s</sub> ; 328-K <sub>s</sub> ; 346-K; 356-K; 371-K <sub>coe</sub> ; 378-K <sub>coe</sub> ; 386- K <sub>s</sub> ; 412-K	ja	ja
254-D <sub>prox.</sub> ; 285-D <sub>prox.</sub> ; 290-D <sub>prox.</sub> ; 311- D <sub>prox.</sub> ; 321-D	ja	ja
152-M <sub>A</sub> ; 182-M <sub>A</sub> ; 249-M <sub>A</sub> ; 253-M <sub>A</sub> ; 257- M <sub>A</sub> ; 322-M <sub>A</sub> ; 373-M <sub>A</sub> ; 379-M <sub>A</sub>	ja	ja

Legende: K, Kolon; K<sub>s</sub>, sigmoides Kolon; K<sub>coe</sub>, Coecum; D, Dünndarm; D<sub>prox.</sub>, proximales Duodenum; M<sub>A</sub>, Antrumregion des Magens

### 7.4 Prozessierung von FCGBP

R1 CAAGRQGVV-GGKAGVAEASTAVRAQGD↓PHYTTFDGRRRYDMMGTSYTMVELCSSEDDTLPAFVSVEAKNEHRGSRVRSYVGLVTVRAYSHSVSLTRGEVGFVLDNRQRSLPVSLEGRLRVYQSGPRVAVELVFLGVVYTDWDQLALSLPARFQDDVGLGNGYNGDPADDFLTPDGA  
R2 CPAGERISVQ-NGLLGYPRDFGTQGSQD↓PHYVSFDGRRFDFMGTQTYLLVSGCGQNAALPAFRVLVENEHRGSRVTSYTRAVRVEARGVKVAVRREYPGQVLDVDDLYQLFPQADQVQVFRQGRDAVVRTDFGLTVTYDWNARVTAKVPSSYAEALGGLGNFNQDPADDDLALRGGGQA  
R3 CGPHEACQPS-GGSLGCVAVGSSSTQASGD↓PHYTTFDGRRFDFMGTQVYVLAQTGTRPGLHRFAVLQENVAWGNRVSVTRVITVQVANFTLRLEQRQWKVTVNGVDMKLPVVLANGQIRASQHGSDVVIETDFGLRVAYDLVYVVRVTPVGNYYQMGGLGNGYNGDPKDDFQKPNQSGAG  
R4 CRPQETCKEQ-GGQVGLPNYEATLWLG↓PHYHSFDGRKFDQGTQNYVLATTGPGVSTQGLTPFTVTTKNQNRGNPAVSYVRVTVVAALGTNISIHKDEIGKVRVNGVLTALPVSADGRISVTVQGASKALLVADFGLQVSYDWNWRVDTLPSSYHGAVGLGNGMDRPNNDQVFPNG  
R5 CGLGEVGLLPSGQHGQPVSTABEQAWGD↓PHYVTLDGHRFDFQGTCEYLLSAPCHGPPPLGAENFTVTVANEHRGSRQAVSYTRSVTLQIYNHSLTLSARWPRKLQVDGVFVTLFPQLDSLHLHAHLSGADVVTTSGLSLAFDGDGDFVRLRVPAAYAGSLGGLGNGYNGDPADDDLKAVGGKPA  
R6 CGPHETCRPS-GGSLGCVAVGSSSTQASGD↓PHYTTFDGRRFDFMGTQVYVLAQTGTRPGLHRFAVLQENVAWGNRVSVTRVITVQVANFTLRLEQRQWKVTVNGVDMKLPVVLANGQIRASQHGSDVVIETDFGLRVAYDLVYVVRVTPVGNYYQMGGLGNGYNGDPKDDFQKPNQSGAG  
R7 CRPQETCKEQ-GGQVGLPNYEATLWLG↓PHYHSFDGRKFDQGTQNYVLATTGPGVSTQGLTPFTVTTKNQNRGNPAVSYVRVTVVAALGTNISIHKDEIGKVRVNGVLTALPVSADGRISVTVQGASKALLVADFGLQVSYDWNWRVDTLPSSYHGAVGLGNGMDRPNNDQVFPNG  
R8 CGLGEVGLLPSGQHGQPVSTABEQAWGD↓PHYVTLDGHRFDFQGTCEYLLSAPCHGPPPLGAENFTVTVANEHRGSRQAVSYTRSVTLQIYNHSLTLSARWPRKLQVDGVFVTLFPQLDSLHLHAHLSGADVVTTSGLSLAFDGDGDFVRLRVPAAYAGSLGGLGNGYNGDPADDDLKAVGGKPA  
R9 CGPHETCRPS-GGSLGCVAVGSSSTQASGD↓PHYTTFDGRRFDFMGTQVYVLAQTGTRPGLHRFAVLQENVAWGNRVSVTRVITVQVANFTLRLEQRQWKVTVNGVDMKLPVVLANGQIRASQHGSDVVIETDFGLRVAYDLVYVVRVTPVGNYYQMGGLGNGYNGDPKDDFQKPNQSGAG  
R10 CRPQETCKEQ-GGQVGLPNYEATLWLG↓PHYHSFDGRKFDQGTQNYVLATTGPGVSTQGLTPFTVTTKNQNRGNPAVSYVRVTVVAALGTNISIHKDEIGKVRVNGVLTALPVSADGRISVTVQGASKALLVADFGLQVSYDWNWRVDTLPSSYHGAVGLGNGMDRPNNDQVFPNG  
R11 CGLGEVGLLPSGQHGQPVSTABEQAWGD↓PHYVTLDGHRFDFQGTCEYLLSAPCHGPPPLGAENFTVTVANEHRGSRQAVSYTRSVTLQIYNHSLTLSARWPRKLQVDGVFVTLFPQLDSLHLHAHLSGADVVTTSGLSLAFDGDGDFVRLRVPAAYAGSLGGLGNGYNGDPADDDLKAVGGKPA  
R12 CGPHEERLE-DGVQAHAHTGCRLLANGG-LHYITLDGRVLDLHGSSYVLAQVCHPKPGDEDFSVLEKNAAGDLQLLTVTAGQVVSQAQQQVTVVDGEAVALPVAAGRVRTAEGRNMVLTQTKLRLLLFDGDAHLMSIPSPFRGLRGLGGLGNFNQDPADDDLKAVGGKPA  
R13s CPPGRVLEVK-ARARNWATRGLVLSVGA-NLTTDFDARGATTSPGVYELSSRPGQLQNTIPWYRVVAEVQIHGKTEAVGVQHIFFDQGMVTLTPNKGVVNGLRVDLPAEKLASVSVSRTPDGSLLVRQKAGVQVWLGAANGKVAIVSNDHAGKLGAGLGNFDGDQTDNDHDSQEKPAMEK

R1 PDAVEFASS-----WKLLDGDYLCEDGQNNCPATPQGAQHVEGDRLCMLTKLDGPFVAVCHDTLDPRPFLEQVYDYLWVGGERLSLRGLSAYAQAQLELGISVGDWRSPANCPLS  
R2 ANALAFGNS-----WQETTRPGCGATEPGDCPKLDSLVAQQQKSKNCGILADPKGPFRECHSKLDPQGAVRDQVYDRCLLPQSGPLDALATYAAAQAAGATVHPWRSEELCPLS  
R3 NANEFGNSWEEVVPDSPLPPTCPGSEDCIPSHKPPPELEKKYQKEEFCGLLSSPTGFLSSCHKLVDPQGPLKDI FDLGLGGNLSILSNIHAYVSAQAAGGHVEPWRNETFCPME  
R4 TLAPSIPIWGS---WRAPGWDFLWDECRGSOPTCPEDRLEQYEGPGFGPLAPGTGGPFTTCHAHVPPSEFFKGVLDVCMGGDRDILKALASYVAAQAAGVVIEDWRAQVGCET  
R5 -----GWQVGAQQGEGEVSKPSPPTPEQQESFGGPDAGVVISATDGLPACHGLVPPAQYFQGLLDAQVQGHPPGLCPAVATYVAAQAAGAQLREWRPDPFQPLQ  
R6 NANEFGNSWEEVVPDSPLPPTCPGSEDCIPSHKPPPELEKKYQKEEFCGLLSSPTGFLSSCHKLVDPQGPLKDI FDLGLGGNLSILSNIHAYVSAQAAGGHVEPWRNETFCPME  
R7 TLAPSIPIWGS---WRAPGWDFLWDECRGSOPTCPEDRLEQYEGPGFGPLAPGTGGPFTTCHAHVPPSEFFKGVLDVCMGGDRDILKALASYVAAQAAGVVIEDWRAQVGCET  
R8 -----GWQVGAQQGEGEVSKPSPPTPEQQESFGGPDAGVVISATDGLPACHGLVPPAQYFQGLLDAQVQGHPPGLCPAVATYVAAQAAGAQLREWRPDPFQPLQ  
R9 NANEFGNSWEEVVPDSPLPPTCPGSEDCIPSHKPPPELEKKYQKEEFCGLLSSPTGFLSSCHKLVDPQGPLKDI FDLGLGGNLSILSNIHAYVSAQAAGGHVEPWRNETFCPME  
R10 TLAPSIPIWGS---WRAPGWDFLWDECRGSOPTCPEDRLEQYEGPGFGPLSPTGGPFTTCHAHVPPSEFFKGVLDVCMGGDRDILKALASYVAAQAAGVVIEDWRAQVGCET  
R11 -----GWQVGAQQGEGEVSKPSPPTPEQQESFGGPDAGVVISATDGLPACHGLVPPAQYFQGLLDAQVQGHPPGLCPAVATYVAAQAAGAQLREWRPDPFQPLQ  
R12 -----WRAPGSKGEGEGPGQCPVLAETAPYESNEACQLRNPQGFATQAVLSPSEYFRQVYDYLQAKGDKAFLERSLAAYTAAQAAGVAVKPRWTFDPLH  
R13s -----WRAQDFSPCYG

R1 CPANSHYELGPACTPSNGAAAPSNLSGRPVEGCVLPLGFVASGGACVPASSGTFQGLQLAPGEVWADDELQRRRTINGATHQVTRDRKQS  
R2 CPPHSHYELASYGCELSGDLVPVGGGSECHEGVDEDEGFALSGESCEPLASCCVHQGTYPFGQTFYPGGDSLCHQEGGLVSESSS  
R3 CPPNSHYELADTCSLGSALSAPLQPDGCAEGQDSDGFLYNGQAQVPIQQCCYHNGVYYPEQTVLIDNRQOCTCHAGKGMVQEHSEKPGQVQPSGGILSVTKDKPHGVT  
R4 CPENSHYELGDSCPGSPSAPLPTTFAVEGPEVEGQDAGFVLSADRCVPLNMGGGWANGTYHEAGSEFWADGTSQWNRGPGGGSLVTPAS  
R5 CPAHSHYELGDSCPGSPSAPBEGESACREGVVDAGFVLSGDTQVPGQCCCLHDDRYPLGQTFYPGGDSLCHQEGGLVSESSS  
R6 CPQNSHYELADTCSLGSALSAPLQPDGCAEGQDSDGFLYNGQAQVPIQQCCYHNGVYYPEQTVLIDNRQOCTCHVGVVQVQEHSEKPGQVQPSGGILSVTKDKPHGVT  
R7 CPENSHYELGDSCPGSPSAPLPTTFAVEGPEVEGQDAGFVLSADRCVPLNMGGGWANGTYHEAGSEFWADGTSQWNRGPGGGSLVTPAS  
R8 CPAHSHYELGDSCPGSPSAPBEGESACREGVVDAGFVLSGDTQVPGQCCCLHDDRYPLGQTFYPGGDSLCHQEGGLVSESSS  
R9 CPQNSHYELADTCSLGSALSAPLQPDGCAEGQDSDGFLYNGQAQVPIQQCCYHNGVYYPEQTVLIDNRQOCTCHVGVVQVQEHSEKPGQVQPSGGILSVTKDKPHGVT  
R10 CPENSHYELGDSCPGSPSAPLPTTFAVEGPEVEGQDAGFVLSADRCVPLNMGGGWANGTYHEAGSEFWADGTSQWNRGPGGGSLVTPAS  
R11 CPAHSHYELGDSCPVSPSAPBEGESACREGVVDAGFVLSGDTQVPGQCCCLHDDRYPLGQTFYPGPEERRERREGGGHVTCQEGAA  
R12 CPAHSHYSITRTTQGSAAALSGLTGTTRCFEGEEDDRFLLSQGVCCTHNGRYLPVNSLSTSDSERSSSSSGLTQAAAG

TIL

**Abb. 15:** Prozessierbarkeit von FCGBP. Vergleich der repetitiven Einheiten (R1-R12, R13s) basierend auf NCBI Accession number NP\_003881.2. Zur Maximierung der homologen Abfolge der Disulfidreste (Grün hervorgehoben) wurden entsprechende Lücken eingefügt. Autokatalytische Schnittstellen in der Sequenz (W)GD↓PHY (Rot hervorgehoben) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Sequenzen markiert, welche mit der von Willebrand Faktor D-Domäne, der C8-Domäne, der Trypsin Inhibitor ähnlichen (TIL) cysteinreichen Domäne, sowie dem CXXC Motiv (CGLCGN oder CGACGN) homolog sind.

**LEBENS LAUF****TIMO ALBERT****PERSÖNLICHE DATEN**

Geburtsdatum/ -ort 13. März 1979 in Hamm  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand ledig  
Adresse privat Hardenbergstr. 7  
39108 Magdeburg  
0171/9111223  
Adresse beruflich Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Universitätsklinikum  
Leipziger Straße 44  
39120 Magdeburg  
0391-67-13090  
timo.albert@med.ovgu.de

**BERUFLICHE TÄTIGKEIT**

Seit 11/2007 Doktorarbeit „Biosynthese von TFF3 im humanen Gastrointestinaltrakt“ im Rahmen der Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie  
08/2007 – 10/2007 Beschäftigung bei der Firma Leiber GmbH im verfahrenstechnischen Projekt „Versuche mit einer Membrananlage“ und in Anlehnung an die Diplomarbeit die Einführung einer mikrobiologischen Analytik auf Hefeschädlinge

**UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG**

05/2007 Abschluss als Diplom-Biologe  
2001 – 2007 Studium der Biologie am Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück  
Thema der Diplomarbeit (Abt. Mikrobiologie): „Nachweis und Charakterisierung von produktschädigenden Bakterien während der Bierhefeverarbeitung“

**SCHULAUSSILDUNG, ZIVILDIENTST**

2000 – 2001 Zivildienst  
06/2000 Augustin-Wibbelt-Gymnasium, Warendorf  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Magdeburg, 22. Februar 2012

Timo Albert

### **Selbstständigkeitserklärung**

Die von mir eingereichte Dissertation „Biosynthese von TFF3 im humanen Gastrointestinaltrakt“ wurde selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, verfasst. Die aus anderen Quellen übernommenen Daten und Erkenntnisse sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

### **Erklärung über Promotionsversuche**

Ich erkläre, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Magdeburg, der 21. Feb. 2012