

TFF2 (Trefoil Factor Family 2) im Magen von Mensch und Schwein: Charakterisierung der Bindung des Peptids TFF2 an den Mukus

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 Franziska Heuer, geb. Richter (M.Sc.)

geb. am 20.03.1989 in Plauen

Gutachter: **Prof. Dr. Werner Hoffmann, Universität Magdeburg**

Prof. Dr. Oliver Lieleg, TU München

eingereicht am: 20.08.2020

verteidigt am: 11.01.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Publikationsliste	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung	9
2. Abstract	10
3. Einleitung	11
3.1. Gastrointestinal (GI)-Trakt	11
3.2. Magen	12
3.3. Mukusschicht im Magen und Dünndarm	14
3.4. Gelbildende Muzine im humanen Magen und Dünndarm	16
3.5. TFF-Peptide	18
3.5.1. TFF2	21
3.6. Zielsetzung	22
4. Material und Methoden	24
4.1. Material	24
4.1.1. Gewebe	24
4.1.2. Antikörper	25
4.1.3. Lektine	26
4.1.4. Peptide	26
4.1.5. Datenbanken und Computerprogramme	26
4.1.6. Statistische Auswertung	27
4.2. Biochemische Methoden	28
4.2.1. Gewebeextraktion	28
4.2.1.1. Wässrige Extraktion	28
4.2.1.2. TRIzol [®] -Extraktion	30
4.2.2. Proteinreinigung mittels Säulenchromatographie	32
4.2.2.1. Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)	33
4.2.2.2. Ionenaustausch-Chromatographie	34
4.2.2.3. Entsalzung der gereinigten Proteinproben mittels PD-10-Säulen	34
4.2.3. Gelelektrophorese	35
4.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese (AgGE)	35
4.2.3.2. SDS –Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
4.2.4. Western Blot	38
4.2.4.1. Elektrobplot und Kapillarplot	39

4.2.4.2. Immundetektion mit spezifischen Antikörpern.....	40
4.2.4.3. Lektinfärbung	42
4.2.5. Kompetitive Inhibition	42
4.2.6. „Stripping“ der Nitrozellulosemembran nach Immundetektion mit spez. Antikörper .	43
4.2.7. Silberfärbung.....	43
4.2.8. Coomassie- Brillantblau-Färbung	44
4.2.9. PAS-Reaktion	45
4.2.10 Bindungsstudien mit ¹²⁵ I-TFF2	46
4.2.10.1. Iodierung mit Iodogen.....	46
4.2.10.2. Hybridisierung mit ¹²⁵ I-TFF2	47
4.2.11. N-Glycosidase F-Verdau	48
4.2.12. Proteinase K-Verdau.....	49
5. Ergebnisse.....	51
5.1. Humanes TFF2.....	51
5.1.1. TFF2 im humanen Magen	51
5.1.1.1. S-75 HL-Läufe von humanen Magenproben.....	52
A: Antrum vs. Korpus	52
B: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden humaner Korpusproben	54
C: Differentielle Extraktion E0, E1 und E3/4	60
5.1.1.2. ResQ-Läufe humaner Magenproben	63
A: ResQ-Läufe differenzielle Extraktion E0, E1 und E3/E4.....	63
B: ResQ-Lauf eines Extraktes E1 im Detail	64
5.1.1.3. S-500-Läufe humaner Magenproben.....	66
A: S-500-Lauf eines humanen Korpusextrakts	66
B: S-500-Lauf eines humanen Korpusextrakts E1 (MC577) nach Kochen mit 1% β-Mercaptoethanol	66
5.1.1.4. Bindungsstudien mit ¹²⁵ I-TFF2.....	68
A: Hybridisierung von Fraktionen nach S-75HL eines Korpusextrakts mit ¹²⁵ I-hTFF2 _{non-glyk}	68
B: Charakterisierung der Bindung von ¹²⁵ I-hTFF2 _{non-glyk} an TFF2-freien Mukus.....	69
C: Charakterisierung der Bindung von ¹²⁵ I-hTFF2 _{glyk} bzw. ¹²⁵ I-pTFF2 an Muzine nach deren Trennung über S-500	70
5.1.1.5. Elution von TFF2 aus dem NR SDS-Gel	72
5.1.2. TFF2 im humanen Duodenum	73
5.1.2.1. S-75-HL Läufe humaner Duodenumproben.....	73
A: Hochmolekulare TFF2-Form im humanen Duodenum	74
B: Niedermolekulare TFF2-Form im humanen Duodenum	76

5.2. TFF2 im Schwein	77
5.2.1. TFF2 im Magen vom Schwein.....	77
5.2.1.1. Vergleich von TFF2 aus dem Korpus von Schwein vs. Mensch.....	77
5.2.1.2. S-75HL-Läufe von Proben aus dem Schweinemagen: Korpus vs. Antrum ...	77
A: S-75HL-Lauf einer Gewebeprobe aus dem Korpus.....	77
B: S-75HL-Lauf einer Gewebeprobe aus dem Antrum	79
C: Gegenüberstellung von S-75HL-Läufen abgekratzter Mukosa vs. Gewebe aus dem Schweinemagen	80
D: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Korpusproben vom Schwein ...	82
E: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Antrumproben vom Schwein ...	86
5.2.1.3. Hybridisierung mit ¹²⁵ I-TFF2	87
5.2.1.4. Elution von TFF2 nach NR SDS-PAGE	89
5.2.2. TFFs in der Hypophyse vom Schwein	90
5.2.2.1. TFF2 in der Hypophyse vom Schwein	91
5.2.2.2. TFF3 in der Hypophyse vom Schwein	92
6. Diskussion	95
6.1. TFF2 im humanen Magen.....	95
6.1.1. TFF2-Formen im Korpus und Antrum.....	95
6.1.2. Die Bindung von TFF2 an MUC6	96
6.1.3. Charakterisierung der Bindung von TFF2 an den Mukus	97
6.1.4. Modell der humanen Magenschleimhaut in Bezug auf die Rolle von TFF2 als Quervernetzer der Muzine	99
6.2. TFF2 im humanen Duodenum	101
6.3. TFF2 im Magen vom Schwein.....	103
6.3.1. TFF2-Formen im Korpus und Antrum.....	103
6.3.2. Die Bindung von TFF2 an den Mukus	105
6.4. TFFs in der Hypophyse vom Schwein	107
6.5. Zusammenfassung und Ausblick	107
7. Literaturverzeichnis	109
8. Anhang.....	123
8.1. Humanes TFF2.....	123
8.1.1. TFF2 im humanen Magen	123
8.1.1.1. S-75HL-Läufe von humanen Magenproben.....	123
A: Antrum vs. Korpus- Kompetitive Inhibition.....	123
B: Extraktionsmethoden im Korpus	124
8.1.1.2. Bindungsstudien mit ¹²⁵ I-TFF2.....	129
8.1.1.3. Elution von TFF2 aus dem NR Coomassiegel	131

8.1.2. TFF2 im humanen Duodenum	131
8.2. TFF2 im Schwein	132
8.2.1. TFF2 im Magen vom Schwein.....	132
8.2.1.1. Vergleich von TFF2 aus dem Korpus vom Schwein vs. Mensch.....	132
8.2.1.2. S-75HL-Läufe von Proben aus dem Schweinemagen	133
8.2.1.3. Hybridisierung mit ¹²⁵ I-TFF2	144
8.2.1.4. Elution von TFF2 aus dem NR SDS-Gel	145
9. Ehrenerklärung	146

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Franziska Heuer, René Stürmer, Jörn Heuer, Thomas Kalinski, Antje Lemke, Frank Meyer and Werner Hoffmann; **Different Forms of TFF2, A Lectin of the Human Gastric Mucus Barrier: *In Vitro* Binding Studies**; *Int. J. Mol. Sci.*, Volume 20, 5871, November 2019

Jörn Heuer, **Franziska Heuer**, René Stürmer, Sönke Harder, Hartmut Schlüter, Nayara Braga Emidio, Markus Muttenthaler, Dörthe Jechorek, Frank Meyer and Werner Hoffmann; **The Tumor Suppressor TFF1 Occurs in Different Forms and Interacts with Multiple Partners in the Human Gastric Mucus Barrier: Indications for Diverse Protective Functions**; *Int. J. Mol. Sci.*; Volume 21/7, 2508; April 2020

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹²⁵ I-TFF2	¹²⁵ Iod gekoppeltes TFF2
x g	mal Erdbeschleunigung
AgGE	Agarosegelelektrophorese
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	<i>counts per minute</i>
deion. Wasser	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
glyk.	glykosyliert
GSAll	<i>Griffonia simplicifolia agglutinin II</i>
GuaHCl	Guanidinhydrochlorid
h	<i>hour</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
mAU	Milliabsorbtionseinheiten
MUC	Muzin
non-glyk.	nicht-glykosyliert
NR	nicht-reduzierend
NRPP	nicht-reduzierender Probenpuffer
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PGM	<i>Porcine gastric mucin</i>
PTS-Region	Prolin-Threonin-Serin-reiche Region
R	reduzierend
rek.	rekombinant
ResQ	RESOURCE™ Q6-Säule
RNA	Ribonukleinsäure
RPP	reduzierender Probenpuffer
RT	Raumtemperatur

S-500	HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-500 HR
S-75HL	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg-Säule
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SL	Stammlösung
Sp	Spatelspitze
SV	Säulenvolumen
syn.	synthetisch
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFF	<i>trefoil factor family</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIZOL®	Markenname für Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Gemisch
üN	über Nacht
ÜS	Überstand
v/v	<i>volume/volume</i>
vNTRs	variable number of tandem repeats
vWF	von Willebrand Faktor
w/v	<i>weight/volume</i>

1. Zusammenfassung

Der Gastrointestinaltrakt von Mensch und Schwein wird durch ein komplexes Gel, die sogenannte Mukusschicht, ausgekleidet. Diese schützt die Epithelschicht der Organe vor enzymatischem Abbau durch Verdauungsenzyme, wie z. B. Proteasen. Hauptbestandteil dieser Schutzschicht sind neben Wasser (ca. 95%) vor allem Muzine. Im Magen und Darm werden diese Muzine zusammen mit verschiedenen *Trefoil factor family* (TFF)-Peptiden sezerniert. TFF2, welches vor allem im Magen vorkommt, bindet lektinartig an das Muzin MUC6, mit welchem es zusammen von Nebenzellen des Korpus und Antrumdrüsenzellen sezerniert wird. In dieser Arbeit wurden zunächst Magenproben von Mensch und Schwein über FPLC (S-75HL, S-500, ResQ) gereinigt. Im menschlichen Magen konnte TFF2 sowohl in einer hochmolekularen Form, als auch in einer niedermolekularen Form (monomeres TFF2) nachgewiesen werden. Bei der hochmolekularen Form handelt es sich um TFF2, welches mit den Muzinen der Mukusschicht interagiert. Diese Bindung von TFF2 an den Mukus wurde im Folgenden untersucht (SDS-PAGE, Western Blot) und näher charakterisiert (stufenweise Extraktion, Hybridisierung mit ^{125}I -TFF2 unter verschiedenen Bedingungen, Kochexperimente mit verschiedenen Detergenzien). Zusätzlich wurde auch die Bindung von TFF2 an Muzine bei Mensch und Schwein gegenübergestellt. Durch die genannten Methoden konnte gezeigt werden, dass TFF2 im humanen Magen abhängig vom pH-Wert und der Konzentration der Ca^{2+} -Ionen an das Muzin MUC6 bindet. Diese Bindung kann durch GSAIL, HIK1083 sowie den Zucker β -Methylgalaktosid tlw. inhibiert werden. Für die Bindung von TFF2 an Muzine sind also, sowohl α -1,4-GlcNAc Einheiten, als auch β -Galaktosid-Reste essentiell. Da die Bindung nach Kochen der Mukusproben mit SDS und EDTA sowie nach TRIZOL[®]-Extraktion im Mensch nicht mehr beobachtet werden kann, handelt es sich hier vermutlich um eine nicht-kovalente Bindung. Es konnten einige Unterschiede der Bindung von TFF2 an Muzine zwischen Mensch und Schwein herausgearbeitet werden (z. B. im Mensch nicht kovalent, im Schwein vermutlich tlw. kovalent). Auf Grund der erzielten Ergebnisse kann eine Rolle von TFF2 bei der Stabilisierung der Mukusschicht (als Quervernetzter von MUC6) vermutet werden.

2. Abstract

The gastrointestinal tract of humans and pigs is lined by a complex gel, the so-called mucus layer. This mucus layer protects the epithelial cells from enzymatic degradation by digestive enzymes such as proteases. The main component of this protective layer is water (approx. 95%). Mucins are also a component of the mucus layer. In the stomach and intestine these mucins are secreted together with various Trefoil factor family (TFF) peptides. TFF2, which is mainly found in the stomach, binds lectin-like to the mucin MUC6. In this work, gastric tissue samples from human and pig were purified by FPLC (S-75HL, S-500, ResQ). In the human stomach TFF2 could be detected as a high molecular form as well as a low molecular form (monomeric TFF2). The high-molecular form interacts with mucins of the mucosal layer. The nature of this bound was studied (SDS-PAGE, Western blot) and characterized in more detail (stepwise extraction, binding studies ^{125}I -TFF2 under different conditions, boiling experiments with different detergents). Additionally, the interaction of TFF2 to mucins in humans and pigs was analysed. Using the methods mentioned above, it could be shown that TFF2 in the human stomach binds to the mucin MUC6 depending on the pH value and concentration of Ca^{2+} ions. This binding can be partially inhibited by GSAIL; HIK1083 and the sugar β -methylgalactoside. Thus, both α -1,4-GlcNAc-residues and β -galactoside residues are essential for the bond of TFF2 to mucins. Since the binding can no longer be observed after boiling the mucus samples with SDS and EDTA, as well as after TRizol[®] extraction, it can be characterised as a non-covalent binding. Some differences in the binding of TFF2 to mucus between human and pig could be found (e.g. non-covalent in humans, partly covalent in pigs). Based on the results obtained, TFF2 probably plays an important role in the stabilization of the mucus layer by cross-linking MUC6.

3. Einleitung

3.1. Gastrointestinal (GI)-Trakt

Im GI-Trakt kommt es zu einem enzymatischen Aufschluss der Nahrung, der Resorption von Nährstoffen und Wasser, sowie der Ausscheidung unverdaulicher, nichtverwertbarer Nahrungsbestandteile. Die Nahrung wird zunächst in der Mundhöhle mit Speichel angereichert und mechanisch zerkleinert. Dieser Speisebrei wird auch als Chymus bezeichnet und gelangt über den Ösophagus in den Magen. Der Transport erfolgt mit Hilfe der Kontraktion von quergestreifter und glatter Muskulatur, der sogenannten Peristaltik. Der Magen (Detail siehe 3.2.) ist ein aus Muskelgewebe aufgebautes Hohlorgan, welches mit Schleimhaut ausgekleidet ist. Beim Mensch ist er in die verschiedenen Abschnitte:

- Mageneingang (Kardia),
- Magengrund (Fundus),
- Magenkörper (Korpus),
- Pförtnerhöhle (Antrum) und
- Pförtner (Pylorus) unterteilt.

Im Magen wird der Chymus mit dem Magensaft vermengt. Dieser enthält vor allem Pepsin (Verdauung von Proteinen, pH-Optimum 1,5-2) und Salzsäure (Schutz vor Infektionen durch Abtötung von Bakterien). Durch Muskelkontraktionen wird der Nahrungsbrei weiter zum Pförtner transportiert, dem Schließmuskel zwischen Magen und Darm. Vom Magen gelangt die Nahrung über den Pylorus in den Darm. Der erste Abschnitt des Darms wird als Dünndarm bezeichnet und ist in drei Abschnitte gegliedert: den Zwölffingerdarm (**Duodenum**), den Leerdarm (**Jejunum**) und den Krummdarm (**Ileum**). Die Hauptaufgabe des Dünndarms besteht in der Aufnahme von Nährstoffen (Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Vitamine), der Resorption von Wasser und in der Neutralisation des Chymus (Ausschüttung von Bikarbonat aus den Brunner'schen Drüsen). Im Dünndarm werden zusätzlich verschiedene Hormone (z. B.: Glukagon, Sekretin, Serotonin) gebildet. Durch darmassoziierte lymphatische Gewebe (Peyer-Plaques) kommt es zu einer immunologischen Schadstoffabwehr. Am *Ostium ileocaecale* geht der Dünndarm in den Dickdarm (**Kolon**) über. Die Aufgabe des Kolons ist der Transport und die Speicherung von Stuhl. Außerdem werden dem Stuhl Wasser entzogen und Natriumionen resorbiert. Das Kolon reguliert über dies den Cl⁻ und K⁺ Haushalt. Die Oberflächenvergrößerung von Dün- und Dickdarm wird über diverse Zotten und Krypten, aber auch mit Hilfe von Mikrobiota (Schroeder 2019) gewährleistet. Die Ausscheidung der unverdaulichen und nicht verwertbaren Nahrung erfolgt über den After (Schiebler and Arnold 1999).

3.2. Magen

Der humane Magen ist, wie bereits erwähnt, ein muskulöses, einhöhliges, sackförmiges Hohlorgan, welches zur Speicherung sowie zur mechanischen (Muskelkontraktion) und enzymatischen (vorwiegend durch Pepsin) Zerkleinerung des Chymus dient. Ausgekleidet wird der humane Magen von einer Schleimschicht, die den Magen u. a. vor einem Abbau durch Salzsäure (Magensaft, niedriger pH-Wert als Schutzschild vor bakterieller und viraler Infektion) schützt. Histologisch und anatomisch betrachtet wird der Magen in verschiedene Abschnitte unterteilt (siehe Abbildung 1).

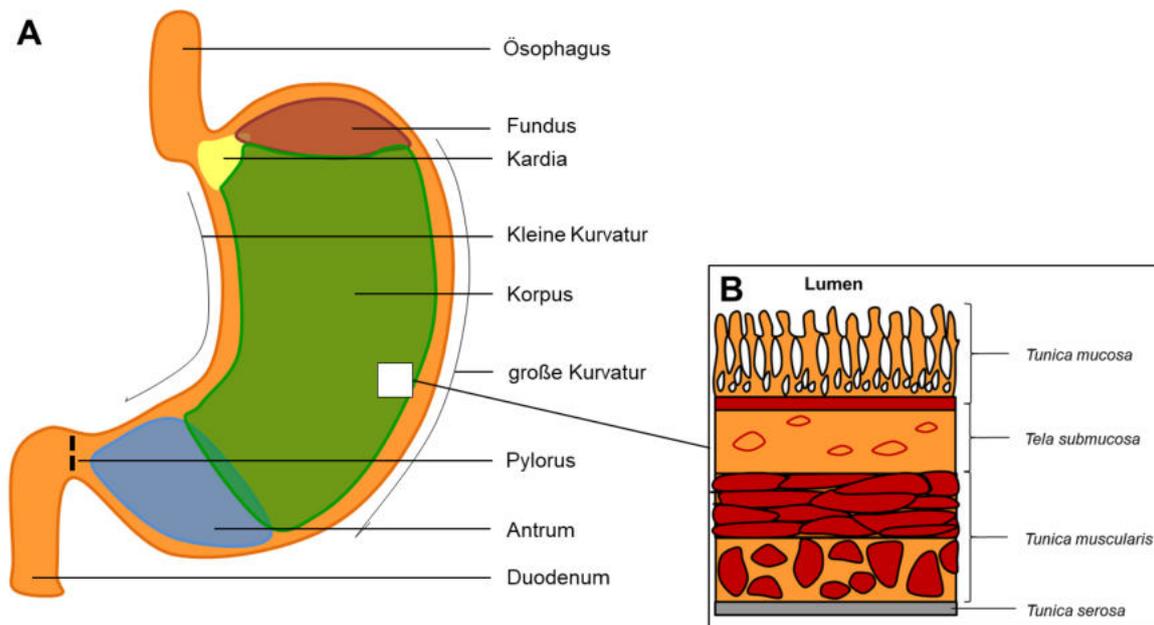


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des humanen Magens. A: Unterteilung des Magens in verschiedene Abschnitte. Der Magen wird anatomisch in die Abschnitte Kardie, Fundus, Korpus, Antrum und Pylorus unterteilt. **B: Aufbau der vierschichtigen Magenwand.** Die Magenwand ist vierschichtig aufgebaut (*Tunica mucosa*, *Tela submucosa*, *Tunica muscularis* sowie *Tunica serosa*). Abbildung nach Bauer L. M. M. 2013.

Das **Ostium cardiacum (Kardia)** stellt den 1-3 cm dicken Mageneingang dar. Links der Kardie erhebt sich kuppelförmig der **Fundus gastricus (Fundus)**, welcher die mit der Nahrungsaufnahme verschluckte Luft sammelt. Den Hauptteil des Magens bildet der **Corpus gastricum (Korpus)**. Auf den Korpus folgt das **Antrum pyloricum (Antrum)** und der **Pylorus (Magenpförtner)** (siehe Abbildung 1A). Letzterer stellt die Verbindung zum Dünndarm her. Eine Oberflächenvergrößerung des Magens wird durch diverse Plicae (*Plicae gastrice*, *Areae gastrice*, *Plicae villosae* und *Foveolae gastrice*) gewährleistet. Die Magenwand ist in folgende vier Schichten (siehe Abbildung 1B) unterteilt:

1. **Tunica mucosa gastrica** (einschichtiges, hochprismatisches Epithel ohne Bürstensaum, Magendrüsen → Bildung und Sekretion von Magenschleim etc.)
2. **Tela submucosa** (gefäßführendes lockeres Bindegewebe)
3. **Tunica muscularis** (Muskelschicht, 3 Schichten glatter Muskulatur)
4. **Tunica serosa**

Im Magen unterscheidet man drei verschiedene Drüsentypen, die **Glandulae cardiacae** (Kardiadrüsen), die **Glandulae gastricae propriae** (Fundusdrüsen) und die **Glandulae pyloricae** (Pylorus/Antrumdrüsen) (siehe Abbildung 2).

In Drüsen des Fundus/ Korpus, die langgestreckt und tubular aufgebaut sind, finden sich u. a. Oberflächenepithelzellen (u. a. Bildung und Ausschüttung MUC5AC, TFF1), Nebenzellen (u. a. Bildung und Ausschüttung von MUC6 und TFF2), Hauptzellen (Sekretion Pepsinogen), Parietalzellen (Sekretion *Intrinsic Factor*) und endokrine Zellen (D-Zellen, ECL-Zellen). Die Drüsen des Antrums enthalten neben Antrumdrüsenzellen (u. a. Bildung und Ausschüttung von MUC6 und TFF2) und Oberflächenepithelzellen (u. a. Bildung und Ausschüttung von MUC5AC und TFF1) auch verschiedene Endokrine Zellen wie z. B. G-Zellen (Hoffmann 2015a; Kouznetsova et al. 2011; Schiebler and Arnold 1999).

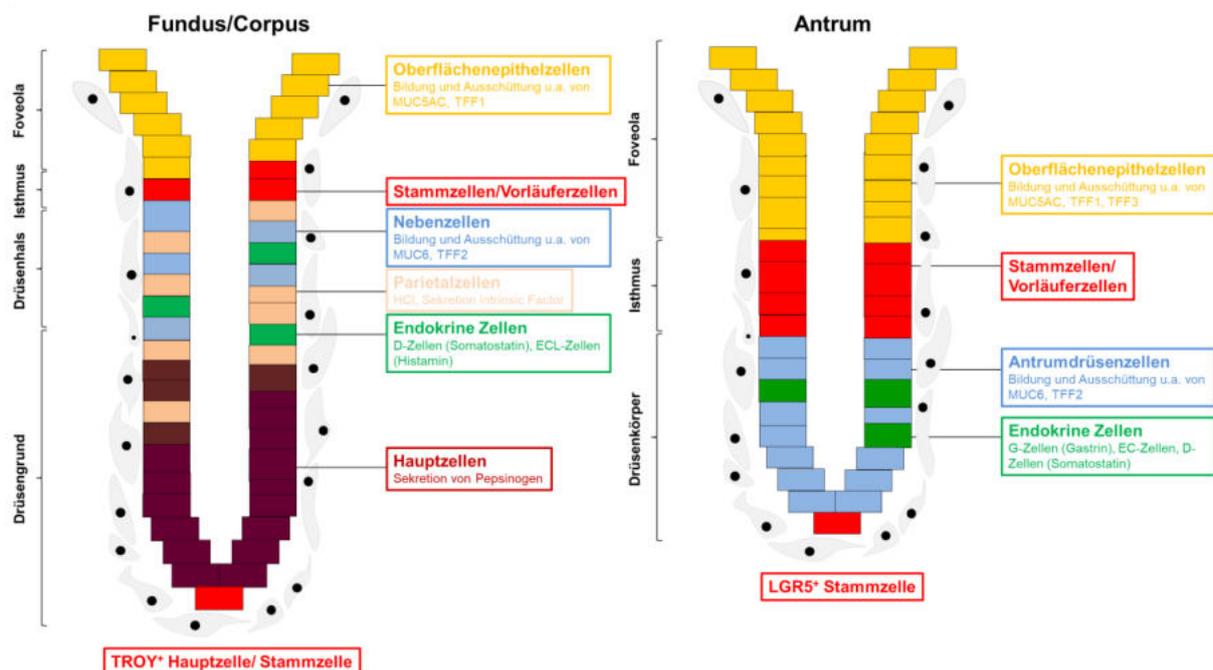


Abbildung 2: Die Zelltypen von Fundusdrüse und Antrumdrüse im Vergleich. Links: Fundusdrüse. Drüsenkörper, Drüsenhals, Isthmus und Foveola bilden die Fundusdrüse. **Rechts: Antrumdrüse.** Aufgeteilt wird die Antrumdrüse in Drüsenkörper, Isthmus und Foveola. Verändert nach Hoffmann 2015a; Kouznetsova et al. 2011.

Auch der Magen des Schweins ist ein einhöhliges Organ, welches große physiologische und anatomische Ähnlichkeiten zum menschlichen Magen aufweist (Patterson et al. 2008). Durch den hohen Anteil an pflanzlicher Nahrung kommen jedoch eine Vielzahl kohlenhydratspaltender Enzyme (u. a. α -Amylase, Carbohydrasen) sowie verschiedene

fermentierende Bakterien (Fermentation faseriges Material; z. B. *Bifidobakterien*, *Bacteroidetes*) entlang des porcinen GI-Trakts vor (Corring 1982; Kararli 1995). Funktionell und strukturell ist der Schweinemagen in vier verschiedene Regionen (**Pars oesophagus**, **Kardia**, **Fundus/Korpus** und **Antrum**, siehe Abbildung 3A) gliedert. Der Magen eines ausgewachsenen Schweins ist mit 200-300 g gut doppelt so groß als der eines erwachsenen Menschen (Gonzalez et al. 2015). Die Magenwand ist, wie beim Menschen, vierschichtig aufgebaut (siehe oben). Wie im humanen Magen wird auch im Schweinemagen eine Mukusschicht (ca. 95% Wasser, ca. 3% Muzin) als Schutz vor enzymatischem und mechanischem Stress gebildet.

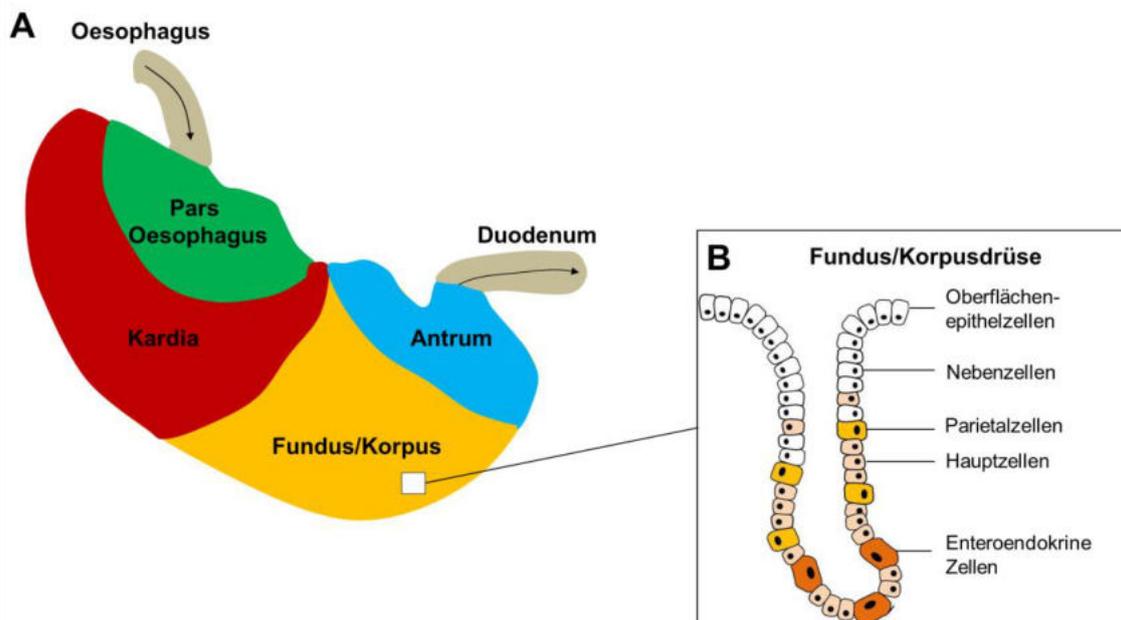


Abbildung 3: Aufbau des Schweinemagens. A: Schematische Darstellung des Schweinemagens. Der porcine Magen wird funktionell und strukturell in vier Abschnitte (Pars Oesophagus, Kardia, Fundus/Korpus und Antrum) unterteilt. **B: Schematische Darstellung einer Fundusdrüse.** In der Fundusdrüse sind verschiedene Zelltypen (z. B. Oberflächenepithelzellen, Nebenzellen, Parietalzellen) zu finden. Abbildung verändert nach H.N. Laerke and M.S. Hedemann 2012 und J.P.Rowan, K.L.Durrance, G.E. Combs, and L.Z. Fisher 1997, revised 2015

Auch der Aufbau der Drüsen des Schweinemagens ist dem im menschlichen Magen sehr ähnlich (siehe Abbildung 3B). Zudem sind die Zelltypen in den verschiedenen Drüsen mit denen des humanen Magens vergleichbar (z. B. Oberflächenepithelzellen → Bildung Mukus durch Ausschüttung von Porcine Gastric Mucin (PGM)).

3.3. Mukusschicht im Magen und Dünndarm

Die Organe des GI-Trakts sind durch eine Mukusschicht vor enzymatischem (z. B. Pepsin) und mechanischem Stress (u. a. Muskelkontraktion) geschützt. Zudem stellt diese Mukusschicht einen wirksamen Schutz vor dem Befall mit schädlichen Mikroorganismen dar (Kim and Ho 2010). Sie ist ein komplexes Gel (95% Wasser), welches reich an Glykoproteinen (Muzinen, z. B. MUC6 und MUC5AC) ist. Auch verschiedene Ionen (z. B. H^+ ,

Cl⁻, Na⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, HCO³⁻) und ein Mix an diversen anderen Proteinen, wie z. B. Immunglobuline IgG, IgA, IgM (McGuckin et al. 2011), TFF-Peptide (Hoffmann 2006), Gastrokine (Menheniott et al. 2013), IgG-Fc-bindendes Protein (FCGBP), Lysozyme (Kouznetsova et al. 2011) und Galektine (Nio-Kobayashi et al. 2009) können in der Mukusschicht gefunden werden. Dabei verleihen die Muzine der Mukusschicht ihre viskosen und elastischen Eigenschaften (Atuma et al. 2001). Die Mukusschicht unterliegt einer kontinuierlichen Erneuerung, d. h. durch kurze Turnover-Zeiten kann schnell auf eventuelle Infektionen oder Beschädigungen reagiert werden. Innerhalb des humanen GI-Traktes ist die Mukusschicht unterschiedlich aufgebaut (siehe Abbildung 4, (Atuma et al. 2001)) und variiert in der Dicke zwischen 150 µm im Dünndarm und über 800 µm im Dickdarm (Atuma et al. 2001).

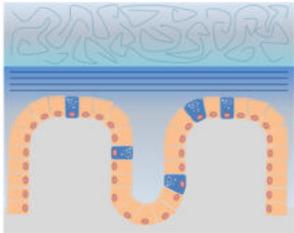
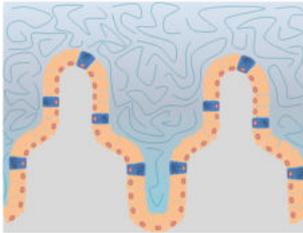
	Magen	Dünndarm
Mukusschicht		
Muzine	<p>MUC5AC (Oberflächenepithelzellen)</p> <p>MUC6 (Nebenzellen) (Antrumdrüsenzellen)</p>	<p>MUC2 (Becherzellen)</p> <p>MUC6 (Brunner'sche Drüsenzellen)</p>
TFF-Peptide	<p>TFF1 (Oberflächenepithelzellen Korpus, Antrum und Kardia)</p> <p>TFF2 (Nebenzellen) (Antrumdrüsenzellen)</p> <p>TFF3 (Oberflächenepithelzellen Antrum und Kardia)</p>	<p>TFF2 (Brunner'sche Drüsenzellen)</p> <p>TFF3 (Becherzellen)</p>

Abbildung 4: Mukusschicht des humanen Magens und Dünndarms. Dargestellt sind schematische Abbildungen der Mukusschichten im Magen und Dünndarms, sowie die in der jeweiligen Mukusschicht vorkommenden Muzine und TFF-Peptide. Abbildungen nach Johansson et al. 2013.

Im **Magen** liegt der Mukus als eine zweischichtige Barriere vor. Die innere, festere Mukusschicht ist mit den Epithelzellen verbunden (Atuma et al. 2001; Phillipson et al. 2008). Die äußere, lockerere Schicht kann hingegen recht einfach von der inneren Mukusschicht abgelöst werden (Atuma et al. 2001). Der Mukus ist dabei vermutlich permeabel für diverse Ionen (z. B. H⁺, Cl⁻) (Allen and Flemström 2005; Ermund et al. 2013). Im Korpus ist die Mukusschicht mit ca. 200 µm dünner als im Antrum (ca. 280-300 µm). Die gelbildenden

Muzine des Magens sind MUC5AC und MUC6 (Bartman et al. 1998; Nordman et al. 2002). Diese sind in der Lage, über intermolekulare Disulfidbrücken Homooligomere zu bilden, welche der Mukusschicht die viskösen Eigenschaften (Atuma et al. 2001) verleihen. Innerhalb der Mukusschicht liegt ein pH-Gradient von neutral, an den Oberflächenepithelzellen, zu sauer, im Lumen, vor (Allen and Flemström 2005; Phillipson et al. 2002; Schreiber and Scheid 1997). Verantwortlich dafür ist eine Barriere aus HCO_3^- als Schutz vor Salzsäure (Allen and Flemström 2005).

Die Mukosa des **Dünndarms** ist generell lockerer aufgebaut als die Schleimschicht des Magens und am proximalen Teil ca. 170-200 μm dick. Im Ileum hingegen kann eine Dicke von 480-500 μm erreicht werden (Atuma et al. 2001). Eine feste, innere Mukusschicht befindet sich lediglich direkt am Mikrovillisaum (10-30 μm dick), der restliche Teil der Mukosa wird durch lockere Ansammlungen von MUC2 Molekülen gebildet und lässt sich gut von der Zelloberfläche trennen (Ermund et al. 2013).

3.4. Gelbildende Muzine im humanen Magen und Dünndarm

Muzine sind große, extrazelluläre, hochglykosylierte Proteine mit einer Masse von 0,5-20 MDa. Man unterscheidet zwei Arten von Muzinen, die membranassoziierten Muzine und die gelbildenden Muzine (Dekker et al. 2002). Die gelbildenden Muzine MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 liegen als Cluster auf dem Chromosom 11p15.5 vor ((Pigny et al. 1996); siehe Abbildung 5).

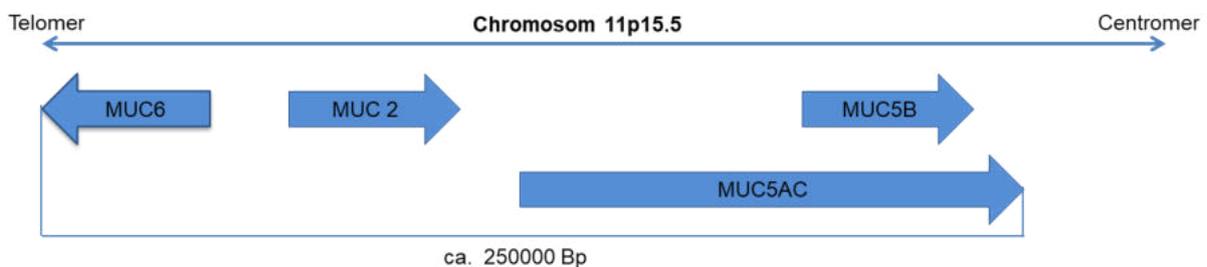


Abbildung 5: Cluster der gelbildenden Muzine auf Chromosom 11p15.5. Dargestellt ist die Anordnung der Gene gelbildender Muzine auf Chromosom 11p15.5.

(<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MUC6ID44115ch11p15.html>)

Ca. 80% der Masse von Muzinen wird durch die Zuckerreste (z. B.: GlcNAc, GalNAc, Fucose, Galaktose, Mannose) bestimmt. Der Proteinkern macht lediglich 20% des Glykoproteins aus (Bansil and Turner 2006). Er besteht aus einer zentralen PTS-Region (Region reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin). Diese Aminosäuren liegen in variabler Anzahl repetitiver Einheiten innerhalb der PTS-Region vor (vNTR, *variable number of tandem repeats*) (siehe Abbildung 6). In der PTS-Region werden Zuckerreste O-glykosidisch an die OH-Gruppen von Threonin und Serin gebunden (5-15 Monomere pro Kette). Zunächst erfolgt dabei die Bindung von GalNAc (N-Acetylgalactosamin) an die Aminosäure, im Golgi-Apparat kommt es dann zur Elongation der Zuckerreste über

Glykosyltransferasen. Der hohe Anteil an O-Glykosylierungen ist wichtig für eine ausgestreckte Konformation der Muzine (Hong et al. 2005), zudem schützen sie das Protein vor Abbau durch endogene Proteasen (Johansson et al. 2013). Am N- und C-Terminus der Muzine finden sich außerdem diverse N-Glykosylierungen, welche bereits im endoplasmatischen Retikulum erfolgen.

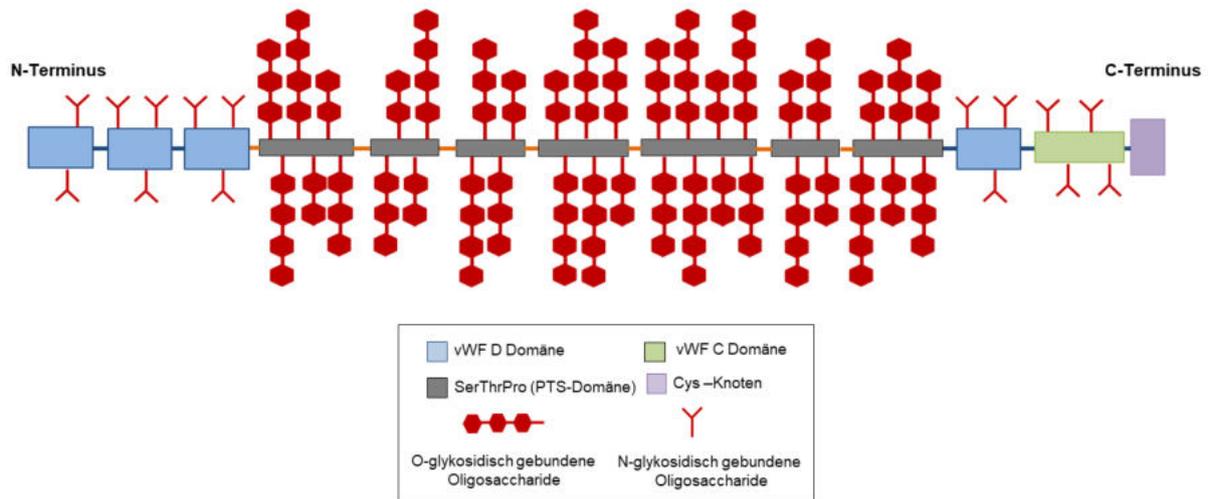


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines gelbildenden Muzins. Muzine sind große Glykoproteine mit einem hohen Anteil an O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden. Diese sind an die Serin- und Threoninreste der PTS-Region gebunden. Durch den hohen Anteil der Zucker in dieser Region liegen Muzine als langgestreckte Moleküle vor. Am N- und C-Terminus der Muzine befinden sich die vWF-Domänen (von Willebrand Faktor) mit diversen glykosidisch gebundenen Zuckerresten. Über Cystein-Reste in den vWF-Domänen können Muzine oligomerisieren. Abbildung nach Bansil and Turner 2006.

Außerdem sind am N- und C-Terminus, wie in Abbildung 6 zu sehen, vWF (von Willebrand Faktor) Domänen und weitere charakteristische cysteinreiche Domänen zu finden (Bell et al. 2001; Perez-Vilar and Hill 1999; Turner et al. 1999). Durch diese cysteinreichen Regionen am N- und C-Terminus kann es zur Ausbildung von Disulfidbrücken und einer daraus resultierenden Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Muzine kommen, wodurch netzwerkartige Strukturen ausgebildet werden können (Ambort et al. 2012; Dekker et al. 2002; Sheehan et al. 2004). Die PTS-Region ist für jedes Muzin in den einzelnen Spezies sehr verschieden, die cysteinreichen Regionen weisen jedoch eine relativ hohe Ähnlichkeit auf (Perez-Vilar and Hill 1999; Vinall et al. 1998). Das durch Oligomerisierung der Muzine gebildete Gel weist je nach experimentellem pH-Wert unterschiedliche viskose Eigenschaften auf (Bhaskar et al. 1991). Bei einem niedrigen pH-Wert nehmen die hydrophoben Eigenschaften der Proteinkette zu, dadurch kommt es zu einer Entfaltung und Exposition der *random Coils* (Cao et al. 1999). Die gelbildenden Muzine werden nach der Produktion in Sekretgranula verpackt und durch Exozytose freigegeben. Dabei werden sie durch die Anlagerung von Ca^{2+} und H^+ komprimiert; dadurch wird die Abstoßung durch negativ geladene anionische Zuckerketten reduziert (Perez-Vilar 2007; Verdugo 1991). Nach

der Exozytose dissoziieren die Ca^{2+} und H^+ Ionen ab und die abstoßenden intramolekularen Kräfte führen schließlich zur Expansion der Muzine (Garcia et al. 2009). Die gelbildenden Muzine des humanen Magens und Dünndarms sind im Wesentlichen die Muzine MUC2, MUC5AC und MUC6. Im porcinen Magen wird hauptsächlich das Porcine Gastric Mucin (PGM) gebildet, dieses weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zum humanen MUC5AC auf (Turner et al. 1999).

3.5. TFF-Peptide

Neben den oben beschriebenen Muzinen sind auch TFF-Peptide (*trefoil factor family peptides*) in der Mukusschicht von Magen und Dünndarm zu finden. Im Mensch sind derzeit drei verschiedene TFF-Peptide (TFF1, TFF2 und TFF3) beschrieben (Aihara et al. 2017; Kjellev 2009; Thim 1997):

TFF1 (früher pS2) ist, wie die anderen TFF-Peptide auch, auf Chromosom 21q22.3 lokalisiert. Es besteht aus nur einer TFF-Domäne und besitzt somit ein siebtes, ungepaartes Cystein. Das sezernierte Peptid ist 60 AS lang und hat ein Molekulargewicht von ca. 6,7 kDa. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,18 (bestimmt mit ExPASy-Protparam). Es wird u. a. von den Oberflächenepithelzellen des Magens gebildet (Jakowlew et al. 1984; Masiakowski et al. 1982).

TFF2 (früher *spasmolytic polypeptide/SP*) besitzt im Gegensatz zu TFF1 zwei TFF-Domänen und somit kein ungepaartes Cystein. Ohne Signalsequenz hat das Peptid damit eine Länge von 106 AS und ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa (nicht glykosyliert). Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,21 (bestimmt mit ExPASy-Protparam). Gebildet wird TFF2 u. a. von den Brunner'schen Drüsen des Dünndarms, den Nebenzellen des Magens sowie den Antrumdrüsenzellen (Jørgensen et al. 1982b).

TFF3 (früher *intestinal trefoil factor/ITF*) besteht, wie TFF1, aus nur einer TFF-Domäne. Der isoelektrische Punkt des 59 AS langen, sezernierten Peptids beträgt 5,13 (bestimmt mit ExPASy-Protparam). Das 6,6 kDa große TFF3 wird vor allem von den Becherzellen des Darms sezerniert (Suemori et al. 1991).

Alle drei humanen TFF-Peptide liegen gemeinsam, in der Reihenfolge tel-TFF1-TFF2-TFF3-cen, auf Chromosom 21 vor (Beck et al. 1996; Hoffmann 2006). Eine koordinierte Transkriptionsregulation wurde bereits beschrieben (Gött et al. 1996). Bei der Synthese der TFF-Peptide wird zunächst ein Vorläuferpeptid gebildet. Durch Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz entstehen die reifen TFF-Peptide. Die TFF-Domäne, die in allen drei TFF-Peptiden zu finden ist, wurde bereits 1989 als 38 bzw. 39 AS lange Domäne mit sechs konservierten Cysteinresten definiert (Thim 1989). Die konservierten Cysteinreste C1 und C5, C3 und C6, sowie C2 und C4 bilden durch intrazelluläre Disulfidbrücken eine 3-Loop-

Struktur, die einem Kleeblatt ähnelt und somit namensgebend für die TFF-Peptide ist (siehe Abbildung 7). Bedingt durch diese Struktur erhalten die TFF-Peptide eine kompakte Form, die sie relativ Protease-resistent macht (Kinoshita et al. 2000). Eine hydrophobe Tasche zwischen Loop 2 und Loop 3 der TFF-Domäne (Polshakov et al. 1997) kann als mögliche Bindungsstelle für Zuckerreste von Muzinen oder anderen Glykoproteinen angesehen werden (Gajhede et al. 1993). Während TFF2 zwei solcher TFF-Domänen enthält (siehe Abbildung 7), besitzen TFF1 und TFF3 jeweils nur eine TFF-Domäne. Deshalb sind TFF1 und TFF3 theoretisch in der Lage, verschiedene Dimere über intermolekulare Disulfidbrücken am C7 zu bilden (Chadwick et al. 1997). Neben Homodimeren, bilden TFF1 und TFF3 auch Heterodimere, z. B. TFF1 mit GKN2 (Kouznetsova et al. 2007a; May et al. 2009) bzw. TFF1 und TFF3 mit FCGBP (Albert et al. 2010; Heuer et al. 2020; Znalesniak et al. 2020). Eine Dimerisierung von TFF1 bzw. TFF3 scheint dabei die biologische Aktivität der beiden Peptide zu erhöhen (Chinery and Playford 1995; Poulsen et al. 2005).

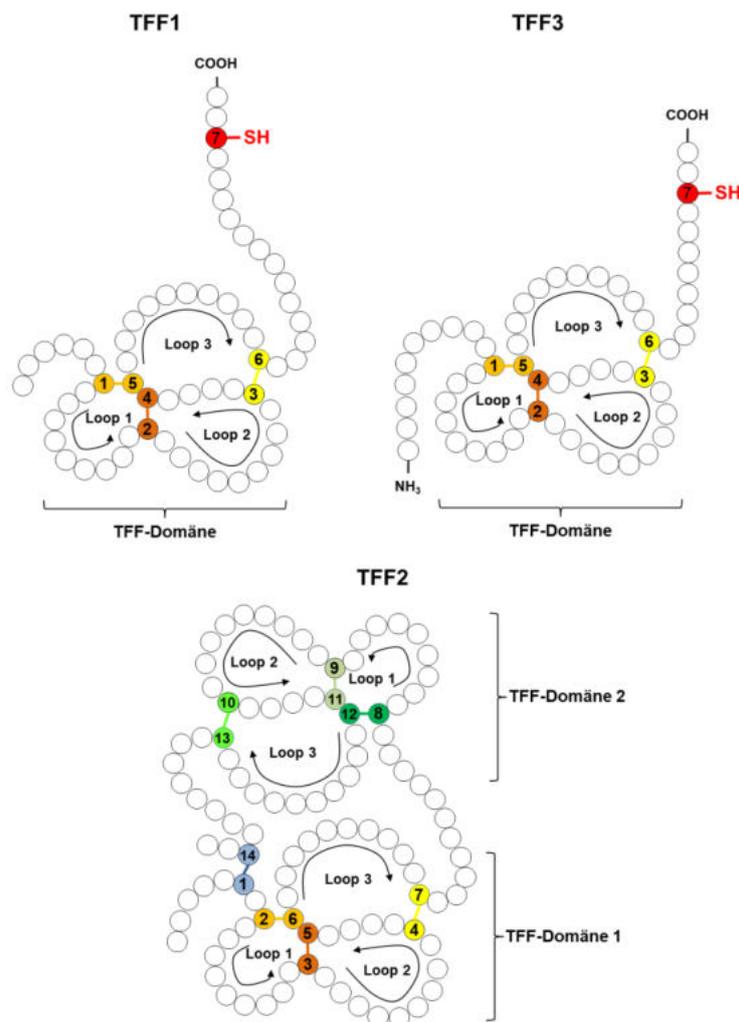


Abbildung 7: Die humanen TFF Peptide TFF1, TFF2 und TFF3. TFF1 und TFF3 besitzen je eine TFF-Domäne. Der siebte Cys-Rest ist nicht gebunden. TFF2 besitzt hingegen zwei TFF-Domänen, die über eine zusätzliche intrazelluläre Disulfidbrücke zwischen Cys 1 und Cys 14 verknüpft sind. Abbildung nach Thim 1997.

TFF-Peptide werden entlang des GI-Trakts von unterschiedlichen Zellen mit verschiedenen Muzinen co-sezerniert (siehe auch Abbildung 2, Abbildung 4, Tabelle 1). Aber auch in anderen Teilen des Körpers konnten TFF-Peptide bereits nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Vorkommen der TFF-Peptide.

	Vorkommen	Quelle
TFF1	Oberflächenepithelzellen Antrum/Korpus	(Rio et al. 1988)
	Auge	(Langer et al. 2001)
	Magensaft	(Rio et al. 1988)
TFF2	Nebenzellen Korpus/ Antrumdrüsenzellen	(Hanby et al. 1993a; Rasmussen et al. 1992; Tomasetto et al. 1990)
	Brunner´sche Drüsen Duodenum	(Hanby et al. 1993b; Rasmussen et al. 1992)
	Lymphatische Organe	(Kurt-Jones et al. 2007)
	Speicheldrüsen	(Jeffrey et al. 1994)
	Magensaft	(Semple et al. 2001)
	Zentrales Nervensystem	(Cook et al. 1999; Hinz et al. 2004; Kurt-Jones et al. 2007)
TFF3	Becherzellen Darm	(Hauser et al. 1993; Podolsky et al. 1993; Suemori et al. 1991)
	Speichel	(Houben et al. 2019; Jagla et al. 1999)
	Ösophagus	(Kouznetsova et al. 2007b)
	Zentrales Nervensystem	(Fu et al. 2014)
	Auge	(Langer et al. 2001)
	Magensaft	(Kouznetsova et al. 2004)
	Uterus	(Wiede et al. 2001)
	Leber/Galle	(Sasaki et al. 2004; Sasaki et al. 2007)

Bei verschiedenen Krebsarten, wie z. B. Kolonkrebs (Taupin et al. 1996) und verschiedenen Krankheiten, wie z. B. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Wright et al. 1993) konnte eine erhöhte Biosynthese der TFF-Peptide ebenfalls nachgewiesen werden.

Die Funktionen der TFF-Peptide sind sehr vielfältig. Ihnen wird unter anderem eine wichtige Rolle bei der Bildung der Mukusbarriere (Schutz und Erhalt der Oberflächenintegrität von

mukösen Epithelien) zugeschrieben (Kindon et al. 1995); TFF2 und TFF3-Dimere können zudem die rheologischen Eigenschaften des Mukus verändern (Thim et al. 2002). Auch an Zellmigration und Restitutionsprozessen (Aihara et al. 2017; Dignass et al. 1994) sind TFF-Peptide beteiligt, da sie über motogene Eigenschaften verfügen. Zudem können sie auch anti-apoptotisch wirksam sein (Bossenmeyer-Pourié et al. 2002; Kinoshita et al. 2000) und spielen dadurch vermutlich eine wichtige Rolle bei mukosalen Wundheilungsprozessen (Ebert et al. 1999; Kjellev 2009; Peitz et al. 2004). TFF1 wurde zudem als Tumorsuppressor beschrieben (Lefebvre et al. 1996). Auch in der Immunabwehr (Cook et al. 1999) und als mögliches Neuropeptid (Fu et al. 2014) spielen TFF-Peptide eine wichtige Rolle.

3.5.1. TFF2

TFF2 wurde früher auch als *spasmolytic polypeptide* bezeichnet, da es die Kontraktion von isoliertem Darmgewebe inhibiert (Jørgensen et al. 1982a). Es wurde erstmals 1982 bei der Isolierung von Insulin aus dem Pankreas des Schweins beschrieben (Jørgensen et al. 1982b; Jørgensen et al. 1982a; Thim et al. 1982). Die AS-Sequenz von TFF2 ist stark konserviert. TFF2 besitzt zwei TFF-Domänen (Tomasetto et al. 1990), welche über eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke verbunden sind. Dadurch weist TFF2 eine recht kompakte Form auf und ist relativ stabil gegenüber verschiedener Proteasen (Jørgensen et al. 1982b). Ein Sequenzvergleich von TFF2 aus Mensch, Schwein und Maus ist in Abbildung 8 dargestellt.

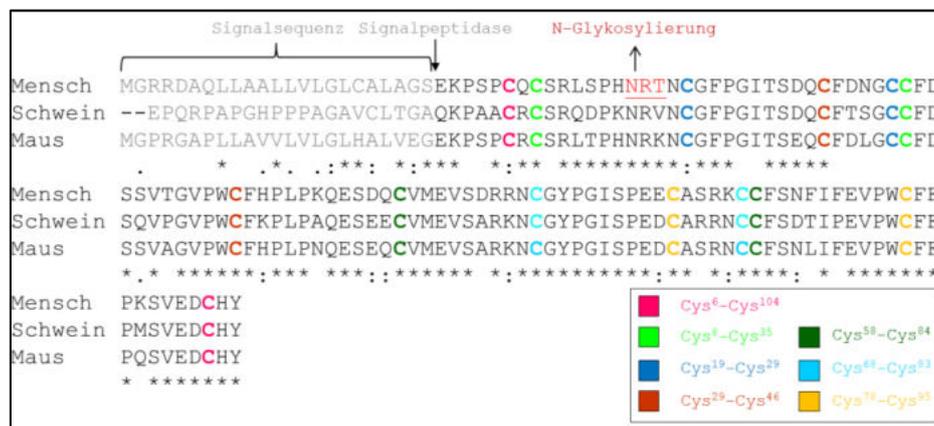


Abbildung 8: Sequenzvergleich der TFF2-Vorstufen aus Mensch, Schwein und Maus. Abgebildet sind die Sequenzen für TFF2-Vorstufen aus Mensch, Schwein bzw. Maus (Uniprot (Q03403 TFF2_HUMAN; P01359 TFF2_PIG; Q03404 TFF2_MOUSE)); Sequenzvergleich mittels Clustal Omega (Larkin et al. 2007)). Hellgrau markiert ist die N-terminale Signalpeptidsequenz der Vorstufe. Farblich markiert sind die intrazellulären Disulfidbrücken. Die N-Glykosylierung bei humanem TFF2 ist rot und unterstrichen hervorgehoben.

Die Vorstufe des humanen TFF2 enthält eine 23 AS lange N-terminale Sortierungssequenz. Diese ist im Schwein 21 AS lang, in der Maus ist sie ebenfalls 23 AS (siehe Abbildung 8) lang. Nach der Abspaltung dieser Signalsequenz besitzt das sezernierte TFF2-Peptid einen N-terminalen Glutaminsäurerest (E, Mensch bzw. Maus) bzw. Glutaminrest (Q, Schwein). Im

Gegensatz zum Schwein und der Maus, besitzt humanes TFF2 eine N-Glykosylierungsstelle (May et al. 2000; Thim et al. 1993); da diese partiell ist, kann TFF2 aber auch unglykosyliert vorliegen. Kennzeichen dieser N-Glykosylierung ist ein *N-linked monofucosylated N,N'-diacetylactosediamine* (LacdiNAc) Oligosaccharid (Hanisch et al. 2013), welches u. a. von *Helicobacter pylori* erkannt werden kann (Rossez et al. 2014). Wie bereits oben erwähnt wird TFF2 vor allem im Magen (Antrum/Korpus) und Duodenum zusammen mit dem Muzin MUC6 sezerniert und ist typischer Bestandteil der Mukusschicht und des Magensafts (Semple et al. 2001). Im Schwein kann TFF2 auch im Pankreas nachgewiesen werden (Rose et al. 1989; Stürmer et al. 2014).

Für TFF2 sind bereits verschiedene Bindungspartner beschrieben:

- Muzine (Hanisch et al. 2014; Hoffmann 2015b; Kouznetsova et al. 2007a; Stürmer et al. 2014)
- Ductin (Thim and Mørtz 2000)
- β -Untereinheit von β -Integrin (Thim and Mørtz 2000)
- CXCR4 (Braga Emidio et al. 2019; Dubeykovskaya et al. 2009; Hoffmann 2009)
- PAR4 (Braga Emidio et al. 2019; Zhang et al. 2011)

Die Bindung von TFF2 an Muzine erfolgt u. a. als Lektin an terminale α -1,4-GlcNAc Reste ($\text{GlcNAc}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta$) der Muzine (Hanisch et al. 2014). Der α -1,4-GlcNAc Rest wird exklusiv von MUC6 sezernierenden Zellen gebildet und u. a. durch den monoklonalen Antikörper HIK1083 (Ishihara et al. 1996) sowie durch das Lektin GSAll erkannt (Ihida et al. 1988; Nordman et al. 1998). Dieser Rest weist zudem eine antibiotische Aktivität gegenüber *H. pylori* auf (Lee et al. 2008; Nakayama 2014). Durch die Bindung von TFF2 an Muzine kann TFF2 die Viskosität und Elastizität der Mukusschicht (Kjellv et al. 2006; Thim et al. 2002) beeinflussen. Zusätzlich kann TFF2 auch Zellmigrationsprozesse *in vitro* unterstützen (Chwieralski et al. 2004; Hoffmann 2004). Auch bei der Immunantwort und bei inflammatorischen Prozessen scheint TFF2 eine Rolle zu spielen (Kurt-Jones et al. 2007). Ebenfalls wurde eine Funktion von TFF2 als Tumorsuppressor bereits diskutiert. (Shi et al. 2006).

3.6. Zielsetzung

TFF2 wird zusammen mit Muzinen im Magen und Dünndarm von verschiedenen Zellen gebildet und sezerniert. Es ist bereits beschrieben, dass porcines TFF2 an Orthanamucin bindet (Stürmer et al. 2018). Außerdem wurde gezeigt, dass ein rekombinantes TFF2-Fusionsprotein als Lektin an terminale α -1,4-GlcNAc-Reste von kommerziell erhältlichem Muzin aus dem Schwein bindet (Hanisch et al. 2014).

Ziel dieser Arbeit ist es nun, u. a. die Bindung von humanem TFF2 an Muzine der humanen Mukusschicht zu untersuchen und näher zu charakterisieren. Dafür werden humane

Gewebeproben aus dem Magen extrahiert und mittels FPLC gereinigt. Die Bindung von rekombinantem ^{125}I -TFF2 an diese gereinigten Mukusproben wird dann in Bindungsstudien unter verschiedenen Bedingungen untersucht (z. B. Abhängigkeit von pH-Wert, Ca^{2+} -Konzentration). Durch stufenweise Extraktion von humanem Gewebe soll die Bindung von TFF2 an den Mukus zusätzlich charakterisiert werden. Im Schwein ist die Bindung von TFF2 an den Mukus bereits für kommerziell erhältliche Muzinpräparate (Orthanamucin) beschrieben (Stürmer et al. 2018). Diese Bindung soll nun auch an Proben von porcinen Magengeweben untersucht, charakterisiert und mit denen humaner Proben verglichen werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (analysereine Qualität, p.a.) stammen, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Riedel-de-Haën (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland). Für alle Puffer und Lösungen, die in dieser Dissertation aufgelistet sind, wurde deionisiertes, gereinigtes Wasser verwendet (Ultra Clear TWF Reinwassersystem, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland). Die Puffer für die Proteinreinigung wurden mit Hilfe eines Millipore Express® PLUS (PES) Filters (Porengröße 0,22 µm; Merck; Deutschland) filtriert und vor dem Säulenlauf im Ultraschallbad (TranssonicT460/H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen Deutschland, 15 min) entgast.

4.1.1. Gewebe

Alle Untersuchungen von menschlichem Gewebe wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg genehmigt und folgen den Grundsätzen der Erklärung von Helsinki. Die Proben wurden dabei aus dem Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) des Menschen durch Mitarbeiter der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie gewonnen und nach der histopathologischen Befundung durch die pathologische Abteilung (Prof. Dr. T. Kalinski, OÄ Dr. med. A. Lemke, OÄ Prof. Dr. med. D. Jechorek) bei -80 °C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Gewebe.

Gewebeummer	Ursprung	Befunde
MC358	Korpus	mäßige chr. leicht floride Gastritis
MC383	Korpus	chr. Gastritis
MC406A	Korpus	ohne Befund (o. B.)
MC479	Korpus	o. B.
MC540	Korpus	o. B.
MC560	Korpus	o. B.
MC577	Korpus	Adipositas
MC588	Korpus	o. B.
MA250	Antrum	mäßige chr. Entzündung, geringgradige Metaplasie
MA343	Antrum	chr. floride Gastritis, intestinale Metaplasie

MA534	Antrum	geringgradige chr. Gastritis
MA561	Antrum	mäßige Gastritis, mäßige Atrophie
Duo118	Duodenum	o. B.
Duo246	Duodenum	o. B.
Duo350	Duodenum	o. B.
Duo360	Duodenum	o. B.
Duo365	Duodenum	o. B.
Duo435	Duodenum	o. B.
Duo554	Duodenum	o. B.
Duo559	Duodenum	o. B.

Die Proben aus dem GI-Trakt des Schweins wurden von frisch geschlachteten Schweinen (Biohof Gut Glüsig, Gut Glüsig GmbH, Ackendorf, OT Glüsig) gewonnen. Diese wurden nach der Schlachtung auf Eis ins IMMC transportiert. Dort wurden die Gewebeprobe entnommen und bis zur Verwendung ebenfalls bei -80 °C gelagert. Für diese Arbeit wurden Proben der Schweine 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 und 12 untersucht.

4.1.2. Antikörper

Tabelle 3: Primäre und Sekundäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Kopplung	Verdünnung	Literatur
a-hTFF2-2	FFPNSVEDCHY	KLH	1:2000	(Jagla et al. 2000)
a-hTFF3-8	FKPLQEAECTF	KLH	1:1000	(Jagla et al. 2000)
a-hMUC5AC-2	RNQDQQGPFKMC	KLH	1:2000	(Kouznetsova et al. 2004)
PGM2B-1	RNQDQQGGKFRIC	KLH	1:1000	(Nordman et al. 1998)
anti-Kaninchen	-	Peroxidase	1:4000	Vector Laboratories PI-1000

Für den immunologischen Nachweis von TFF2 bzw. TFF3 (Jagla et al. 2000) bei Mensch und Schwein wurden affinitätsgereinigte, polyklonale, primäre Antikörper (a-hTFF2-2 bzw. a-hTFF3-8) verwendet (siehe Tabelle 3). Diese wurden gegen das Peptid FFPNSVEDCHY (TFF2) bzw. FKPLQEAECTF (TFF3) generiert, welche für die Immunisierung an Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) gekoppelt wurden. Für den Nachweis von MUC5AC (Kouznetsova et al. 2004) beim Mensch wurde ein affinitätsgereinigter polyklonaler Antikörper (a-hMUC5AC-2) gegen das Peptid RNQDQQGPFKMC verwendet. Der Nachweis

von MUC5AC beim Schwein erfolgte über den affinitätsgereinigten, polyklonalen Antikörper PGM 2B-1 (Nordman et al. 1998) gegen das Peptid RNQDQGGKFRIC.

Der Nachweis des primären Antikörpers erfolgte mittels Peroxidase gekoppeltem sekundären Antikörper anti-Kaninchen-IgG (H+L) (PI-1000, Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A), welcher in einer 1:4000 Verdünnung eingesetzt wurde.

4.1.3. Lektine

Der Nachweis von MUC6 erfolgte über das biotinylierte Lektin GSAll (siehe Tabelle 4). Dieses konnte über die Bindung an Streptavidin (Sigma Aldrich, Missouri, U.S.A.), welches an eine Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gebunden ist, detektiert werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Lektine

Lektin	Abkürzung	Bindemotiv	Verdünnung	Bezug
biotinyliertes <i>Griffonia</i> <i>Simplicifolia</i> Lektin II	GSAll	α - und β - N-Acetylglucosamin	1:1000	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Streptavidin- Peroxidase		Biotinylierte Antikörper/ Lektine	1:2500	Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

4.1.4. Peptide

Die rekombinanten Peptide TFF2_{glyc}, TFF2_{non-glyc} (Thim et al. 1993) bzw. pTFF2 (Jørgensen et al. 1982b), die für Vergleichsgele und die Hybridisierung mit ¹²⁵I verwendet wurden, stellte freundlicher Weise Dr. L. Thim (Novo Nordisk, Bagsværd, Dänemark) zur Verfügung.

4.1.5. Datenbanken und Computerprogramme

Für die Literatursuche, die Analyse von Proteinsequenzen, die Darstellung der Proteinstruktur und für die Bildbearbeitung wurden folgende Datenbanken und Programme verwendet:

ACD/ ChemSketch 2018.1.1 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada)

Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Incorporated, San Jose, USA)

Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>; (Larkin et al. 2007))

ExPASy ProtParam (**Expert Protein Analysis System**; Swiss Institute of Bioinformatics <http://www.expasy.ch>; (Walker 2005))

GeneTools Version 4.03.05.0 (SynGene, Cambridge, England)

GeneView Version 4.03.05.0 (SynGene, Cambridge, England)

ImageJ 1.52a (Image Processing and Analysis in Java, Institut of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>; (Schneider et al. 2012))

Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

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

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

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

4.1.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse bei einer Stichprobenzahl $n \geq 2$ erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes Microsoft Office 2010 (Excel, siehe Abschnitt 4.1.5). Fehlerbalken in Abbildungen, die einen solchen enthalten, stellen die Standardabweichung δ (Excel: STABW.N) grafisch dar. Für die Signifikanztests wurde ebenfalls das Programm Microsoft Office 2010 (Excel, siehe Abschnitt 4.1.5) verwendet. Es handelt sich dabei um einen Zwei-Stichproben F-Test mit * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

4.2. Biochemische Methoden

4.2.1. Gewebeextraktion

Die Gewebeextraktionen und anschließenden Säulenläufe wurden tlw. in Zusammenarbeit mit Herrn Jörn Heuer durchgeführt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Puffer für die Gewebeextraktion.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Extraktionspuffer S-75HL	20 mM Tris/HCl, pH 7.0 30 mM NaCl 0,5 mM Benzamidin 0,1 mM Pefabloc SC 0,21 µM Leupeptin
Extraktionspuffer ResQ	20 mM Tris/HCl, 7.0 0,5 mM Benzamidin 0,1 mM Pefabloc SC 0,21 µM Leupeptin

4.2.1.1. Wässrige Extraktion

A: Standard-Methode

Für die analytische Reinigung wurden ca. 0,2 g Gewebe verwendet, für die präparative Reinigung wurden ca. 1,6 g-1,8 g Gewebe aufgeschlossen. Die Extraktion erfolgte mittels mechanischer Lyse. Dazu wurden die bei -80 °C eingefrorenen Gewebestücke kurz angetaut und mittels Skalpells ca. 0,2 g schwere Gewebestücke abgetrennt. Diese wurden in mit Keramikkügelchen gefüllte 2 mL Reaktionsgefäße gegeben und dann mit dem fünffachen Volumen (w/v) an Extraktionspuffer (siehe Tabelle 5) versetzt. Danach wurden die Proben für 10 sec in flüssigen Stickstoff gegeben und die Suspension mit dem Homogenisator Precellys 24 (peglab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) aufgeschlossen (3x10 sec, 6800 x g, 30 sec Pause). Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min bei 4 °C (Hettich Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand (ÜS) wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt, mit der gleichen Menge an Chloroform (v/v) versetzt (Entfernung interferierender unpolarer Substanzen) und kurz gevortext. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min bei 4 °C. Der dabei gebildete Überstand wurde als Extrakt für die anschließende Analyse abgenommen (siehe Abbildung 9).

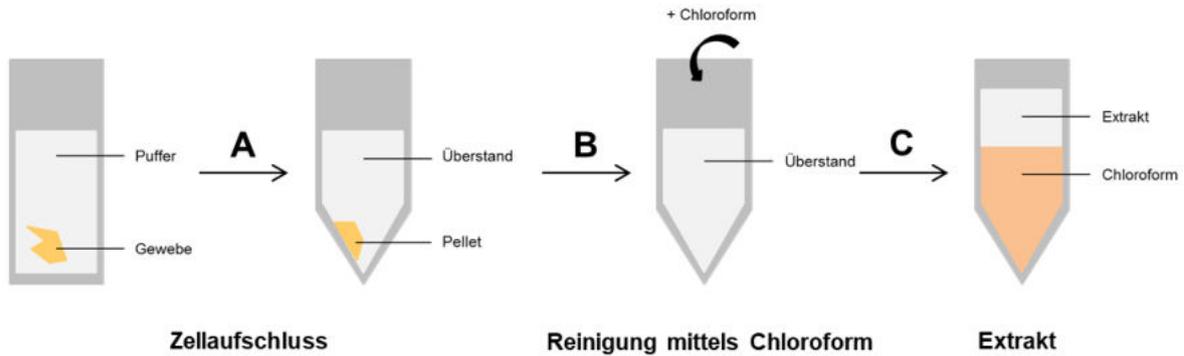


Abbildung 9: Wässrige Extraktion von Geweben nach dem Standardprotokoll. Das Gewebe wird zunächst im fünffachen Volumen an Puffer aufgenommen. **A:** Es folgt der Zellaufschluss mittels Precellys und eine anschließende Zentrifugation. **B:** Der Überstand nach der Zentrifugation wird in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit Chloroform im Verhältnis 1:1 gemischt. **C:** Nach erneuter Zentrifugation bilden sich zwei Phasen. Der Extrakt (obere Phase) wird analysiert, die untere Phase wird verworfen.

B: Stufenweise Extraktion

Bei der stufenweisen Gewebeextraktion wurde das Gewebe (ca. 0,2 g Gewebe für die analytische Reinigung und ca. 1,6 g für die präparative Reinigung) zunächst ohne Zellaufschluss mit Extraktionspuffer inkubiert (siehe Abbildung 10). Dazu wurde das bei -80 °C gelagerte Gewebe zunächst angetaut und mit dem Skalpell in ca. 0,2 g schwere Stücke geschnitten. Diese wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß, welches Keramikugeln enthält, überführt und mit dem fünffachen Volumen (w/v) an Extraktionspuffer (siehe Tabelle 5) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde im Kühlraum auf dem Karussellschüttler (Mixing Rotor, Variotim/Variospeed, Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland) gedreht und danach bei $16000 \times g$ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

Der nach der Zentrifugation gebildete ÜS wurde mit Chloroform extrahiert (ÜS + Chloroform 1:1 (v/v); Zentrifugation bei $16000 \times g$ für 10 min bei 4 °C) und der wässrige Überstand (**E0**) anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Pellet, welches sich nach dem einstündigen Waschen mit Extraktionspuffer und anschließender Zentrifugation gebildet hatte, wurde im zweiten Schritt der stufenweisen Extraktion mit dem fünffachen Volumen (w/v) Extraktionspuffer versetzt und mittels Precellys (siehe oben, 3×10 sec, $6800 \times g$, 30 sec Pause) aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation ($16000 \times g$, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen (+ Chloroform 1:1 (v/v) \rightarrow Zentrifugation $16000 \times g$, 10 min, 4 °C \rightarrow Überstand -20 °C (**E1**)) und das Pellet im nächsten Schritt erneut extrahiert.

Dazu wurde das Pellet nun mit dem fünffachen Volumen (w/v) 1% Natriumdodecylsulfat (SDS) in Extraktionspuffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert ($16000 \times g$, 4 °C , 10 min). Der Überstand wurde abgenommen (+ Chloroform 1:1 (v/v) \rightarrow Zentrifugation $16000 \times g$, 10 min, 4 °C \rightarrow Überstand -20 °C (**E2**)) und das Pellet weiter extrahiert. Dieser

Extraktionsschritt (**E2**) wurde jedoch nicht bei allen stufenweisen Extraktionen durchgeführt (siehe Ergebnisteil); fehlt dieser Schritt, wurde das Pellet nach E1 direkt mit 1% SDS in Extraktionspuffer 30 min bei 50 °C inkubiert (siehe unten E3).

Das Pellet (nach E1 bzw. E2) wurde mit dem 2,5-fachen Volumen (w/v) 1% SDS in Extraktionspuffer für 30 min bei 50 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 16000 x g, 4 °C und 10 min. Der Überstand wurde abgenommen (+ Chloroform 1:1 (v/v) → Zentrifugation 16000 x g, 10 min, 4 °C → Überstand -20 °C (**E3**)) und das Pellet nochmals extrahiert.

Dazu wurde das Pellet nun für 5 min in 2,5-fachem Volumen (w/v) 1%igem SDS (in Extraktionspuffer) gekocht und anschließend zentrifugiert (16000 x g, 4 °C, 10 min). Das dabei entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt, für 10 min bei 16000 x g und bei 4 °C zentrifugiert und anschließend bei -20 °C gelagert (**E4**). E3 und E4 wurden für die Säulenläufe vereinigt. Bei der Analyse von Extrakten wurde zum Pellet ebenfalls das fünffache Volumen an Extraktionspuffer gegeben.

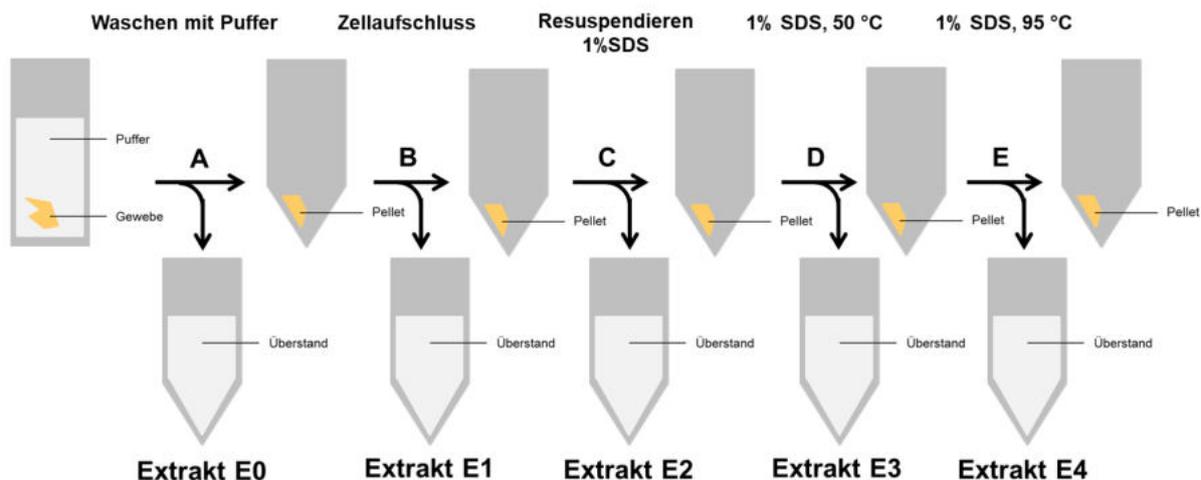


Abbildung 10: Stufenweise, wässrige Extraktion von Geweben. Das Gewebe wird zunächst im fünffachen Volumen an Puffer aufgenommen. **A:** Anschließend erfolgt die Inkubation des Gewebes bei 4 °C im Karussellschüttler für eine Stunde. Nach Zentrifugation der Probe erhält man Pellet und Überstand. Letzterer wird abschließend mit Chloroform gereinigt (E0), das Pellet wird weiter aufgeschlossen. **B:** Nach Zugabe von Puffer zum Pellet erfolgt der Zellaufschluss via Precellys und anschließender Zentrifugation. Der Überstand wird wieder mit Chloroform gereinigt (E1) und das Pellet weiter aufgeschlossen. **C:** Das Pellet wird in Extraktionspuffer mit 1% SDS resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand (E2) wird mit Chloroform gereinigt, das Pellet weiter extrahiert. **D:** Dazu wird es in 1% SDS gelöst und bei 50 °C für 30 min inkubiert. Nachfolgende Zentrifugation trennt den Überstand vom Pellet. Der ÜS wird wieder mit Chloroform gereinigt (E3), das Pellet nochmals aufgeschlossen. **E:** Dabei wird das Pellet nach Zugabe von 1%igem SDS 5 min gekocht. Nach Zentrifugation erhält man den Überstand E4, der wiederum vor Verwendung mittels Chloroform gereinigt wird.

4.2.1.2. TRIzol[®]-Extraktion

Die Extraktion von RNA mittels eines sauren Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Gemischs wurde erstmals von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) beschrieben. Für die Extraktion der Proteine mittels TRIzol[®]-Reagenz (ambion[®] by life

technologies™, Waltham, Massachusetts, USA) wurde nach Anleitung des Herstellers (siehe Abbildung 11) verfahren. Für die analytische Reinigung wurden ca. 0,1 g Gewebe, für die präparative Reinigung ca. 0,8 g Gewebe extrahiert. Zunächst wurde das gefrorene Gewebe angetaut, davon ca. 0,1 g mit dem Skalpell abgetrennt und in ein 2 mL Reaktionsgefäß, welches Keramikugeln enthält, überführt. Nach der Zugabe von 1 mL TRIzol® je 100 mg Gewebe wurde die Suspension für 10 sec in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend mittels Precellys homogenisiert (siehe Kapitel 4.2.1.1.). Danach erfolgte die Zentrifugation bei 12000 x g, 10 min, 4 °C (Hettich Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und mit 0,2 mL Chloroform versetzt. Nach 15 sec schütteln per Hand wurde nochmals 3 min bei RT inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 12000 x g für 15 min bei 4 °C. Es entstanden 3 Phasen (organische Phase, Interphase, wässrige Phase), von denen nur die organische und die Interphase für die Proteinextraktion weiter verwendet wurden. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 0,3 mL 100%igem EtOH und Inkubation bei RT für 3 min, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation bei 2000 x g, 5 min, 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 1,5 mL Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 x g, 10 min bei 4 °C. Das dabei gebildete Pellet wurde nun 3-mal mit je 2 mL Waschlösung (0,3 M Guanidiniumchlorid in 95% EtOH) gewaschen (Pellet + Waschlösung → 20 min RT → Zentrifugation 7500 x g, 5 min, 4 °C). Abschließend wurde das Pellet nun noch 1-mal mit 100%igem EtOH gewaschen und getrocknet. Zu dem Pellet wurden 500 µL 1%iges SDS in Extraktionspuffer (siehe Tabelle 5) gegeben und das Pellet durch schütteln für ca. 2 h bei 50 °C gelöst. Der Extrakt konnte anschließend analysiert werden.

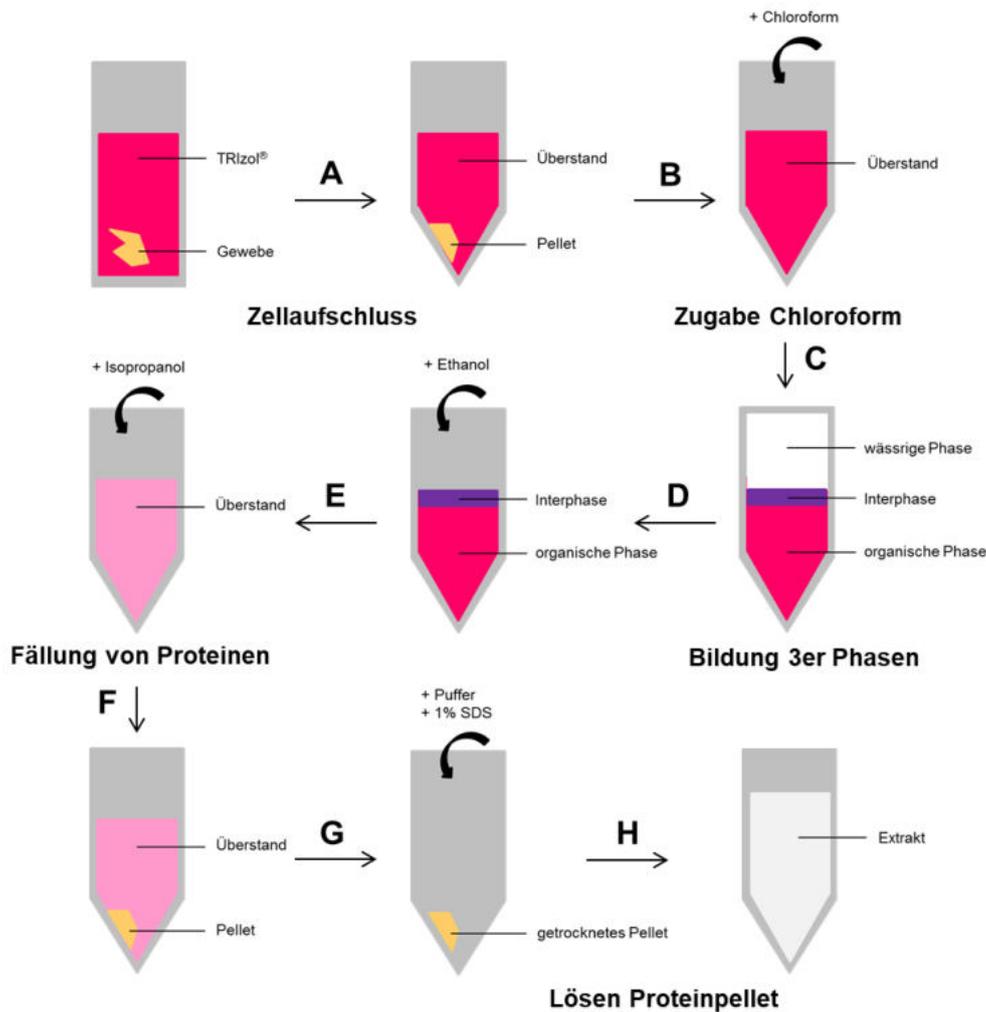


Abbildung 11: Gewebeextraktion mittels TRIzol®. Das Gewebe wird zunächst in TRIzol® aufgenommen. **A:** Der Zellaufschluss erfolgt mittels Precellys. Durch anschließende Zentrifugation entstehen Pellet und Überstand. **B:** Der Überstand wird abgenommen und mit Chloroform versetzt. **C:** Durch eine Zentrifugation entstehen drei verschiedene Phasen, wobei die wässrige Phase (RNA) nicht weiter verwendet wird. **D:** Die organische Phase und die Interphase werden mit Ethanol versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet (DNA) wird nicht weiter betrachtet. **E:** Der Überstand wird abgenommen und die Proteine mit Isopropanol gefällt. **F:** Nach der Fällung wird erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit Waschlösung und Ethanol gewaschen (**G**). **H:** Nach den Waschsritten wird das Pellet in 1%igem SDS bei 50 °C für 1-2h gelöst.

4.2.2. Proteinreinigung mittels Säulenchromatographie

Falls nicht anders angegeben, wurde der pH-Wert der Puffer für die Größenausschlusschromatographie (S-75HL, S-500) und Ionenaustausch-Chromatographie (ResQ) mit HCl auf pH 7.0 eingestellt. Die Säulenläufe wurden tlw. in Zusammenarbeit mit Herrn Jörn Heuer durchgeführt.

Tabelle 6: Lauf-und Bindepuffer für die Reinigung der Proteine über Gelfiltration und Ionenaustausch-Chromatographie.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Laufpuffer S-75HL	20 mM Tris/HCl, pH 7.0 30 mM NaCl 0,5 mM Benzamidin 0,1 mM Pefabloc SC 0,21 µM Leupeptin
Bindepuffer ResQ	20 mM Tris/HCl, 7.0 0,5 mM Benzamidin 0,1 mM Pefabloc SC 0,21 µM Leupeptin
Elutionspuffer ResQ	20 mM Tris/HCl, 7.0 1 M NaCl 0,5 mM Benzamidin 0,1 mM Pefabloc SC 0,21 µM Leupeptin

4.2.2.1 Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)

Bei der Gelfiltration können Moleküle nach ihrer Größe, Form und ihrem hydrodynamischen Radius voneinander getrennt werden. Die stationäre Phase der Säule bildet dabei eine spezielle Gelmatrix, in der Regel ein dreidimensionales Netzwerk aus polymeren organischen Verbindungen (z. B. Dextran), das mit hydrophilen Poren durchsetzt ist. Da große Moleküle schlechter in die Poren der Matrix eindringen können, als kleinere Moleküle, wandern sie schneller durch die Säule und eluieren dementsprechend eher. Das Elutionsvolumen eines Stoffes (Volumen an Lösemittel das nötig ist, um Moleküle von der Säule zu eluieren) ist also abhängig von dessen Molekülgröße (Berg et al. 2014).

Die Trennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte entweder über eine HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade-Säule (120 mL Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) oder über eine HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-500 HR-Säule (120 mL Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) mittels eines ÄKTA™-FPLC Systems (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) bzw. eines ÄKTA™Prime plus Systems (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.). Die Säule wurde zunächst mit zwei Säulenvolumen (SV) Elutionspuffer equilibriert und der Extrakt (ca. 5 mL) anschließend aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug dabei 1 mL/min (S-75HL) bzw. 0,5 mL/min (S-500). Eluiert wurde mit zwei SV Elutionspuffer, dabei wurden 2 mL Fraktionen gesammelt.

Das Elutionsprofil wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C bzw. -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.2.2. Ionenaustausch-Chromatographie

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie trägt das Säulenmaterial, also die stationäre Phase, kovalent gebundene, ionisierbare Gruppen. Bei der Anionenaustausch-Chromatographie sind positive Ladungen fixiert, bei der Kationenaustausch-Chromatographie negative Ladungen. Die Chromatographie verläuft in zwei Schritten. Zunächst binden Proteine an die geladenen Gruppen des Säulenmaterials und anschließend werden diese dann durch mobile Ionen des Elutionspuffers wieder verdrängt. Je stärker geladen dabei ein Protein ist, desto besser bindet es an das entgegengesetzt geladene Säulenmaterial. Die Bindung der Proteine an die Säule ist u. a. abhängig vom pH-Wert des Puffers. Liegt dieser pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins, bindet das Protein nur schwach an die Säule. Zum anderen ist die Bindung auch abhängig von der Salzkonzentration des Elutionspuffers. Bei geringer Salzkonzentration werden zunächst nur die schwach gebundenen Proteine von der Säule eluiert, bei hoher Salzkonzentration auch die fester gebundenen Proteine (Berg et al. 2014).

Es wurden entweder Extrakte (ca. 5 mL) oder Fraktionen nach S-75HL (Identifikation der TFF2-positiven Fraktionen mittels Western Blot) über eine RESOURCE™ Q6-Säule (Anionenaustauschsäule, 6 mL Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) mit Hilfe des ÄKTA™-FPLC Systems (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) gereinigt. Die Säule wurde zunächst mit drei SV Bindepuffer equilibriert, die Probe dann bei 0% Elutionspuffer und 100% Bindepuffer (siehe Tabelle 6) injiziert. Dann wurde zunächst über eine Länge von 1,5 SV der Anteil des Elutionspuffers auf 5% erhöht. Im zweiten Schritt wurde der Anteil an Elutionspuffer über vier SV auf 100% erhöht (linearer Gradient). Abschließend wurde dann mit fünf SV Elutionspuffer nachgespült. Die Fließgeschwindigkeit betrug 4 mL/min und es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1 mL gesammelt. Das Elutionsprofil wurde konstant durch Absorptionsmessungen bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen wurden bis zur weiteren Analyse bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

4.2.2.3. Entsalzung der gereinigten Proteinproben mittels PD-10-Säulen

Die Entsalzung der gereinigten Proteinproben, als Vorbereitung für proteomanalytische Untersuchungen, erfolgte über GE Healthcare Life Sciences™ PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K) nach Herstellerangaben. Diese sind mit einem Sephadex™ G-25 Medium gepackt. Durch die Reinigung mittels PD-10-Säulen können Proteine und Salze voneinander getrennt werden.

Zunächst wurde die Säule mit 25 mL Equilibrierungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.0) oder deion. Wasser gespült und anschließend max. 2,5 mL der gereinigten Proteinfraction

aufgetragen. Die Elution erfolgte ebenfalls mit Equilibrierungspuffer bzw. deion. Wasser. Es wurden ca. 14 Fraktionen zu je 1 mL gesammelt und die TFF2-positiven Fraktionen (Überprüfung mittels Western Blot) vereinigt und konzentriert (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

4.2.3. Gelelektrophorese

4.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese (AgGE)

Tabelle 7: Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Laufpuffer	40 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,1% (w/v) SDS
4 x Probenpuffer	40 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA 0,1% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 1 Spatelspitze (Sp) Bromphenolblau

Um hochmolekulare Proteine unter nativen Bedingungen (nicht-denaturierend und nicht-reduzierend) zu trennen, wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese (AgGE) durchgeführt. Agarosegele eignen sich ideal zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 500 kDa (Lottspeich and Zorbas 1998). Es wurde zunächst ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 2,5 g peqGOLD MegaBase Agarose (peqlab, Erlangen, Deutschland) in 250 mL Laufpuffer vorsichtig in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg, Deutschland) erwärmt und gelöst. Die heiße Gelmischung wurde durch Schütteln auf einem Taumelschüttler (Heidolph Polymax 1040, Carl Roth GmbH & CO KG, Karlsruhe, Deutschland) bei RT auf ca. 40 °C abgekühlt und anschließend in die Gelkammer gegossen (Horizontale Kammer W7, Biodeal Handelsvertretung Edelmann e.K., Markkleeberg, Deutschland). Das polymerisierte Gel wurde mit Laufpuffer überschichtet und anschließend die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Proben wurden zuvor mit Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 7) im Verhältnis 3:1 gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung (Netzgerät von Heinzinger Economy Line LNG 35006, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) von 40 V über 4 h. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der getrennten Proteine mittels Kapillarblot auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0.1 µm NC, GE Healthcare Life science, Buckinghamshire, England).

4.2.3.2. SDS –Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 8: Puffer für die SDS-PAGE

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Laufpuffer nach (Laemmli 1970)	25 mM Tris/HCl, pH 8.5 190 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8 0,4% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl, pH 6.8
4 x reduzierender Probenpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 6.8 0,8% (w/v) SDS 5% (w/v) β -Mercaptoethanol 39% (w/v) Glycerin 1 Sp Bromphenolblau
4 x nicht-reduzierender Probenpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 6.8 0,8% (w/v) SDS 39% (w/v) Glycerin 1 Sp Bromphenolblau

Die SDS-PAGE dient der analytischen Trennung von Proteinen bzw. Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli 1970). Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch SDS überlagert und die Proteine erhalten eine konstante negative Ladungsverteilung. Somit werden die Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis, in dem längere Proteine stärker zurückgehalten werden als kürzere Proteine. Zunächst durchlaufen die Proteine dabei ein Sammelgel (neutraler pH-Wert) und werden dort konzentriert, bevor sie im Trenngel mit basischem pH-Wert getrennt werden.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Trenngels und des Sammelgels für die 15%ige SDS-PAGE

	Trenngel (15%)	Sammelgel (6%)
Trenngelpuffer	10 mL	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 mL
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	20 mL	2,5 mL
20% SDS	-	100 μ L
H ₂ O	ad. 50 mL	ad. 12,2 mL
10% Ammoniumpersulfat (APS)	120 μ L	100 μ L
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	56 μ L	10 μ L

Für die Analyse der TFF-Peptide wurde eine Kombination aus 15%igem Trenngel und 6%igem Sammelgel verwendet. Für die Herstellung von vier 15%igen SDS-Gelen wurde zunächst die Trenngelmischung nach oben aufgeführter Zusammensetzung (Tabelle 9) pipettiert (zunächst ohne APS und TEMED). Aus dieser Mischung wurde 2x 1 mL entnommen und mit je 10 μ L 10% APS und 5 μ L TEMED versetzt. In jede Gelgießvorrichtung (*Mini-PROTEAN[®] Tetra System*, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, U.S.A) wurde von diesem sogenannten Fußgel nun 480 μ L gegossen. Das Fußgel ist nach ca. 5 min polymerisiert und verhindert ein Auslaufen der Trenngele. Danach wurden zu der restlichen Trenngelmischung ebenfalls 10% APS und TEMED zugegeben (siehe Tabelle 9) und dadurch die Polymerisation eingeleitet. Die Trenngele wurden auf die Fußgele in die Gelgießvorrichtung gegossen und mit einem Wasser/Isopropanolgemisch (1:1) überschichtet. Dies führte zur Bildung einer geraden Abschlusskante ohne Luftblasen. Nachdem die Trenngele vollständig polymerisiert waren, wurde das Wasser/Isopropanolgemisch sorgfältig entfernt. Nun wurde die Sammelgelmischung, wie in Tabelle 9 beschrieben, angesetzt und diese dann auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurden die Kämme für die Geltaschen in das Sammelgel eingesteckt. Auch hier wurde die Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED eingeleitet. Die Gele wurden bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel im Verhältnis 3:1 mit 4 x Probenpuffer (reduzierend bzw. nicht-reduzierend) versetzt und für 5 min gekocht. Dadurch wurde die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken denaturiert. Das β -Mercaptoethanol im reduzierenden Probenpuffer führte zudem zu einer Aufspaltung der Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten.

Die Elektrophorese der Gele erfolgte in einer *Mini-PROTEAN[®] Tetra System* Gelelektrophoresekammer von Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, U.S.A) mit SDS-Laufpuffer (Laemmli 1970) bei RT zunächst bei 70 V (Netzgerät von Heinzinger Economy Line LNG 35006, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Anschließend wurde die Spannung auf 100 V erhöht und die Elektrophorese so lange durchgeführt, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Als Molekulargewichtsmarker diente der *Unstained Protein Molecular Weight* Marker (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), mit in folgender Tabelle aufgelisteten molekularen Größenstandards.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Größenmarkers für die SDS-PAGE

MW [kDa]	Protein	Quelle
116.0	β -Galaktosidase	<i>E.coli</i>
66.2	Serumalbumin	Rinderblut
45.0	Ovalbumin	Hühnereiweiß
35.0	Laktat-Dehydrogenase	Schweinemuskel
25.0	REase Bsp98I	<i>E.coli</i>
18.4	β -Laktoglobulin	Kuhmilch
14.4	Lysozym	Hühnereiweiß

Die SDS-Gele wurden nun entweder mittels Western Blot analysiert (siehe 4.2.4.), mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 4.2.8.) oder einer Silberfärbung (siehe 4.2.7.) unterzogen.

4.2.4. Western Blot

Tabelle 11: Auflistung der Puffer und Lösungen für die Western Blot-Analyse

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Transferpuffer Elektroblob	48 mM Tris/HCl, pH 8.8 39 mM Glycin 23 mM SDS 20% (v/v) Methanol
Transferpuffer Kapillarblob	0,6 M NaCl 0,06 M Tri-Natriumcitrat
Ponceau-Färbelösung	2,97 mM Ponceau S 0,18 M Trichloressigsäure
Puffer zur Nachreduktion	10 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl 1% β -Mercaptoethanol
Fixierlösung	10 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl 0,2% Glutaraldehyd
Waschpuffer TBS-T	20 mM Tris/HCl, pH 7.2 150 mM NaCl 0,1% Tween 20
Waschpuffer PBS-T	10 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl 0,1% Tween 20
Blockierung	20 mM Tris/HCl, pH 7.2

	150 mM NaCl 0,1% Tween 20 1% BSA 1% Trockenmilch
ECL-Lösung 1	2,5 mM Luminol 0,4 mM p-Cumarsäure 100 mM Tris/HCl, pH 8.5
ECL-Lösung 2	0,02% (w/v) Wasserstoffperoxid 100 mM Tris/HCl, pH 8.5

4.2.4.1. Elektrolot und Kapillarlot

Die Methode des Western Blot wurde 1979 von Towbin (Towbin et al. 1979) und Renard (Renart et al. 1979) eingeführt (Lottspeich and Zorbas 1998). Dabei erfolgt der Proteintransfer von einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran mit anschließender Immundetektion der Proteine.

Der Transfer der Proteine nach SDS-PAGE erfolgte mittels Elektrolot, der Transfer nach AgGE mittels Kapillarlot. Der Aufbau der beiden verschiedenen Blotting-Methoden ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0.1 µm NC, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England) übertragen und durch anschließende Fixierung immobilisiert. Für den Elektrolot wurde ein 20 x 20 cm Semi-Dry-Blotter (biostep® GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) verwendet. Das Gel und die Membran liegen zwischen puffergetränkten Filterpapieren und die SDS-Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld von der Kathode (rostfreier Edelstahl) zur Anode (beschichtetes Titan). Die Proteinkomplexe binden dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran.

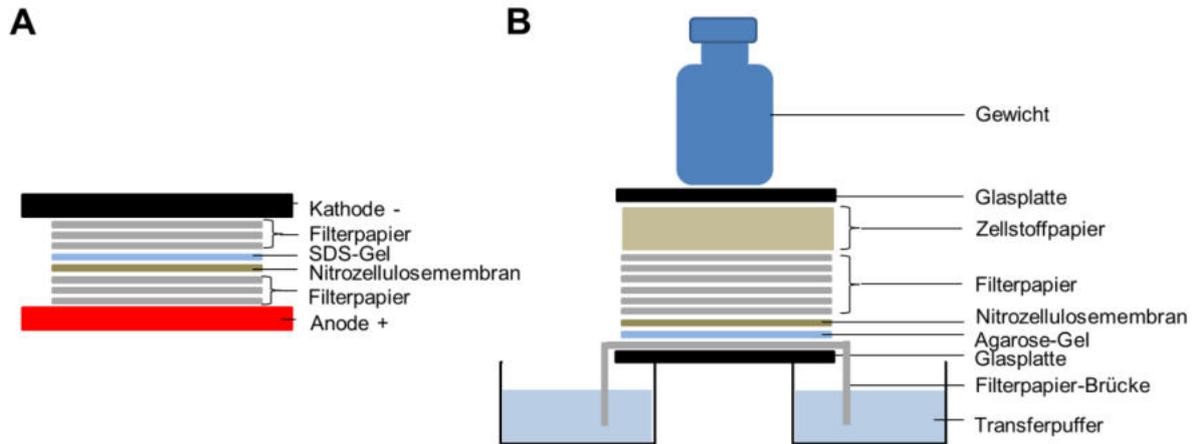


Abbildung 12: Aufbau von Elektrobplot und Kapillarblot. A: Aufbau des Elektrobplots: Auf die Anode werden drei in Puffer getränkte Filterpapiere gelegt. Es folgt die ebenfalls in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran und das SDS-Gel. Den Abschluss zur Kathode bilden wiederum drei in Puffer getränkte Filterpapiere. **B: Aufbau des Kapillarblots:** Eine Brücke aus Filterpapier wird auf eine Glasscheibe aufgelegt, die zwei mit Transferpuffer befüllte Gefäße verbindet. Die Enden der Brücke reichen in den Transferpuffer der Gefäße. Es folgt das Agarosegel und die in Puffer getränkte Nitrozellulosemembran. Nach sechs trockenen Filterpapieren folgt eine Schicht aus Zellstoffpapier. Eine zweite Glasplatte bildet den Abschluss. Als Gewicht zur Beschwerung dient eine 2 L Flasche.

Der Aufbau des Elektrobplots wird in Abbildung 12A beschrieben. Das in Puffer getränkte SDS-Gel wird dabei zwischen Kathode und Anode der Blotvorrichtung gelegt. Dabei liegt das Gel zwischen Transferpuffer getränktem Filterpapier (Gel- Blotting- Papier BF2, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Auf der Seite der Anode, wird zwischen Filterpapier und Gel noch eine Nitrozellulosemembran gelegt (Amersham™ Protran™ 0.1 µm NC, GE Healthcare Life science, Buckinghamshire, England). Handelte es sich um nicht-reduzierende SDS-Gele, wurden diese zuvor mit ca. 50 °C warmen 1%igem β-Mercaptoethanol in 1 x PBS-T reduziert und danach erst auf die Membran aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte für 70 min bei 0,8 mA/cm². Die Membranen wurden nach dem Blot für 5 min mit Ponceau S-Lösung behandelt, um die Übertragungseffizienz zu kontrollieren und die Proteinmarkerbanden zu kennzeichnen.

Der Kapillarblot der Agarosegele erfolgte über Nacht. Der Aufbau ist ebenfalls in Abbildung 12 dargestellt. Das Agarosegel wird zwischen die in Transferpuffer getränkte Filterpapier-Brücke und einem Stapel an 6 Filterpapieren aufgelegt. Die Nitrozellulosemembran (siehe oben) liegt beim Blot zwischen dem Agarosegel und dem Filterpapierstapel. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte ÜN bei RT.

4.2.4.2. Immundetektion mit spezifischen Antikörpern

Die Identifikation der elektrophoretisch getrennten Proteine erfolgte über einen immunologischen Nachweis mittels spezifischer Antikörperreaktion. Dabei bindet zunächst ein antigenspezifischer Primärantikörper an das entsprechende Epitop des Proteins. Im zweiten Schritt bindet der enzymgekoppelte Sekundärantikörper an die Fc-Region des

primären Antikörpers (AK) und ermöglicht eine visualisierende Detektion durch ECL-Reaktion (*enhanced chemiluminescence*). Dabei wird durch die Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*), welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert (siehe Abbildung 13). Die HRP katalysiert die Reaktion von alkalischer Luminollösung mit Wasserstoffperoxid zum Aminophthalat-Dianion, wobei Licht mit einer Wellenlänge von rund 428 nm emittiert wird. Diese Wellenlänge kann mit einer CCD (*charge-coupled device*) Kamera detektiert werden.

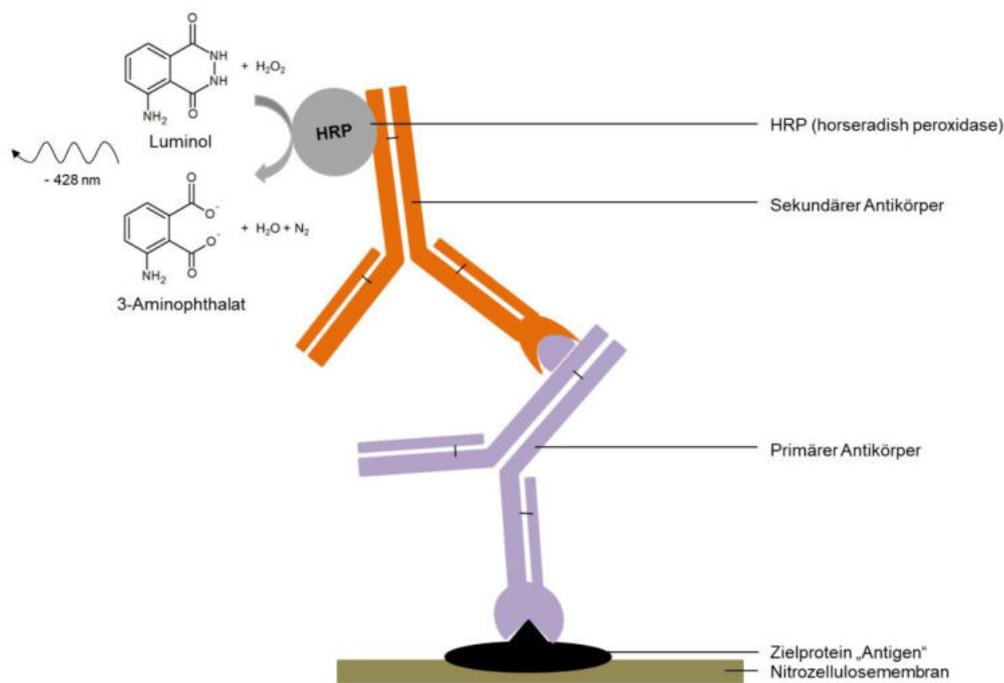


Abbildung 13: Immundetektion der Proteine nach Elektro- oder Kapillarblot. Das Protein befindet sich nach dem Blot auf der Nitrozellulosemembran. Der primäre Antikörper erkennt die Zielsequenz des Proteins und bindet an selbige. Der sekundäre Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers. An den sekundären Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Abbildung nach <https://www.bosterbio.com/enhanced-chemiluminescent-reagent-kit-rabbit-igg-for-western-blotting-ek1002-boster.html>

Die durch Elektro- oder Kapillarblot auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden zunächst durch Behandlung mit Fixierlösung (30 min, RT) auf der Membran fixiert. Bei den Membranen nach Kapillarblot erfolgte eine Reduktion mit 1% β -Mercaptoethanol in 1 x PBS-T für 10 min nach der Fixierung. Anschließend wurde die Membran 2-mal 5 Minuten mit 1 x PBS-T gewaschen und 1-mal fünf Minuten mit 1 X TBS-T. Nach dem Waschen mit 1 x TBS-T erfolgte die Blockierung möglicher unspezifischer Bindestellen auf der Membran mittels Blockierlösung für 1 h. Die Inkubation mittels Primärantikörper (siehe Tabelle 3) in 10 mL TBS-T erfolgte bei 4 °C üN. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut gewaschen (3-mal fünf Minuten in 1 x TBS-T) und danach mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) in 10 mL 1 x TBS-T inkubiert. Vor der ECL-Färbung wurde die Membran

abschließend 2-mal 10 min mit 1 x TBS-T gewaschen. Für die ECL-Färbung wurden pro Membran 2,5 mL ECL-Lösung 1 mit 2,5 mL ECL-Lösung 2 gemischt und für 2 min auf die Membran gegeben. Die nun lichtemittierenden Proteinbanden wurden mit dem Geldokumentationsgerät GeneGnome (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) visualisiert (Expositionszeit von 5-mal 2 Minuten). Die semiquantitative Auswertung der Western Blots erfolgte mit Hilfe der GeneTools Gel-Analyse Software (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) bzw. mit dem Programm ImageJ. Dabei wurde die Bandenintensität der untersuchten Fraktionen in Bezug auf eine Referenzprobe oder durch doppelte Überlappung im Gel ermittelt und anschließend graphisch dargestellt.

4.2.4.3. Lektinfärbung

Tabelle 12: Lösungen für die Lektinfärbung. Gelöst wurde die Gelatine in 1 x TBS-T.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Blockierung	2% (w/v) Gelatine
Waschlösung	1% (w/v) Gelatine

Für den Nachweis von MUC6 wurde das Lektin GSAll verwendet. Dieses bindet an α - und β -N-Acetylglucosamin des Muzins. GSAll selbst ist biotinyliert und kann über eine Streptavidin-Peroxidase (bindet an Biotintag des GSAll) sichtbar gemacht werden. Dabei katalysiert die Peroxidase des Streptavidins in der ECL-Reaktion die oben beschriebene Umsetzung von Luminol zu 3-Aminophthalat.

Die Membranen nach Kapillarblot oder Elektrobplot (siehe 4.2.4.1.) wurden zunächst in Blockierlösung (siehe Tabelle 12) für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Lektin (siehe Tabelle 4), gelöst in Waschlösung, für 30 min bei RT inkubiert. Danach folgten mehrere Waschschrte (2-mal 10 min 1 x TBS-T, 2-mal 10 min Waschlösung) und die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase (Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz, 1:2500 in Waschlösung). Nach erneuten Waschschrten (4-mal 10 min 1 x TBS-T) erfolgte die ECL-Färbung wie oben (siehe 4.2.4.2.) beschrieben.

4.2.5. Kompetitive Inhibition

Die kompetitive Inhibition wird genutzt, um die spezifische Bindung des Antikörpers zu überprüfen und artifizielle Bindungen auszuschließen. Dazu wird der primäre AK über Nacht mit dem synthetischen Peptid (enthält die Zielsequenz für den Antikörper) inkubiert und dadurch die Bindestelle des primären Antikörpers blockiert. Dieser kann dadurch nicht mehr an das Peptid mit dieser Zielsequenz auf der Membran binden. Der Nachweis mittels ECL auf der Membran ist an dieser Stelle folglich stark abgeschwächt oder negativ.

Über Nacht wurden 40 μ g des synthetischen Peptids mit 10 μ L (bei 1:1000 Verdünnung des AK) des entsprechenden affinitätsgereinigten primären Antikörpers in 10 mL 1 x TBS-T

inkubiert (4 °C, Karussellschüttler, siehe Tabelle 13). Der Ansatz wurde am nächsten Tag entsprechend des Protokolls für den Western Blot (siehe 4.2.4.) als primärer Antikörper eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne synthetisches Peptid.

Tabelle 13: Antigensequenz kompetitive Inhibition.

Antiserum	Antigen
a-hTFF2-2	FFPNSVEDCHY gekoppelt an KLH mit GA
a-hTFF3-8	FKPLQEAECTF gekoppelt an KLH mit GA

4.2.6. „Stripping“ der Nitrozellulosemembran nach Immundetektion mit spez. Antikörper

Tabelle 14: Puffer und Lösungen für das „Stripping“ der Nitrozellulosemembran

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Stripping-Puffer	1,6% SDS (w/v) 62,5 mM Tris/HCl, pH 6.8 0,7% β -Mercaptoethanol

Um den primären und sekundären Antikörper nach Immundetektion von der Nitrozellulosemembran zu entfernen und diese erneut mit einem Antikörper gegen ein anderes Antigen nachzuweisen, erfolgte ein sogenanntes „Stripping“ der Membran.

Dazu wurde die Membran nach der ECL-Reaktion (siehe 4.2.4.2.) zunächst an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Stripping Puffer im Brutschrank (innova™4200, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, U.S.A.) bei ca. 50 °C inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal 5 min mit deion. Wasser gewaschen und 3-mal 5 min mit 1 x TBS-T (siehe Tabelle 11). Die Membran wurde nun wie in Kapitel 4.2.4.2. beschrieben (ab Blockierung) weiter behandelt.

4.2.7. Silberfärbung

Tabelle 15: Puffer und Lösungen für die Silberfärbung der SDS-Gele

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Färbelösung	0,2% (w/v) Silbernitrat 0,02% (v/v) Formaldehyd (37%)
Fixierlösung	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) konz. Essigsäure
Sensibilisierung	0,02% (w/v) Natriumthiosulfat
Entwicklung	3% (w/v) Natriumcarbonat 0,0005% Natriumthiosulfat 0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)
Waschlösung	30% (v/v) Ethanol

Um die aufgetrennten Proteinbanden nach SDS-PAGE zu visualisieren und einen Überblick über die Reinheit der einzelnen Proben zu erhalten, wurde die Silberfärbung (Nachweisgrenze 0,1-1 ng) eingesetzt (Blum et al. 1987). Zunächst wurden die Proteine nach der SDS-Gelelektrophorese mit Fixierlösung (siehe Tabelle 15) im Gel fixiert (1 h, RT). Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit Waschlösung (siehe Tabelle 15) und ein Waschschriff mit deionisiertem Wasser (je 20 min). Danach wurden die Gele mit Sensibilisierungslösung (siehe Tabelle 15) 1 min inkubiert, 3-mal 20 sec mit deion. Wasser gewaschen und schließlich mit Färbelösung (siehe Tabelle 15) behandelt (20 min, RT). Die Ag^+ -Ionen bilden dabei Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Nach erneuten Waschschriffen mit deion. Wasser (3-mal 20 sec) wurde die Entwicklungslösung (siehe Tabelle 15) zugegeben. Dabei werden durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd die Komplexe zu elementarem Silber reduziert. Dies wird als dunkle Färbung im Gel sichtbar. Die Entwicklung dauerte ca. 10 Minuten und wurde durch Zugabe von Fixierungslösung (5 min) abgestoppt. Alle Lösungen (außer Fixierlösung und Waschlösung) wurden vor der Silberfärbung frisch angesetzt. Die Dokumentation der Silbergele erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Scanners.

4.2.8. Coomassie- Brillantblau-Färbung

Bei Coomassie-Brillantblau handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff. Dieser bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine. Es kommt durch Wechselwirkungen, vor allem mit Arg-Resten der Proteine, zur Komplexbildung. Das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillantblau verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm (Lottspeich and Zorbas 1998). Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei ca. 100 ng/Bande und ist damit wesentlich unempfindlicher als die Silberfärbung (Kang et al. 2002). Verwendet wird sie zur Visualisierung aufgetrennter Proteinbanden, die zur massenspektrometrischen Analyse verwendet werden.

Die Proben für SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wurden vor dem Gellauf konzentriert (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Nach dem Gellauf wurde das Gel dann zunächst 3-mal mit deion. Wasser gewaschen und anschließend für eine Stunde mit einer gebrauchsfertigen Coomassie-Lösung (Bio-Safe Coomassie G250, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel erneut mit deion. Wasser gewaschen. Die Dokumentation der Coomassiegele erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Scanners.

4.2.9. PAS-Reaktion

Tabelle 16: Puffer und Lösungen für die PAS-Färbung

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Lösung 1	1% (w/v) H_5IO_6 3% (v/v) Eisessig
Lösung 2	0,1% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1 mM HCl

Bei der PAS-Reaktion (*periodic acid-Schiff reaction*) kommt es zur Färbung von Oligosacchariden wie Glykogen, Cellulose, Glykoproteinen sowie Glykolipiden. Durch die Periodsäure werden zunächst freie Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese können dann mit dem im Schiff-Reagenz enthaltenen schwefelsauren Fuchsin magentafarbene Komplexe bilden (Mantle and Allen 1978).

5 μL der zu untersuchenden Probe wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™Protran™0.1 μm NC, GE Healthcare Life science, Buckinghamshire, England) aufgetragen. Die Membran wurde für ca. 30 min getrocknet und anschließend 3-mal 2 min mit deion. Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 30 min mit Lösung 1 (siehe Tabelle 16) inkubiert und danach 2-mal 2 min mit Lösung 2 (siehe Tabelle 16) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Schiff-Reagenz (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) für 15 min. Danach wurde die Membran 2-mal 3 min mit Lösung 2 gewaschen und abschließend getrocknet. Die Dokumentation der Membranen erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Scanners. Die semiquantitative Auswertung der Dot Blots erfolgte mit Hilfe der GeneTools Gel-Analyse Software (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) bzw. mit dem Programm ImageJ.

4.2.10 Bindungsstudien mit ^{125}I -TFF2

Die Iodierung der Peptide und Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Peptid wurden von Hr. R. Stürmer durchgeführt.

4.2.10.1. Iodierung mit Iodogen

Tabelle 17: Puffer und Lösungen für die Iodierung mit Iodogen. Puffer 1 wurde auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt.

Puffer/ Lösungen	Zusammensetzung
Stammlösung (SL) 1	0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
SL 2	0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
Puffer 1	193,5 mL SL 2 56,5 mL SL 1
Puffer 2	100 mL Puffer 1 0,1% NaN_3

Um die Wechselwirkung von TFF2 an Muzine zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit rekombinanten (glyc und non-glyc) bzw. porcinem ^{125}I -TFF2 durchgeführt. Das ^{125}I wird dabei über elektrophile Addition an Tyrosinreste und Histidinreste des Peptids gekoppelt. Der radioaktive Zerfall des ^{125}I setzt dabei Energie frei (γ -Strahlung, $\gamma = 35 \text{ keV}$), die gemessen werden kann (Lottspeich and Engels 2009). Im ersten Schritt der Iodierung reagiert Iodogen als Oxidationsmittel und so wird aktiviertes $^{125}\text{I}^+$ gebildet. Dieses bindet dann im zweiten Schritt an die Histidinreste oder Tyrosinreste der Proteine (siehe Abbildung 14).

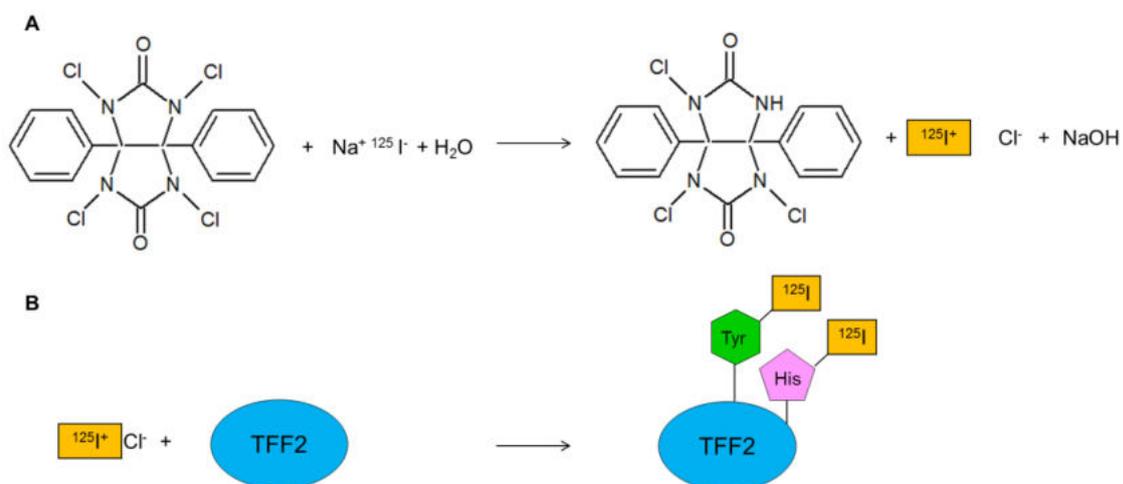


Abbildung 14: Iodierung von TFF2. **A:** Zunächst reagiert Iodogen mit Na^{125}I und wirkt dabei als Oxidationsmittel. Es wird aktiviertes $^{125}\text{I}^+$ gebildet. **B:** $^{125}\text{I}^+$ kann in einem weiteren Schritt an die Tyrosin und/oder Histidinreste von TFF2 binden. Das ^{125}I -TFF2 kann nun für diverse Bindungsstudien genutzt werden.

Zunächst wurden 5 mg Iodogen (1,3,4,6-Tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycouril, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) in 25 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 20 μ L dieser Iodogenlösung in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Dichlormethan mit einer Wasserstrahlpumpe und einer dünnen Pasteurpipette als Gas abgesaugt. Das TFF2-Peptid wurde in einer Konzentration von 1 μ g/ μ L eingesetzt (gelöst in Puffer 1). 6 μ L dieser Peptidlösung wurden nun in das mit Iodogen beschichtete Reaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurden 5 μ L Na¹²⁵I (Konzentration: 3700MBq/mL (100 mCi)/mL), Spezifische Aktivität: 74TBq/mmol (2000Ci/mmol), I-RB-31, Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) dazu pipettiert. Das Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert und danach in ein neues Reaktionsgefäß (ohne Iodogen) überführt. Der Ansatz wurde für weitere 40 min auf Eis inkubiert und abschließend über eine Sephadex® G10-Säule gereinigt. Die Säule wurde bereits am Vortag präpariert. Dazu wurden 1,2 g Sephadex® G10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) in 7 mL Puffer 2 (siehe Tabelle 17) gemischt und über Nacht bei RT quellen gelassen. Das Säulenmaterial wurde in eine leere Poly-Prep®-Säule (10 mL, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, U.S.A.) gefüllt und 3-mal mit 2 mL Puffer 2 gewaschen. Der gesamte Iodierungsansatz wurde nun auf die Sephadex® G10-Säule gegeben und mit Puffer 2 eluiert. Es wurden dabei 24 Fraktionen gesammelt (Fraktion 1-16 je 3 Tropfen, Fraktionen 17-24 je 6 Tropfen). Die Aktivität der Proben wurde im Hidex Scintillations Counter (Hidex 300 SL Automatic liquid Scintillations counter, Hidex; Turku, Finnland) gemessen (2 μ L Probe in 10 μ L Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® eco plus, LSC-Universalcocktail, Roth, Karlsruhe, Deutschland)), die Fraktionen mit der größten Aktivität (cpm) im Bereich, in dem TFF2 eluiert, vereinigt und bei 4 °C im Bleigefäß aufbewahrt.

4.2.10.2. Hybridisierung mit ¹²⁵I-TFF2

Tabelle 18: Puffer für die Hybridisierung mit ¹²⁵I-TFF2. Angegeben ist die Zusammensetzung des Basispuffers. Bei verschiedenen Experimenten (siehe Ergebnisteil) wurde der Puffer leicht verändert (z. B. Erhöhung Ca²⁺-Konzentration, Zugabe von EDTA). Bei Änderung des pH-Werts (pH 2.0 bzw. pH 4.0) wurde auf verd. HCl (pH 2.0) bzw. den Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (pH 4.0, (T. C. McIlvaine 1921)) zurückgegriffen (+ Zusatz von 0,5 M NaCl und 2,5 mM CaCl₂).

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Hybridisierungspuffer Basis	20 mM Tris/HCl, pH 7.0 0,5 M NaCl 2,5 mM CaCl ₂

Zunächst wurden die zu hybridisierenden Membranen nach Elektroblob bzw. Kapillarblob (siehe 4.2.4.1.) für 1 h bei RT in Blockierungslösung blockiert (siehe Tabelle 11). Anschließend wurde die Membran 3-mal 5 min in 1 x TBS-T gewaschen. Nun folgte die

Hybridisierung mit ^{125}I -TFF2 (ca. 10000 cpm/10 mL Hybridisierungspuffer, entspricht einer Konzentration von etwa 5 pg/ μL) für 4-5 Stunden bei RT. Dabei erfolgte die Hybridisierung in oben beschriebenem Puffer. Bei einigen Experimenten wurden der pH-Wert des Puffers (pH 2.0: verd. HCl, 0,5 M NaCl, 2,5 mM CaCl_2 ; pH 4.0: Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine, 0,5 M NaCl, 2,5 mM CaCl_2) bzw. die Ca^{2+} -Konzentration (2,5 mM, 10 mM bzw. ohne Ca^{2+}) variiert. Auch Hybridisierungen in Gegenwart der Zucker α - bzw. β -Methylgalaktosid und nach Inkubation der Membran mit GSAII bzw. HIK1083 wurden durchgeführt. Die Membran wurde nach der Hybridisierung wieder 3-mal 5 min mit 1 x TBS-T gewaschen und getrocknet. Die getrocknete Blotmembran wurde zwischen zwei Klarsichtfolien in die Filmkassette gelegt und mit einem Klebestreifen fixiert. In der Dunkelkammer wurde dann der Carestream[®] Kodak[®] BioMax[®] MS Film (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) auf die Blotmembran aufgelegt und die geschlossene Filmkassette bei -80 °C gelagert. Die Exposition erfolgte in der Regel über Nacht bei -80 °C. Nach der Exposition wurde der Film in der Dunkelkammer zunächst ca. 1 min in der Entwicklungslösung (Carestream[®] Kodak[®] autoradiography GBX developer, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) geschwenkt und nach einem Waschschrift mit deion. Wasser für eine Minute fixiert (Carestream[®] Kodak[®] autoradiographie GBX fixer, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A). Der Film wurde nach der Fixierung gründlich mit Wasser gewaschen und konnte anschließend ausgewertet werden. Die Dokumentation des Films erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Scanners. Zur Auswertung wurde das Computerprogramm ImageJ verwendet.

4.2.11. N-Glycosidase F-Verdau

Tabelle 19: Puffer und Lösungen für den N-Glycosidase-F-Verdau

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Puffer Verdau	0,5 M Na_2HPO_4 , pH 7.0

N-Glycosidase F ist ein Enzym, welches N-glykosidisch gebundene Zucker von Glykoproteinen trennt. Dabei wird die Oligosaccharidkette zwischen dem GlcNAc- Rest und dem Asparaginrest des Proteins gespalten (Tarentino et al. 1985).

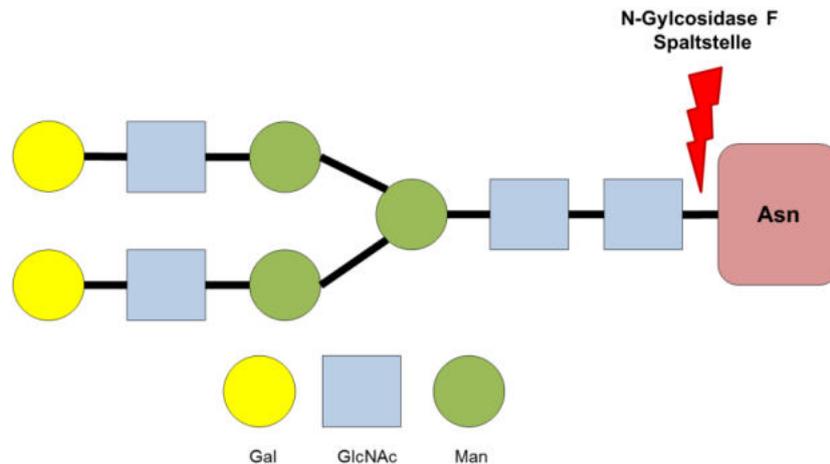


Abbildung 15: Spaltstelle der N-Glycosidase F. Das Enzym N-Glycosidase F spaltet N-glykosidisch gebundene Zuckerreste von Proteinen. Die Spaltung erfolgt zwischen einem GlcNAc -Rest der Zuckerkette und dem Asn des Proteins. Das pH-Optimum liegt bei einem pH von 7.0.

Die Proteinprobe (20 µL) wurde zunächst mit 95 µL deion. Wasser und 1% β-Mercaptoethanol gemischt, 3 Minuten gekocht und anschließend direkt auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Ansatz mit N-Glycosidase F üN bei 37 °C inkubiert. Dafür wurden zuvor 20 µL N-Glycosidase F (rekombinant aus *E.coli*, Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz, 250 units) in 15 µL des in Tabelle 19 angegebenen Puffer gelöst und anschließend zum Ansatz gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Acetonfällung des Ansatzes. Dazu wurde 600 µL, -20 °C kaltes Aceton zum Ansatz gegeben. Dieser wurde nun bei -20 °C für 1 h inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 16000 x g für 15 min bei 4 °C. Nach der Zentrifugation wurde das Aceton vorsichtig abgegossen und das Pellet bei RT getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in reduzierendem Probenpuffer (Tabelle 8) aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst (10 min). Die Probe wurde anschließend über SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe 4.2.3. bzw 4.2.4.).

4.2.12. Proteinase K-Verdau

Tabelle 20: Puffer und Lösungen für den Proteinase K-Verdau

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Puffer Verdau	20 mM Tris/HCl, pH 7.4 1 mM CaCl ₂

Proteinase K ist ein Enzym (isoliert aus dem Schlauchpilz *Engyodontium album*), welches unspezifisch Peptidbindungen spaltet. Das Enzym wird dabei als Endopeptidase und als Exopeptidase wirksam (Hilz et al. 1975). Werden Muzine mit Proteinase K behandelt, so werden vermutlich die C- bzw. N-Termini der Glykoproteine abgebaut, das O-glykosylierte Muzinrückgrat sollte in der Regel jedoch erhalten bleiben (Johansson et al. 2013). Ein

Bindepertner, der über Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Muzin interagiert, kann also nach dem Proteinase K-Verdau nicht mehr binden. Erfolgt die Bindung jedoch über die Zuckerketten des Muzins, so sollte eine Bindung auch nach dem Verdau stattfinden.

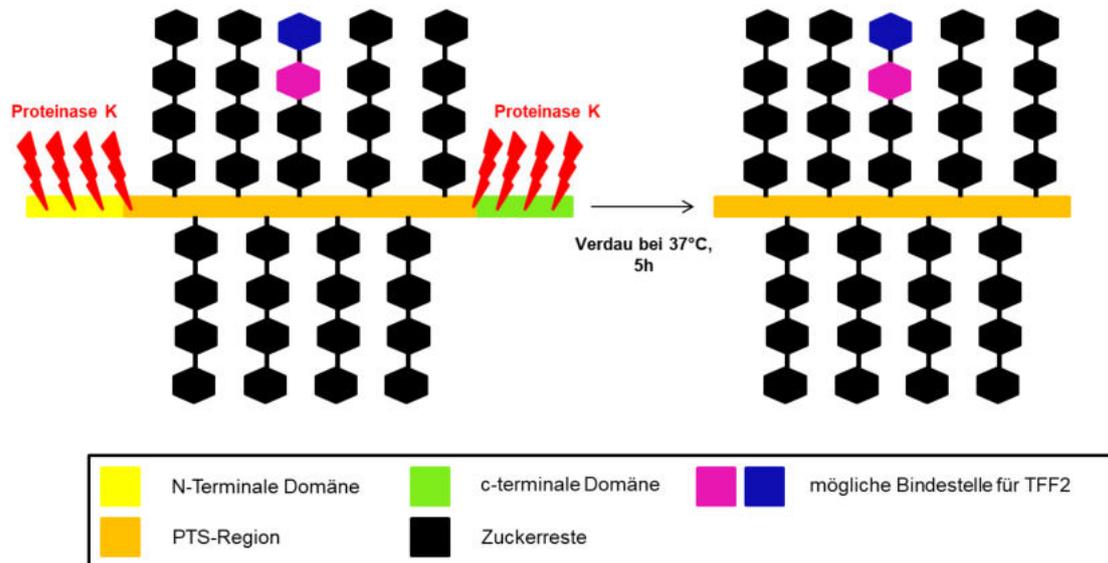


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Proteinase K-Verdau eines Muzins. Das Enzym Proteinase K spaltet als Endo- und Exopeptidase Proteinbindungen. C- und N-Terminus des Muzins sind nicht durch O-glykosidisch gebundene Oligosaccharidketten geschützt und können deshalb durch die Proteinase K abgebaut werden. Die PTS-Region des Muzins ist vor einem Abbau durch Proteinase K jedoch geschützt und bleibt erhalten. Bindepertner, die über die Zuckerketten mit dem Muzin interagieren, können demnach weiterhin binden.

Im Ansatz werden 70% (v/v) Proteinprobe mit 20% (v/v) Puffer und 10% Proteinase K Lösung [0,01 µg/mL] (lyophilisiert, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemischt und bei 37 °C für 5 h inkubiert. Danach erfolgte eine PCI-Extraktion (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, 25:24:1). Dazu wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit PCI-Reagenz (Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, gevortext und für 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und mit Chloroform extrahiert (wässrige Phase: Chloroform 1:1 (v/v)). Nach der Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g und 4 °C wurde die wässrige Phase entnommen und anschließend über SDS-PAGE bzw. AgGE und Western Blot analysiert (siehe 4.2.3. bzw. 4.2.4.)

5. Ergebnisse

5.1. Humanes TFF2

5.1.1. TFF2 im humanen Magen

Bei der Extraktion von Gewebe aus humanem Magen konnten im Wesentlichen zwei verschiedene TFF2-Formen beobachtet werden. Eine Form liegt nach Größenausschlusschromatographie im hochmolekularen Größenbereich vor, im weiteren Verlauf als TFF2_{groß} (mucus-assoziiert) bezeichnet. Die zweite Form liegt nach Größenausschlusschromatographie im niedermolekularen Größenbereich vor und wird im weiteren Verlauf als TFF2_{klein} (freies TFF2) bezeichnet. Mittels 15%iger SDS-PAGE wurden zunächst diese beiden Formen mit rekombinanten TFF2-Peptiden (glykosyliert und nicht-glykosyliert) sowie pTFF2 verglichen (siehe Abbildung 17).

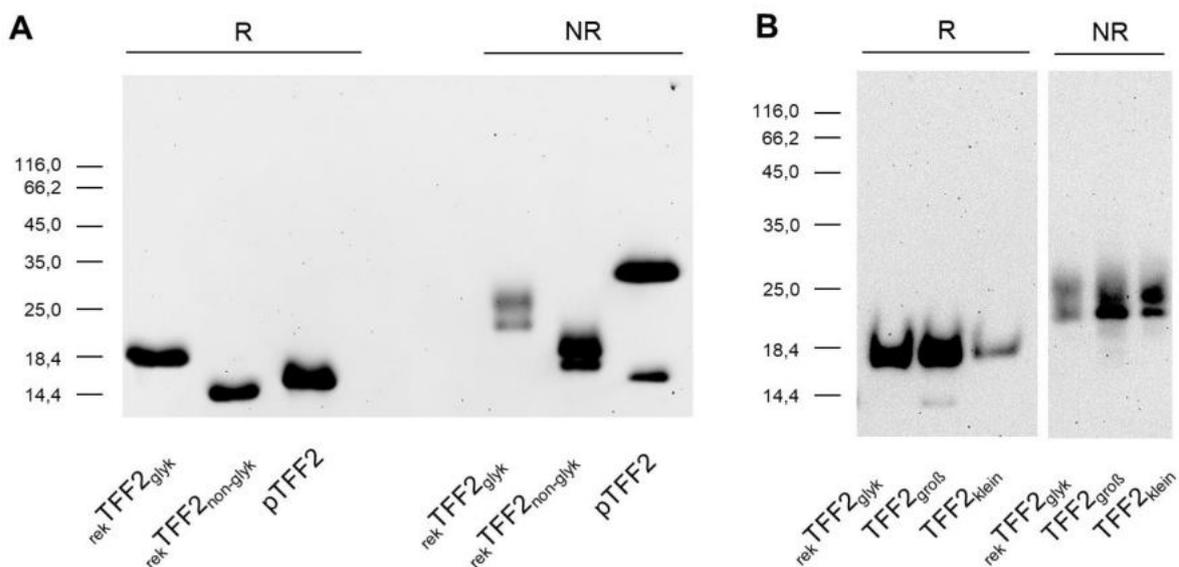


Abbildung 17: SDS-PAGE zum Vergleich verschiedener TFF2-Formen. A: Rekombinante humane TFF2-Peptide und pTFF2. 15%ige reduzierende (R) bzw. nicht-reduzierende (NR) SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 von verschiedenen rekombinanten Peptiden (*rekTFF2_{glyk}* bzw. *rekTFF2_{non-glyk}*) vs. TFF2 aus dem Schweinepankreas (*pTFF2*). **B: TFF2-Formen aus dem humanen Magen im Vergleich mit *rekTFF2_{glyk}*.** 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 von TFF2_{groß} und TFF2_{klein} aus dem humanen Magen (S-75HL, 20.01.17, MC577, Daten nicht gezeigt) vs. *rekTFF2_{glyk}*. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Abbildung 17A zeigt den Vergleich der rekombinanten TFF2-Formen und pTFF2 nach reduzierender (R) und nicht-reduzierender (NR) SDS-PAGE. Das Signal auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE für *rekTFF2_{glyk}* kann bei ca. 18 kDa detektiert werden, für *rekTFF2_{non-glyk}* zeigt sich ein Signal bei ca. 14 kDa. TFF2 aus dem Schweinepankreas kann bei ca. 16 kDa detektiert werden. Auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE sind Banden für *rekTFF2_{glyk}* bei ca. 23 kDa und ca. 25 kDa zu erkennen und für *rekTFF2_{non-glyk}* bei ca. 17 kDa und ca. 19 kDa. Für pTFF2 werden ebenfalls zwei Banden sichtbar, eine Bande bei ca. 16 kDa und eine zweite Bande bei ca. 30 kDa, die bereits als Homodimer beschrieben wurde

(Stürmer et al. 2014). Wie in Abbildung 17B zu erkennen ist, zeigen TFF2_{groß} und TFF2_{klein} aus dem humanen Magen sowohl in der R als auch der NR SDS-PAGE ähnliche Bandenmuster (R bei ca. 18 kDa, NR zwei Banden bei ca. 23 kDa und ca. 25 kDa) wie rek TFF2_{glyk}.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob Unterschiede bzgl. TFF2 im Korpus bzw. Antrum beobachtet werden können. Dazu wurden Extrakte drei verschiedener Korpus- bzw. Antrumproben angefertigt und diese mittels Western Blot bzgl. TFF2 analysiert (siehe Abbildung 18).

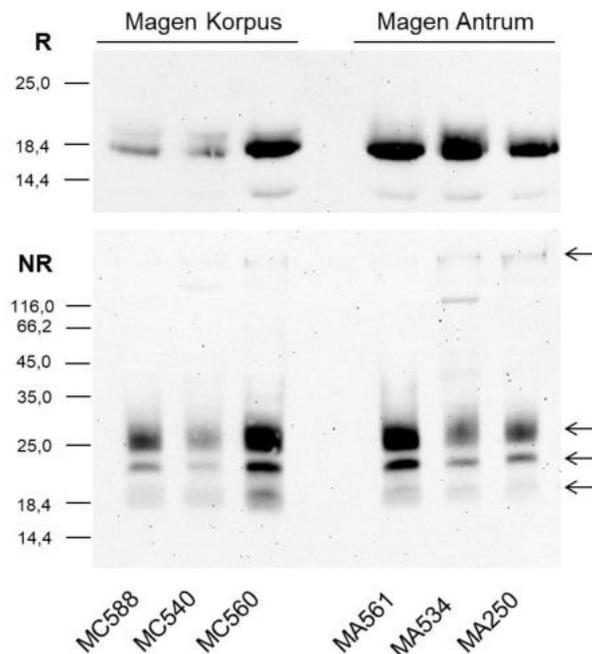


Abbildung 18: Vergleich von TFF2 im humanen Korpus vs. Antrum. R bzw. NR 15%ige SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 von verschiedenen Extrakten humaner Korpus- und Antrumproben (gleiche Gewebemenge aufgetragen). Die Extraktion erfolgte bei einem pH-Wert von 7.0. Die Pfeile markieren die verschiedenen Signale für TFF2 im NR Gel (Gelstart, ca. 25 kDa, ca. 23 kDa und ca. 18 kDa). Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE sind bei den Extrakten von Korpus und Antrum Banden bei ca. 18 kDa und schwach bei ca. 14 kDa zu erkennen. Nicht-reduzierend sind bei allen Proben im Wesentlichen drei Banden sichtbar, eine ca. 25 kDa Bande, eine ca. 23 kDa Bande und eine ca. 18 kDa Bande. Ein sehr schwaches Signal an der Grenze von Tasche zu Sammelgel kann vor allem bei den Antrumproben detektiert werden (siehe Abbildung 18).

5.1.1.1. S-75 HL-Läufe von humanen Magenproben

A: Antrum vs. Korpus

Die Reinigung der Korpus- und Antrumextrakte erfolgte über eine S-75HL-Säule bei einem pH-Wert von 7.0 (Korpus) bzw. 8.0 (Antrum).

Aus Abbildung 19A geht hervor, dass im Korpus ein Teil des TFF2 (24%) nach S-75HL in den niedermolekularen Fraktionen zu finden ist (TFF2_{klein}). Ca. 74% des TFF2 ist hingegen im hochmolekularen Bereich (TFF2_{groß}) detektierbar (siehe Abbildung 19A). Die R SDS-PAGE zeigt Signale für TFF2_{groß} bei ca. 18 kDa und 14 kDa. Für TFF2_{klein} hingegen ist nur eine Bande bei ca. 18 kDa sichtbar. NR sind in beiden Peaks zwei verschiedene Banden für TFF2 (ca. 23 kDa und eine bei ca. 25 kDa) zu finden (siehe Abbildung 19C). Eine kompetitive Inhibition der Banden nach NR 15%iger SDS-PAGE, bei der sich alle Banden komp. inhibieren lassen, ist im Anhang gezeigt (siehe Anhang 1). Die 1%ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 (siehe Abbildung 19D) zeigt ein Signal für TFF2_{groß} in der Geltasche bzw. kurz unterhalb der Geltasche.

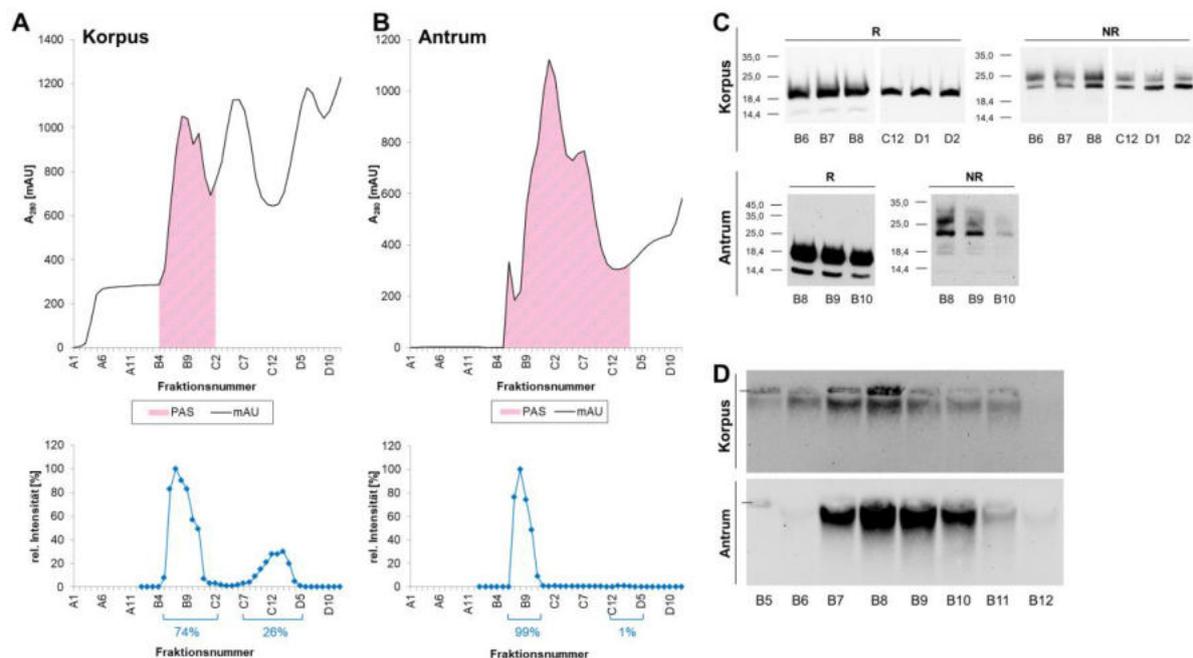


Abbildung 19: Reinigung von humanen Korpus und Antrumextrakten. A: S-75HL-Lauf des Korpusextraktes (MC383). Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Unten: TFF2-Profil nach semiquantitativer Auswertung der R 15%igen SDS-PAGE. Säulenlauf bei pH 7.0. B: S-75HL-Lauf des Antrumextraktes (MA343). Oben: UV-Profil bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Unten: TFF2-Profil nach semiquantitativer Auswertung der R 15%igen SDS-PAGE. Säulenlauf bei pH 8.0. C: R und NR SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2. 15%ige R und NR SDS-PAGE von Proben der in A und B gezeigten S-75HL-Säulen. Aufgetragen sind Proben vom Korpus aus dem hochmolekularen Bereich (B6-B8) und dem niedermolekularen Bereich (C12-D2) sowie Proben vom Antrum aus dem hochmolekularen Bereich (B8-B10). D: AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2. 1%ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 von Proben des hochmolekularen Bereichs (B5-B12) der in A und B gezeigten S-75HL-Säulen.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve; PAS: pinkere Fläche. Strich: Taschen Agarosegel. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Auch die Reinigung der Extrakte aus dem Antrum erfolgte mittels einer S-75HL-Säule. Im Antrum kann bei einem pH-Wert von 8.0 nach dem S-75HL-Lauf lediglich ein Anteil von 1% TFF2_{klein} beobachtet werden. 99% des TFF2 liegen im hochmolekularen Größenbereich vor (siehe Abbildung 19B). TFF2 zeigt auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE zwei Banden (ca. 14 kDa und ca. 18 kDa), nicht-reduzierend sind Banden bei ca. 25 kDa, ca. 23 kDa und

schwach bei ca. 18 kDa erkennbar (siehe Abbildung 19C). Auf dem Western Blot nach 1%iger AgGE (Agarosegelelektrophorese) der Fraktionen B5-B12 sind für TFF2 Signale direkt unterhalb der Geltaschen zu erkennen (siehe Abbildung 19D).

B: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden humaner Korpusproben

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Extraktionsexperimenten durchgeführt, um die Bindung von TFF2 an Muzine im humanen Magen zu untersuchen. Dabei wurden die Korpusproben bei unterschiedlichen Bedingungen extrahiert, mittels S-75HL gereinigt und der Anteil an TFF2_{klein} bestimmt. Ein Überblick aller Extraktionsmethoden ist sowohl in Tabelle 21 als auch in Abbildung 20 dargestellt.

Tabelle 21: Verteilung von TFF2 nach S-75HL-Läufen verschiedener Extraktionsmethoden im humanen Korpus. Angegeben ist der Anteil an TFF2_{klein} von S-75HL-Läufen nach verschiedenen Extraktionsbedingungen. Variiert wurden pH-Wert, Zusätze und Kochen. Es ist angegeben, ob ein Extrakt (E) oder ein zuvor über S-75HL gereinigter Mukuspeak (M) der Behandlung unterzogen wurde.

Zusätze	Anzahl der Experimente (n)	Kochen	Extrakt bzw. Mukuspeak	pH	% TFF2 _{klein}	Stand. Ab. δ	Anhang/Abbildung
keine	12	nein	E	7.0	21	+/- 10	Abbildung 19
keine	2	nein	E	8.0	0	0	Anhang 7
keine	2	nein	E	6.0	4	+/- 3,5	Anhang 7
1% β -Mercaptoethanol	1	nein	E	6.0	0	-	Anhang 2
30 mM EDTA	1	nein	E	8.0	0	-	Anhang 3
TRIZOL [®]	4	nein	E	7.0	97	+/- 5	Abbildung 24
30 mM EDTA/1% SDS	3	ja	M	7.0	100	0	Anhang 4
30 mM EDTA/1% SDS	1	ja	E	7.0	97	-	Anhang 6
30 mM EDTA/1% SDS	1	ja	E	8.0	88	-	Anhang 5
1% SDS	2	ja	M	7.0	95	+/- 3	Anhang 4
1% SDS	1	ja	E	8.0	71	-	Anhang 5
keine	1	ja	E	7.0	55	-	Anhang 6
1% β -Mercaptoethanol	1	ja	E	6.0	100	-	Anhang 2
30 mM EDTA	1	ja	E	6.0	47	-	Anhang 3

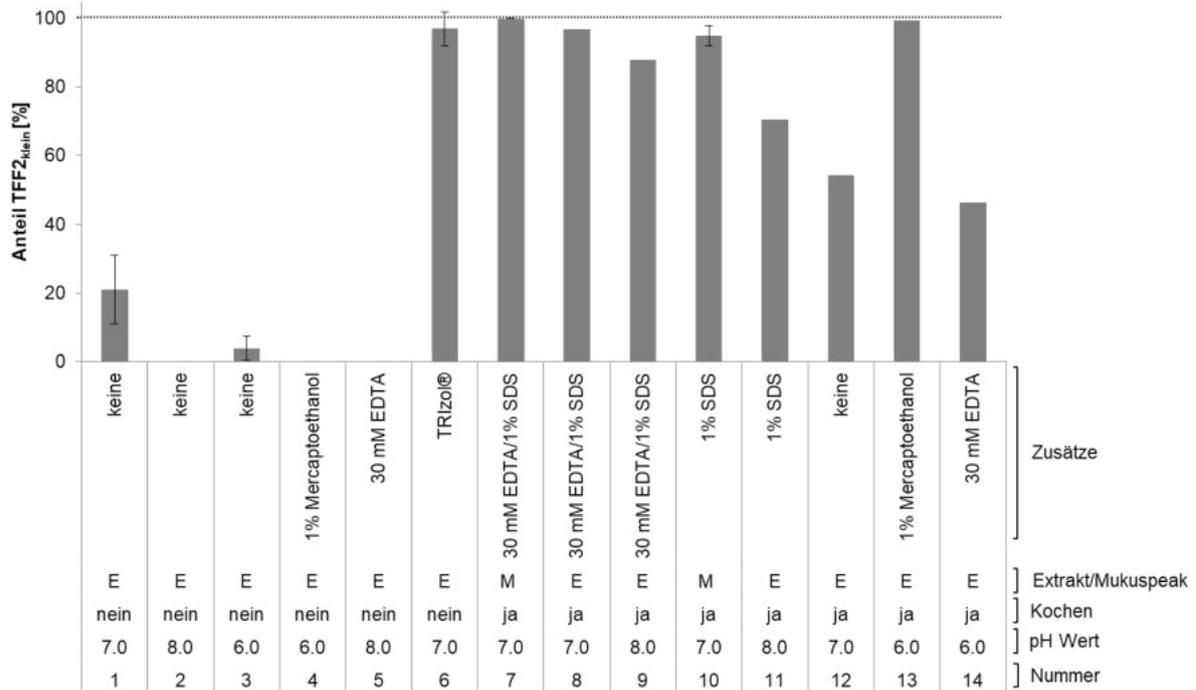


Abbildung 20: Anteil an TFF2_{klein} bei verschiedenen Extraktionsmethoden im humanen Korpus. Dargestellt ist der Anteil an TFF2_{klein} nach S-75HL-Lauf verschiedener Extraktionsmethoden. Außerdem ist angegeben, ob ein Extrakt (E) oder ein gereinigter Mukuspeak (M) der Behandlung unterzogen wurde. Fehlerbalken: Standardabweichung δ .

Wird ein Korpusextrakt, wie standardmäßig, bei einem pH-Wert von 7.0 extrahiert und über eine S-75HL gereinigt, kann durchschnittlich ein Anteil von etwa 20% an TFF2_{klein} beobachtet werden. Kochen des Extrakts führt dazu, dass der Anteil an TFF2_{klein} auf ca. 50% erhöht werden kann. Werden zusätzlich zum Kochen noch 1% SDS, 1% β -Mercaptoethanol oder 1% SDS/30 mM EDTA zugesetzt, ist TFF2 nahezu vollständig aus dem Mukus herauslösbar und liegt fast ausschließlich als TFF2_{klein} vor. Ein S-75HL-Lauf nach TRIZOL®-Extraktion führt ebenfalls dazu, dass fast ausschließlich TFF2_{klein} gefunden werden kann. Kochen nur mit 30 mM EDTA zeigt keinen zusätzlichen Effekt. Wird der Extrakt nicht gekocht, aber z. B. mit 30 mM EDTA bzw. 1% β -Mercaptoethanol versetzt, so kann TFF2 nicht in den niedermolekularen Größenbereich verschoben werden (siehe Tabelle 21, Abbildung 20).

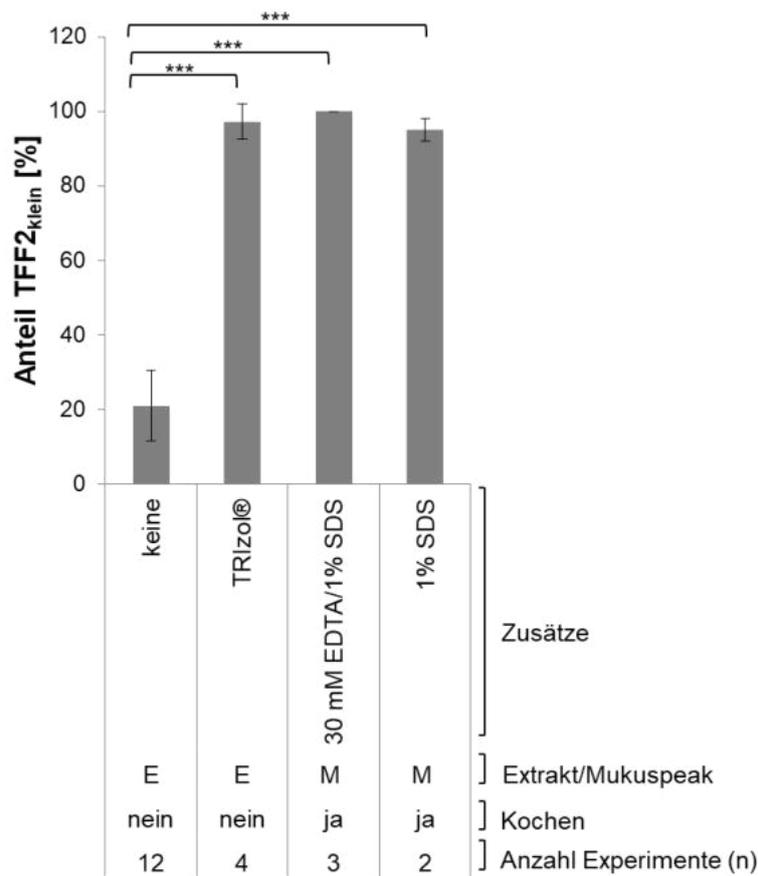


Abbildung 21: Generierung von TFF2_{klein} aus humanen Magenproben. Dargestellt ist die statistische Auswertung des Anteils an TFF2_{klein} verschiedener Extraktionsexperimente (TRIZOL®-Extraktion, Kochen des Mukuspeaks mit 1% SDS bzw. 1%SDS/30 mM EDTA). Fehlerbalken: Standardabweichung δ . Signifikanz (Zwei-Stichproben F-Test) mit *** $p \leq 0,001$. Säulenläufe bei pH 7.0.

TFF2 kann also durch verschiedene Extraktionsmethoden aus dem Mukuspeak herausgelöst werden (siehe Abbildung 21). Sowohl das Kochen mit 1% SDS als auch das Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA erhöhen den Anteil an TFF2_{klein} im Vergleich zur Kontrolle (Extrakt ohne Zusätze) signifikant. Auch eine TRIZOL®-Extraktion mit anschließender S-75HL führt dazu, dass der Anteil an TFF2_{klein} signifikant erhöht wird. Im Folgenden wurde das TFF2_{klein} gereinigt und versucht es näher zu charakterisieren.

Zunächst erfolgte dazu die Generierung von TFF2_{klein} durch Größenausschlusschromatographie nach Kochen eines gereinigten Mukuspeaks (Reinigung über S-75HL) mit 1% SDS/30 mM EDTA (siehe Abbildung 22). Der gereinigte Mukuspeak wurde zunächst durch einen S-75HL-Lauf eines Korpusextrakts (MC406A) generiert (siehe Abbildung 22A). Nach dem Säulenlauf des Extrakts liegen 87% des TFF2 im hochmolekularen Bereich (Fr. B5-B12) vor, 13% des TFF2 können im niedermolekularen Bereich (Fr. C11-D5) detektiert werden. Es werden dabei auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE Banden für TFF2_{klein} und TFF2_{groß} bei ca. 18 kDa und ca. 14 kDa sichtbar, NR sind für beide Formen drei Banden (ca. 18 kDa, ca. 23 kDa und ca. 25 kDa) detektierbar (siehe Abbildung 22C).

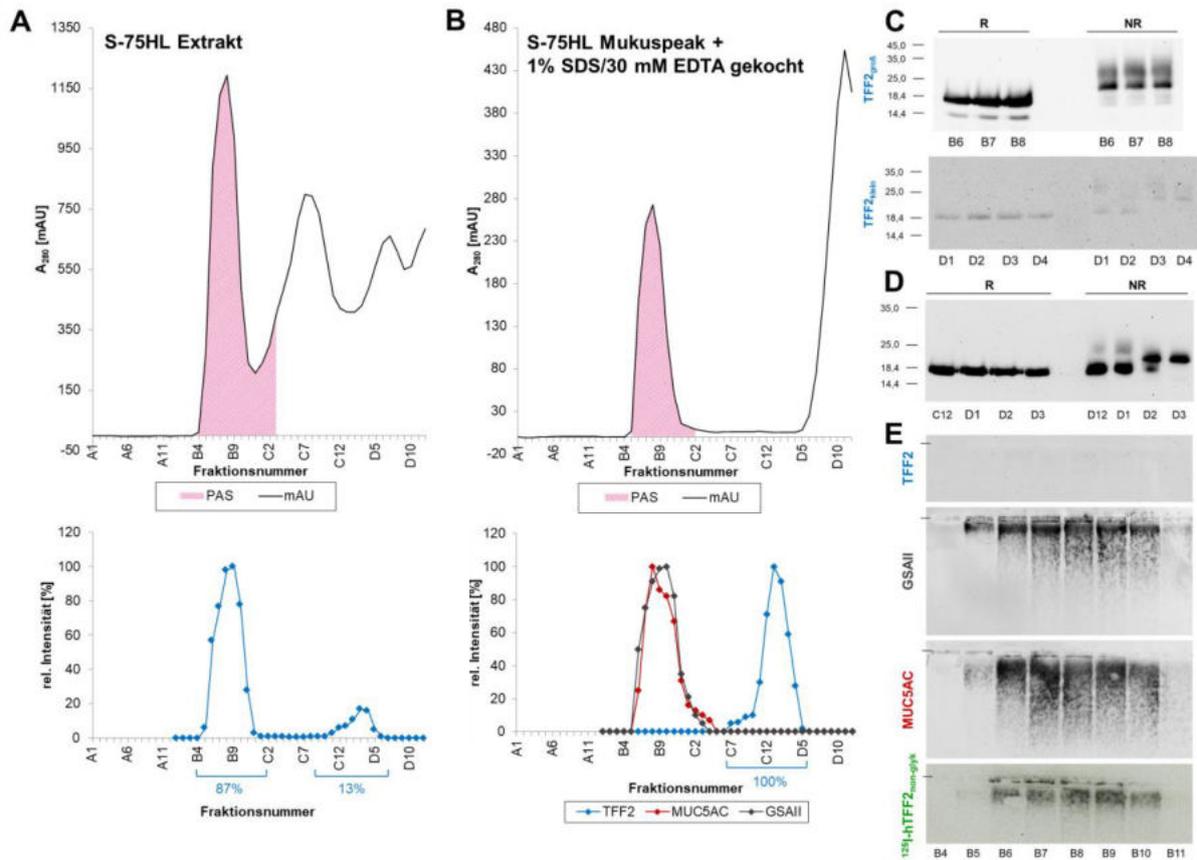


Abbildung 22: Generierung von TFF2_{klein} aus dem humanen Korpus (MC406A) durch Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. A: S-75HL-Lauf eines humanen Korpusextrakts. Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). **Unten:** TFF2-Profil nach semiquantitativer Auswertung (R 15%ige SDS-PAGE). B6-B10 wurden vereinigt, mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht und erneut über eine S-75HL gereinigt. **B: S-75HL-Lauf des Mukuspeaks nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. Oben:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). **Unten:** TFF2-Profil nach semiquantitativer Auswertung (R 15%ige SDS-PAGE), sowie Profile der semiquantitativen Auswertung von MUC5AC und GSAll nach 1% AgGE. **C: Vergleichende SDS-PAGE von TFF2_{klein} und TFF2_{groß} nach S-75HL.** 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE der Fraktionen B6-B8 (TFF2_{groß}) bzw. D1-D4 (TFF2_{klein}) nach einem S-75HL-Lauf (beschrieben in A) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2. **D: Vergleichende SDS-PAGE R vs. NR von TFF2_{klein} der S-75HL nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA.** 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE der Fraktionen C12-D3 der S-75HL (Profil gezeigt in B) nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2. **E: AgGE des hochmolekularen Bereichs nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA.** 1%ige AgGE der Fraktionen B4-B11 der S-75HL nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA (S-75HL-Säule gezeigt in B) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2, GSAll, MUC5AC bzw. Hybridisierung mit ¹²⁵I-hTFF2_{non-glyk} (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer)

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve; MUC5AC: rote Kurve, GSAll: graue Kurve und PAS: pinke Fläche. Strich: Taschen Agarosegel. Säulenläufe bei pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Die Fraktionen des Mukuspeaks (Fr. B6-B10) dieses S-75HL-Laufes wurden vereinigt, mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht und erneut über eine S-75HL gereinigt. Wie in Abbildung 22B zu erkennen ist, kann TFF2 komplett in den niedermolekularen Bereich (Fr. C7-D5) verschoben werden, MUC6 (GSAll-Reaktivität) und MUC5AC hingegen sind ausschließlich im hochmolekularen Bereich zu finden (Fr. B5-C5). Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE kann für TFF2 eine Bande bei ca. 18 kDa detektiert werden, auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE sind drei Banden (ca. 18 kDa, ca. 25 kDa und ca. 23 kDa) zu erkennen (siehe

Abbildung 22D). Von den Fraktionen des hochmolekularen Bereichs der S-75HL nach Kochen wurde eine 1%ige AgGE mit Western Blot bzgl. TFF2, GSAll, MUC5AC durchgeführt und auch die Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} an diesen Bereich untersucht. Ein Signal für TFF2 im Agarosegel kann nicht detektiert werden, Signale für MUC5AC und MUC6 (GSAll) sind in den Fraktionen B5-B10 unterhalb der Geltaschen erkennbar. Dort bindet ebenfalls ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} (siehe Abbildung 22E).

Der Hauptpeak von TFF2_{klein} nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA wurde 5fach konzentriert (SpeedVac) und auf ein R 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Dieses wurde nach dem Gellauf mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe Abbildung 23A).

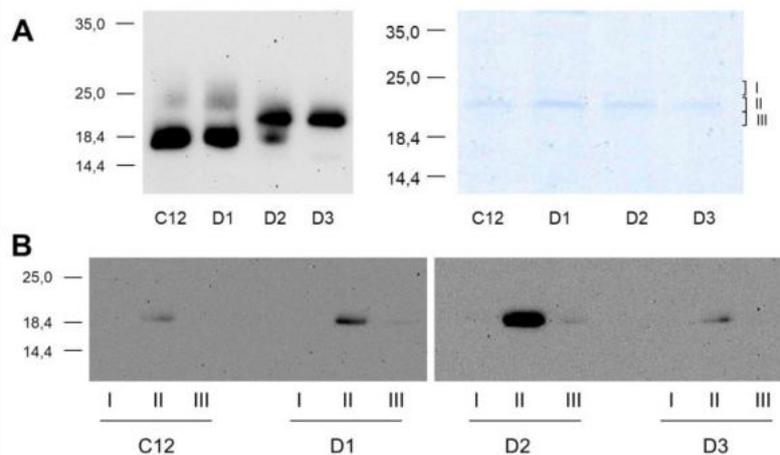


Abbildung 23: Elution von TFF2_{klein} nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA aus dem NR Coomassiegel. A: Links: 15%ige NR SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen C12-D3 (TFF2_{klein}) einer S-75HL-Säule nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA (siehe Abbildung 22B) **Rechts:** 15%ige NR SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Fraktionen C12-D3 (TFF2_{klein}) einer S-75HL-Säule nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA (siehe Abbildung 22B). Die Banden I-III wurden aus dem Gel eluiert. **B:** 15%ige R SDS-PAGE der eluierten Banden (siehe A) und Western Blot bzgl. TFF2. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Die markierten Banden (I: ca. 25 kDa, II: ca. 23 kDa und III ca. 21 kDa) wurden eluiert und auf eine R SDS-PAGE aufgetragen. TFF2 kann hauptsächlich in der Bande II (23 kDa) jeder Fraktion detektiert werden. Die Proben D1-II und D2-II wurden zur massenspektrometrischen Analyse eingeschickt, das Vorhandensein von TFF2 konnte in beiden Banden bestätigt werden (siehe Anhang 8, Massenanalyse durch Herrn S. Harder, UKE Hamburg).

TFF2_{klein} kann ebenfalls durch S-75HL nach TRIzol[®]-Extraktion generiert werden. Dazu wurde das Gewebe mit TRIzol[®] extrahiert, das Proteinpellet (siehe Abbildung 11) in 1% SDS gelöst (2 h, 50 °C) und anschließend über eine S-75HL-Säule getrennt. Die Verteilung von TFF2 in der RNA-Phase, dem DNA-Pellet und dem Proteinpellet der TRIzol[®]-Extraktion ist im Anhang (Anhang 9) zu finden. Da die Extraktion mehrfach durchgeführt wurde und sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden, wird hier exemplarisch lediglich eine Extraktion beschrieben (siehe Abbildung 24).

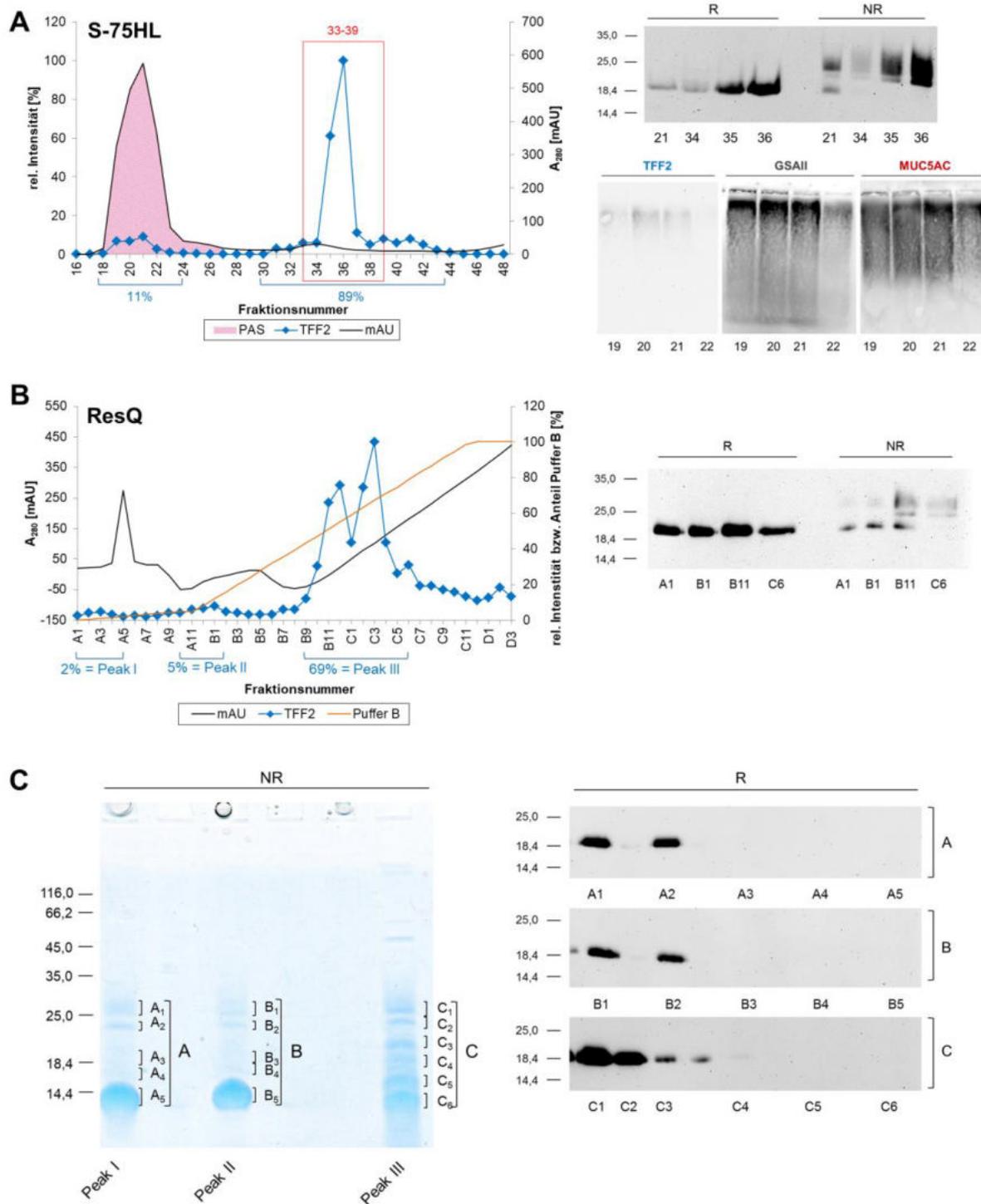


Abbildung 24: Reinigung einer humanen Korpusprobe (MC577) nach TRIZOL®-Extraktion. A: S-75HL-Lauf des Proteinpellets nach TRIZOL®-Extraktion. Links: UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung von PAS (Dot Blot) bzw. TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Rechts: R und NR 15%ige SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen 21, 34-36 der S-75HL nach TRIZOL®-Extraktion. Außerdem 1%ige AgGE und anschließender Western Blot bzgl. TFF2, MUC5AC und GSAII der Fraktionen 19-22 der S-75HL nach TRIZOL®-Extraktion. B: ResQ-Lauf des TFF2_{klein} (Fr.33-39) nach TRIZOL®-Extraktion (S-75HL siehe A). Links: UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung von TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Rechts: R und NR 15%ige SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen A1, B1, B11 und C6 der ResQ des TFF2_{klein} nach TRIZOL®-Extraktion. C: Elution des TFF2 nach TRIZOL®-Extraktion aus dem Coomassiegelelutionsprofil. Links: 15%ige NR SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Peaks I-III (siehe B) nach Konzentration (100fach) und Entsalzung (PD-10-Säule). Die markierten Banden wurden eluiert. Rechts:

15%ige R SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der aus dem Coomassiegel (siehe links) eluierten Banden A1-A5, B1-B5 bzw. C1-C6.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Nach S-75HL-Lauf des gereinigten Proteinpellets nach TRIzol[®]-Extraktion kann TFF2 zu ca. 90% im niedermolekularen Bereich (Fr. 34-42) detektiert werden (siehe Abbildung 24A). Unter reduzierenden Bedingungen ist für TFF2 eine Bande bei ca. 18 kDa erkennbar, nicht-reduzierend sind drei Banden zu beobachten (ca. 18 kDa, ca. 23 kDa und ca. 25 kDa). MUC6 (GSAll-Reaktivität) und MUC5AC können in den Fraktionen 19-22 der 1%igen AgGE nachgewiesen werden. TFF2 ist in diesen Fraktionen ebenfalls zu finden, das Signal ist jedoch sehr schwach. Die Fraktionen 33-39 wurden vereinigt und im zweiten Reinigungsschritt mittels ResQ gereinigt. TFF2 eluiert in drei Entitäten von der Säule. Ca. 2% eluieren in den Fraktionen A1-A5 (Peak I), ca. 5% in den Fraktionen A11-B4 (Peak II) und ca. 70% in den Fraktionen B9-C6 (Peak III) (siehe Abbildung 24B). Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE wird bei allen drei Peaks eine Bande bei ca. 18 kDa für TFF2 sichtbar, NR werden Banden bei 18 kDa, 23 kDa und 25 kDa sichtbar. Nach Entsalzung und Konzentration der Proben von Peak I, Peak II und Peak III wurde das Konzentrat auf eine NR SDS-PAGE aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die markierten Banden A1-A5, B1-B5 bzw. C1-C6 (kleiner 14 kDa bis ca. 25 kDa, siehe Abbildung 24C) wurden eluiert und auf eine R SDS-PAGE aufgetragen. In den Banden 1 (25 kDa) und 2 (23 kDa) kann TFF2 sowohl auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE nachgewiesen werden, als auch durch massenspektrometrische Analysen (Massenanalyse durch Herrn S. Harder, UKE Hamburg, siehe Anhang 10).

C: Differentielle Extraktion E0, E1 und E3/4

Zunächst erfolgte die stufenweise Extraktion (siehe Abbildung 10) einer Korpusprobe (MC577). Dabei wurden die Extrakte E0 (Waschen ohne Zellaufschluss), E1 (ÜS nach Zellaufschluss), E2 (Pellet nach Zellaufschluss gewaschen in 1% SDS), E3 (Pellet nach Zellaufschluss erwärmt mit 1% SDS) und E4 (Pellet nach Zellaufschluss gekocht mit 1% SDS) generiert und über eine 15%ige SDS-PAGE bzw. 1%ige AgGE bzgl. TFF2, MUC5AC und MUC6 (GSAll) analysiert (siehe Abbildung 25).

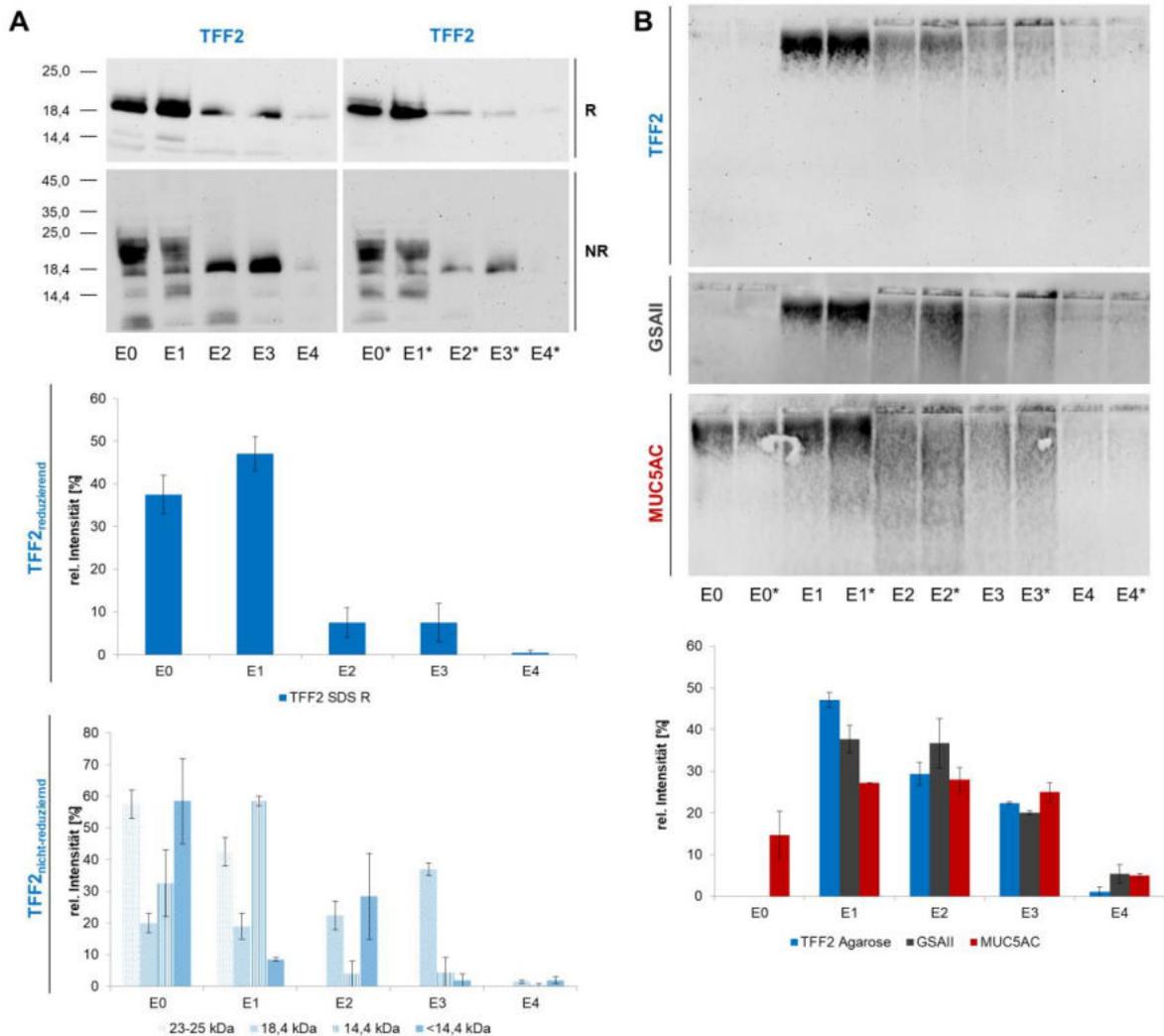


Abbildung 25: Differenzielle Extraktion E0, E1, E2, E3 und E4 im humanen Korpus (MC577). **A: Oben:** R und NR 15%ige SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2. **Unten:** Semiquantitative Auswertung der R bzw. NR 15%igen SDS-PAGE. **B: Oben:** 1%ige AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSAll und MUC5AC. **Unten:** Semiquantitative Auswertung der 1%igen AgGE.

E0-E4 bzw. E0*-E4* sind Parallelexperimente der gleichen Probe. E0: Extraktion ohne Zellaufschluss, E1: ÜS nach Zellaufschluss, E2: Extraktion Pellet nach E1 durch Waschen mit 1% SDS, E3: Extraktion Pellet nach E2 durch Erwärmen in 1% SDS (30 min, 50 °C), E4: Extraktion Pellet nach E3 durch Kochen mit 1% SDS (5 min). Auf den einzelnen Gelen wurden äquivalente Volumeneinheiten der einzelnen Extrakte aufgetragen. Puffer: 20 mM Tris/HCl, 30 mM NaCl, pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben. Fehlerbalken: Standardabweichung δ (n=2).

TFF2 kann mittels SDS-PAGE in allen Extrakten (E0-E4) detektiert werden, der größte Teil ist in E0 und E1 zu finden. Dort werden für TFF2 auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE mehrere Banden sichtbar (ca. 23 kDa, ca. 25 kDa, ca. 18 kDa, ca. 14 kDa und kleiner 14 kDa). Bei den Extrakten E2, E3 und E4 kann sowohl auf dem Western Blot der R, als auch der NR SDS-PAGE für TFF2 lediglich ein schwaches Signal detektiert werden (NR Banden bei ca. 18 kDa und ca. 14 kDa). Auf dem Western Blot nach 1%iger AgGE kann für TFF2 hauptsächlich in den Extrakten E1, E2 und E3 ein Signal unterhalb der Geltaschen

detektiert werden. In diesen Extrakten ist auch eine Reaktivität mit GSAll zu beobachten. MUC5AC kann in allen Extrakten im Agarosegel detektiert werden (siehe Abbildung 25).

Für die folgenden S-75HL-Läufe wurde der Extraktionsschritt E2 (siehe Abbildung 10) ausgelassen und die Extrakte E3 und E4 vor dem Säulenlauf vereinigt (siehe Abbildung 26).

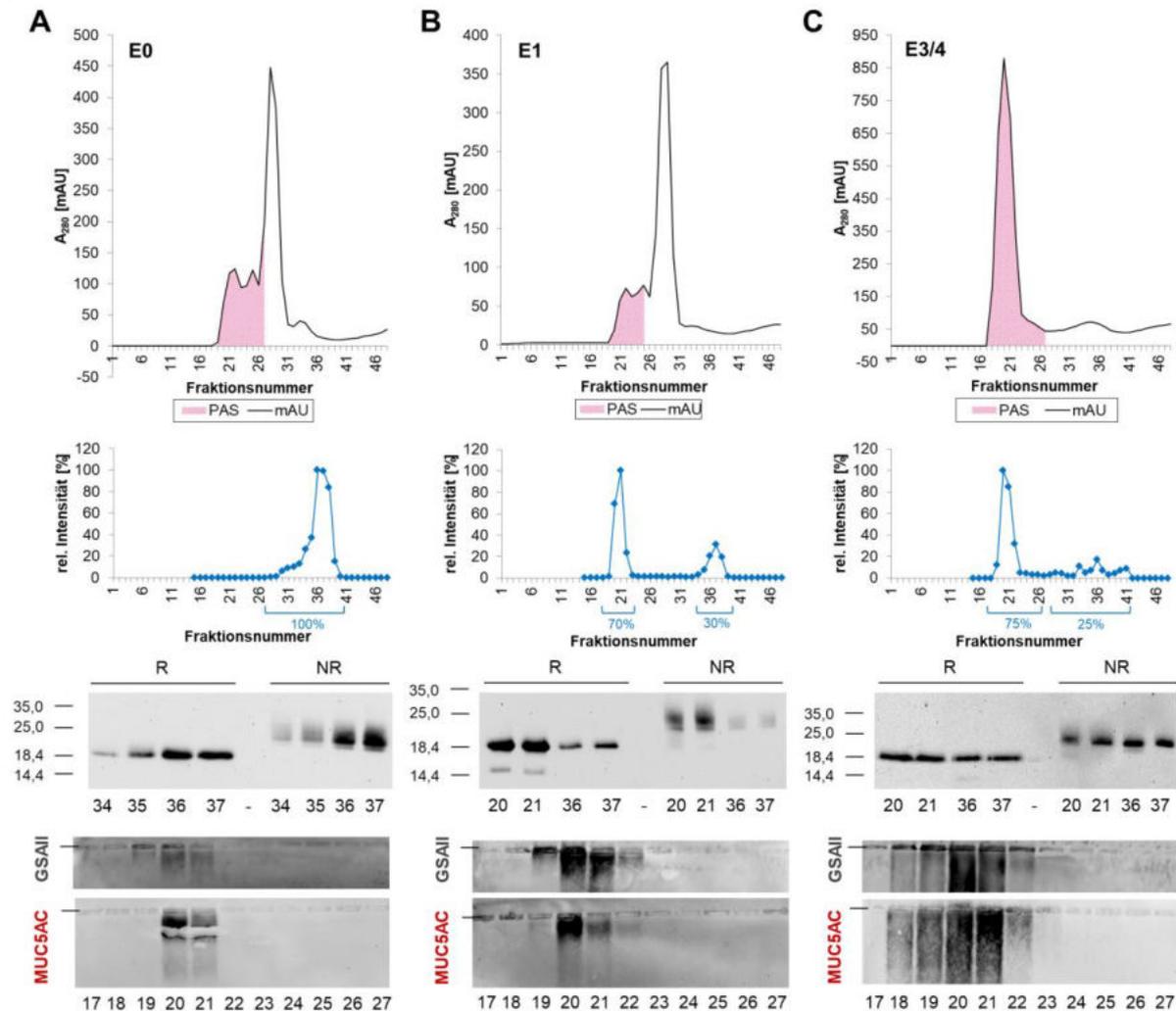


Abbildung 26: S-75HL-Läufe von Extrakten E0, E1 und E3/E4 einer humanen Korpusprobe (MC577). A: S-75HL-Lauf von E0 (Waschen ohne Zellaufschluss). Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertungen für PAS (Dot Blot) und TFF2 (15%ige R SDS-PAGE). Unten: R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen 34-37 und Western Blot bzgl. TFF2 sowie 1%ige AgGE der Fraktionen 17-27 und Western Blot bzgl. GSAll und MUC5AC. **B: S-75HL-Lauf von E1 (ÜS nach Zellaufschluss).** Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertungen für PAS (Dot Blot) und TFF2 (15%ige R SDS-PAGE). Unten: R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen 20/21 bzw. 36/37 und Western Blot bzgl. TFF2 sowie 1%ige AgGE der Fraktionen 17-27 und Western Blot bzgl. GSAll und MUC5AC. **C: S-75HL-Lauf von E3/4 (Pellet nach Zellaufschluss).** Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertungen für PAS (Dot Blot) und TFF2 (15%ige R SDS-PAGE). Unten: R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen 20/21 bzw. 36/37 und Western Blot bzgl. TFF2 sowie 1%ige AgGE der Fraktionen 17-27 und Western Blot bzgl. GSAll und MUC5AC.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve und PAS: pinke Fläche. Strich: Taschen Agarosegel. Säulenläufe bei pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Nach dem S75HL-Lauf des Extrakts E0 kann TFF2 ausschließlich im niedermolekularen Größenbereich detektiert werden (siehe Abbildung 26A). Nach dem Zellaufschluss können

zwei TFF2-Formen im Extrakt E1 beobachtet werden (70% TFF2_{groß}, 30% TFF2_{klein}, siehe Abbildung 26B). Im Extrakt E3/E4 (Waschen mit 1%SDS) sind 75% des TFF2 im Mukuspeak zu finden, lediglich 25% liegen als TFF2_{klein} vor (siehe Abbildung 26C). MUC6 (GSAll-Reaktivität) und MUC5AC sind nach allen S-75HL-Läufen im hochmolekularen Bereich zu finden, in E0 ist das Singal für MUC6 (GSAll) jedoch sehr schwach.

5.1.1.2. ResQ-Läufe humaner Magenproben

A: ResQ-Läufe differenzielle Extraktion E0, E1 und E3/E4

Neben den in 5.1.1.1.C beschriebenen S-75HL-Läufen der Extrakte E0, E1 und E3/4 wurden von diesen Extrakten auch ResQ-Läufe durchgeführt. Das Ergebnis der Läufe ist in Abbildung 27 dargestellt.

Beim Extrakt E0 eluiert TFF2 in fünf verschiedenen Peaks von der ResQ-Säule. Der Hauptteil eluiert in den Fraktionen B1-B3 (64%) bei einem Salzgehalt von 120-200 mM NaCl (siehe Abbildung 27A). Von allen Fraktionen der Säule wurden 1%ige AgGE mit Western Blot bzgl. TFF2, MUC5AC und MUC6 (GSAll) angefertigt (Daten nicht gezeigt), wobei diese lediglich für MUC5AC in fast allen Fraktionen (siehe semiquantitative Auswertung Abbildung 27A) positiv sind. GSAll-Reaktivität und TFF2 konnten nach 1%iger AgGE nicht nachgewiesen werden. Beim Extrakt E1 (Abbildung 27B) eluiert TFF2 vor allem (80%) in den Fraktionen B2-B10 (160-480 mM NaCl). MUC6 (GSAll-Reaktivität) kann in den Fraktionen B5-C12 beobachtet werden, MUC5AC kann in nahezu allen Fraktionen der Säule detektiert werden (siehe Abbildung 27B). Im Extrakt E3/E4 (Abbildung 27C) eluiert TFF2 hauptsächlich (88%) in den Fraktionen B2-B11 (170-520 mM NaCl). MUC6 (GSAll) ist in den Fraktionen B4-C12 zu finden, MUC5AC schmiert ebenfalls über die gesamte Säule (siehe Abbildung 27C). Der Anteil von TFF2, welches nicht bzw. nur sehr schwach an die ResQ-Säule bindet (Fr. A1-A5) nimmt von E0 über E1 bis hin zu E3/4 ab.

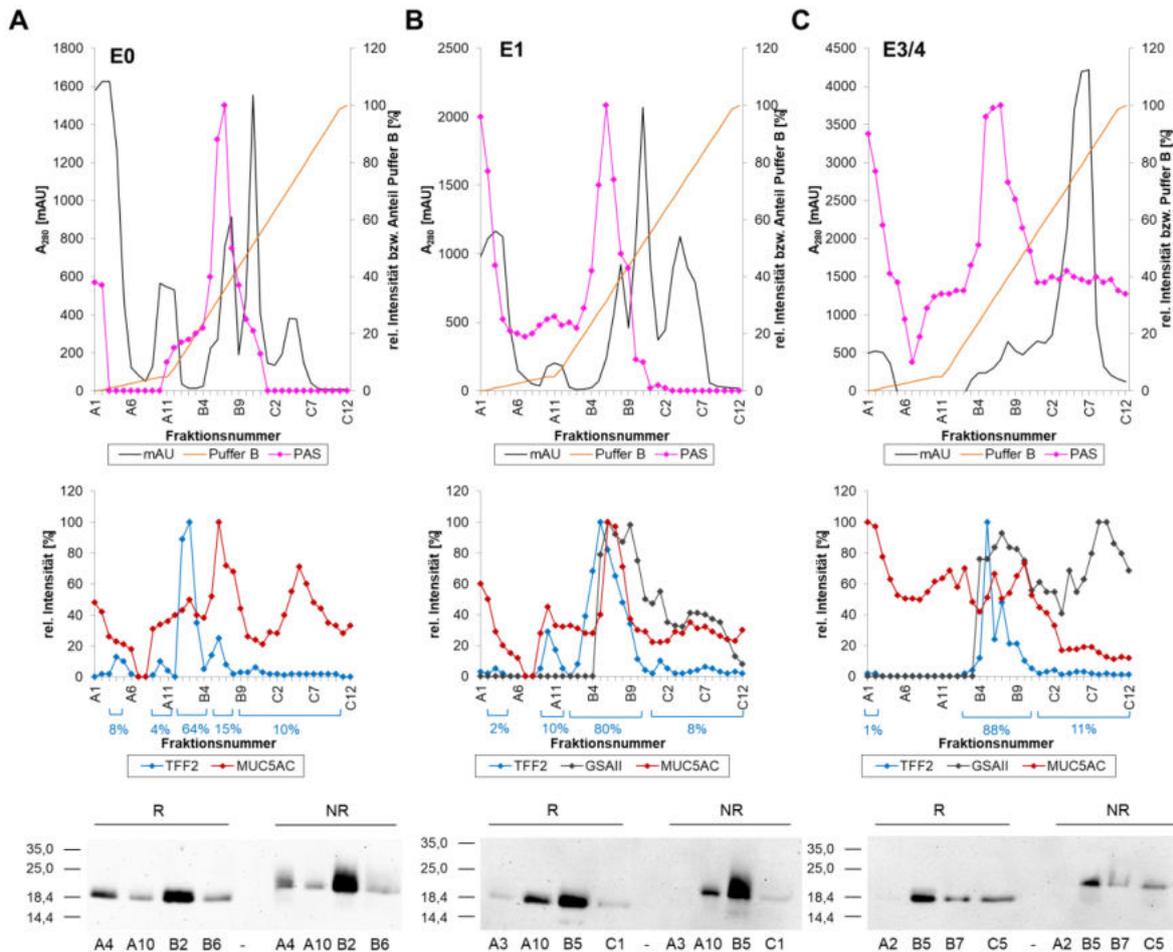


Abbildung 27: ResQ-Läufe der Extrakte E0, E1 und E3/4 einer humanen Korpusprobe (MC577). **A. ResQ-Lauf von E0 (Waschen ohne Zellaufschluss).** **Oben:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Ebenfalls dargestellt sind Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (15%ige R SDS-PAGE) und MUC5AC (1%ige AgGE). **Unten:** R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen A4, A10, B2 und B6 und Western Blot bzgl. TFF2. **B. ResQ-Lauf von E1 (ÜS nach Zellaufschluss).** **Oben:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Ebenfalls dargestellt sind die Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (15%ige R SDS-PAGE), MUC5AC und GSaII (1%ige AgGE). **Unten:** R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen A3, A10, B5 und C1 und Western Blot bzgl. TFF2. **C. ResQ-Lauf von E3/4 (Pellet nach Zellaufschluss).** **Oben:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Ebenfalls dargestellt sind Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (15%ige R SDS-PAGE), MUC5AC und GSaII (1%ige AgGE). **Unten:** R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen A2, B5, B7 und C5 und Western Blot bzgl. TFF2. Absorption: schwarze Kurve, PAS: pinke Kurve, TFF2: blaue Kurve, MUC5AC: rote Kurve, GSaII: dunkelgraue Kurve und Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

B: ResQ-Lauf eines Extraktes E1 im Detail

Ein Extrakt E1 einer humanen Korpusprobe (MC577) wurde direkt auf eine ResQ-Säule aufgetragen (siehe Abbildung 27B). TFF2 eluiert dort in verschiedenen Entitäten von der Säule. 2% des TFF2 eluieren bereits in den Fraktionen A1-A4 (Peak I), 10% eluieren in den Fraktionen A9-A12 (Peak II), der Hauptteil (80 %) eluiert in den Fraktionen B2-B9 (Peak III) und 8% eluieren in den Fraktionen C1-C12 (Peak IV) (siehe Abbildung 27B, Abbildung 28).

In Abbildung 28 sind 1%ige AgGE der Fraktionen X1-C12 gezeigt, welche durch Western Blot bzgl. TFF2, MUC6 (GSAll), MUC5AC und Autoradiographie mit ^{125}I -pTFF2 analysiert und semiquantitativ ausgewertet wurden. Für TFF2 ist lediglich ein Signal in Peak III (B5-B11) unterhalb der Geltaschen zu beobachten. In den Peaks I, II und IV kann TFF2 nur mittels SDS-PAGE detektiert werden (siehe Abbildung 27B). MUC6 (GSAll-Reaktivität) kann in den Fraktionen B5-C12 (Peak III und Peak IV) unterhalb der Geltaschen detektiert werden (Maximum B5-B10). Bei diesen Fraktionen kann ^{125}I -pTFF2 ebenfalls unterhalb der Geltaschen gebunden werden. MUC5AC weist neben einem positiven Signal in den Fraktionen B5-C12 auch Signale in den Fraktionen A1-A4 (Peak I) und A9-B4 (Peak II) auf. Dort kann jedoch kein ^{125}I -pTFF2 gebunden werden (siehe Abbildung 28).

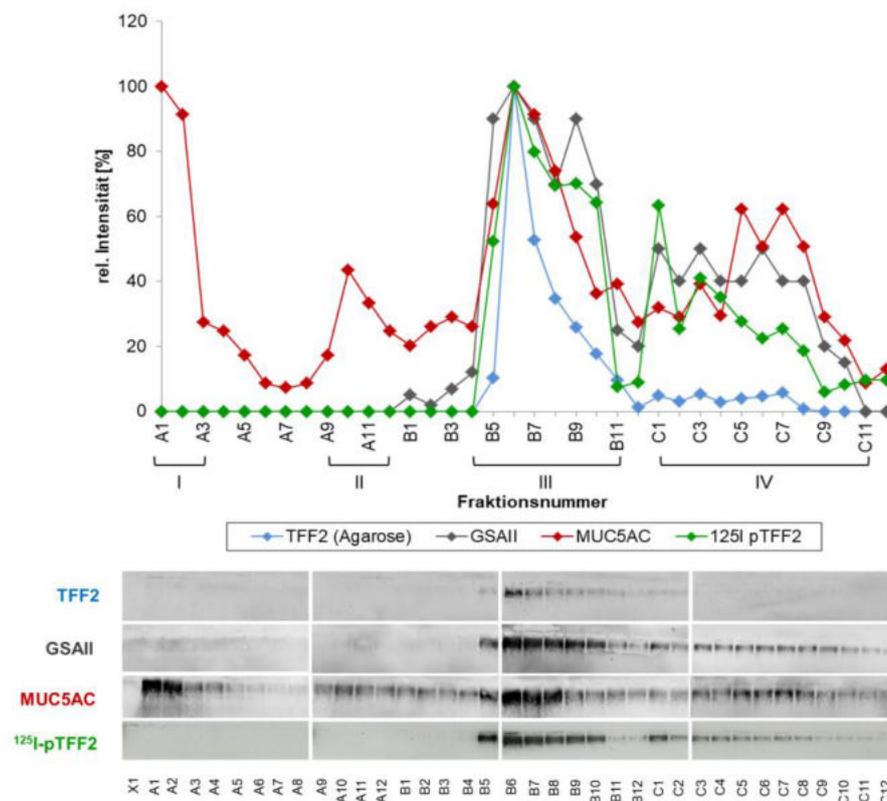


Abbildung 28: ResQ-Lauf eines humanen Korpusextrakts E1 (siehe Abbildung 27B). Verteilung von TFF2, GSAll, MUC5AC und ^{125}I -pTFF2. Oben: Profile der semiquantitativen Auswertung von TFF2, GSAll und MUC5AC der Fraktionen A1-C12 nach 1%iger AgGE sowie Profile der semiquantitativen Auswertung der Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2 (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer) nach 1%iger AgGE. **Unten:** 1%ige AgGE der Fraktion X1, A1-C12 der ResQ von E1 (siehe Abbildung 27B) und Western Blot bzgl. TFF2, GSAll und MUC5AC sowie Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2 (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer). Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, MUC5AC: rote Kurve, GSAll: graue Kurve; ^{125}I -pTFF2: grüne Kurve.

5.1.1.3. S-500-Läufe humaner Magenproben

A: S-500-Lauf eines humanen Korpusextrakts

Um die Bindung von TFF2 an die Muzine zu untersuchen, wurde mittels S-500-Lauf versucht, die Muzine MUC5AC und MUC6 zu trennen, um so den Bindepartner für TFF2 eindeutig zu klären.

Der S-500-Lauf wurde von einer humanen Korpusprobe (MC406A) durchgeführt. Das Absorptionsprofil und das Profil für TFF2 nach Auswertung von Western Blots der R 15%igen SDS-PAGE sind in Abbildung 29 dargestellt.

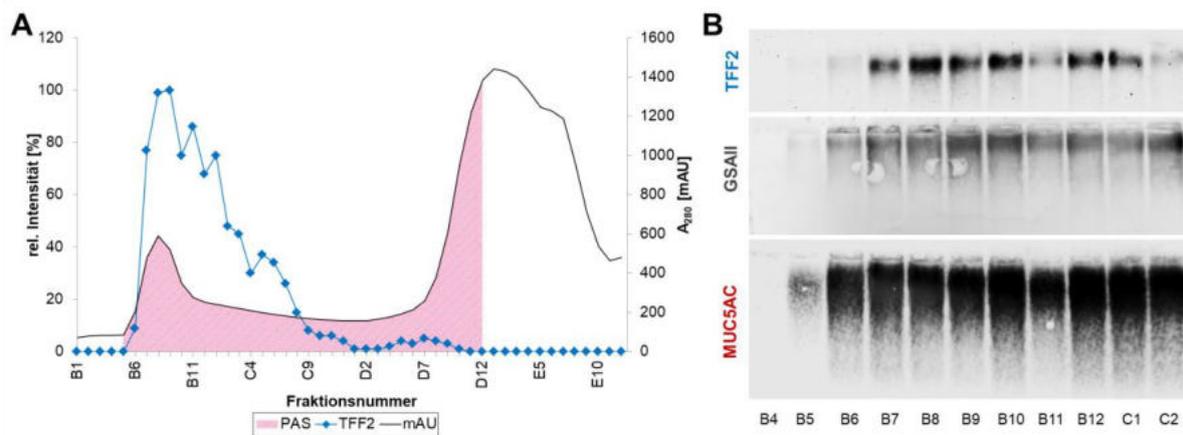


Abbildung 29: S-500-Lauf eines humanen Korpusextraktes (MC406A). A: UV-Profil und TFF2-Profil. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) bzw. TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). B: 1% AgGE mit Western Blot bzgl. TFF2, GSAII und MUC5AC. 1%ige AgGE der Fraktionen B4-C2 des S-500-Laufs und Western Blot bzgl. TFF2, MUC6 (GSAII) und MUC5AC. Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenlauf bei pH 7.0.

TFF2 eluiert hauptsächlich in den Fraktionen B6-C9 von der Säule. Diese Fraktionen sind ebenfalls PAS-positiv. Für den TFF2-Hauptpeak (Fr. B4-C2) wurden 1%ige AgGE mit Western Blot bzgl. TFF2, MUC6 (GSAII) und MUC5AC angefertigt. Die Auswertung zeigt, dass die Muzine nicht getrennt werden können, MUC5AC und MUC6 (GSAII) sind beide in den Fraktionen B5-C2 zu finden (siehe Abbildung 29).

B: S-500-Lauf eines humanen Korpusextrakts E1 (MC577) nach Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol

Da die Muzine über S-500-Lauf nach normaler Extraktion nicht getrennt werden konnten (siehe Abbildung 29), wurde in einem weiteren Experiment der Extrakt (E1, siehe Abbildung 10) einer Korpusprobe (MC577) vor dem Auftragen auf die Säule mit 1% β -Mercaptoethanol gekocht und der ÜS auf die Säule gegeben.

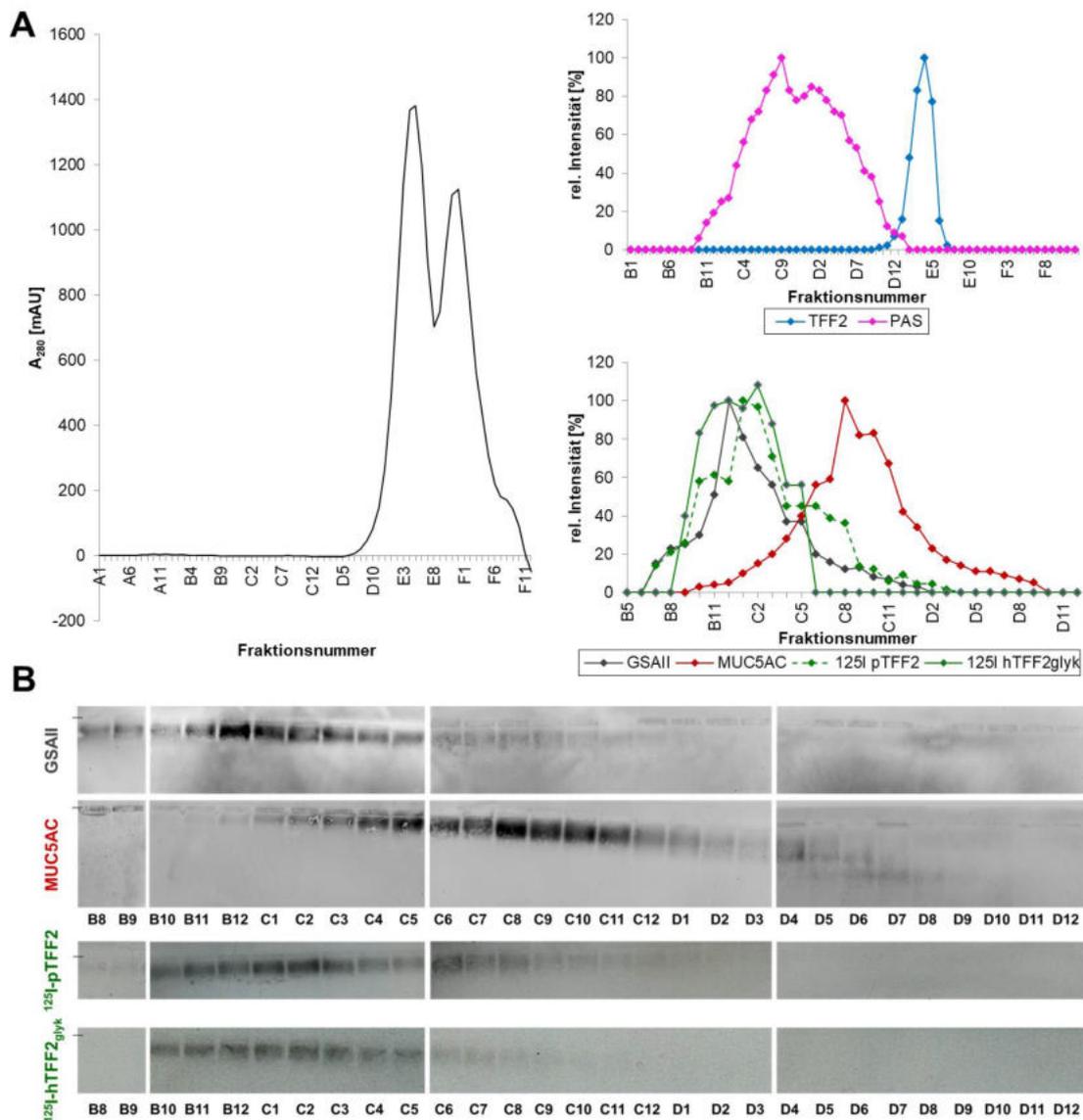


Abbildung 30: S-500-Lauf eines humanen Korpusextrakts E1 (MC577) nach Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol. A: UV-Profil und Profile für TFF2/PAS/GSAII/MUC5AC und $^{125}\text{I-pTFF2}/^{125}\text{I-hTFF2}_{\text{glyk}}$. UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie die Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) und TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Außerdem gezeigt sind Profile der semiquantitativen Auswertungen für MUC5AC und GSAII (1%ige AgGE) bzw. für die Hybridisierung mit $^{125}\text{I-pTFF2}$ (1%ige AgGE, Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer) bzw. $^{125}\text{I-hTFF2}_{\text{glyk}}$ (1%ige AgGE, Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer). B: AgGE und Western Blot bzgl. GSAII, MUC5AC und Hybridisierung mit $^{125}\text{I-pTFF2}$ bzw. $^{125}\text{I-hTFF2}_{\text{glyk}}$. 1%ige AgGE und Western Blot bzgl. GSAII und MUC5AC der Fraktionen B8-D12 der S-500 nach Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol (siehe A). Ebenfalls dargestellt sind 1%ige AgGE nach Hybridisierung mit $^{125}\text{I-pTFF2}$ (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer) bzw. $^{125}\text{I-hTFF2}_{\text{glyk}}$ (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, MUC5AC: rote Kurve, GSAII: graue Kurve, $^{125}\text{I-pTFF2}$: grüne, gestrichelte Kurve, $^{125}\text{I-hTFF2}_{\text{glyk}}$: grüne, durchgezogene Kurve. Strich: Taschen Agarosegel. Säulenlauf bei pH 7.0.

TFF2 wird durch das Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol vollständig aus dem Mukuspeak herausgelöst und eluiert nun in den niedermolekularen Fraktionen (E1-E7) (siehe Abbildung 30A). MUC5AC kann auf dem Western Blot nach AgGE vor allem in den Fraktionen C5-C11 (PAS-Maximum) unterhalb der Geltasche detektiert werden. MUC6 (GSAII-Reaktivität) ist jedoch in den Fraktionen B10-C4 zu finden (siehe Abbildung 30B). Dort binden ebenfalls die

radioaktiv markierten Peptide ^{125}I -pTFF2 und ^{125}I -hTFF2_{glyk}. MUC6-positive Fraktionen konnten folglich durch Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol von MUC5AC-positiven Fraktionen getrennt werden.

5.1.1.4. Bindungsstudien mit ^{125}I -TFF2

Um die Bindung von TFF2 an die Mukusbestandteile unter verschiedenen Bedingungen zu betrachten, wurden Bindungsstudien mit ^{125}I -markiertem TFF2 durchgeführt. Es wurde entweder humanes rekombinantes TFF2_{glyk} bzw. TFF2_{non-glyk} oder pTFF2 für die Iodierung verwendet. Die Hybridisierung der Membranen mit radioaktivem Material wurde vom technischen Assistenten Herrn R. Stürmer durchgeführt. Wie die einzelnen Mukusfraktionen generiert wurden, ist den folgenden Abschnitten zu entnehmen.

A: Hybridisierung von Fraktionen nach S-75HL eines Korpusextrakts mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk}

Ein Extrakt einer humanen Korpusprobe wurde über S-75HL gereinigt (siehe Anhang 11). TFF2 liegt in mukusgebundener Form (TFF2_{groß}, ca. 75%) und als freies TFF2 (TFF2_{klein}, ca. 25%) vor. Von den Fraktionen B10-B11 (TFF2_{groß}) und von Proben des TFF2_{klein} (Fr. D3-D4) wurden 7%ige SDS-PAGEs (siehe Abbildung 31A) bzw. 1%ige AgGEs (siehe Abbildung 31B) angefertigt. Zum einen erfolgte ein Western Blot bzgl. TFF2 (1%ige AgGE und R 7%ige SDS-PAGE), MUC5AC und GSAll (1%ige AgGE), zum anderen die Hybridisierung mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} (siehe Abbildung 31).

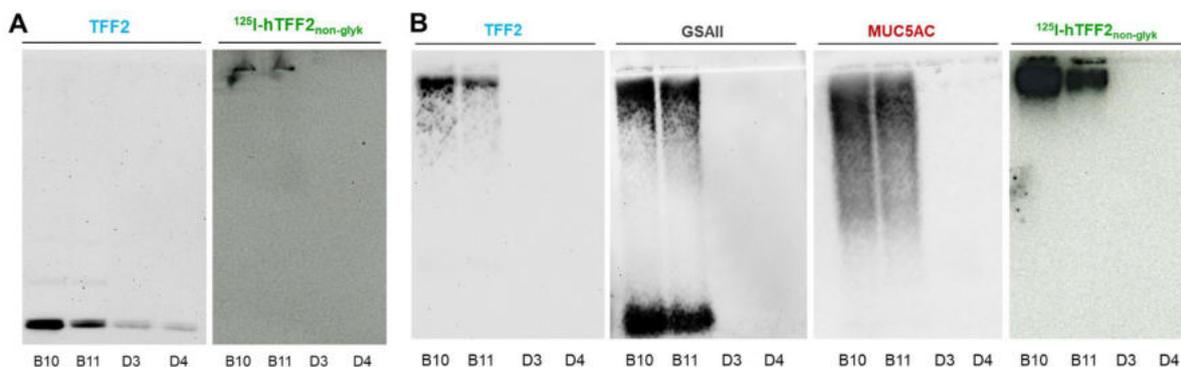


Abbildung 31: Hybridisierung einer Korpusprobe (MC406A) mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} nach S-75HL-Lauf (siehe Anhang 11). A: 7%ige R SDS-PAGE. 7%ige R SDS-PAGE der Fraktionen B10-B11 (TFF2_{groß}) und D3-D4 (TFF2_{klein}) nach S-75HL-Lauf (siehe Anhang 11) und Western Blot bzgl. TFF2 sowie Hybridisierung mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer). **B: 1%ige AgGE.** 1%ige AgGE der Fraktionen B10-B11 und D3-D4 und Western Blot bzgl. TFF2, GSAll, MUC5AC und ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer).

Säulenlauf bei pH 7.0.

Sowohl bei TFF2_{groß} als auch bei TFF2_{klein} kann ein Signal für TFF2 an der Lauffront der 7%igen SDS-PAGE detektiert werden. ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} bindet jedoch nur die Fraktionen B10 und B11 am Übergang von Geltasche zum Sammelgel (siehe Abbildung 31A). Zusätzlich zur

7%igen SDS-PAGE sind auch 1%ige AgGE mit Western Blot bzgl. TFF2, GSAll, MUC5AC und ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} gezeigt (siehe Abbildung 31B). Ein Signal, sowohl für TFF2 als auch für MUC5AC, GSAll (MUC6) und ^{125}I -hTFF2_{non-glyk}, ist jeweils in den Fraktionen B10 und B11 im hochmolekularen Bereich zu erkennen.

B: Charakterisierung der Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} an TFF2-freien Mukus

TFF2-freier Mukus wurde, wie in Anhang 12 beschrieben, durch Kochen eines Mukuspeaks mit 1% SDS/30 mM EDTA generiert. Nach ResQ-Lauf des TFF2-freien Mukuspeaks eluieren MUC6 (GSAll) und MUC5AC in den Fraktionen A1-A4 (25% MUC5AC und 3% GSAll) und in den Fraktionen B4-C12 (75% MUC5AC und 97% GSAll). Die Fraktionen A2, B8 und B10 wurden nach AgGE unter verschiedenen Bedingungen mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} hybridisiert, um die Bindung an die Muzine näher zu charakterisieren. Variiert wurde zum einen der pH-Wert (A), zum anderen die Ca^{2+} -Konzentration (B) des Puffers. Auch eine Inhibition mit dem Lektin GSAll (erkennt α - und β -GlcNAc-Reste (Ihida et al. 1988)) bzw. dem Antikörper HIK1083 (erkennt nur α -GlcNAc-Rest (Ishihara et al. 1996)) wurde durchgeführt (C).

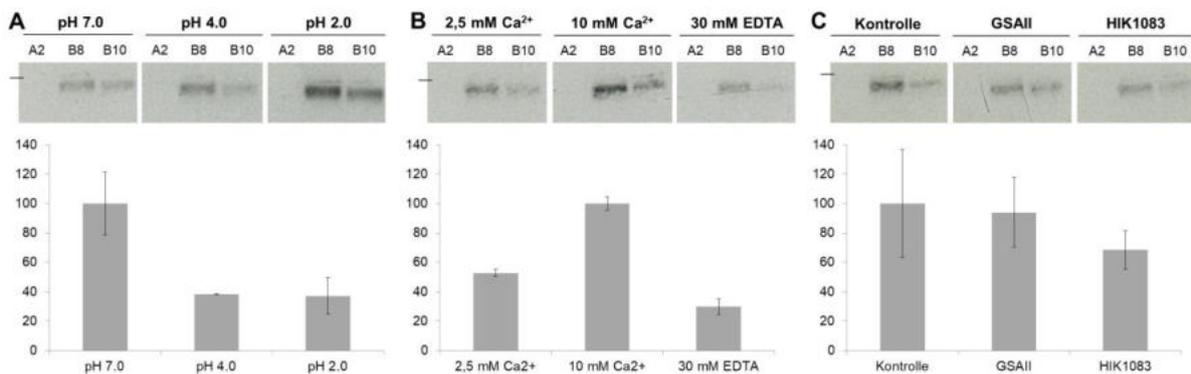


Abbildung 32: Hybridisierung eines TFF2-freien Mukus (MC406A) mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} unter verschiedenen Bedingungen. 1%ige AgGE der Fraktionen A2, B8 und B10 nach ResQ-Lauf des TFF2-freien Mukus (siehe Anhang 12). Die Blots wurden mit ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Unter allen getesteten Bedingungen kann keine Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} an die Fraktion A2 festgestellt werden, deshalb wurde für die Auswertung nur der Mittelwert von B8 und B10 gebildet und in den Diagrammen aufgetragen. **A: pH-Wert:** pH-Wert des Hybridisierungspuffes 7.0 (20 mM Tris/HCl), 4.0 (McIlvaine) bzw. 2.0 (verd. HCl). **B: Ca²⁺-Konzentration:** Hybridisierungspuffer mit 2,5 mM Ca²⁺, 10 mM Ca²⁺, bzw. 30 mM EDTA versetzt. **C: Inhibition mit GSAll bzw. HIK1083:** Inhibiert wurde die Hybridisierung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} durch vorherige Inkubation der Membran mit GSAll bzw. HIK1083 (je 1:1000, 1h, RT). Die Proben die miteinander verglichen wurden, sind auf dem gleichen Agarosegel gelaufen und wurden zusammen geblotted (gleiches Probenvolumen, gleiche Menge an ^{125}I -hTFF2, gemeinsam entwickelt), jedoch auf Grund der Übersichtlichkeit digital neu zusammengesetzt. Strich: Taschen Agarosegel. Fehlerbalken: Standardabweichung δ (n=2).

Bei der Fraktion A2 kann unter keiner der gewählten Bedingungen ein Signal für die Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} detektiert werden. An die Fraktionen B8 und B10 bindet ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} unterhalb der Geldtaschen.

(A) Variation des pH-Werts: Bei einem pH-Wert von 7.0 ist die Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} am stärksten. Mit abnehmendem pH-Wert nimmt auch das Signal für ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} ab.

(B) **Variation der Ca^{2+} -Konzentration:** Bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 10 mM ist das Signal für die Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} am stärksten, am schwächsten bei dem Puffer ohne Ca^{2+} (30 mM EDTA).

(C) **Inhibition der Bindung durch GSAll/HIK1083:** Die Bindung von ^{125}I -hTFF2_{non-glyk} kann durch vorherige Inkubation der Membran mit HIK1083 und GSAll leicht herabgesetzt werden.

C: Charakterisierung der Bindung von ^{125}I -hTFF2_{glyk} bzw. ^{125}I -pTFF2 an Muzine nach deren Trennung über S-500

Eine Mukusprobe, die hauptsächlich MUC6 (GSAll) enthält, wurde durch S-500-Lauf eines Extraktes E1 nach Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol (Abbildung 30) generiert. Die Fraktionen B12 und C1 (GSAll-Maximum) wurden nach einer 1%igen AgGE unter verschiedenen Bedingungen mit ^{125}I -pTFF2 bzw. ^{125}I -hTFF2_{glyk} hybridisiert. Variiert wurde zum einen der pH-Wert (A) und zum anderen die Ca^{2+} -Konzentration (D) des Puffers. Auch eine Inhibition mit dem Lektin GSAll (erkennt α - und β -GlcNAc-Reste (Ihida et al. 1988)) bzw. dem Antikörper HIK1083 (erkennt nur α -GlcNAc-Rest (Ishihara et al. 1996)) (C) sowie eine Inhibition mit je 0,1 M bzw. 1 mM α - bzw. β -Methylgalaktosid (B; Bestandteil der MUC6 typischen Zuckereinheit GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow R (Ishihara et al. 1996)) wurden durchgeführt (siehe Abbildung 33).

An beide Fraktionen B12 und C1 binden sowohl ^{125}I -pTFF2 als auch ^{125}I -hTFF2_{glyk} unterhalb der Geltaschen an die Membran. Bei den verschiedenen Bedingungen können folgende Ergebnisse beobachtet werden:

(A) **Variation des pH-Werts:** Bei einem pH-Wert von 7.0 ist die Bindung am stärksten. Mit abnehmendem pH Wert, nimmt auch das Signal für ^{125}I -pTFF2 bzw. ^{125}I -hTFF2_{glyk} ab.

(B) **Inhibition mit α - bzw. β -Methylgalaktosid:** Während α -Methylgalaktosid die Intensität der Bindung von ^{125}I -pTFF2 bzw. ^{125}I -hTFF2_{glyk} nur tlw. herabsetzt, kann β -Methylgalaktosid die Bindung nahezu vollständig inhibieren.

(C) **Inhibition mit GSAll/HIK1083:** Durch Inkubation der Membran mit HIK1083 kann das Signal für die Bindung fast vollständig inhibiert werden. GSAll kann bei ^{125}I -hTFF2_{glyk} die Intensität der Bindung herabsetzen, bei ^{125}I -pTFF2 wird diese jedoch durch GSAll kaum beeinflusst.

(D) **Variation der Ca^{2+} -Konzentration:** Am schwächsten ist das Signal bei dem Puffer ohne Ca^{2+} (30 mM EDTA). Es scheint jedoch keinen signifikanten Unterschied zu machen, ob 2,5 mM bzw. 10 mM Ca^{2+} im Puffer vorliegen.

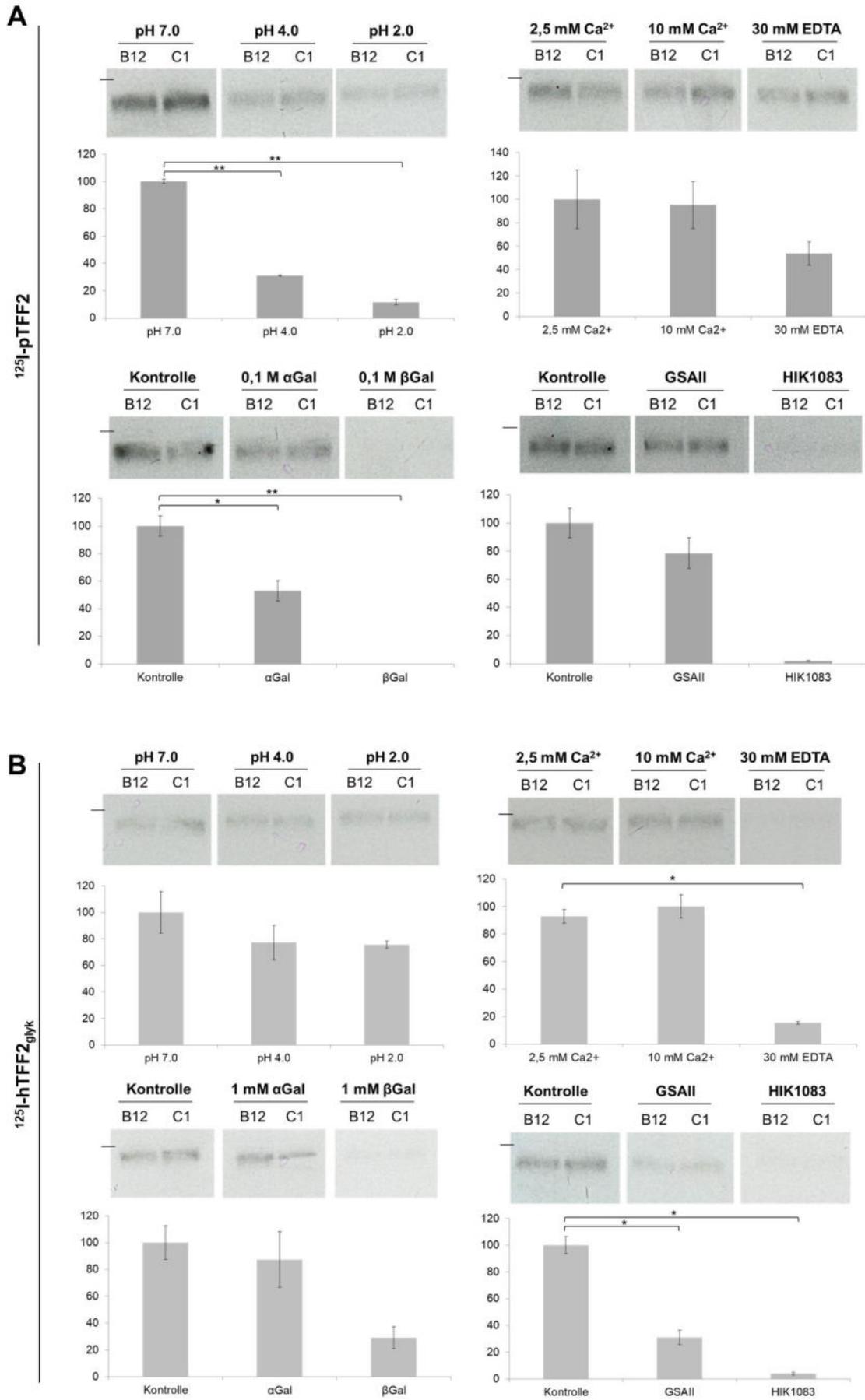


Abbildung 33: Hybridisierung einer MUC6-angereicherten Fraktion nach S-500 mit ^{125}I -pTFF2 bzw. ^{125}I -hTFF2_{glyk} unter verschiedenen Bedingungen. Dargestellt sind 1%ige AgGE der Fraktionen B12 und C1 nach S-500-Lauf eines mit 1% β -Mercaptoethanol gekochten Extraktes E1 (MC577, siehe Abbildung 30). Die Membranen wurden mit ^{125}I -pTFF2 bzw. ^{125}I -hTFF2_{glyk} (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. **pH Wert:** pH-Wert des Hybridisierungspuffer 7.0 (20 mM Tris/HCl), 4.0 (McIlvaine) bzw. 2.0 (verd. HCl). **Ca²⁺-Konzentration:** Hybridisierungspuffer mit 2,5 mM Ca²⁺, 10 mM Ca²⁺ bzw. 30 mM EDTA versetzt. **Inhibition mit α - bzw. β -Methylgalaktosid.** Inhibiert wurde die Bindung durch Hybridisierung in Gegenwart von α - bzw. β -Methylgalaktosid (je 0,1 M bzw. 1 mM). **Inhibition mit GSAll/HiK1083:** Inhibiert wurde die Bindung durch vorherige Inkubation der Membran mit GSAll bzw. HiK1083 (je 1:1000, 1h). Die Proben, die miteinander verglichen wurden, sind auf dem gleichen Agarosegel gelaufen und wurden zusammen geblotted (gleiches Probenvolumen, gleiche Menge an ^{125}I -TFF2, gemeinsam entwickelt), jedoch auf Grund der Übersichtlichkeit digital neu zusammengesetzt. Strich: Taschen Agarosegel. Die Bindungsintensität wurde mittels Image J semiquantitativ bestimmt und der Mittelwert der beiden Fraktionen B12 und C1 im Diagramm grafisch dargestellt. Fehlerbalken: Standardabweichung δ (n=2). Signifikanz (Zwei-Stichproben F-Test) mit * = $p \leq 0,05$ und ** = $p \leq 0,01$.

5.1.1.5. Elution von TFF2 aus dem NR SDS-Gel

Auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE eines humanen Magenextraktes zeigt TFF2 Signale bei verschiedenen Größenbereichen (18 kDa, 23 kDa, 25 kDa). Um herauszufinden wie diese Formen prozentual verteilt sind, wurden sie aus einer 15%igen SDS-PAGE nach Coomassiefärbung eluiert und deren Verhältnis zueinander bestimmt (siehe Abbildung 34).

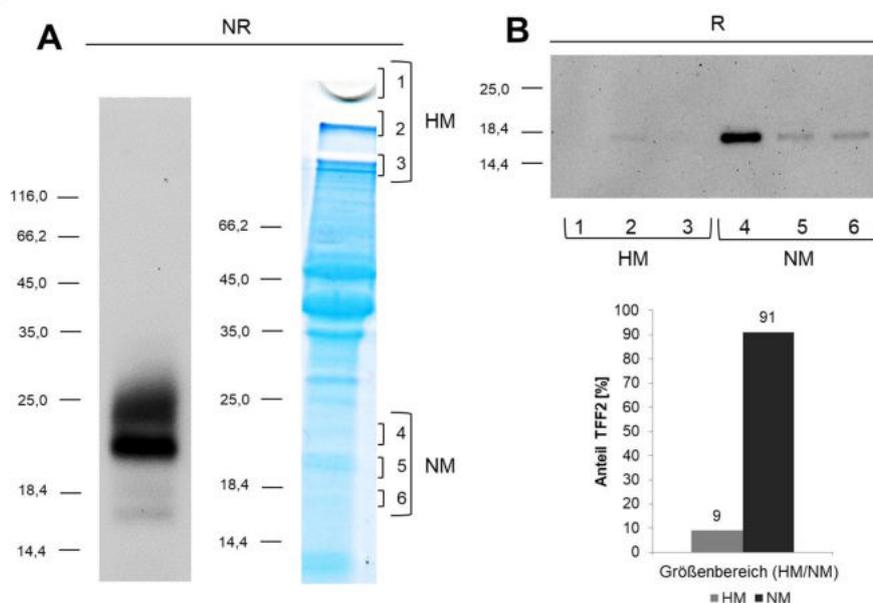


Abbildung 34: Verteilung von TFF2 aus dem humanen Korpus (MC479) im NR SDS-Gel. **A:** NR 15%ige SDS-PAGE des Extraktes mit Western Blot bzgl. TFF2 bzw. nach Coomassiefärbung. **B:** R 15%ige SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der aus dem Coomassiegel eluierten Banden 1-6 (1=Tascheninhalt) sowie die semiquantitative Auswertung der Banden für TFF2.

HM: hochmolekular, NM: niedermolekular. Extraktion bei pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

In Abbildung 34A (links) ist zunächst ein Western Blot nach NR SDS-PAGE bzgl. TFF2 abgebildet. Für TFF2 können die drei oben beschriebenen Banden detektiert werden. Aus dem mit Coomassie gefärbten NR SDS-Gel (Abbildung 34A, rechts) wurden die markierten Banden eluiert (HM: hochmolekular, NM: niedermolekular) und diese auf einer R 15%igen SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 analysiert (siehe Abbildung 34B). TFF2 kann vor

allem (91%) im niedermolekularen Bereich detektiert werden (Banden 4-6). Nur schwache Signale (9%) sind in der Bande 2 (hochmolekulare Form) zu erkennen. Neben der Verteilung von TFF2 im Extrakt wurde auch die Verteilung von TFF2 einer gereinigten Probe nach S-75HL analysiert (siehe Anhang 13). Auch dort konnte TFF2 fast ausschließlich im niedermolekularen Bereich detektiert werden.

5.1.2. TFF2 im humanen Duodenum

5.1.2.1. S-75-HL Läufe humaner Duodenumproben

Um TFF2 im humanen Duodenum charakterisieren zu können, wurden S-75HL-Läufe verschiedener Duodenumproben durchgeführt (siehe Abbildung 35). TFF2 liegt meist entweder nur PAS-assoziiert oder nur in den niedermolekularen Fraktionen vor; selten kommt TFF2 in beiden Varianten vor.

Bei fünf Duodenumproben (Duo118, Duo350, Duo360, Duo559, Duo435) kann TFF2 ausschließlich im niedermolekularen Bereich (C3-D1) detektiert werden (siehe Abbildung 35C-G). Bei zwei Duodenumproben (siehe Abbildung 35A-B; Duo246 und Duo554) liegt TFF2 fast ausschließlich im hochmolekularen Bereich vor, der Anteil an TFF2_{klein} ist kleiner als 10%. Nur bei einer der Duodenumproben liegt TFF2 zum Großteil (88%) in den niedermolekularen Fraktionen vor und kann dennoch auch in den PAS-positiven Fraktionen (12%) gefunden werden (siehe Abbildung 35H, Duo365).

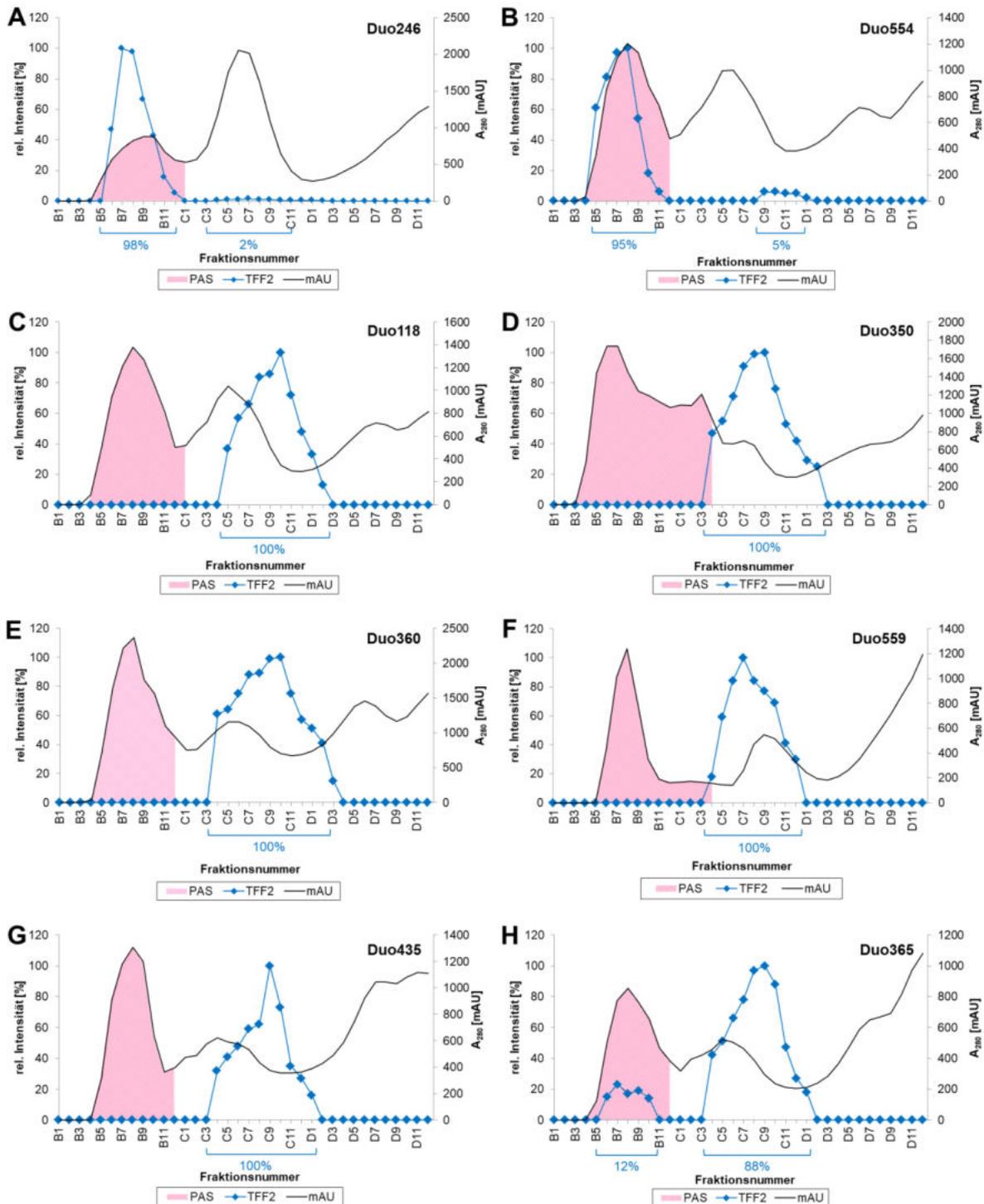


Abbildung 35: Elutionsprofile von S-75HL-Läufen verschiedener humaner Duodenumproben. Dargestellt sind jeweils das UV-Profil [mAU] bei 280 nm und die Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) sowie für PAS (Dot Blot).

A: Duo246; B: Duo554; C: Duo118; D: Duo350; E: Duo360; F: Duo559; G: Duo435, H: Duo365. Die S-75HL-Läufe von Duo559 und Duo246 wurden bei einem pH-Wert von 6.0 durchgeführt, alle anderen erfolgten bei pH 7.0. UV-Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche.

A: Hochmolekulare TFF2-Form im humanen Duodenum

Nach S-75HL-Lauf der humanen Duodenumprobe Duo246 liegt TFF2 fast vollständig (98%) im hochmolekularen Bereich vor (siehe Abbildung 36A). Auf dem Western Blot nach R SDS-

PAGE sind Banden bei ca. 18 kDa und ca. 14 kDa für TFF2 zu erkennen. Nicht-reduzierend können mehrere Banden (ca. 35 kDa, ca. 25 kDa, ca. 18 kDa, ca. 14 kDa sowie ca. 45 kDa) detektiert werden (siehe Abbildung 36C). Die TFF2-positiven Fraktionen des hochmolekularen Bereichs (B6-B11, TFF2_{groß}) wurden vereinigt und auf eine ResQ-Säule aufgetragen. TFF2 eluiert dort in den Fraktionen B3-B10 (ca. 200 mM-ca. 500 mM NaCl) von der Säule (siehe Abbildung 36B). Dieses TFF2 zeigt auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE Signale bei ca. 18 kDa (Doppelbande) und ca. 14 kDa. Die Banden bei 18 kDa konnten nach Elution aus dem reduzierenden Coomassiegel positiv für TFF2 getestet werden (Daten Anhang 14). Auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE werden Banden für TFF2 bei ca. 25 kDa, ca. 35 kDa, Doppelbanden bei ca. 18 kDa und schwache Banden bei ca. 66 kDa und ca. 14 kDa sichtbar (siehe Abbildung 36D).

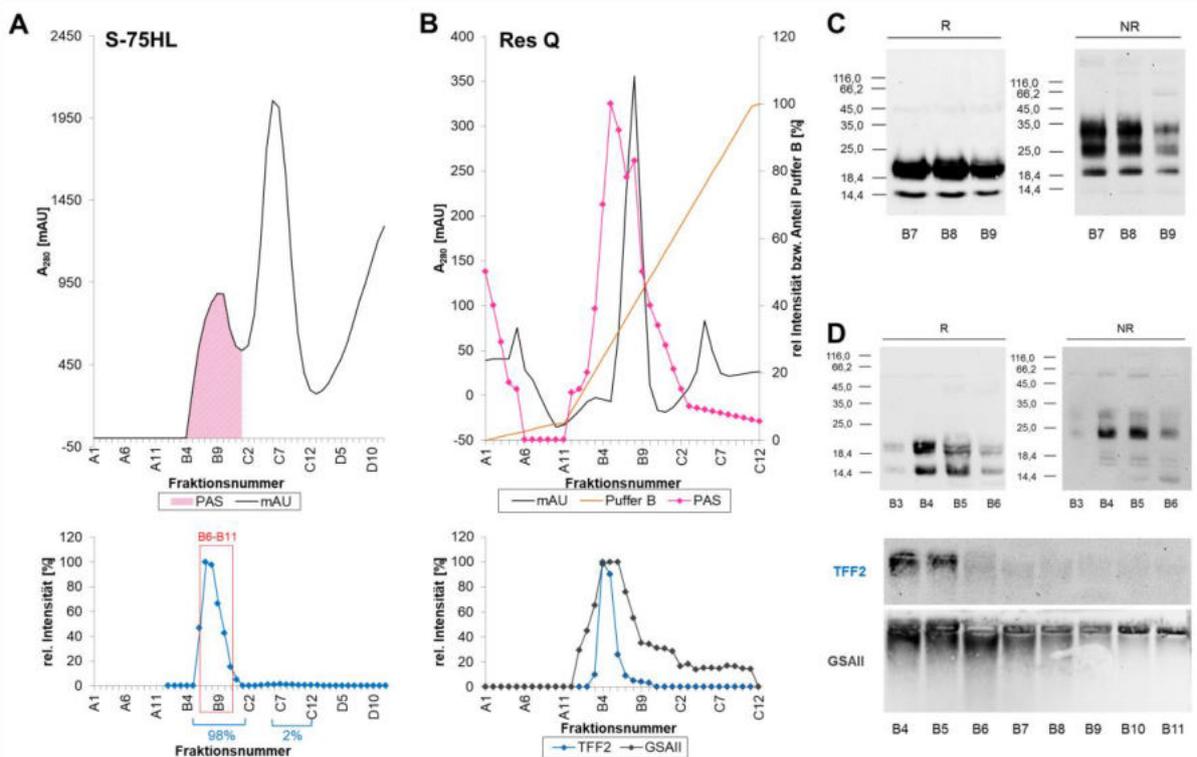


Abbildung 36: Hochmolekulare Form von TFF2 im humanen Duodenum. **A:** S-75HL eines Duodenumextrakts (Duo246). **Oben:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). **Unten:** Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). **B:** ResQ-Lauf von TFF2_{groß} (Fr. B6-B11). **Oben:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). **Unten:** Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) und GSAll (1%ige AgGE). **C:** R und NR SDS-PAGE von TFF2_{groß} nach S-75HL. 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen B7-B9 nach S-75HL-Lauf (siehe A). **D:** R und NR SDS-PAGE bzw. AgGE von TFF2_{groß} nach ResQ-Lauf. 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen B3-B6 nach ResQ von TFF2_{groß} (siehe B) sowie 1%ige AgGE der Fraktionen B4-B11 nach ResQ von TFF2_{groß} (siehe B) bzgl. TFF2 und GSAll.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, GSAll: dunkelgraue Kurve, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 6.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Auf dem Western Blot nach AgGE kann ein Signal für TFF2 unterhalb der Geltaschen, vor allem in den Fraktionen B4-B5, detektiert werden. In den Fraktionen B4-B11 kann auch MUC6 (GSAll) unterhalb der Geltaschen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36D).

B: Niedermolekulare TFF2-Form im humanen Duodenum

Nach S-75HL-Lauf der humanen Duodenumprobe 559 kommt TFF2 ausschließlich als freies TFF2 (TFF2_{klein}) in den Fraktionen C3-D1 vor, eluiert also im niedermolekularen Bereich (siehe Abbildung 37A). Reduzierend ist für TFF2 eine Bande bei ca. 18 kDa zu beobachten, auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE werden Banden bei ca. 45 kDa, ca. 25 kDa, ca. 18 kDa und kleiner 14 kDa sichtbar (siehe Abbildung 37C). Die Fraktionen C6-D1 wurden vereinigt und über eine ResQ-Säule gereinigt. Wie in Abbildung 37B zu erkennen ist, gibt es beim ResQ-Lauf zwei Elutionsmaxima für TFF2. Zum einen eluiert TFF2 direkt in den Fraktionen A1-A4 (ca. 0-10 mM NaCl) und zum anderen in den Fraktionen B2-B7 (ca. 150-350 mM NaCl). Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE sind für beide TFF2 Entitäten Banden bei ca. 18 kDa sichtbar. Nicht-reduzierend werden in den Fraktionen A1-A3 mehrere Banden sichtbar (ca. 45 kDa, ca. 25 kDa, ca. 18 kDa und kleiner 14 kDa), in den Fraktionen B2-B4 kann jedoch lediglich eine ca. 18 kDa Bande beobachtet werden (siehe Abbildung 37D).

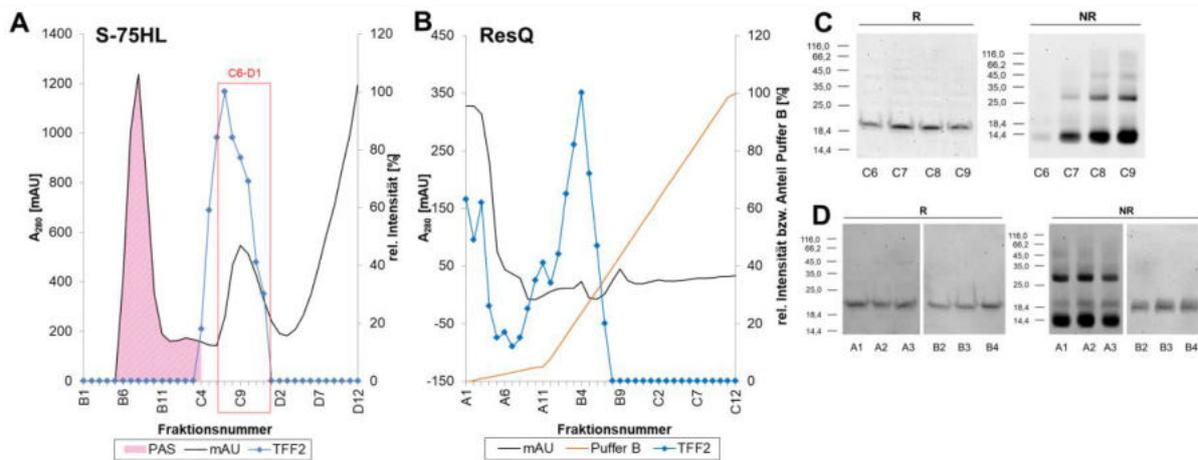


Abbildung 37: Niedermolekulare Form von TFF2 im humanen Duodenum. **A:** S-75HL eines Duodenumextrakts (Duo559). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) und TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). **B:** ResQ-Lauf von TFF2_{klein} (C6-D1 nach S-75HL (A)). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). **C:** R und NR SDS-PAGE von TFF2_{klein} nach S-75HL. R und NR 15%ige SDS-PAGE und anschließender Western Blot bzgl. TFF2 von den Fraktionen C6-C9 nach S-75HL (siehe A). **D:** R und NR SDS-PAGE von TFF2_{klein} nach ResQ-Lauf. R und NR 15%ige SDS-PAGE und anschließender Western Blot bzgl. TFF2 von den Fraktionen A1-A3 bzw. B2-B4 nach ResQ (siehe B).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 6.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

5.2. TFF2 im Schwein

5.2.1. TFF2 im Magen vom Schwein

5.2.1.1. Vergleich von TFF2 aus dem Korpus von Schwein vs. Mensch

Extrakte aus dem Korpus von Mensch und Schwein wurden zunächst über S-75HL gereinigt (siehe Anhang 15), Proben aus dem hochmolekularen Bereich anschließend auf eine 15%ige SDS-PAGE aufgetragen und durch Western Blot bzgl. TFF2 analysiert und miteinander verglichen (siehe Abbildung 38).

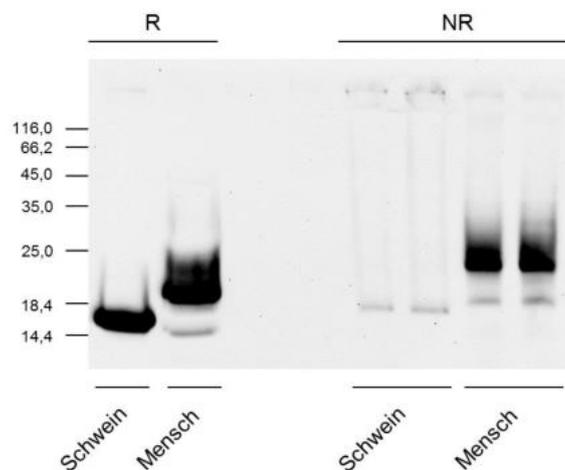


Abbildung 38: Vergleich von TFF2 aus dem Korpus von Schwein vs. Mensch. 15%ige R und NR SDS-PAGE und anschließender Western Blot bzgl. TFF2 des hochmolekularen Bereichs nach S-75HL (Mensch: MC383, Schwein: 6; siehe Anhang 15).

Säulenläufe bei pH 6.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE kann für TFF2 aus dem Schweinmagen eine Bande bei ca. 16 kDa detektiert werden. Für den Mensch ist sowohl eine deutliche Bande bei ca. 18 kDa als auch eine schwächere Bande bei ca. 14 kDa sichtbar. NR wird die Immunreaktivität für TFF2 aus dem Magen vom Schwein sehr stark abgeschwächt, eine schwache Bande bei ca. 16 kDa und ein Signal an der Grenze von Geltasche zu Sammelgel sind sichtbar. Für den Mensch werden Banden bei ca. 23 kDa und ca. 18 kDa auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE sichtbar.

5.2.1.2. S-75HL-Läufe von Proben aus dem Schweinmagen: Korpus vs. Antrum

A: S-75HL-Lauf einer Gewebeprobe aus dem Korpus

Die Reinigung von TFF2 aus dem Korpus vom Schwein erfolgte durch ein zweistufiges Reinigungsprotokoll. Zunächst wurde ein Extrakt (Schwein 6) über S-75HL gereinigt. Die TFF2-positiven Fraktionen des hochmolekularen Bereichs (TFF2_{groß}) wurden anschließend vereinigt und im zweiten Schritt über eine ResQ-Säule gereinigt (Abbildung 39).

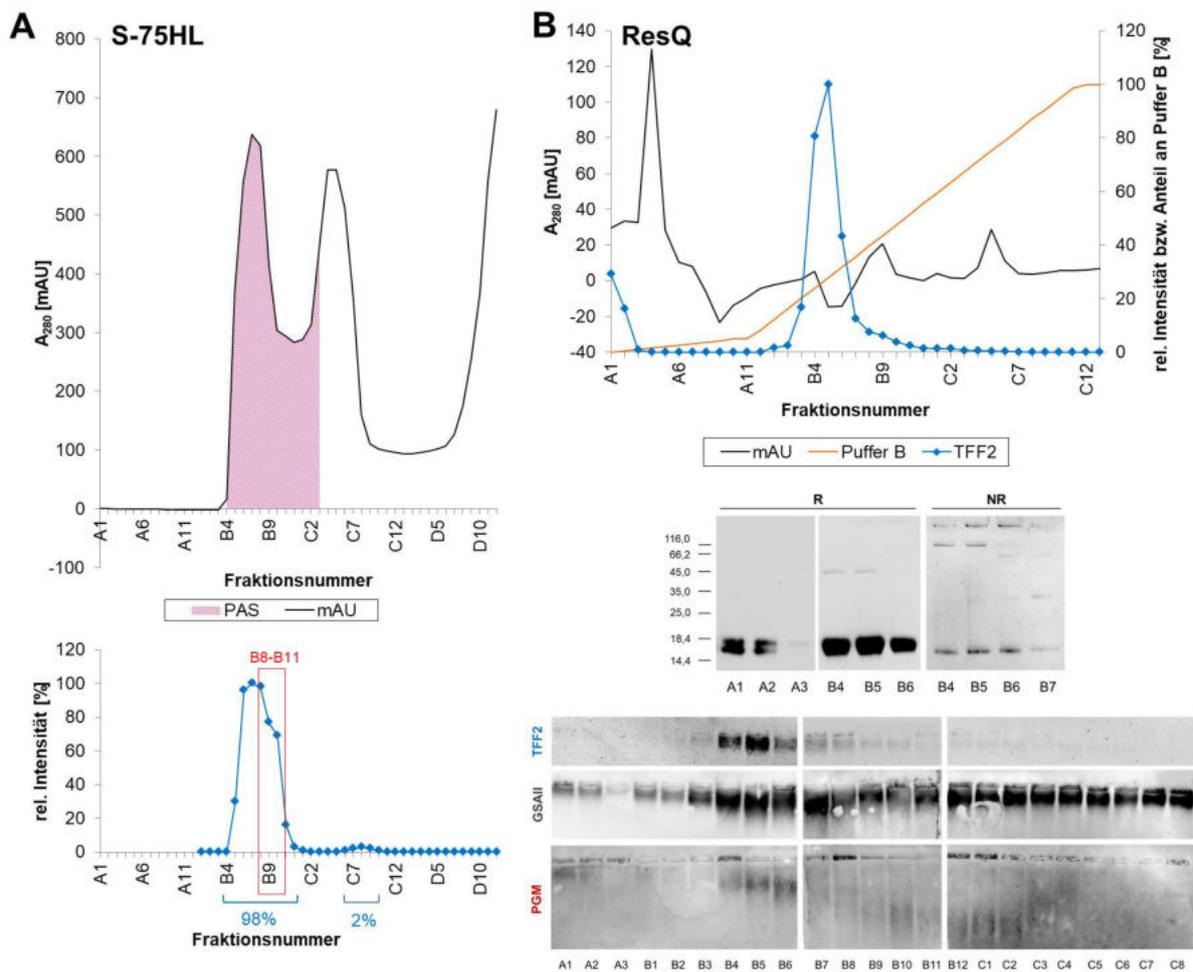


Abbildung 39: Reinigung von TFF2 aus dem Korpus vom Schwein. A: S-75HL-Lauf eines Korpusextrakts vom Schwein (Gewebe, Schwein 6). Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Unten: Profil für TFF2 nach semiquantitativer Auswertung (R 15%ige SDS-PAGE). B: ResQ-Lauf des hochmolekularen Bereichs (Fr. B8-B11) nach S-75HL. Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Unten: R bzw. NR 15%ige SDS-PAGE und anschließender Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen A1-A3 bzw. B4-B7 nach ResQ. Außerdem gezeigt sind 1%ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2, GSALII (MUC6) und PGM (MUC5AC).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve; PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 6.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Nach dem S-75HL-Lauf liegt TFF2 zu ca. 98% im hochmolekularen Bereich (Fr. B5-B12) vor (siehe Abbildung 39A). Die Fraktionen B8-B11 wurden vereinigt und über eine ResQ-Säule gereinigt. TFF2 eluiert dort in zwei Entitäten von der Säule (Fr. A1-A3 bzw. B1-C3). TFF2 der Fraktionen A1-A3 kann nur auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE detektiert werden (Doppelbande bei ca. 16 kDa). TFF2 der Fraktionen B4-B7 zeigt auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE ebenfalls eine Doppelbande bei ca. 16 kDa; NR werden Banden bei ca. 16 kDa und am Gelstart sichtbar (in Fraktion B7 auch ca. 30 kDa Bande). Diese hochmolekulare TFF2-Form kann auch auf dem Western Blot nach AgGE unterhalb der Geltaschen detektiert werden. MUC6 (GSALII-Reaktivität) ist in den Fraktionen A1-A2 und B1-B8 unterhalb der Geltasche zu finden und MUC5AC (PGM-Reaktivität, (Nordman et al.

1998; Turner et al. 1999)) kann in den Fraktionen A1-A2 und B4-C4 nach AgGE detektiert werden.

B: S-75HL-Lauf einer Gewebeprobe aus dem Antrum

Die Reinigung von TFF2 aus dem Antrum vom Schwein erfolgte ebenfalls durch ein zweistufiges Reinigungsprotokoll. Dazu wurde ein Extrakt (Schwein 6) mittels S-75HL gereinigt und der Mukuspeak im zweiten Schritt auf eine ResQ-Säule aufgetragen (Abbildung 40).

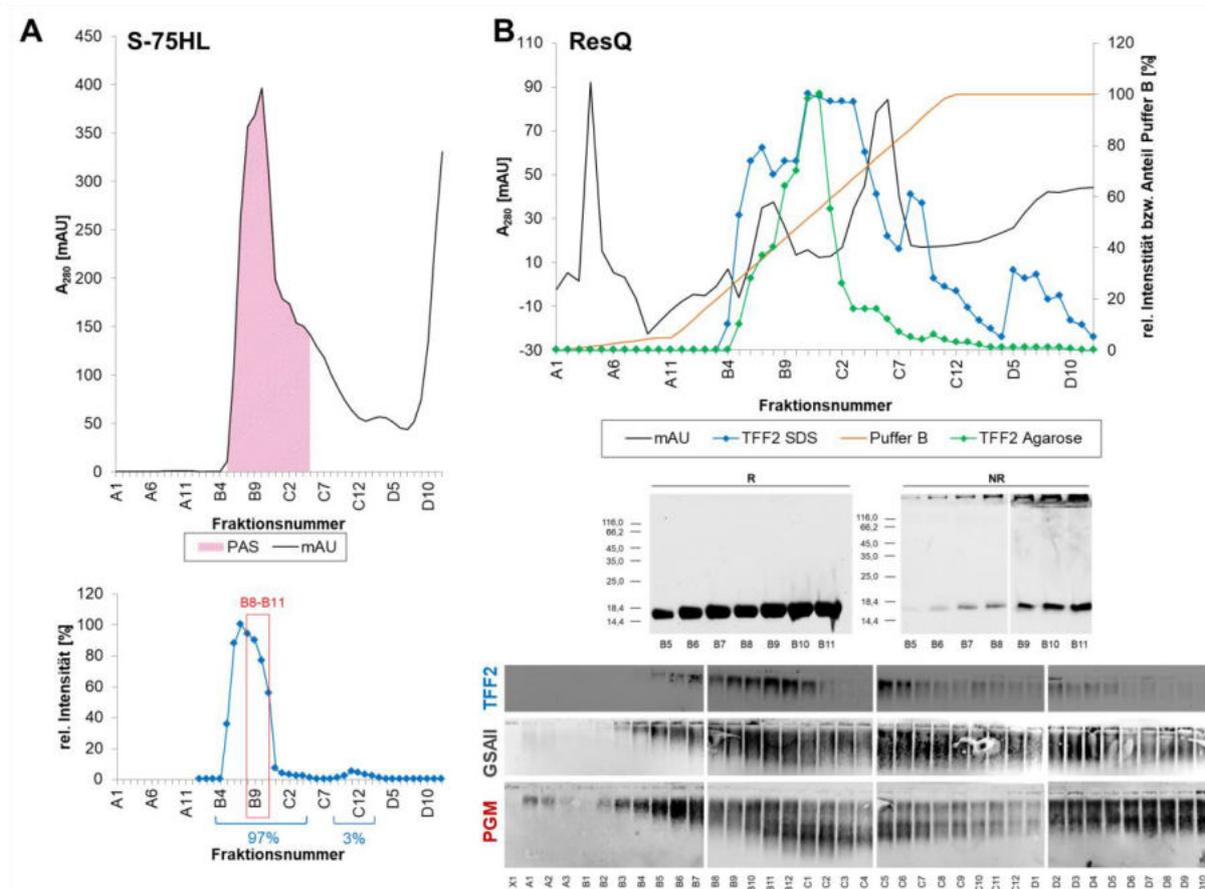


Abbildung 40: Reinigung von TFF2 aus dem Antrumgewebe vom Schwein. A: S-75HL-Lauf Antrum Schwein (Gewebe, Schwein 6). Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Unten: Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). B: ResQ-Lauf des hochmolekularen Bereichs (Fr. B8-B11). Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE bzw. 1%ige AgGE). Unten: Vergleichende R bzw. NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen B5-B11 nach ResQ und Western Blot bzgl. TFF2. Außerdem dargestellt sind 1%ige AgGE der Fraktionen X1, A1-D10 nach ResQ und Western Blot bzgl. TFF2, GSAII (MUC6) und PGM (MUC5AC).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2 (semiquantitative Auswertung SDS-PAGE): blaue Kurve, TFF2 (semiquantitative Auswertung AgGE): grüne Kurve, PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 6.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Nach dem S-75HL-Lauf des Antrumextrakts liegt TFF2 zu 97% im hochmolekularen Bereich vor (siehe Abbildung 40A). Die Fraktionen B8-B11 wurden vereinigt und auf eine ResQ-Säule aufgetragen. Dort eluiert TFF2 in den Fraktionen B5-D12 von der Säule. Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE zeigt TFF2 ein Signal bei ca. 16 kDa; nicht-reduzierend

sind Signale bei ca. 16 kDa und um den Gelstart zu erkennen. TFF2 und MUC6 (GSALI-Reaktivität) sind in den Fraktionen B5-C10 der AgGE unterhalb der Geltaschen zu finden. MUC5AC (PGM-Reaktivität) kann dort ebenfalls detektiert werden, zeigt aber zusätzlich auch in den Fraktionen A1-A3 ein Signal.

C: Gegenüberstellung von S-75HL-Läufen abgekratzter Mukosa vs. Gewebe aus dem Schweinemagen

Es wurden drei verschiedene Korpusproben analysiert. Dabei wurde entweder abgekratzte Mukosa (Mukosa wurde mittels Skalpell von der Gewebeprobe abgekratzt) oder Gewebe (gesamte Gewebeprobe einschließlich Mukosa) extrahiert und über S-75HL (siehe Abbildung 41) gereinigt.

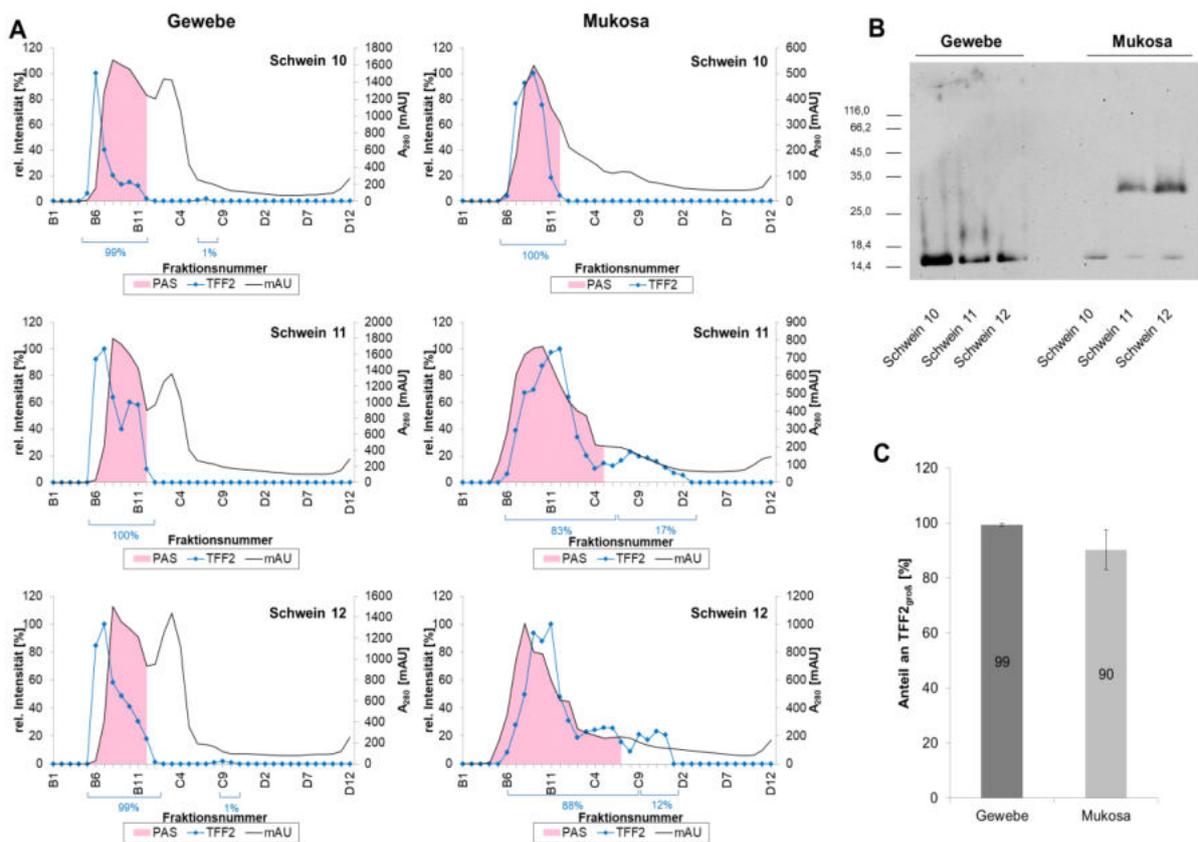


Abbildung 41: Abgekratzte Mukosa vs. Gewebe Korpus Schwein. A: S-75HL-Läufe von Korpusproben dreier verschiedener Schweine (Gewebe vs. Mukosa). UV-Profile [mAU] bei 280 nm sowie Profile der semiquantitativen Auswertungen für PAS (Dot Blot) bzw. TFF2 (15%ige R SDS-PAGE). **B: Vergleichende NR SDS-PAGE von TFF2 aus Gewebe vs. abgekratzte Mukosa.** NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen aus dem Mukuspeak nach S-75HL (Schwein 10_{Gewebe}: B6; Schwein 11_{Gewebe}: B7, Schwein 12_{Gewebe}: B7; Schwein 10_{Mukosa}: B9, Schwein 11_{Mukosa}: B11, Schwein 12_{Mukosa}: B12) und Western Blot bzgl. TFF2. **C: Anteil an hochmolekularem TFF2 (TFF2_{groß}) im Gewebe vs. abgekratzter Mukosa.** Dargestellt ist ein Diagramm, welches den Anteil an TFF2_{groß} in Bezug auf die TFF2-Gesamtmenge nach S-75HL-Lauf von Gewebe bzw. abgekratzter Mukosa vergleicht.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 8.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben. Fehlerbalken: Standardabweichung δ (n=3).

Bei den S-75HL-Läufen der Gewebeprobe und der Proben abgekratzter Mukosa liegt TFF2 fast ausschließlich im hochmolekularen Bereich (Fr. B5-B12) vor (Abbildung 41A), lediglich ca. 10% liegen als TFF2_{klein} bei Proben abgekratzter Mukosa vor. Das Verhältnis von TFF2_{klein} zu TFF2_{groß} nach S-75HL von abgekratzter Mukosa variiert jedoch je nach Schweineprobe stark (siehe Anhang 16). Von den TFF2-Hauptfraktionen aus dem hochmolekularen Bereich wurde eine vergleichende NR 15%ige SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 angefertigt (Abbildung 41B). Bei den Proben vom Gewebe sind Signale bei ca. 16 kDa und schwach am Übergang von den Taschen zum Sammelgel zu erkennen. Bei den Proben der abgekratzten Mukosa können Banden bei ca. 16 kDa und bei ca. 30 kDa für TFF2 detektiert werden.

Auch von drei verschiedenen Antrumproben wurde entweder abgekratzte Mukosa oder Gewebe extrahiert und mittels S-75HL gereinigt (siehe Abbildung 42). Bei allen Läufen liegt TFF2 fast ausschließlich PAS-assoziert vor.

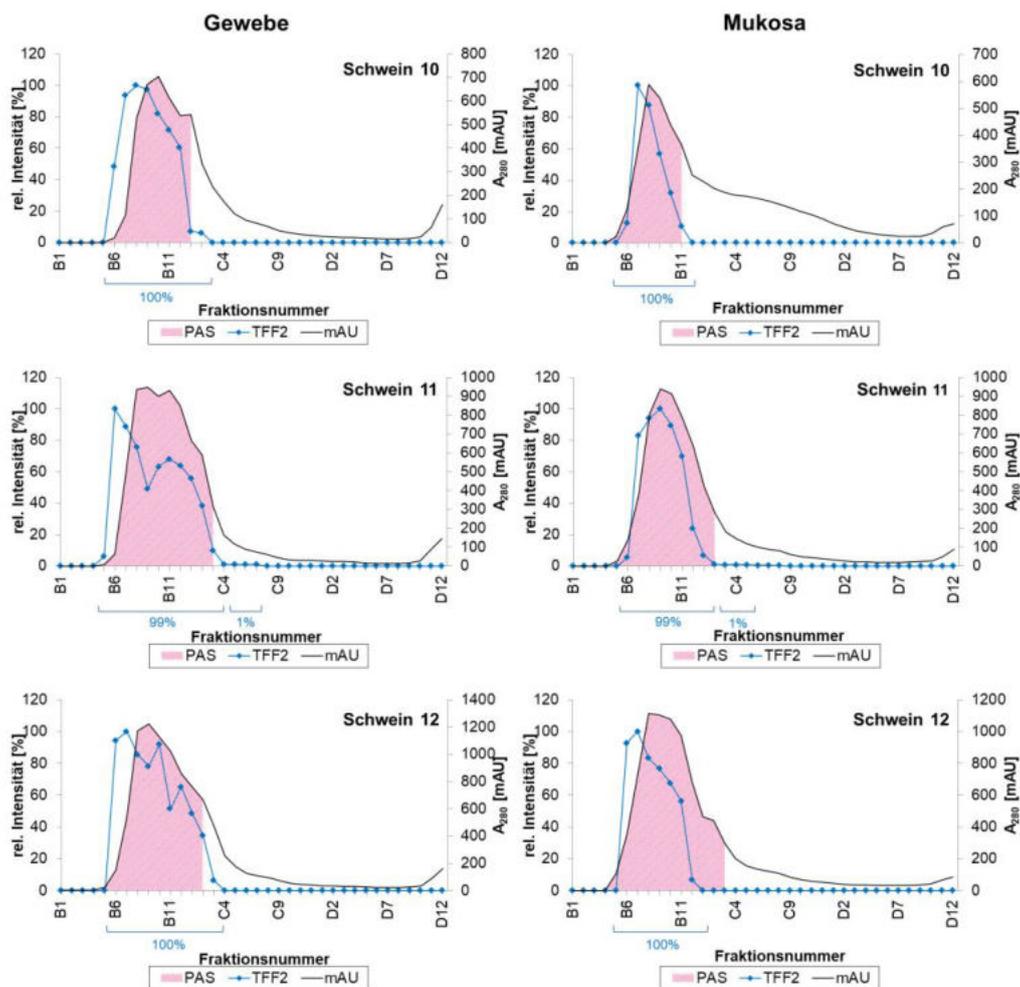


Abbildung 42: Abgekratzte Mukosa vs. Gewebe Antrum Schwein. S-75HL Läufe von Antrumproben dreier verschiedener Schweine (Gewebe vs. Mukosa). Dargestellt sind UV-Profile [mAU] bei 280 nm der S-75HL-Säulen und die semiquantitativen Auswertungen für PAS (Dot Blot) bzw. TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 8.0.

D: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Korpusproben vom Schwein

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Vielzahl von Extraktionsmethoden für die Reinigung von TFF2 aus dem Korpus des Schweins. Durch diese Extraktionsmethoden sollte die Bindung von TFF2 an den Mukus im Schwein untersucht und charakterisiert werden sowie Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zur Bindung von TFF2 an den Mukus im Mensch aufgeklärt werden. Die Extraktion erfolgte dazu bei verschiedenen pH-Werten (Test pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung), unter Zugabe verschiedener Zusätze (Test der Abhängigkeit der Bindung von Ca^{2+} -Konzentration) oder durch Kochen der Proben (Test auf Bindungsart, kovalent/ nicht-kovalent). Dabei wurde entweder ein Rohextrakt (Extrakt) behandelt oder ein zuvor gereinigter Mukuspeak (Mukuspeak nach S-75HL-Lauf). Die Extrakte wurden über eine S-75HL-Säule gereinigt und der Anteil an $\text{TFF2}_{\text{groß}}$ zu $\text{TFF2}_{\text{klein}}$ bestimmt. Eine Übersicht aller Extraktionsmethoden und der prozentuale Anteil von $\text{TFF2}_{\text{klein}}$ sind in Tabelle 22 und in Abbildung 43 dargestellt.

Tabelle 22: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Korpusproben- Anteil an $\text{TFF2}_{\text{klein}}$. Angegeben ist der prozentuale Anteil von $\text{TFF2}_{\text{klein}}$ (freies TFF2) nach S-75HL-Läufen unter verschiedenen Bedingungen. Variiert wurden pH-Wert, Zusätze und Kochen. Es ist angegeben, ob ein Extrakt (E) oder ein gereinigter Mukuspeak (M, gereinigt durch S-75HL-Lauf) der Behandlung unterzogen wurde und ob es sich bei dem Extrakt um abgekratzte Mukosa (M, Mukus mit Skalpell vom Gewebe angekratzt) oder Gewebe (G, gesamte Gewebeprobe einschließlich Mukosa) handelt.

Zusätze	Anzahl Experimente (n)	Kochen	Extrakt bzw. Mukuspeak	Gewebe bzw. Mukosa	pH	% $\text{TFF2}_{\text{klein}}$	Stand. Ab. (δ)	Anhang/ Abbildung
keine	8	nein	E	M	8.0	23	+/- 26	Anhang 16
keine	1	nein	E	G	8.0	0	-	Anhang 16
keine	1	nein	E	G	6.0	2	-	Abbildung 39
TRizol [®]	2	nein	E	G	7.0	1	+/- 0.5	Abbildung 44/Anhang 23
1% SDS	1	nein	M	G	8.0	0	-	Anhang 18
6 M GuaHCl	1	nein	E	G	6.0	0	-	Anhang 22
6 M Urea/ 2,5 mM CaCl_2	1	nein	E	G	6.0	1	-	Anhang 22
30 mM EDTA/ 1% SDS	11	ja	M	G	8.0	53	+/- 37	Anhang 25/ Abbildung 45
1% SDS	2	ja	M	G	8.0	0	0	Anhang 18
30 mM EDTA	3	ja	E	M	6.0	51	+/- 27	Anhang 19
keine	1	ja	E	G	6.0	9	-	Anhang 21
6 M GuaHCl	1	ja	M	G	8.0	0	-	Anhang 20

Bei der Extraktion von Gewebe (gesamtes Gewebe inkl. Mukosa) liegt TFF2 nach S-75HL-Lauf fast ausschließlich mukusassoziiert ($\text{TFF2}_{\text{groß}}$) vor. Dabei spielen pH-Wert und die Zugabe verschiedener Zusätze keine Rolle (siehe Tabelle 22). Lediglich das Kochen mit

1% SDS/30 mM EDTA führt tlw. dazu, dass der Anteil an freiem TFF2 (TFF2_{klein}) auf etwa 50% erhöht wird. Wird nur abgekratzte Mukosa (mit dem Skalpell vom Gewebe abgetrennt) extrahiert (pH-Wert 8.0), so liegt TFF2 auch bereits tlw. als freies TFF2 vor (siehe Tabelle 22, Abbildung 41). Durch Kochen mit 30 mM EDTA kann der Anteil des freien TFF2 hier leicht auf 50% erhöht werden.

Die Ergebnisse schwanken stark zwischen den verschiedenen Tieren, so dass sich dadurch tlw. hohe Standardabweichungen ergeben (siehe Anhang 17; Anhang 24). Die Ergebnisse der Extraktionsexperimente sind in Abbildung 43 zusammenfassend dargestellt.

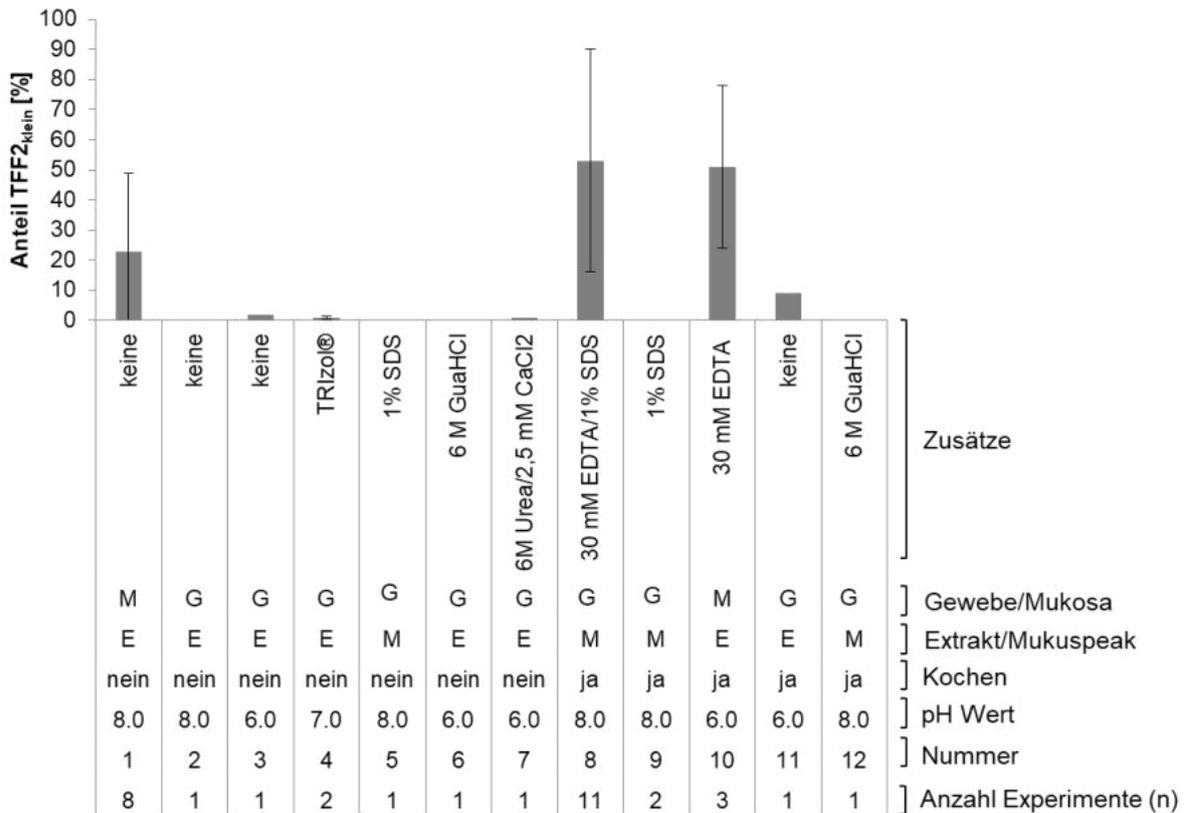


Abbildung 43: Anteil an TFF2_{klein} bei verschiedenen Extraktionsmethoden für Korpusproben vom Schwein. Dargestellt ist der Anteil an TFF2_{klein} nach S-75HL-Lauf der verschiedenen Extraktionsmethoden. Es ist angegeben, welche Zusätze bei der Extraktion benutzt wurden, welcher pH-Wert genutzt wurde und ob der Extrakt (E) bzw. ein vorher über S-75HL gereinigter Mukuspeak (M) gekocht wurde. Außerdem ist angegeben, ob Gewebe (G, gesamtes Gewebe inkl. Mukosa) oder abgekratzte Mukosa (M, mit Skalpell von Gewebe gelöst) verwendet wurde. Fehlerbalken: Standardabweichung δ .

Da bei humanen Korpusproben durch eine TRIZOL®-Extraktion TFF2 aus dem Mukusbereich gelöst werden konnte, wurde dieses Experiment im Schweinemagen wiederholt, um so Rückschlüsse auf die Art der Bindung ziehen zu können. Die TRIZOL®-Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Proteinpellet wurde vor dem Auftragen auf die Säule für 2h bei 50 °C in 1% SDS gelöst. Das Ergebnis der Reinigung ist in Abbildung 44 gezeigt.

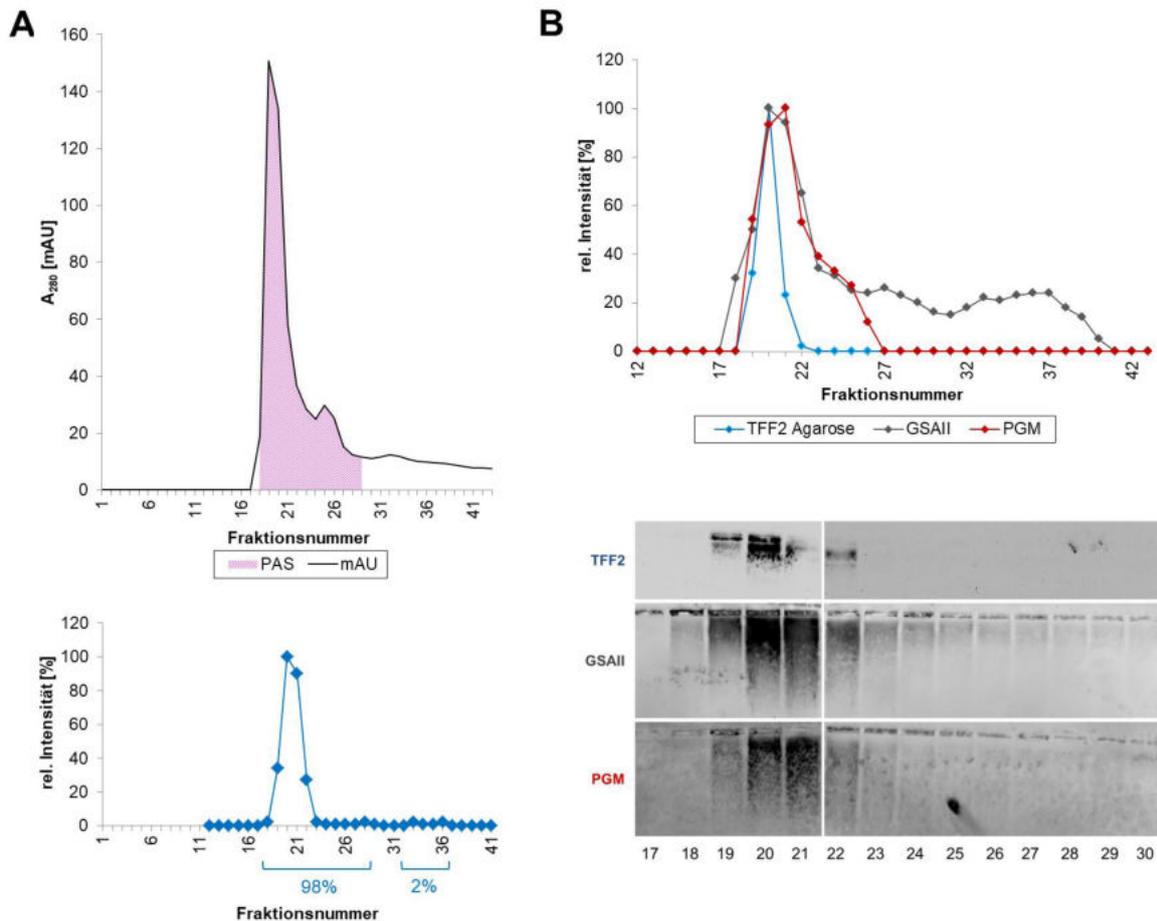


Abbildung 44: TRIZOL[®]-Extraktion von Korporgewebe Schwein. A: S-75HL-Lauf des Proteinpellets nach TRIZOL[®]-Extraktion. Oben: UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie Profil der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot). Unten: Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). B: AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSAll (MUC6) und PGM (MUC5AC). Oben: Profil der semiquantitativen Auswertung bzgl. TFF2, GSAll (MUC6) und PGM (MUC5AC) nach 1%iger AgGE. Unten: 1%ige AgGE und anschließendem Western Blot bzgl. TFF2, GSAll (MUC6) und PGM (MUC5AC) der Fraktionen 17-30 nach S-75HL.
Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, GSAll: graue Kurve, PGM: rote Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH-Wert 7,0, Probe: Schwein 6.

Nach der TRIZOL[®]-Extraktion des Gewebes ist TFF2 fast ausschließlich im hochmolekularen Bereich (Fr. 19-28) der S-75HL-Säule zu finden (siehe Abbildung 44A). Auf dem Western Blot nach AgGE kann ein Signal für TFF2 in den Fraktionen 19-22 direkt unterhalb der Geltasche detektiert werden. Auch MUC6 (GSAll) und MUC5AC (PGM) können in diesen Fraktionen detektiert werden, schmieren jedoch weiter ins Agarosegel (siehe Abbildung 44C). Auch eine Inkubation des Gewebes in verd. HCl, pH 1.0 vor der TRIZOL[®]-Extraktion führt nicht zu einer Erhöhung des Anteils an TFF2_{klein} (siehe Anhang 23).

Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, kann TFF2 im Schweinemagen tlw. durch Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA aus dem Mukus herausgelöst werden. Um dieses TFF2_{klein} weiter zu charakterisieren, wurden zunächst drei S-75HL-Läufe von Gewebeextrakten (Schwein 6 bzw. 7) angefertigt (siehe Abbildung 45A-C, links).

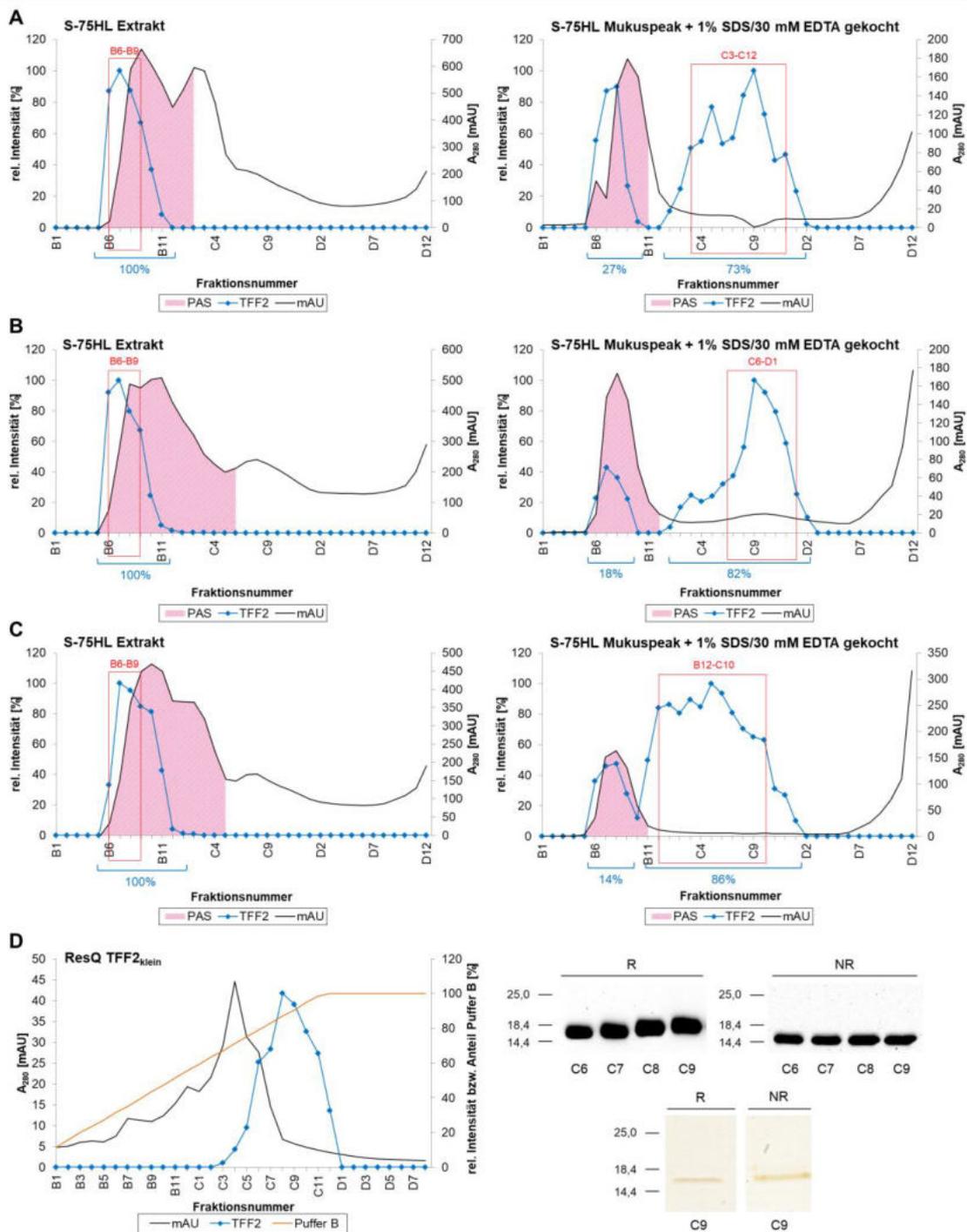


Abbildung 45: Generierung von freiem TFF2 (TFF2_{klein}) aus Korpusproben vom Schwein durch Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. A-C: S-75HL-Läufe. Links: S-75HL-Läufe von Extrakten (A: Schwein 6 bzw. B-C: Schwein 7). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) und TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Die Fraktionen B6-B9 wurden jeweils vereint und mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht. Rechts: S-75HL-Läufe der Mukuspeaks nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) und TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Die Fraktionen mit freiem TFF2 (TFF2_{klein}) wurden vereint (A: C3-C12; B: C6-D1; C: B12-C10) und mittels ResQ gereinigt. D: ResQ-Lauf des TFF2_{klein} nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. Links: UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Rechts: R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen C5-C9 und anschließender Western Blot bzgl. TFF2 sowie R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktion C9 mit anschließender Silberfärbung.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 8.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

TFF2 kommt dort ausschließlich im hochmolekularen Bereich (Fr. B6-B11) vor. Die Fraktionen mit mukusassoziiertem TFF2 (TFF2_{groß}, B6-B9) wurden jeweils vereinigt und mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht. Die gekochten Proben wurden dann wiederum jeweils auf eine S-75HL-Säule aufgetragen (Abbildung 45A-C, rechts). Bei allen drei Läufen liegt TFF2 nun zum großen Teil ($\geq 70\%$) als freies TFF2 (TFF2_{klein}) vor. Dieses freie TFF2 aller Läufe wurde vereinigt und im letzten Schritt mittels ResQ gereinigt. TFF2 eluiert dort in den Fraktionen C3-C12 (ab ca. 600 mM NaCl) von der Säule und zeigt sowohl auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE als auch nach NR SDS-PAGE ein Signal bei ca. 16 kDa. Auch im Silbergel ist eine Bande im Größenbereich um 16 kDa zu erkennen (siehe Abbildung 45D). Die Bande aus dem NR Silbergel wurde durch Herrn Dr. H. Kalbacher (Universität Tübingen; IFIB) analysiert (positiv für TFF2, siehe Anhang 26). Diese Extraktion wurde mehrfach wiederholt, der Anteil an herauslösbarem TFF2 variiert dabei recht stark zwischen den verschiedenen Tieren (siehe Anhang 25).

E: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Antrumproben vom Schwein

Auch bei Antrumproben des Schweins wurden diverse Extraktionsmethoden angewendet, um die Bindung von TFF2 an den Mukus zu untersuchen. Dazu wurden entweder Extrakte oder zuvor gereinigte Mukuspeaks (Reinigung mittels S-75HL) unter verschiedenen Bedingungen extrahiert und über S-75HL gereinigt. Danach erfolgte die Bestimmung des Anteils an freiem TFF2 (TFF2_{klein}) im Verhältnis zum gesamten TFF2. Ein Überblick aller Extraktionsmethoden stellen Tabelle 23 und Abbildung 46 dar.

Tabelle 23: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Antrumproben vom Schwein - Anteil an TFF2_{klein}. Angegeben ist der prozentuale Anteil von freiem TFF2 (TFF2_{klein}) nach S-75HL-Läufen verschieden extrahierter Antrumproben. Variiert wurden pH-Wert, Zusätze und Kochen. Es ist angegeben, ob ein Extrakt (E) oder ein gereinigter Mukuspeak (M, gereinigt durch S-75HL-Lauf) der Behandlung unterzogen wurde und ob es sich bei dem Extrakt um abgekratzte Mukosa (M, mit Skalpell vom Gewebe abgekratzte) oder Gewebe (G, Gesamtheit aus Gewebe und Mukosa) handelt.

Zusätze	Anzahl der Experimente (n)	Kochen	Extrakt/Mukuspeak	Gewebe/Mukosa	pH	% TFF2 _{klein}	Stand. Ab. δ	Abbildung/Anhang
keine	2	nein	E	G	8.0	2	+/- 2	Abbildung 42
keine	1	nein	E	G	6.0	3	-	Abbildung 40
keine	2	nein	E	M	8.0	3	+/- 2	Anhang 27
keine	1	nein	E	M	6.0	0	-	-
30 mM EDTA/ 1% SDS	2	ja	M	G	8.0	66	+/- 21	Anhang 27
20 mM EDTA/ 0,1% SDS	1	ja	M	G	8.0	1	-	Anhang 28

Wird eine Gewebeprobe oder eine Probe abgekratzter Mukosa ohne Zusätze extrahiert und im Anschluss über S-75HL gereinigt, so ist ein Anteil von $\geq 98\%$ großem TFF2 zu beobachten, unabhängig vom verwendeten pH-Wert. Wird ein nach S-75HL gereinigter Mukuspeak bei pH 8.0 mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht, so kann TFF2 aus dem hochmolekularen Bereich herausgelöst werden (ca. 66% TFF2_{klein}). Erfolgt eine Extraktion durch Kochen mit 0,1% SDS/20 mM EDTA kann jedoch kein kleines TFF2 generiert werden. Die Ergebnisse der Extraktionsexperimente sind in Abbildung 46 zusammengefasst.

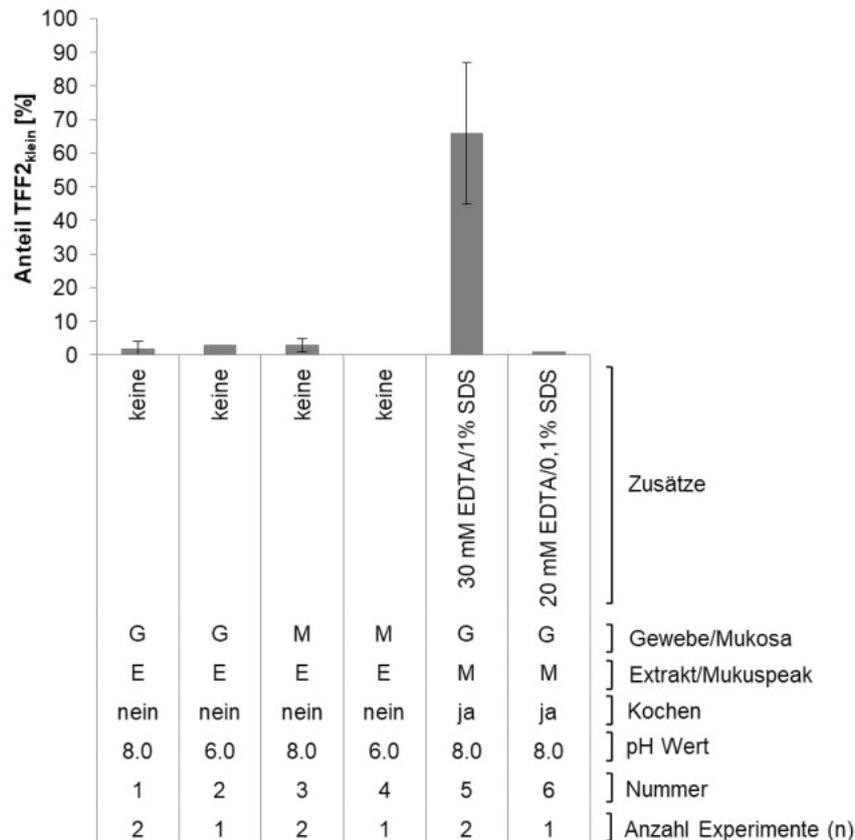


Abbildung 46: Anteil an TFF2_{klein} bei verschiedenen Extraktionsmethoden für Antrumproben vom Schwein. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an TFF2_{klein} nach S-75HL-Läufen bei verschiedenen Extraktionsmethoden. Außerdem ist angegeben, ob ein Extrakt (E) oder ein gereinigter Mukuspeak (M, nach S-75HL-Lauf) der Behandlung unterzogen wurde und ob es sich bei dem Extrakt um abgekratzte Mukosa (M, mit Skalpell vom Gewebe abgekratzt) oder Gewebe (G, Gesamtheit aus Gewebe und Mukosa) handelt. Fehlerbalken: Standardabweichung δ .

5.2.1.3. Hybridisierung mit ¹²⁵I-TFF2

Um die Bindung von TFF2 an die Mukusbestandteile zu betrachten und näher zu charakterisieren, wurden Bindungsstudien mit ¹²⁵I-markiertem TFF2 durchgeführt. Alle Hybridisierungen mit radioaktivem Material wurden von Herrn R. Stürmer durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Generierung einer gereinigten Mukusprobe durch S-75HL eines Extrakts von abgekratzter Mukosa aus dem Korpus vom Schwein (siehe Anhang 29A). Es erfolgte eine 1%ige AgGE der Fraktion B8 (TFF2- und PAS-positiv); die Membran wurde anschließend mit ¹²⁵I-pTFF2 (Abbildung 47) hybridisiert. Außerdem erfolgte auch die

Hybridisierung in Gegenwart von α - bzw. β -Methylgalaktosid (0,1 M), da Methyl-D-Galaktosid Bestandteil der evolutionär konservierten, MUC6 typischen Zuckereinheit GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow R ist (Ishihara et al. 1996).

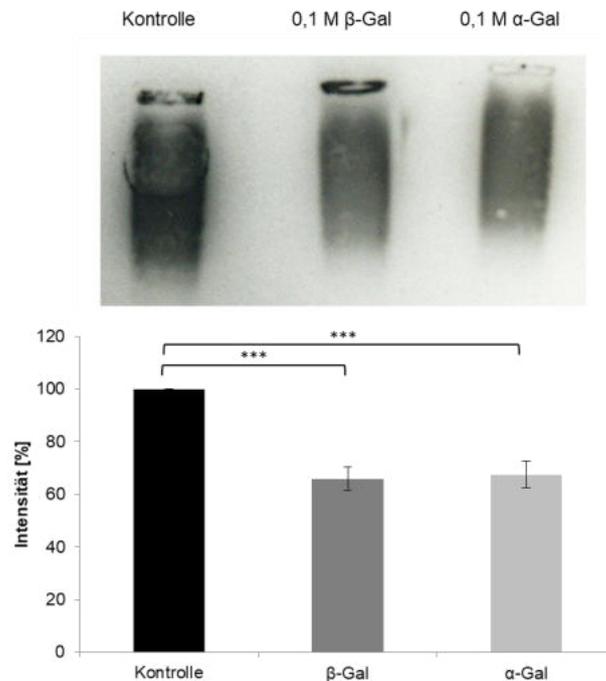


Abbildung 47: Inhibierung der Bindung von ^{125}I -pTFF2 an durch S-75HL gereinigten Schweinemucus mittels α - bzw. β -Methylgalaktosid. Oben: 1%ige AgGE der Fraktion B8 nach S-75HL-Lauf (siehe Anhang 29) eines Korpus-Extrakts mit anschließender Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2 (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer). Die Hybridisierung erfolgte in Gegenwart von 0,1 M α - bzw. β -Methylgalaktosid. Unten: semiquantitative Auswertung der Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2 (ausgewertet wurde die gesamte Bande). Hybridisierungspuffer: 20 mM Tris/HCl, 0,5 M NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , pH 6,0. Fehlerbalken: Standardabweichung δ (n=2). Signifikanz (Zwei-Stichproben F-Test) mit * = $p \leq 0,05$ und ** = $p \leq 0,01$ und *** = $p \leq 0,001$.

Ein Signal für ^{125}I -pTFF2 kann sowohl bei der Kontrolle als auch nach Hybridisierung in Gegenwart von α - bzw. β -Methylgalaktosid beobachtet werden. Die Intensität der Signale nach Zugabe von α - bzw. β -Methylgalaktosid ist jedoch signifikant reduziert (Abbildung 48, Anhang 29B).

Von der gleichen Probe (siehe oben) wurde ebenfalls eine Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2 unter Verwendung verschiedener Hybridisierungspuffer durchgeführt (Abbildung 48), um zu Überprüfen ob die Bindung von TFF2 an den Mukus von zweiwertigen Ionen abhängig ist.

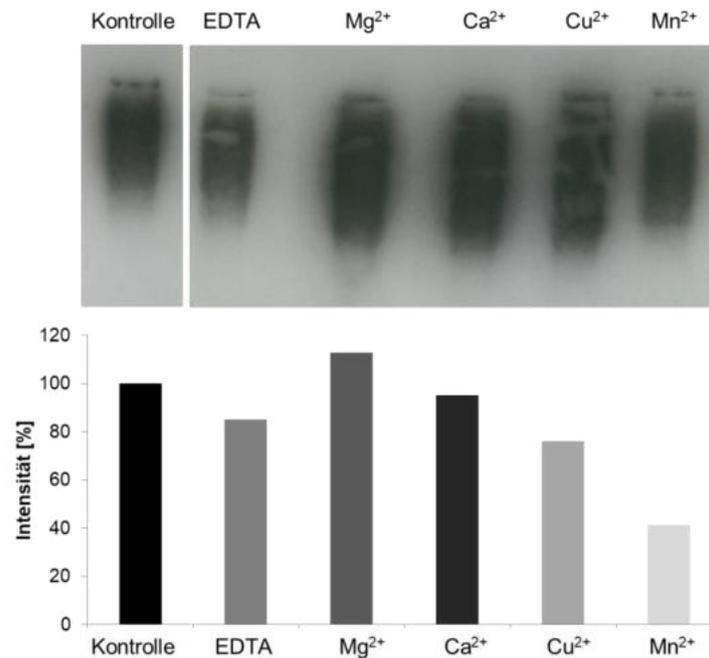


Abbildung 48: Hybridisierung von gereinigtem Schweinemukus (durch S-75HL gereinigt) mit ¹²⁵I-pTFF2 unter Zugabe von verschiedenen zweiwertigen Ionen. Oben: 1%ige AgGE einer mittels S-75HL gereinigten Mukusprobe aus dem Korpus vom Schwein (Fr. B8, siehe Anhang 29) mit anschließender Hybridisierung mit ¹²⁵I-pTFF2 (Autoradiographie, Iodierung Hr. Stürmer) unter Zugabe verschiedener zweiwertiger Ionen. Unten: Semiquantitative Auswertung (ausgewertet wurde die gesamte Bande) der Hybridisierung unter Zugabe verschiedener zweiwertiger Ionen (Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ bzw. Mn²⁺).

Hybridisierungspuffer: mit 20 mM Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 6.0: +/- 20 mM EDTA, 2,5 mM Mg²⁺, 2,5 mM Ca²⁺, 2,5 mM Cu²⁺ bzw. 2,5 mM Mn²⁺.

Das Signal für die Bindung von ¹²⁵I-pTFF2 ist beim Puffer mit EDTA bzw. Cu²⁺ leicht schwächer als in der Kontrolle. Am schwächsten ist das Signal für die Bindung von ¹²⁵I-pTFF2 beim Puffer mit Mn²⁺. Werden dem Puffer Mg²⁺ bzw. Ca²⁺ zugesetzt, so wird die Intensität des Signals für die Bindung von ¹²⁵I-pTFF2 kaum beeinflusst (siehe Abbildung 48).

5.2.1.4. Elution von TFF2 nach NR SDS-PAGE

Im Vergleich zur R SDS-PAGE (siehe auch Abbildung 38) kommt es bei der NR SDS-PAGE zum starken Verlust der Immunreaktivität. Deshalb wurden die Banden für TFF2 (14-18 kDa: NM, Tascheninhalt/Übergang Tasche zu Sammelgel: HM) eines gereinigten Mukuspeaks (S-75HL-Lauf nach TRizol[®]-Extraktion, siehe Abbildung 44, Fr. 21) nach NR SDS-PAGE aus dem Coomassiegel eluiert, um so die Verteilung von TFF2 zu bestimmen (siehe Abbildung 49).

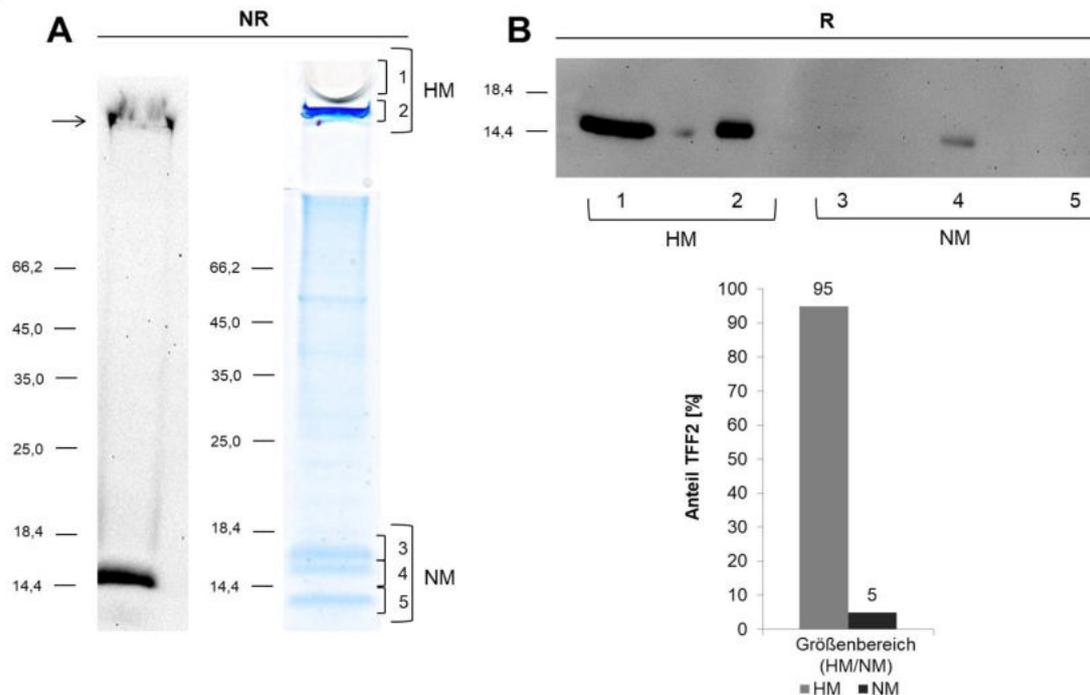


Abbildung 49: Verteilung von TFF2 aus Korpusproben vom Schwein nach NR SDS-PAGE. A: NR SDS-PAGE. NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktion 21 der S-75HL-Säule (Korpus Schwein) nach TRIzol[®]-Extraktion (siehe Abbildung 44) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF2 bzw. Coomassiefärbung. **B: R SDS-PAGE der aus dem Coomassiegel eluierten Banden.** R 15%ige SDS-PAGE der eluierten Banden des HM und NM Größenbereichs der NR 15%igen SDS-PAGE nach Coomassiefärbung und semiquantitative Auswertung der prozentualen Verteilung von TFF2.

HM: hochmolekular; NM: niedermolekular. Der Pfeil markiert den Gelstart. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Die 15%ige NR SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 in Abbildung 49A zeigt, dass TFF2 im Größenbereich bei ca. 16 kDa (NM) und am Übergang der Geltaschen zum Sammelgel (HM) detektiert werden kann. Diese Größenbereiche (+ Tascheninhalt) wurden aus der NR SDS-PAGE nach Coomassiefärbung eluiert und auf eine R 15%ige SDS-PAGE aufgetragen. 95% des TFF2 sind in Bande 1 (Tascheninhalt) und Bande 2 (Übergang Geltasche zu Sammelgel) zu finden, lediglich 5% des gesamten TFF2 kann in Bande 4 (ca. 16 kDa) detektiert werden (siehe Abbildung 49B). In der Verteilung von TFF2 nach NR SDS-PAGE unterscheidet sich die Schweineprobe signifikant vom Mensch (siehe Anhang 30), denn dort liegt der Hauptteil als niedermolekulare TFF2-Form vor (siehe Abbildung 34).

5.2.2. TFFs in der Hypophyse vom Schwein

Für TFF-Peptide wurde bereits eine mögliche Rolle als Neuropeptid (Fu et al. 2014) in der Maus diskutiert. Deshalb wurde im folgenden Experiment Hypophysengewebe vom Schwein entnommen, über S-75HL gereinigt und bzgl. der TFF-Peptide TFF2 und TFF3 analysiert.

5.2.2.1. TFF2 in der Hypophyse vom Schwein

Nach dem S-75HL-Lauf (siehe Abbildung 50) einer Hypophysenprobe liegt TFF2 ausschließlich im niedermolekularen Größenbereich vor (Fraktionen C12-D2). Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE zeigt TFF2 eine Bande bei ca. 16 kDa. NR kann ein schwaches Signal bei ca. 16 kDa und ein starkes Signal bei ca. 35 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 50A).

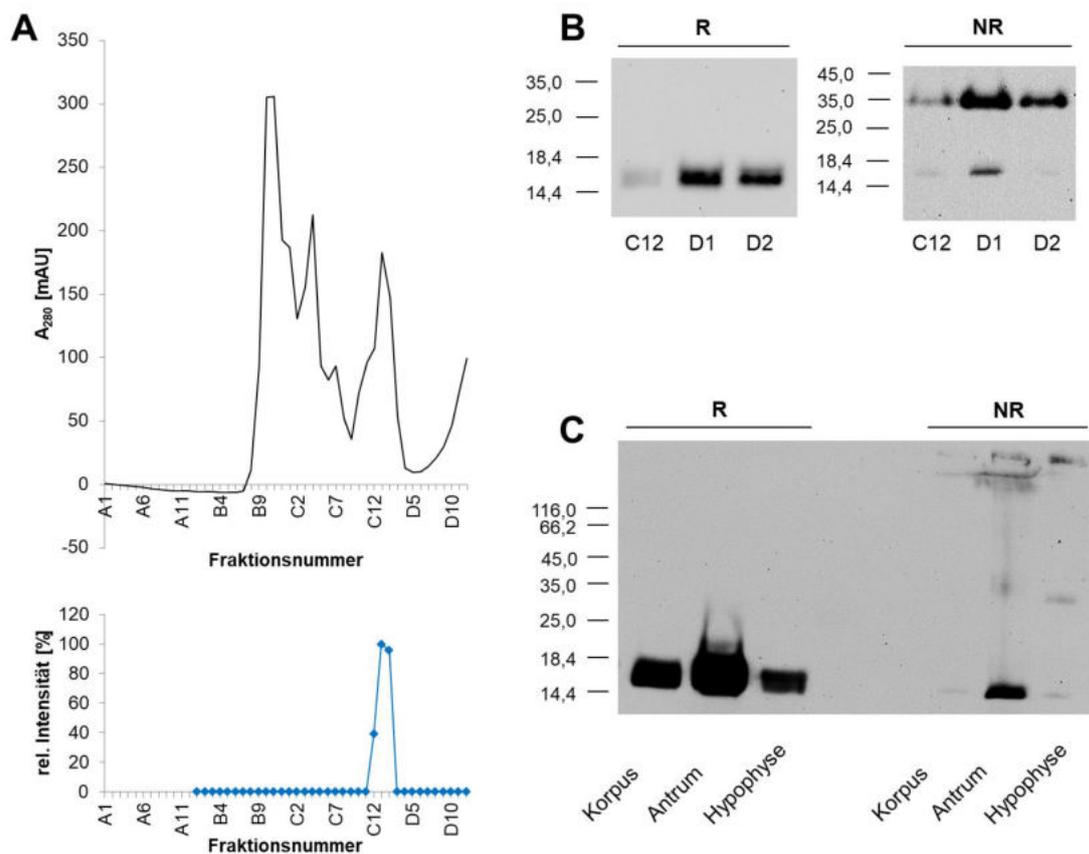


Abbildung 50: TFF2 in der Hypophyse vom Schwein. A: S-75HL-Lauf einer Hypophyse vom Schwein. UV-Profil [mAU] bei 280 nm sowie das Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). **B: Vergleichende R und NR SDS-PAGE.** R und NR 15%ige SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen C12-D2 nach S-75HL der Hypophyse (siehe A). **C: Vergleich von TFF2 aus Hypophyse vs. Korpus vs. Antrum vom Schwein.** R und NR 15%ige SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 von Proben aus dem Korpus (HM nach S-75HL, Säule nicht gezeigt), Antrum (HM nach S-75HL, Säule nicht gezeigt) und der Hypophyse (Fr. D1, S-75HL-Lauf siehe A) nach S-75HL-Lauf. Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve. Säulenlauf bei pH 8.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Des Weiteren wurde ein Vergleichsgel angefertigt, auf dem gereinigte TFF2-Formen aus dem Korpus und dem Antrum vom Schwein (TFF2 aus dem hochmolekularen Größenbereich nach S-75HL, Säulen nicht gezeigt) mit dem TFF2 aus der Hypophyse verglichen wurden. Das TFF2 aus der Hypophyse (ca. 16 kDa) läuft reduzierend auf derselben Höhe wie TFF2 aus dem Antrum und dem Korpus. Während NR in allen Proben für TFF2 ein Signal bei ca. 16 kDa und an der Grenze von Tasche zu Sammelgel detektiert

werden kann, zeigt sich in der Hypophysenprobe zusätzlich eine Bande bei ca. 30 kDa (siehe Abbildung 50).

5.2.2.2. TFF3 in der Hypophyse vom Schwein

Eine weitere Hypophysenprobe wurde bzgl. TFF3 analysiert. Nach S-75HL-Lauf liegt TFF3 in den Fraktionen C2-D1 vor (siehe Abbildung 51A). Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE werden Banden bei ca. 16 kDa und schwach bei ca. 20 kDa sichtbar, NR schmiert TFF3 im Größenbereich zwischen 20 kDa und kleiner 14 kDa. Um sicherzustellen, dass es sich um spezifische Signale für TFF3 handelt, wurde eine komp. Inhibition für Fraktion C7 durchgeführt (Abbildung 51C). Das Signal für TFF3 konnte durch die Inhibition mit dem Peptid nahezu komplett unterdrückt werden, was für ein spezifisches Signal spricht.

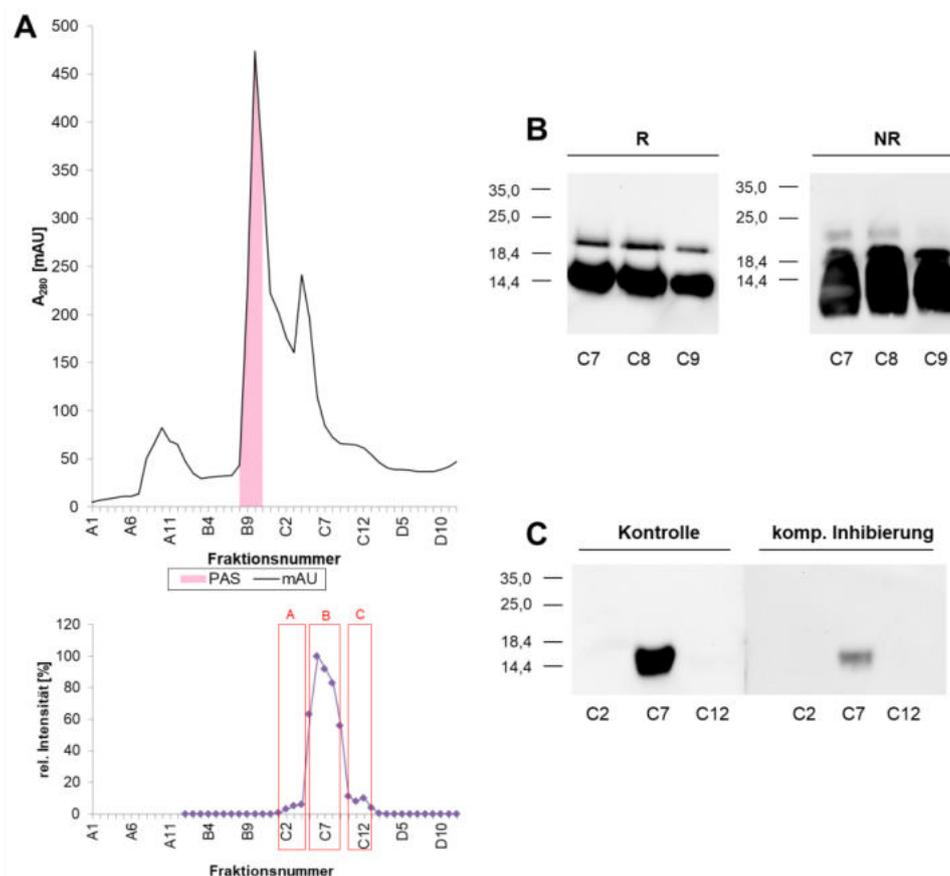


Abbildung 51: TFF3 in der Hypophyse vom Schwein. A: S-75HL-Lauf einer Hypophysenprobe vom Schwein. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF3 (R 15%ige SDS-PAGE). Die markierten Fraktionen (A: C1-C4, B: C5-C9 und C: C10-D1) wurden nachfolgend mittels ResQ gereinigt (siehe Abbildung 52) **B: R und NR SDS-PAGE der Hauptfraktionen.** R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen C7-C9 nach S-75HL und Western Blot bzgl. TFF3. **C: Komp. Inhibition.** R 15%ige SDS-PAGE der Fraktionen C2, C7 und C12 nach komp. Inhibition ün.

Absorption: schwarze Kurve, TFF3: lila Kurve, PAS: pinke Fläche, Säulenlauf bei pH 8.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Die TFF3-positiven Fraktionen nach S-75HL-Lauf wurden in einem zweiten Reinigungsschritt über ResQ gereinigt (C1-C4: Lauf A, C5-C9: Lauf B, C10-D1: Lauf C, Abbildung 52 A-C).

TFF3 eluiert bei allen drei Läufen jeweils in den Fraktionen B8-B11 (400-500 mM NaCl) von der Säule. Die TFF3-Hauptfraktionen der drei Läufe (Fraktion B9) wurden auf eine R und NR 15%ige SDS-PAGE aufgetragen und bzgl. TFF3 analysiert. Als Kontrolle diente eine Fraktion nach S-75HL (Fr. C7, siehe Abbildung 51). Bei allen Proben kann reduzierend eine Bande für TFF3 bei ca. 16 kDa detektiert werden. Bei der Probe B9 des ResQ-Laufs A wird zusätzlich eine Bande bei ca. 25 kDa sichtbar. Nicht-reduzierend sind Banden bei ca. 14 kDa und ca. 18 kDa detektierbar (Abbildung 52D).

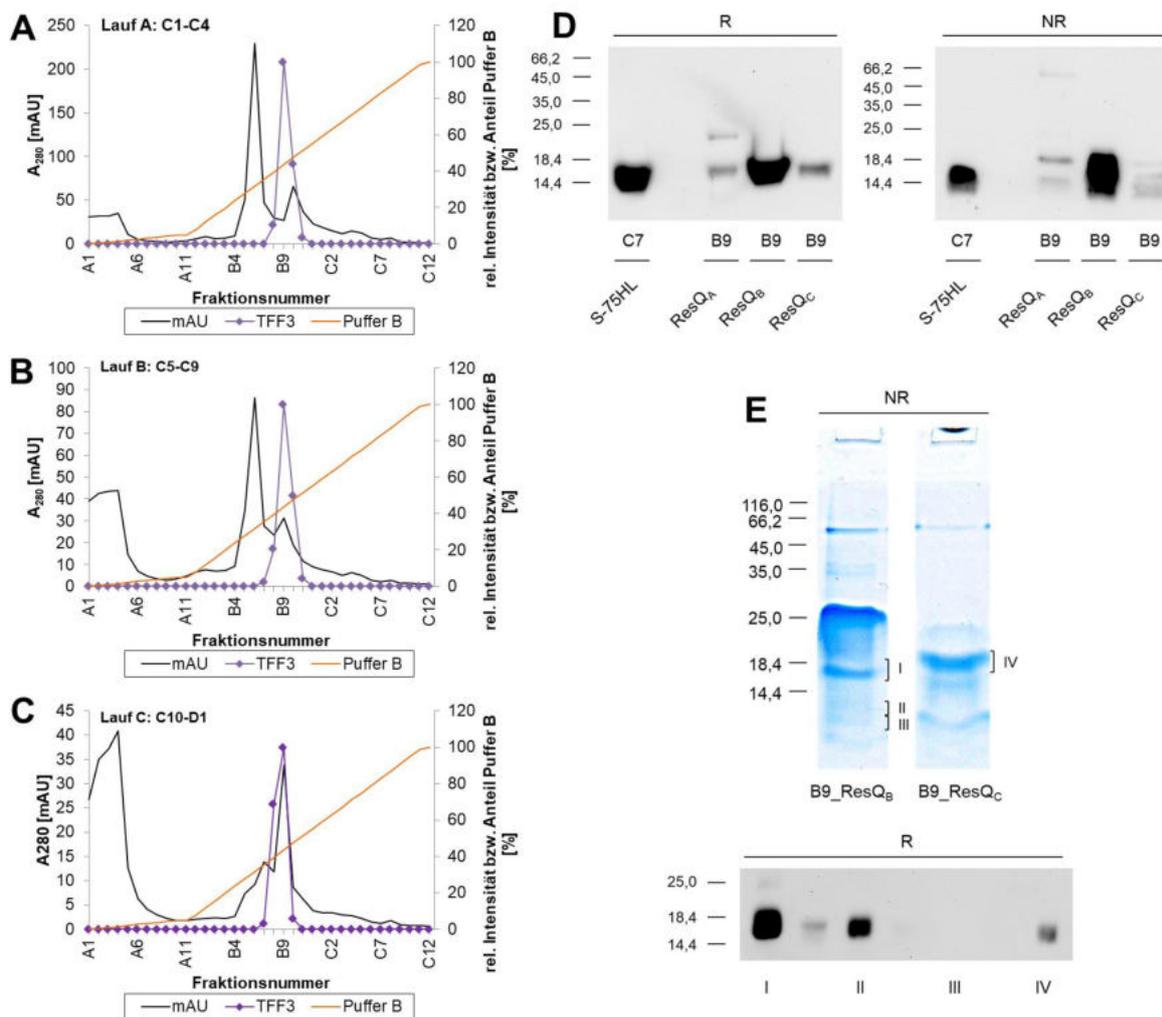


Abbildung 52: ResQ-Läufe der TFF3-Fraktionen aus der Hypophyse vom Schwein nach S-75HL (siehe Abbildung 51). **A: ResQ-Lauf A: C1-C4.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF3 (R 15%ige SDS-PAGE). **B: ResQ-Lauf B: C5-C9.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF3 (R 15%ige SDS-PAGE). **C: ResQ-Lauf C: C10-D1.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF3 (R 15%ige SDS-PAGE). **D: Vergleichende R und NR SDS-PAGE.** R und NR 15%ige SDS-PAGE der Fraktion B9 aller ResQ-Läufe und anschließender Western Blot bzgl. TFF3. Als Kontrolle dient eine Fraktion nach S-75HL (siehe Abbildung 51, Fr.C7). **E: Elution von TFF3 aus dem Coomassiegelel.** NR 15%ige SDS-PAGE mit Coomassiefärbung der Fraktion B9 von Lauf B bzw. Lauf C. Die markierten Banden I-IV wurden eluiert und auf eine R 15%ige SDS-PAGE aufgetragen. Absorption: schwarze Kurve, TFF3: lila Kurve, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve, Säulenläufe bei pH 8.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

Von der Fraktion B9 aus den ResQ-Läufen B und C wurde eine NR 15%ige SDS-PAGE angefertigt und mittels Coomassie gefärbt (siehe Abbildung 52E). Die markierten Banden (I und IV: ca. 18 kDa, II und III: kleiner 14 kDa) wurden eluiert und auf eine reduzierende SDS-PAGE aufgetragen. TFF3 kann in den Banden I, IV und II detektiert werden.

6. Diskussion

6.1. TFF2 im humanen Magen

TFF2 kommt sowohl im Antrum als auch im Korpus des menschlichen Magens vor und wird dort von den Nebenzellen und den Antrumdrüsenzellen sezerniert (Thim et al. 1982). Durch seine N-Glykosylierung (Hanisch et al. 2013) zeigt rekombinantes glykosyliertes (glyk) TFF2 auf dem Western Blot nach reduzierender 15%iger SDS-PAGE eine Bande bei ca. 18 kDa (Abbildung 17). Rekombinantes nicht-glykosyliertes (non-glyk) TFF2 kann bei einer Größe von ca. 14 kDa detektiert werden (Abbildung 17). Auf dem Western Blot nach nicht-reduzierender 15%iger SDS-PAGE zeigen beide Peptide (glyk bzw. non-glyk) Doppelbanden (glyk: 20-25 kDa, non-glyk: 18-20 kDa, Abbildung 17) mit höherer molekularer Masse als unter reduzierenden Bedingungen. Diese höhere molekulare Masse unter NR-Bedingungen kann eventuell mit einer Zirkularisierung von TFF2 (Disulfidbrücke zwischen Cys⁶ und Cys¹⁰⁴) erklärt werden, wie sie bereits für TFF2 aus dem Schweinepankreas beschrieben wurde (Thim 1997). Diese Zirkularisierung hat eventuell Einfluss auf den hydrodynamischen Radius und dadurch das Laufverhalten in der SDS-PAGE. Da auch nicht-glykosyliertes TFF2 Doppelbanden in der NR SDS-PAGE (Abbildung 17) zeigt, können verschiedene Glykoformen als Erklärung für das Auftreten dieser Doppelbanden ausgeschlossen werden. Möglich wäre, dass Cys⁷⁸ und Cys¹⁰⁴ Isomerisierungsreaktionen (Intermolekulare Disulfidaustauschreaktionen) eingehen, da sie von einem Paar saurer Aminosäuren flankiert werden (EE und ED, siehe Abbildung 8), die die Cysteinreste empfindlich gegenüber einer Reduktion machen und ebenfalls den pKs dieser Cysteinreste verändern (Gilbert 1990; Poole 2015).

6.1.1. TFF2-Formen im Korpus und Antrum

In dieser Arbeit wurden Proben aus Korpus und Antrum des Magens untersucht. Ein Unterschied im Gehalt an TFF2 zwischen Korpus und Antrum kann nicht festgestellt werden (Abbildung 18). Nach S-75HL-Lauf sind zwei Entitäten für TFF2 zu beobachten (siehe Abbildung 19); zum einen TFF2 im hochmolekularen Größenbereich (TFF2_{groß}), zum anderen TFF2 im niedermolekularen Größenbereich (TFF2_{klein}, Abbildung 19). Da TFF2 lediglich eine Größe von ca. 14 kDa (nicht-glykosyliert, Abbildung 17) bzw. 18 kDa (glykosyliert, Abbildung 17) aufweist, muss TFF2_{groß} an einen hochmolekularen Partner gebunden sein. Bei TFF2_{klein} handelt sich vermutlich um freies TFF2 der äußeren, lockeren Mukusschicht, welches vermutlich nicht mehr als Quervernetzter für Muzine agiert. Diese TFF2-Form scheint gut löslich zu sein, da bereits eine „milde Extraktion“, d.h. Waschen mit Puffer, dieses TFF2 freisetzen kann (Abbildung 25; Abbildung 26). TFF2_{groß} und TFF2_{klein} von Korpus- und Antrumproben zeigen beide auf dem Western Blot nach 15%iger SDS-PAGE jeweils eine

Bande bei ca. 18 kDa reduzierend und eine Doppelbande bei ca. 23 kDa und 25 kDa nicht-reduzierend (Abbildung 19).

Bei einem pH-Wert von 7.0 kann nach S-75HL-Lauf bei den Korpusproben ein Anteil von ca. 80% TFF2_{groß} (Tabelle 21) beobachtet werden, der kleinere Anteil (ca. 20%, Tabelle 21) des TFF2 liegt im niedermolekularen Größenbereich (TFF2_{klein}) vor (Abbildung 19). Bei einem pH-Wert von 8.0 kann nach S-75HL-Lauf hingegen nahezu kein TFF2_{klein} beobachtet werden (Tabelle 21). Ein erhöhter pH-Wert könnte die Bindung von TFF2 an Muzine also begünstigen (im Detail später noch diskutiert).

Da nur sehr wenige Antrumproben zur Verfügung standen, konnte nur eine geringe Anzahl an S-75HL-Läufen generiert werden. Bei einem pH-Wert von 8.0 kann, wie im Korpus, nach einem S-75HL-Lauf nahezu nur TFF2_{groß} detektiert werden (Abbildung 19). TFF2_{groß} aus dem Antrum zeigt auf dem Western Blot nach SDS-PAGE ein ähnliches Bandenmuster wie TFF2_{groß} bzw. TFF2_{klein} aus dem Korpus (Abbildung 19). Zwischen Korpus- und Antrumproben können also keine molekularen Unterschiede bzgl. TFF2 festgestellt werden.

6.1.2. Die Bindung von TFF2 an MUC6

Humanes TFF2 ist trotz seiner geringen Größe (14 kDa bzw. 18 kDa, siehe Abbildung 17) nach Größenausschlusschromatographie (S-75HL, S-500) hauptsächlich im hochmolekularen Größenbereich zu finden (siehe Abbildung 19, Tabelle 21). Eine Interaktion mit Proteinen aus dem hochmolekularen Größenbereich wurde u.a. für rekombinantes TFF2 und TFF2 aus dem Schweinemagen bereits beschrieben (Hanisch et al. 2013; Kouznetsova et al. 2007a; Kouznetsova et al. 2007b; Ota et al. 2006; Stürmer et al. 2014). Zu den Proteinen des hochmolekularen Größenbereichs gehören u.a. die Muzine MUC6 und MUC5AC (siehe u.a. Abbildung 22, Abbildung 26, Abbildung 29). In immunhistologischen Studien wurde bereits eine Assoziation von TFF2 mit MUC6 beschrieben (Ota et al. 2006). Diese Bindung wurde anhand von kommerziell erworbenen Muzinpräparationen vom Schwein bereits näher charakterisiert (Hanisch et al. 2014; Stürmer et al. 2018). Die Bindung von TFF2 an diese Muzinpräparate erfolgt dabei lektinartig über den Zuckerrest GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β (Hanisch et al. 2014). Der periphere α 1,4-GlcNAc-Rest wird durch das Enzym α 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase (α 4GnT) an nicht-reduzierende Enden von O-verknüpften Glykanen transferiert (Nakayama et al. 1999). Der α 1,4-GlcNAc-Rest ist für MUC6 des Magens spezifisch (Hanisch et al. 2014) und evolutionär von Frosch bis Mensch stark konserviert (Nordman et al. 1998).

In dieser Arbeit konnte durch die verschiedenen Experimente A: ResQ-Lauf eines Extraktes E1 (Abbildung 28, Abbildung 27), B: S-75HL-Lauf eines Extraktes E0 (Abbildung 26) und C: S-500-Lauf nach Kochen mit 1% β -Mercaptoethanol (Abbildung 30) gezeigt werden, dass auch humanes TFF2 an das Muzin MUC6, jedoch nicht an MUC5AC bindet.

A: Nach dem ResQ-Lauf eines Extrakts E1 (Abbildung 28, Abbildung 27) ähneln sich die Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 und MUC6 (GSAll als spezifischer Nachweis für MUC6 (Ihida et al. 1988; Nordman et al. 1998)) sowie der Hybridisierung mit ¹²⁵I-pTFF2 sehr. Das Profil für MUC5AC weist hingegen Unterschiede zum TFF2-Profil auf (MUC5AC auch in Fraktionen A1-A3, dort aber kein TFF2 und auch keine Bindung von ¹²⁵I-pTFF2, Abbildung 28). Es liegt also nahe, dass TFF2 mit MUC6 assoziiert ist.

B: Auch der S-75-Lauf eines Extraktes E0 (siehe Abbildung 26) weist darauf hin, dass TFF2 mit MUC6, aber nicht mit MUC5AC interagiert. MUC5AC kann dort im hochmolekularen Größenbereich detektiert werden, TFF2 liegt jedoch nur als TFF2_{klein} vor (Abbildung 26) und eluiert dort nicht in Fraktionen des hochmolekularen Größenbereichs.

C: Durch einen S-500-Lauf nach Kochen des Extrakts E1 mit 1% β-Mercaptoethanol können die Muzine MUC6 und MUC5AC getrennt werden (siehe Abbildung 30). MUC6 (GSAll-Reaktivität) eluiert dabei eher als MUC5AC (Abbildung 30); die MUC6-Monomere sind also, wie bereits beschrieben, größer als die MUC5AC-Monomere (Nordman et al. 2002). Die ¹²⁵I-markierten Peptide pTFF2 und hTFF2 binden ebenfalls im hochmolekularen Größenbereich nach der S-500-Säule. Das Profil für die Hybridisierung mit beiden Peptiden unterscheidet sich vom MUC5AC-Profil und ähnelt stark dem GSAll-Profil (siehe Abbildung 30); die Peptide binden also vor allem an GSAll (MUC6)-positive Fraktionen.

Eine Bindung von TFF2 an MUC6 könnte dazu dienen, die Muzine zusätzlich zu vernetzen, um so die Festigkeit der Mukusschicht zu beeinflussen und zu regulieren. Auch andere Studien liefern Hinweise darauf, dass TFF2 als Quervernetzer der Muzine dient, da TFF2 die Viskosität des Magenmukus erhöhen (Kjellv et al. 2006; Thim et al. 2002) und außerdem die Protonen-Permeation durch den Magenmukus inhibieren kann (Tanaka et al. 1997). So könnte die Stabilität der Mukusschicht, die durch die Oligomerisierung von Muzinen über N- und C-terminale Disulfidbrücken (Carlstedt et al. 1983; Snary et al. 1970; Toribara et al. 1997) entsteht, noch zusätzlich durch den Quervernetzer TFF2 (Überblick siehe Hoffmann 2015b) begünstigt werden. Die Bindung von humanem TFF2 an MUC6 wurde im Folgenden näher charakterisiert (siehe unten).

6.1.3. Charakterisierung der Bindung von TFF2 an den Mukus

Dass rekombinantes TFF2 bzw. pTFF2 als Lektin an MUC6 (aus kommerziell erworbenen Muzinpräparaten vom Schwein) binden, wurde bereits beschrieben (Hanisch et al. 2014; Stürmer et al. 2018). Für humanes TFF2 wurde nun ebenfalls überprüft, ob es sich um eine lektinartige Wechselwirkung mit MUC6 handelt, oder ob TFF2 evtl. kovalent an MUC6 gebunden ist. Möglich wäre eine solche kovalente Bindung durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei TFF2-Monomeren. TFF2 weist zwar eine gerade Anzahl an Cysteinen (7 Disulfidbrücken) auf, aber Cys⁶ und Cys¹⁰⁴ wurden bereits in einer früheren Arbeit am porcinen TFF2 als partiell sensitiv für eine Reduktion beschrieben (Otto et al.

1996). Deshalb wäre es denkbar, dass humanes TFF2, ähnlich wie TFF1 (TFF1-GKN2 (Kouznetsova et al. 2007a; Westley et al. 2005)/ TFF1-FCGBP (Heuer et al. 2020; Znalesniak et al. 2020)) und TFF3 (TFF3-FCGBP (Albert et al. 2010)) kovalente Heteromere über Disulfidbrücken bildet. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch humanes TFF2 lektinartig, also nicht-kovalent an MUC6 bindet. So kann TFF2 nach Elution aus dem Coomassiegel nach NR SDS-PAGE fast ausschließlich im niedermolekularen Größenbereich detektiert werden (Abbildung 34). Auch auf dem Western Blot nach NR SDS-PAGE ist TFF2 nur im niedermolekularen Größenbereich zu finden (Abbildung 18); Kochen mit SDS reicht also aus, um die Bindung von TFF2 an den Mukus zu lösen. Diese Beobachtung kann auch nach S-75HL-Läufen von gekochten Mukusproben (Kochen mit SDS oder SDS/EDTA) gemacht werden; TFF2 kann dort ebenfalls nahezu vollständig im niedermolekularen Größenbereich detektiert werden (Tabelle 21; Abbildung 22). Auch eine Extraktion mittels TRIzol[®] (Abbildung 24) führt dazu, dass die Bindung von TFF2 an MUC6 gelöst wird, TFF2 liegt fast ausschließlich als TFF2_{klein} vor. Eine kovalente Bindung von TFF2 kann also ausgeschlossen werden. Auch die Bindungsstudien mit ¹²⁵I-markiertem TFF2 (an MUC6 angereicherte Fraktionen nach S-500 Lauf, Abbildung 33) weisen auf eine lektinartige Wechselwirkung von TFF2 mit dem Muzin MUC6 hin. So kann die Bindung der ¹²⁵I-markierten Peptide durch GSAll und HIK1083 (monoklonaler AK, bindet α 1,4-GlcNAc-Reste von MUC6 (Ishihara et al. 1996)) inhibiert werden (Abbildung 33). Es liegt also nahe, dass auch humanes TFF2 an MUC6 lektinartig über terminale α -GlcNAc-Strukturen bindet; dies steht in Einklang mit einer zuvor veröffentlichten Arbeit (Hanisch et al. 2014). Die Bindung der ¹²⁵I-markierten Peptide an gereinigte MUC6-Fraktionen kann auch durch β -Methylgalaktosid inhibiert werden (siehe Abbildung 33), β -Galaktosidase-Reste spielen also eine wichtige Rolle für die Bindung von TFF2 an den Mukus.

Um die Bindung nun weiter zu charakterisieren, wurde zunächst die Abhängigkeit vom pH-Wert betrachtet, die bereits für rekombinantes TFF2 beschrieben ist (Hanisch et al. 2014). Dazu wurden Bindungsstudien mit rekombinatem ¹²⁵I-hTFF2 bzw. ¹²⁵I-pTFF2 an gereinigten Mukusfraktionen (Abbildung 32, Abbildung 33) durchgeführt. Die Bindung ist bei einem pH-Wert von 7.0 am stärksten und nimmt mit sinkendem pH-Wert ab (pH 7 > pH 4 > pH 2, siehe Abbildung 33, Abbildung 32). Bedingt könnte diese pH-Wert-Abhängigkeit dadurch sein, dass der Mukus möglicherweise zweischichtig aufgebaut ist (Johansson et al. 2013). Während die lose, äußere Mukusschicht in Kontakt mit dem sauren Magensaft steht, wird in der inneren, festeren Mukusschicht ein pH-Gradient gebildet (pH 7.0 an der Epitheloberfläche, pH 2.0 äußere Mukusschicht (Bahari et al. 1982; Johansson et al. 2013; Phillipson et al. 2002; Schreiber and Scheid 1997)). Dieser pH-Gradient kommt durch die Sekretion von HCO₃⁻ aus den Oberflächenepithelzellen zustande (Hoffmann 2020). Eine festere Bindung von TFF2 bei einem höheren pH-Wert (Abbildung 32, Abbildung 33),

eventuell dadurch bedingt, dass TFF2 die Protonen-Permeation inhibiert (Tanaka et al. 1997), könnte dazu führen, dass die Mukusschicht an der Epitheloberfläche besonders stabil ist. Auch das Fehlen der niedermolekularen TFF2-Form nach S-75HL-Lauf bei einem pH-Wert von 8.0 (Tabelle 21) spricht für eine festere Bindung von TFF2 bei höheren pH-Werten. Auch eine Abhängigkeit von Ca^{2+} -Ionen der lektinartigen Bindung des humanen TFF2s an den Mukus wurde in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurden ebenfalls Bindungsstudien mit rekombinantem ^{125}I -hTFF2 bzw. ^{125}I -pTFF2 an gereinigte Mukusfraktionen (Abbildung 32, Abbildung 33) durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass Ca^{2+} -Ionen die Bindung von TFF2 an den Mukus begünstigen; TFF2 bindet jedoch ebenfalls an den Mukus, wenn dem Puffer EDTA zugesetzt wird (Abbildung 32, Abbildung 33). Auch das Kochen eines Extrakts mit SDS und EDTA weisen darauf hin, dass zweiwertige Ionen die Bindung von TFF2 an MUC6 begünstigen (Tabelle 21). Hier ist der Anteil an TFF2_{klein} höher als durch Kochen mit SDS alleine (Tabelle 21). Eine solche Ca^{2+} -abhängige Bindung von Lektinen wurde bereits früher (Gabius 2008) beschrieben. Neben einem unterschiedlichen pH-Wert von Epitheloberfläche und Magenlumen (siehe oben) unterscheidet sich auch der Gehalt an Ca^{2+} -Ionen von Mukus und Magensaft deutlich. Während in der Mukusschicht eine Konzentration von etwa 2 mM Ca^{2+} (Grant 1941) beobachtet werden kann, nimmt diese zum Lumen hin ab. Im Magensaft kann lediglich eine Ca^{2+} -Konzentration von ca. 0,8 mM (Powell et al. 1992) detektiert werden. Im Mukus könnte die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration dazu führen, dass TFF2 fester an MUC6 binden kann und die möglichen Quervernetzungen so einen festen und dichten Mukus erzeugen. Die zum Lumen abnehmende Ca^{2+} -Konzentration könnte hingegen dafür sorgen, dass die Quervernetzung der Muzine durch TFF2 abnimmt und so der Mukus zum Lumen hin lockerer wird und an Festigkeit verliert. Das dabei freigesetzte TFF2 (TFF2_{klein}) könnte die Restitution von Epithelzellen stimulieren und somit einer Verwundung des Mukus entgegenwirken. Frühere Studien zeigen, dass TFF2 an den CXCR4-Rezeptor bindet und dadurch proliferatorisch wirksam wird (Dubeykovskaya et al. 2009). Auch eine Reparatur von epithealen Zellen via NHE2 (Na/H-Austauscher) ist für TFF2 bereits beschrieben (Xue et al. 2011).

6.1.4. Modell der humanen Magenschleimhaut in Bezug auf die Rolle von TFF2 als Quervernetzer der Muzine

Ein schematischer Überblick über den möglichen Aufbau des Magenmukus, inklusive der Rolle von TFF2 als Bindepartner von MUC6, ist in Abbildung 53 dargestellt.

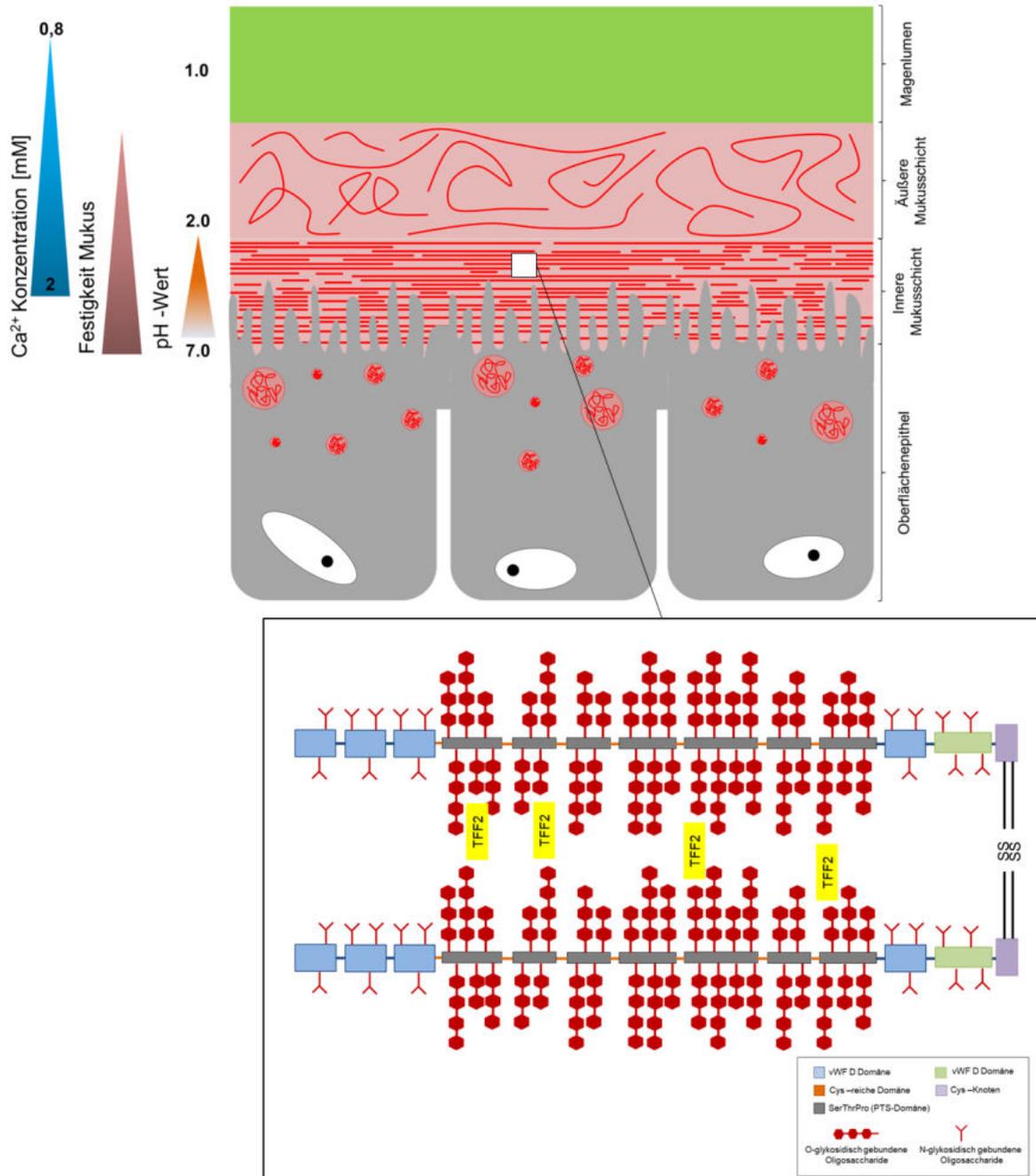


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Mukusschicht im humanen Magen und der postulierten Quervernetzung durch TFF2. Der Mukus des humanen Magens ist zweischichtig aufgebaut. An die Epitheloberfläche grenzt ein relativ fester Mukus. Ein pH-Wert von 7.0 und eine Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM begünstigen eine Quervernetzung der Muzine durch das Lektin TFF2. Diese Quervernetzung erfolgt über die an MUC6 O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide und stabilisiert die bereits durch Disulfidbrücken vorhandene Verknüpfung von MUC6-Monomeren. An die innere, unlösliche Mukusschicht grenzt eine lockerere äußere Mukusschicht. Der sinkende pH-Wert und die abnehmende Konzentration an Ca^{2+} -Ionen führen dazu, dass die Bindung von TFF2 an MUC6 abnimmt und der Mukus an Stabilität und Festigkeit verliert. Die Wechselwirkung von TFF2 mit MUC6 beeinflusst dessen rheologische Eigenschaften. Abbildung tlw. nach Bansil and Turner 2006. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

Die Mukosa des Magens setzt sich aus einer inneren, festen Mukusschicht und einer äußeren, lockeren Schicht zusammen (Atuma et al. 2001). Der pH-Wert der inneren Schicht

ist dabei höher als in der äußeren Mukusschicht (Bahari et al. 1982; Phillipson et al. 2002). Der höhere pH-Wert der inneren Mukusschicht begünstigt die Bindung von TFF2 an MUC6, wodurch vermutlich eine zusätzliche Quervernetzung der Muzine entsteht. Dadurch ist die Festigkeit und Stabilität der inneren Mukusschicht höher als die der äußeren Mukusschicht. Auch die Ca^{2+} -Konzentration von 2 mM (Grant 1941) an der Epitheloberfläche begünstigt vermutlich die Quervernetzung der Muzine durch TFF2 und führt somit zu einer erhöhten Festigkeit der inneren Mukusschicht. In der äußeren Mukusschicht wird die Bindung von TFF2 an MUC6 durch den niedrigeren pH-Wert und die geringere Konzentration an Ca^{2+} -Ionen hingegen gestört. TFF2 ist nur noch tlw. an den Mukus gebunden und liegt auch als freies TFF2 vor (Abbildung 19, Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Durch die angenommene zusätzliche Quervernetzung der Muzine durch TFF2 kann vermutlich einen wirksamer Schutz vor dem sauren pH-Wert des Magensafts und vor versch. Verdauungsenzymen ausgebildet werden.

Ein pH-Gradient innerhalb der Mukusschicht wird vermutlich außerdem benötigt, um die Dicke der Mukusschicht zu regulieren. So erfolgt an der Grenze zum Magenlumen ein kontinuierlicher Abbau der Muzine (Allen and Carroll 1985) und der gesamten Mukusschicht, der vermutlich auch durch die fehlende Quervernetzung von TFF2 bei einem niedrigen pH-Wert einhergeht. An der Epitheloberfläche hingegen, werden die Muzine bei einem pH-Wert von ca. 7.0 aus den Transportvesikeln freigesetzt und könnten zusätzlich durch die Bindung von TFF2 quervernetzt werden, um so eine stabile Schutzschicht zu bilden. Durch den mehrschichtigen Aufbau der Mukusschicht wird ein Eindringen von Pathogenen, wie *H. pylori* in die darunterliegenden Epithelzellen erschwert. Dabei bindet TFF2 zwar nicht direkt an *H. pylori* (Reeves et al. 2008), aber verhindert möglicherweise durch Verdichten des Mukus oberhalb des Epithels ein weiteres Eindringen (Schreiber et al. 2004). Durch die Abgabe von HCO_3^- in die innere, feste Mukusschicht und der damit verbundene höhere pH-Wert an der Epitheloberfläche, welcher eventuell mit der festern Bindung von TFF2 an den Mukus einhergeht, wird vermutlich ein guter Schutz gegenüber der Salzsäure des Magensafts gewährleistet (Übersicht siehe Hoffmann 2020).

6.2. TFF2 im humanen Duodenum

TFF2 wird nicht nur von den Antrumdrüsenzellen und Nebenzellen des Magens sezerniert, sondern auch von den Brunner'schen Drüsen des Duodenums (Wong et al. 1999). Die Brunner'schen Drüsen, die neben TFF2 auch MUC6 sezernieren (Krause 2000), sind über das Duodenum unterschiedlich verteilt und vor allem im vorderen, distalen Teil des Duodenums (*Pars superior*) sehr groß und stark verzweigt. Bis hin zur Mündung der Pankreasgänge (*Pars descendens*) verlieren sie an Größe, sind jedoch sehr zahlreich vertreten. Nach der Mündung der Gallengänge nimmt die Anzahl der Brunner'schen Drüsen hin zum Jejunum jedoch stark ab (Bargmann 2013). MUC6 kommt also folglich vor allem im

vorderen, oralen Abschnitt des Duodenums vor. Die Mukusschicht im Duodenum wird hauptsächlich von dem gelbildenden Muzin MUC2 und den Transmembranmuzinen MUC1, MUC3 und MUC4 gebildet (Corfield 2001), so dass im hinteren, kaudalen Teil des Duodenums vor allem MUC2, jedoch kaum MUC6 zu finden ist. Das Verhältnis von MUC6 zu MUC2 verschiebt sich also entlang des Duodenums (vorderer Abschnitt, oral: verhältnismäßig viel MUC6, hinterer Abschnitt, kaudal: kaum MUC6).

In dieser Arbeit wurden acht verschiedene Duodenumproben bzgl. des Gehalts an TFF2 analysiert. Dazu wurden die Proben über eine S-75HL-Säule gereinigt (Abbildung 35). Bei sechs von acht Proben kommt TFF2 ausschließlich als niedermolekulare Form (TFF2_{klein}) vor, ist also nicht an einen hochmolekularen Partner gebunden (Abbildung 36). Der Gesamtanteil an TFF2 ist dort, verglichen mit dem Magen, recht gering. In diesen Proben kann außerdem kein GSAll detektiert werden (Daten nicht gezeigt), es fehlt also der u.a. im Magen vorhandene Bindungspartner (MUC6) von TFF2.

Wird eine Duodenumprobe mit ausschließlich TFF2_{klein} nach S-75HL anschließend mit ResQ analysiert (Abbildung 37), eluiert TFF2 in zwei Entitäten von der ResQ. MUC6 (GSAll) ist hier nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Im Western Blot nach NR SDS-PAGE werden für TFF2 mehrere Banden sichtbar (Abbildung 37), die auf eine unterschiedliche Glykosylierung von TFF2 im Duodenum, verglichen mit dem Magen, hindeuten.

In einer der Duodenumproben liegt TFF2 fast ausschließlich im hochmolekularen Bereich (TFF2_{groß}) vor (GSAll positiv, Abbildung 35). Vermutlich liegt der Entnahmeort der Probe im oralen Abschnitt des Duodenums, wo relativ viele Brunner'sche Drüsen zu finden sind, welche u. a. MUC6 sezernieren (Bargmann 2013). Wird diese Duodenumprobe zunächst über eine S-75HL-Säule und anschließend mit ResQ gereinigt, lässt sich TFF2 in einem relativ scharfen Peak von der ResQ-Säule eluieren. Dort ist auch GSAll (MUC6) detektierbar (Abbildung 36). TFF2 scheint hier also, genauso wie im Magen, an MUC6 gebunden zu sein. Im Western Blot nach NR SDS-PAGE werden ebenfalls viele verschiedene Banden für TFF2 sichtbar (14-62 kDa, Abbildung 36), dies könnte auf eine andere Glykosylierung des TFF2 im Duodenum verglichen mit dem Magen hindeuten.

Ob TFF2 im Duodenum als TFF2_{groß} oder TFF2_{klein} vorliegt, hat eventuell etwas mit dem Entnahmeort der Probe zu tun. Wurde die Probe nahe am Antrum entnommen, ist es wahrscheinlich, dass TFF2 noch in mukusassoziierter Form vorliegt. Entweder dadurch bedingt, dass es dort, wie oben beschrieben besonders große und verzweigte Brunner'sche Drüsen gibt (Bargmann 2013), oder weil es sich um TFF2 aus der Magenschleimhaut handelt, die evtl. tlw. durch z. B. die Peristaltik ins Duodenum gelangt. Wurde die Probe hingegen aus dem kaudalen Teil des Duodenums entnommen, werden vermutlich nur noch geringe Mengen an TFF2 und auch kaum noch MUC6 sezerniert, da die Anzahl der Brunner'sche Drüsen dort deutlich geringer ist als im distalen Teil (Bargmann 2013) des

Duodenums. Es Auch eine mögliche Bindung von TFF2 an MUC2 im Dünndarm der Ratte *in situ* (McCarthy et al. 2019) wurde bereits diskutiert. Eventuell bindet auch humanes TFF2 im kaudalen Teil des Duodenums MUC2; vermutlich ist diese Bindung dann aber deutlich schwächer als die Bindung von TFF2 an MUC6, da diese eventuelle Bindung an MUC2 bereits im Rahmen des Reinigungsprotokolls gelöst werden würde und somit das Fehlen von TFF2_{groß} erklärt werden könnte. In anderen Bereichen des Dünndarms (Jejunum, Ileum) und des GI-Trakts kann kein TFF2 detektiert werden (Wong et al. 1999).

Dass TFF2 im Duodenum eine wichtige Rolle in der Abwehr von potentiellen Pathogenen spielt, konnte bereits in Jungtieren der Ratte nachgewiesen werden (McCarthy et al. 2019). Dort führt ein Fehlen von TFF2 (*Tff2*^{KO}-Tiere) dazu, dass *E. coli* K1 durch die Mukusschicht hindurch in die Blutbahn gelangen kann. TFF2 scheint also entweder, wie im Magen, wichtig für die Integrität der Mukusschicht zu sein (Quervernetzung der Muzinuntereinheiten), oder durch eine direkte Bindung an *E. coli* und andere potentielle Pathogene deren Ausbreitung durch die Mukusschicht hindurch zu verhindern.

6.3. TFF2 im Magen vom Schwein

Anders als TFF2 des humanen Magens fehlt dem porcinen TFF2 die N-Glykosylierung (Rose et al. 1989). Deshalb kann es auf dem Western Blot nach R 15%iger SDS-PAGE mit ca.16 kDa etwas kleiner als das humane TFF2 (18 kDa, Abbildung 38) detektiert werden. Ähnlich wie im Mensch kann das porcine TFF2 nach Größenausschlusschromatographie zum großen Teil im hochmolekularen Größenbereich detektiert werden. Es ist also ebenfalls, wie bereits beschrieben (Stürmer et al. 2014), an hochmolekulare Bestandteile des Mukus gebunden. Anders als beim Mensch kann diese Bindung allerdings nicht so leicht getrennt werden; nach NR SDS-PAGE kann nur ein geringer Teil an TFF2 im niedermolekularen Größenbereich beobachtet werden, der Großteil ist noch in der Geltasche bzw. am Übergang von Geltasche zum Sammelgel nachweisbar (Abbildung 38; Abbildung 49). Da der größte Teil gar nicht erst in das SDS-Gel einläuft und in der Geltasche verbleibt, nimmt die Immunreaktivität unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Vergleich zu reduzierenden Bedingungen stark ab (Abbildung 38). Außerdem reicht Kochen mit SDS und EDTA alleine nicht aus, um die Bindung von porcinem TFF2 an den Mukus vollständig zu lösen (Tabelle 22). TFF2 im Schwein ist also fester an den Mukus gebunden als humanes TFF2; entweder auf Grund der fehlenden Glykosylierung im Schwein (Rose et al. 1989) oder auf Grund von Unterschieden in der Aminosäuresequenz (Abbildung 8).

6.3.1. TFF2-Formen im Korpus und Antrum

Es wurden Gewebeproben aus dem Korpus und dem Antrum von verschiedenen Schweinen extrahiert und bzgl. TFF2 analysiert. Sowohl im Korpus als auch im Antrum kann ein Anteil

von ca. 2-3% TFF2_{klein} nach S-75HL-Lauf (pH-Wert 6.0) detektiert werden (Tabelle 22, Tabelle 23). Werden die hochmolekularen TFF2-Formen (TFF2_{groß}) von Korpus und Antrum mittels ResQ gereinigt, so kann TFF2 anschließend hauptsächlich in Fraktionen detektiert werden, die ebenfalls GSAll- und PGM- Reaktivität (Antiserum zum Nachweis von MUC5AC (Nordman et al. 1998)) enthalten (Abbildung 39; Abbildung 40). Eine Bindung von TFF2 an Muzine ist daher sehr wahrscheinlich.

Zudem wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es einen Unterschied der TFF2-Formen zwischen Gewebeextrakten bzw. Extrakten abgekratzter Mukosa gibt. Im Korpus ist der Anteil an TFF2_{klein} in Extrakten abgekratzter Mukosa etwas höher (ca. 10%; Abbildung 41) als bei Gewebeextrakten (ca. 1%, Abbildung 41). Dies könnte wiederum auf einen zweischichtigen Mukusaufbau, wie im Mensch (Atuma et al. 2001), hindeuten. Auf dem Western Blot nach nicht-reduzierender 15%iger SDS-PAGE unterscheiden sich die beiden TFF2-Formen von Extrakten abgekratzter Mukosa und Gewebeextrakten deutlich. So kann bei der TFF2-Form der abgekratzten Mukosa eine ca. 30 kDa Bande beobachtet werden (Abbildung 42). Ob es sich um ein kovalent oder nicht-kovalent gebundenes Homodimer handelt, konnte nicht geklärt werden. Bei Proben des porcinen Pankreas wurde eine solche Bande für TFF2 auf der Höhe von ca. 30 kDa jedoch in einer früheren Studie als ein nicht-kovalent gebundenes TFF2-Homodimer beschrieben, welches sich als resistent gegenüber Kochen mit SDS erwies (Stürmer et al. 2014). Auch wurde bereits gezeigt, dass TFF2 als nicht-kovalentes Homodimer kristallisiert (Gajhede et al. 1993; Petersen et al. 1996). Solch ein Homodimer erinnert stark an xP4-Peptide aus dem Magen des Krallenfroschs *Xenopus laevis*, welche vier TFF-Domänen enthalten (Jagla et al. 1998). Gebildet werden könnte ein oben beschriebenes TFF2-Homodimer, welches möglicherweise über die hydrophoben Taschen ausgebildet wird, weil vermutlich der Bindepartner (MUC6) für TFF2 fehlt. Da es im Schweinemagen vermutlich wie im porcinen Pankreas (Stürmer et al. 2014) resistent gegenüber Kochen mit SDS ist, kann es in der NR SDS-PAGE detektiert werden (Abbildung 42). Im Mensch, kann ein solches Homodimer nicht beobachtet werden, evtl. weil es dort schwächer bindet und nicht-resistent gegenüber Kochen mit SDS ist. Die mögliche Funktion eines solchen Homodimers konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Im Korpus des Schweins scheint das TFF2 in Extrakten abgekratzter Mukosa schwächer gebunden zu sein, als bei Gewebeextrakten, da es hier tlw. im niedermolekularen Größenbereich nach S-75HL zu finden ist (Abbildung 41). Möglich ist, dass die Mukusschicht des porcinen Korpus, wie die des humanen Magens, zweischichtig aufgebaut ist, es möglicherweise zu einem Abbau der Muzine in der äußeren Mukusschicht kommt und dadurch TFF2 freigesetzt wird. Dieser Unterschied zwischen Gewebeextrakten und Extrakten abgekratzter Mukosa kann jedoch im Antrum nicht beobachtet werden (Abbildung 42). Das spricht dafür, dass das TFF2 im Antrum des Schweins generell fester gebunden ist

als im Korpus. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine unterschiedliche Glykosylierung von MUC6 in Korpus und Antrum sein (Karlsson et al. 1997).

6.3.2. Die Bindung von TFF2 an den Mukus

Wie bereits oben beschrieben, kommt porcines TFF2 nach S-75HL-Lauf fast ausschließlich im hochmolekularen Größenbereich vor. Eine Bindung von TFF2 an Muzine des Schweinemagens wurde bereits beschrieben (Stürmer et al. 2014) und konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Zum einen eluiert TFF2 nach dem oben beschriebenen, zweistufigen Reinigungsprotokoll (S-75HL und anschließender ResQ-Lauf) zusammen mit GSAll- und PGM-positiven Fraktionen von der ResQ-Säule. TFF2 kann dort im Agarosegel ebenso wie die Signale für GSAll und PGM direkt unterhalb der Tasche detektiert werden (Abbildung 39; Abbildung 40). Zum anderen konnte mit Hilfe von Bindungsstudien mit ^{125}I -pTFF2 eine Bindung an GSAll/PGM-positiv Fraktionen nachgewiesen werden (Abbildung 47). Diese Bindung kann, ähnlich wie im Mensch, durch die Zucker α - bzw. β -Methylgalaktosid inhibiert werden. TFF2 bindet also vermutlich zumindest tlw. als Lektin an das bereits beschriebene Trisaccharid $\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 4\text{Gal}\beta 1\rightarrow \text{R}$ (Hanisch et al. 2014).

Um die Bindung von TFF2 des Schweinemagens besser analysieren zu können, wurde, so wie im humanen Magen, eine Vielzahl von Extraktionsexperimenten durchgeführt (Tabelle 21, Tabelle 22). Trägt man einen Extrakt abgekratzter Mukosa des Korpus auf eine S-75HL-Säule auf, dann liegt ein Anteil von ca. 10-20% des TFF2 als TFF2_{klein} vor. Wird jedoch Gewebeextrakt über S-75HL gereinigt, ist der Anteil von TFF2_{klein} deutlich geringer. TFF2 liegt also in der Mukusschicht tlw. als freies TFF2 vor. Durch Kochen hochmolekularer Fraktionen mit 1% SDS/30 mM EDTA bzw. 30 mM EDTA können ca. 50% des TFF2 in den niedermolekularen Größenbereich nach S-75HL verschoben werden, 50% bleiben weiterhin mit Mukusbestandteilen assoziiert (Tabelle 22). Es könnte also sein, dass TFF2 des Schweinemagens zumindest tlw. über kovalente Bindungen mit den Muzinen verknüpft ist. Für eine solche kovalente Bindung spricht, dass TFF2 sowohl durch Zugabe von 6 M GuaHCl (+/- kochen) als auch 6 M Harnstoff zum Extrakt vor dem S-75HL-Lauf bzw. durch eine TRIzol[®]-Extraktion mit anschließender S-75HL nicht aus den hochmolekularen Fraktionen gelöst werden kann. Auch durch Kochen mit SDS/EDTA kann nur in etwa die Hälfte des TFF2 aus dem hochmolekularen Größenbereich herausgelöst werden. Eine Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen TFF2 und Muzinen über Disulfidbrücken scheint nicht ausgeschlossen, da Cys⁶ und Cys¹⁰⁴ als partiell sensitiv für Reduktion beschrieben wurden (Otto et al. 1996) und somit trotz der geraden Zahl an Cys-Resten eine intermolekulare Verknüpfung über Disulfidbrücken möglich wird (Hoffmann 2015b). Es ist aber auch möglich, dass TFF2 ausschließlich als Lektin bindet. So wurde eine extrem feste, lektinartige Wechselwirkung von pTFF2 mit kommerziell erhältlichen Muzinpräparationen

bereits beschrieben, die auch durch Kochen mit SDS nicht gelöst werden kann (Stürmer et al. 2018). Die Ergebnisse des Proteinase K-Verdau (siehe Anhang 29) sprechen ebenfalls für eine, zumindest tlw. vorhandene, lektinartige Wechselwirkung von TFF2 mit dem Mukus. Nach dem Verdau mit Proteinase K bleibt lediglich das Muzinrückgrat, das durch die Zuckerreste vor dem Abbau geschützt wird, erhalten (Johansson et al. 2013). ^{125}I -pTFF2 kann auch nach Proteinase K-Verdau auf Höhe der GSAll-Reaktivität detektiert werden (Anhang 29). Da N- und C-Terminus des Muzins fehlen, können keine Disulfidbrücken ausgebildet werden; da TFF2 aber dennoch bindet, ist eine Lektinwechselwirkung sehr wahrscheinlich. Die Tatsache, dass SDS alleine nicht ausreicht, um TFF2 zumindest tlw. aus dem Mukuspeak herauszulösen, EDTA alleine jedoch schon (Anhang 18, Tabelle 22, Abbildung 45), spricht dafür, dass auch im Schwein die Bindung von TFF2 an den Mukus durch zweiwertige Ionen begünstigt wird. Auch Bindungsstudien mit ^{125}I -pTFF2 deuten darauf hin, dass zweiwertige Ionen bei der Bindung beteiligt sind. So ist die Bindung in Gegenwart von 30 mM EDTA leicht abgeschwächt, die Bindung in Gegenwart von Mg^{2+} leicht erhöht (Abbildung 48).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass TFF2 aus dem Schweinemagen, ebenso wie humanes TFF2, mit Muzinen der Mukusschicht interagiert und somit der Mukusschicht vermutlich durch Quervernetzung der Muzine mehr Stabilität verleiht (Übersicht siehe Hoffmann 2015b). Außerdem weisen die Daten darauf hin, dass auch im Schwein der Mukus mehrschichtig aufgebaut ist (Vergleich Abbildung 53). Nahe der Zelloberfläche (Gewebeextrakte) ist mehr TFF2 an den Mukus gebunden als in den Extrakten der abgekratzten Mukosa (Abbildung 41); TFF2 könnte also auch im Schweinemagen durch Quervernetzung der Muzine die Festigkeit der Mukusschicht beeinflussen. Die Bindung im Schwein scheint jedoch deutlich fester zu sein als im menschlichen Magen; Kochen mit SDS/EDTA ist nicht ausreichend, um TFF2 komplett vom Mukus zu lösen. Die stärkere Bindung könnte durch ein Fehlen der Glykosylierung (Rose et al. 1989) beim porcinen TFF2 zu Stande kommen. Da aber Tff2 der Maus, welches wie im Schwein ebenfalls nicht-glykosyliert vorliegt, durch Kochen mit SDS aus dem Mukus gelöst werden kann (Znalesniak et al. 2020), ist es wahrscheinlicher, dass die Aminosäuresequenz (Abbildung 8) und nicht die Glykosylierung bestimmt, wie stark TFF2 an den Mukus gebunden ist. Ursache für eine stärkere Bindung von TFF2 im Schwein könnte eine Anpassung der Mukusschicht an die Ernährungsweise der Schweine sein. So nehmen diese ihre Nahrung in unbehandelter Form (z. B. rohes Fleisch) zu sich und somit könnten mehr Bakterien in den GI-Trakt gelangen. Eine stabilere und festere Mukusschicht, also eine bessere Quervernetzung durch TFF2 (stärkere Bindung von TFF2), könnte dabei einen besseren Schutz gewährleisten.

6.4. TFFs in der Hypophyse vom Schwein

TFF2 konnte bereits 2004 auf RNA-Ebene im Hypophysenvorderlappen der Maus nachgewiesen werden (Hinz et al. 2004). Aber auch in anderen Bereichen des Gehirns konnten TFF-Peptide bereits nachgewiesen werden (Fu et al. 2014; Hirota et al. 1995; Probst et al. 1996); dies legt eine Funktion der TFF-Peptide als Neuropeptide nahe. In dieser Arbeit wurden Hypophysenvorderlappen, auch als Adenohypophyse bezeichnet, vom Schwein bzgl. TFF2 und TFF3 auf Proteinebene analysiert. Von der Adenohypophyse werden sowohl gonadotrope Hormone (Follitropin, Lutropin) als auch nicht-gonadotrope Hormone (Corticotropin, Thyrotropin, Somatotropin, Melanotropin und Prolactin) (Schiebler and Arnold 1999) ausgeschüttet. Sowohl TFF2 als auch TFF3 konnten in der Hypophyse auf Proteinebene nachgewiesen werden.

TFF2 ist nach S-75HL-Lauf ausschließlich im niedermolekularen Größenbereich (TFF2_{klein}) zu finden (Abbildung 50). Eine TFF2-Form, die an einen hochmolekularen Bindepartner gebunden ist (TFF2_{groß}), fehlt hier. Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE zeigt TFF2 ähnliche Bandenmuster wie im porcinen Magen, nicht-reduzierend wird eine ca. 30 kDa Bande sichtbar. Diese wurde, wie bereits oben erwähnt, im Pankreas (Stürmer et al. 2014) als TFF2-Homodimer beschrieben. Ursache für die Bildung eines nicht-kovalent gebundenen Homodimers ist vermutlich das Fehlen von Muzinen als Bindepartner, so wie dies in der Hypophyse und im Pankreas (Stürmer et al. 2014) der Fall ist.

TFF3 liegt in der Hypophyse ebenfalls ausschließlich im niedermolekularen Größenbereich nach S-75HL vor (Abbildung 51). Auf dem Western Blot nach R SDS-PAGE läuft es mit >14 kDa auf einer etwas anderen Höhe als das TFF3-Monomer des Kolons (Albert et al. 2010). Dies legt die Vermutung nahe, dass TFF3 in der Hypophyse möglicherweise posttranslational modifiziert vorliegen könnte. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht hinreichend geklärt werden und bedarf noch weiterer Untersuchung.

TFF-Peptide scheinen also, neben dem Schutz und Erhalt der Oberflächenintegrität von mukösen Epithelzellen (Kidon et al. 1995), auch von der Hypophyse endokrin in das Blut abgegeben zu werden. So ist bereits für die Ratte beschrieben, dass TFF-Peptide über die Blutbahn in unterschiedliche Organe transportiert werden können (Poulsen et al. 2003).

6.5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TFF2 sowohl im humanen Magen als auch im Schweinemagen an Muzine der Magenschleimhaut bindet. Bei humanen Gewebeproben wurde herausgearbeitet, dass TFF2 als Lektin nicht-kovalent an das Muzin MUC6 bindet. Diese Bindung ist zum einen abhängig vom pH-Wert und zum anderen abhängig von der Ca²⁺-Konzentration. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Vermutung, dass die Mukusschicht im humanen Magen zweischichtig aufgebaut ist (Atuma et al. 2001). So bindet

TFF2 bei einem neutralen pH-Wert und einer höheren Ca^{2+} -Konzentration (Bedingungen der Epithelzelloberfläche, (Bahari et al. 1982; Grant 1941)) fester an MUC6 als bei einem sauren pH-Wert und einer geringeren Ca^{2+} -Konzentration. An der Epitheloberfläche wird also, vermutlich durch eine zusätzliche Quervernetzung der Muzine durch TFF2, ein festerer und stabilerer Mukus gebildet. Im Schwein kann ebenfalls eine Bindung von TFF2 an den Magenmukus beobachtet werden. Diese ist jedoch deutlich fester als bei humanen Magenproben. Diese Bindung erfolgt zum Teil über eine lektinartige Wechselwirkung, die ebenfalls pH-Wert abhängig ist. Eine tlw. kovalente Wechselwirkung von TFF2 mit den Muzinen im Schweinemagen kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden. Eine evtl. Ursache für eine stärkere Bindung von TFF2 im Schwein könnte eine Anpassung der Mukusschicht an die Ernährungsweise der Schweine sein. Durch die Bindung von TFF2 an Muzine der Mukusschicht des Magens könnte eine zusätzliche Quervernetzung der Muzine erfolgen und somit die rheologischen Eigenschaften der Mukosa moduliert werden (Thim et al. 2002).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass TFF2 auch im humanen Duodenum vorkommt. Je nach Entnahmeort der Probe liegt TFF2 dort vermutlich entweder als TFF2_{groß} oder als freies TFF2 vor. Der saure Chymus des Magens gelangt zunächst in den oralen Teil des Duodenums, dort schützt dann der Mukus (MUC6, vermutlich stabilisiert und quervernetzt durch TFF2) das Duodenum vor diesem sauren pH-Wert (Ovesen et al. 1986; Schweitzer 2018). Der Anteil an Brunner'schen Drüsen ist dort besonders hoch (Bargmann 2013), TFF2 ist dort vermutlich größtenteils an MUC6 gebunden (TFF2_{groß}). Durch die basische Gallenflüssigkeit und den basischen Pankrassaft im kaudalen Teil des Duodenums (Ovesen et al. 1986; Schweitzer 2018), wird diese oben beschriebene Schutzfunktion vermutlich nicht mehr benötigt; es gibt kaum noch Brunner'sche Drüsen (Bargmann 2013), dadurch kaum MUC6 und TFF2 liegt somit vermutlich vorwiegend als freies TFF2 vor. Das TFF2 des Duodenums unterscheidet sich in der NR SDS-PAGE deutlich vom TFF2 des Magens. Viele verschiedene Banden deuten auf viele verschiedene Glykoformen im Duodenum hin. Um dies jedoch zu klären, wäre es sinnvoll, in folgenden Arbeiten die Banden nach NR SDS-PAGE zu eluieren und massenspektrometrisch zu analysieren.

Ebenfalls wurden die TFF-Peptide TFF2 und TFF3 in der Hypophyse des Schweins untersucht. Nachdem bereits 2004 gezeigt wurde, dass TFF2 in der Hypophyse der Maus exprimiert wird (Hinz et al. 2004), konnte TFF2 nun auch in der Hypophyse des Schweins nachgewiesen werden. Dort bildet es vermutlich, wie bereits tlw. im Schweinemagen (abgekratzte Mukosa) und auch im Pankreas (Stürmer et al. 2014) beobachtet, Homodimere. Es stellt sich nun die Frage, welche Funktionen diese Homodimere aufweisen und ob sie an einen Partner binden (z.B. Rezeptor). Zudem sollte auch die Funktion von TFF2 als mögliches Neuropeptid in Zukunft untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Aihara E, Engevik KA, Montrose MH (2017) Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu Rev Physiol* 79:357–380
- Albert TK, Laubinger W, Müller S, Hanisch F-G, Kalinski T, Meyer F, Hoffmann W (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
- Allen A, Carroll NJH (1985) Adherent and soluble mucus in the stomach and duodenum. *Digestive Diseases and Sciences* 30:55S-62S
- Allen A, Flemström G (2005) Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol , Cell Physiol* 288:C1-19
- Ambort D, Johansson MEV, Gustafsson JK, Ermund A, Hansson GC (2012) Perspectives on mucus properties and formation--lessons from the biochemical world. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2
- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L (2001) The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G922-9
- Bahari HM, Ross IN, Turnberg LA (1982) Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro. *Gut* 23:513–516
- Bansil R, Turner BS (2006) Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11:164–170
- Bargmann W (2013) *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen: Band 5, Teil 3: Zähne, Darm, Atmungsapparat*. Springer Berlin Heidelberg
- Bartman AE, Buisine M-P, Aubert J-P, Niehans GA, Toribara NW, Kim YS, Kelly EJ, Crabtree JE, Ho SB (1998) The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissues. *J Pathol* 186:398–405
- Bauer L. M. M. (2013) *Bedeutung tumorstammzellassoziierter Gene für die Chemotherapieresistenz und Prognose beim Magenkarzinom: Dissertation*
- Beck S, Schmitt H, Shizuya H, Blin N, Gött P (1996) Cloning of contiguous genomic fragments from human chromosome 21 harbouring three trefoil peptide genes. *Hum Genet* 98:233–235
- Bell SL, Xu G, Forstner JF (2001) Role of the cystine-knot motif at the C-terminus of rat mucin protein Muc2 in dimer formation and secretion. *Biochem J* 357:203–209

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2014) Erforschung der Proteine und Proteome. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto GJ (eds) *Biochemie*, 7. Auflage, korrigierter Nachdruck. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, pp 66–109
- Bhaskar KR, Gong DH, Bansil R, Pajevic S, Hamilton JA, Turner BS, LaMont JT (1991) Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH. *Am J Physiol* 261:G827-32
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99
- Bossenmeyer-Pourié C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio M-C (2002) The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 157:761–770
- Braga Emidio N, HOFFMANN W, Brierley SM, Muttenthaler M (2019) Trefoil factor family: unresolved questions and clinical perspectives. *Trends Biochem Sci* 44:387–390
- Cao X, Bansil R, Bhaskar KR, Turner BS, LaMont JT, Niu N, Afdhal NH (1999) pH-Dependent Conformational Change of Gastric Mucin Leads to Sol-Gel Transition. *Biophysical Journal* 76:1250–1258
- Carlstedt I, Lindgren H, Sheehan JK (1983) The macromolecular structure of human cervical-mucus glycoproteins. Studies on fragments obtained after reduction of disulphide bridges and after subsequent trypsin digestion. *Biochem J* 213:427–435
- Chadwick MP, Westley BR, May FE (1997) Homodimerization and hetero-oligomerization of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem J* 327:117–123
- Chinery R, Playford RJ (1995) Combined intestinal trefoil factor and epidermal growth factor is prophylactic against indomethacin-induced gastric damage in the rat. *Clin Sci* 88:401–403
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Chwieralski CE, 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
- Cook GA, Familiarì M, Thim L, Giraud AS (1999) The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett* 456:155–159

- Corfield AP (2001) Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 6:d1321-1357
- Corring T (1982) Enzyme digestion in the proximal digestive tract of the pig: A review. *Livestock Production Science* 9:581–590
- Dekker J, Rossen JWA, Büller HA, Einerhand AWC (2002) The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 27:126–131
- Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK (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 TC (2009) Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J Biol Chem* 284:3650–3662
- Ebert MP, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P (1999) Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 45:105–111
- Ermund A, Schütte A, Johansson MEV, Gustafsson JK, Hansson GC (2013) Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305:G341-7
- Fu T, Stellmacher A, Znalesniak EB, Dieterich DC, Kalbacher H, Hoffmann W (2014) Tff3 is Expressed in Neurons and Microglial Cells. *CPB* 34:1912–1919
- Gabius H-J (2008) *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Incorporated, Somerset
- Gajhede M, Petersen TN, Henriksen A, Petersen JF, Dauter Z, Wilson KS, Thim L (1993) Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Structure* 1:253–262
- Garcia MAS, Yang N, Quinton PM (2009) Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest* 119:2613–2622
- Gilbert HF (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63:69–172

- Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT (2015) Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research. *Transl Res* 166:12–27
- Gött P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N (1996) Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet* 4:308–315
- Grant R (1941) Calcium in gastric mucus and regulation of gastric acidity. *Am J Physiol* 135:496–503
- H.N. Laerke, M.S. Hedemann (eds) (2012) The digestive system of the pig. Nutritional physiology of pigs - Online Publication. ed. Videncenter for Svineproduktion, Foulum
- Hanby AM, Poulsom R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA (1993a) Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: Distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology* 105:1110–1116
- Hanby AM, Poulsom R, Elia G, Singh S, Longcroft JM, Wright NA (1993b) The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'. *J Pathol* 169:355–360
- Hanisch F-G, Ragge H, Kalinski T, Meyer F, Kalbacher H, Hoffmann W (2013) Human gastric TFF2 peptide contains an N-linked fucosylated N,N'-diacetyllactosamine (LacdiNAc) oligosaccharide. *Glycobiology* 23:2–11
- Hanisch F-G, Bonar D, Schloerer N, Schroten H (2014) Human trefoil factor 2 is a lectin that binds α -GlcNAc-capped mucin glycans with antibiotic activity against *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 289:27363–27375
- Hauser F, Poulsom R, Chinery R, Rogers LA, Hanby AM, Wright NA, 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
- Heuer J, Heuer F, Stürmer R, Harder S, Schlüter H, Braga Emidio N, Muttenthaler M, Jechorek D, Meyer F, Hoffmann W (2020) The Tumor Suppressor TFF1 Occurs in Different Forms and Interacts with Multiple Partners in the Human Gastric Mucus Barrier: Indications for Diverse Protective Functions. *Int J Mol Sci* 21
- Hilz H, Wiegers U, Adamietz P (1975) Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. *Eur J Biochem* 56:103–108

- Hinz M, Schwegler H, Chwieralski CE, Laube G, Linke R, Pohle W, Hoffmann W (2004) Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides* 25:827–832
- Hirota M, Awatsuji H, Sugihara Y, Miyashita S, Furukawa Y, Hayashi K (1995) Expression of pS2 gene in rat brain. *Biochem Mol Biol Int* 35:1079–1084
- Hoffmann W (2004) Trefoil factor family (TFF) peptides: regulators of mucosal regeneration and repair, and more. *Peptides* 25:727–730
- Hoffmann W (2006) TFF (Trefoil Factor Family) Peptides. In: Kastin AJ (ed) *Handbook of biologically active peptides*. Academic Press, Amsterdam, Boston, 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 (2015a) Current Status on Stem Cells and Cancers of the Gastric Epithelium. *Int J Mol Sci* 16:19153–19169
- Hoffmann W (2015b) TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int J Oncol* 47:806–816
- Hoffmann W (2020) Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Diverse Molecular Functions in Mucus Barrier Protection and More: Changing the Paradigm. *Int J Mol Sci* 21
- Hong Z, Chasan B, Bansil R, Turner BS, Bhaskar KR, Afdhal NH (2005) Atomic force microscopy reveals aggregation of gastric mucin at low pH. *Biomacromolecules* 6:3458–3466
- Houben T, Harder S, Schlüter H, Kalbacher H, Hoffmann W (2019) Different Forms of TFF3 in the Human Saliva: Heterodimerization with IgG Fc Binding Protein (FCGBP). *Int J Mol Sci* 20
- Ihida K, Sukanuma T, Tsutama S, Murata F (1988) Glycoconjugate histochemistry of the rat fundic gland using Griffonia simplicifolia agglutinin-II during the development. *American Journal of Anatomy* 182:250–256
- Ishihara K, Kurihara M, Goso Y, Urata T, Ota H, Katsuyama T, Hotta K (1996) Peripheral alpha-linked N-acetylglucosamine on the carbohydrate moiety of mucin derived from mammalian gastric gland mucous cells: epitope recognized by a newly characterized monoclonal antibody. *Biochem J* 318 (Pt 2):409–416
- J.P.Rowan, K.L.Durrance, G.E. Combs, and L.Z. Fisher (1997, revised 2015) *The Digestive Tract of the Pig*. <https://edis.ifas.ufl.edu/an012>

- Jagla W, Wiede A, Kölle S, Hoffmann W (1998) Differential expression of the TFF-peptides xP1 and xP4 in the gastrointestinal tract of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res* 291:13–18
- Jagla W, Wiede A, Hinz M, Dietzmann K, Gülicher D, Gerlach KL, 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. *The FASEB Journal* 14:1126–1131
- Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P (1984) Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res* 12:2861–2878
- Jeffrey GP, Oates PS, Wang TC, Babyatsky MW, Brand SJ (1994) Spasmolytic polypeptide: A trefoil peptide secreted by rat gastric mucous cells. *Gastroenterology* 106:336–345
- Johansson MEV, Sjövall H, Hansson GC (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:352–361
- Jørgensen KD, Diamant B, Jørgensen KH, Thim L (1982a) Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. Pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effects. *Regul Pept* 3:231–243
- Jørgensen KH, Thim L, Jacobsen HE (1982b) Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept* 3:207–219
- Kang D-H, Gho Y-S, Suh M-K, Kang C-H (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23:1511–1512
- Kararli TT (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* 16:351–380
- Karlsson NG, Nordman H, Karlsson H, Carlstedt I, Hansson GC (1997) Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. *Biochem J* 326 (Pt 3):911–917
- Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12:319–330
- Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK (1995) Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 109:516–523

- Kinoshita K, Taupin DR, Itoh H, Podolsky DK (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
- Kjellev S (2009) The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 66:1350–1369
- Kjellev S, Nexø E, Thim L, Poulsen SS (2006) Systemically administered trefoil factors are secreted into the gastric lumen and increase the viscosity of gastric contents. *Br J Pharmacol* 149:92–99
- Kouznetsova I, Peitz U, Vieth M, Meyer F, Vestergaard EM, Malfertheiner P, Roessner A, Lippert H, 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, Laubinger W, Kalbacher H, Kalinski T, Meyer F, Roessner A, Hoffmann W (2007a) 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* 20:899–908
- Kouznetsova I, Kalinski T, Peitz U, Mönkemüller KE, Kalbacher H, Vieth M, Meyer F, Roessner A, Malfertheiner P, Lippert H, Hoffmann W (2007b) 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, 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
- Krause WJ (2000) Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile. *Prog Histochem Cytochem* 35:259–367
- Kurt-Jones EA, Cao L, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR, Cerny A, Bowen G, Yan J, Takaishi S, Chi AL, Reed G, Houghton J, Fox JG, Wang TC (2007) Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect Immun* 75:471–480
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Langer G, Walter S, Behrens-Baumann W, Hoffmann W (2001) TFF-Peptide. *Der Ophthalmologe* 98:976–979

- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948
- Lee H, Wang P, Hoshino H, Ito Y, Kobayashi M, Nakayama J, Seeberger PH, Fukuda M (2008) Alpha1,4GlcNAc-capped mucin-type O-glycan inhibits cholesterol alpha-glucosyltransferase from *Helicobacter pylori* and suppresses *H. pylori* growth. *Glycobiology* 18:549–558
- Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC (1996) Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 274:259–262
- Lottspeich F, Engels JW (eds) (2009) *Bioanalytik, 2., [aktualisierte und erw.] Aufl., [Nachdr.]*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
- Lottspeich F, Zorbas H (eds) (1998) *Bioanalytik. Spektrum Lehrbuch*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
- Mantle M, Allen A (1978) A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain proceedings. *Biochem Soc Trans* 6:607–609
- Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P (1982) Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10:7895–7903
- May FE, Semple JI, Newton JL, Westley BR (2000) The human two domain trefoil protein, TFF2, is glycosylated in vivo in the stomach. *Gut* 46:454–459
- May FEB, Griffin SM, Westley BR (2009) The trefoil factor interacting protein TFIZ1 binds the trefoil protein TFF1 preferentially in normal gastric mucosal cells but the co-expression of these proteins is deregulated in gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 41:632–640
- McCarthy AJ, Birchenough GMH, Taylor PW (2019) Loss of Trefoil Factor 2 Sensitizes Rat Pups to Systemic Infection with the Neonatal Pathogen *Escherichia coli* K1. *Infect Immun* 87
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9:265–278
- Menheniott TR, Kurklu B, Giraud AS (2013) Gastrokines: stomach-specific proteins with putative homeostatic and tumor suppressor roles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304:G109-21

- Nakayama J, Yeh JC, Misra AK, Ito S, Katsuyama T, Fukuda M (1999) Expression cloning of a human alpha1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase that forms GlcNAcalpha1--4Galbeta--R, a glycan specifically expressed in the gastric gland mucous cell-type mucin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8991–8996
- Nakayama J (2014) Dual Roles of Gastric Gland Mucin-specific O-glycans in Prevention of Gastric Cancer. *Acta Histochem Cytochem* 47:1–9
- Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T (2009) Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem* 57:41–50
- Nordman H, Davies JR, Carlstedt I (1998) Mucus glycoproteins from pig gastric mucosa: different mucins are produced by the surface epithelium and the glands. *Biochem J* 331:687–694
- Nordman H, Davies JR, Lindell G, Bolós C de, Real F, Carlstedt I (2002) Gastric MUC5AC and MUC6 are large oligomeric mucins that differ in size, glycosylation and tissue distribution. *Biochem J* 364:191–200
- Ota H, Hayama M, Momose M, El-Zimaity HMT, Matsuda K, Sano K, Maruta F, Okumura N, Katsuyama T (2006) Co-localization of TFF2 with gland mucous cell mucin in gastric mucous cells and in extracellular mucous gel adherent to normal and damaged gastric mucosa. *Histochem Cell Biol* 126:617–625
- Otto WR, Rao J, Cox HM, Kotzian E, Lee CY, Goodlad RA, Lane A, Gorman M, Freemont PA, Hansen HF, Pappin D, Wright NA (1996) Effects of Pancreatic Spasmolytic Polypeptide (PSP) on Epithelial Cell Function. *Eur J Biochem* 235:64–72
- Ovesen L, Bendtsen F, Tage-Jensen U, Pedersen NT, Gram BR, Rune SJ (1986) Intraluminal pH in the stomach, duodenum, and proximal jejunum in normal subjects and patients with exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology* 90:958–962
- Patterson JK, Lei XG, Miller DD (2008) The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:651–664
- Peitz U, Kouznetsova I, Wex T, Gebert I, Vieth M, Roessner A, HOFFMANN W, Malfertheiner P (2004) TFF3 expression at the esophagogastric junction is increased in gastro-esophageal reflux disease (GERD). *Peptides* 25:771–777
- Perez-Vilar J, Hill RL (1999) The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem* 274:31751–31754
- Perez-Vilar J (2007) Mucin granule intraluminal organization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:183–190

- Petersen TN, Henriksen A, Gajhede M (1996) Structure of porcine pancreatic spasmolytic polypeptide at 1.95 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52:730–737
- Phillipson M, Atuma C, Henriksnäs J, Holm L (2002) The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G211-9
- Phillipson M, Johansson MEV, Henriksnäs J, Petersson J, Gendler SJ, Sandler S, Persson AEG, Hansson GC, Holm L (2008) The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:G806-12
- Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiegue-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van-Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N (1996) Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 38:340–352
- Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, De-Baumont M, Sands BE, Mahida YR (1993) Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* 268:12230
- Polshakov VI, Williams MA, Gargaro AR, Frenkiel TA, Westley BR, Chadwick MP, May FE, Feeney J (1997) High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: a single trefoil motif protein. *J Mol Biol* 267:418–432
- Poole LB (2015) The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med* 80:148–157
- Poulsen SS, Thulesen J, Hartmann B, Kissow HL, Nexø E, Thim L (2003) Injected TFF1 and TFF3 bind to TFF2-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract in rats. *Regul Pept* 115:91–99
- Poulsen SS, 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 Pept* 126:163–171
- Powell JJ, Greenfield SM, Thompson RP (1992) Concentrations of metals in gastric juice in health and peptic ulcer disease. *Gut* 33:1617–1620
- Probst JC, Zetzsche T, Weber M, Theilemann P, Skutella T, Landgraf R, Jirikowski GF (1996) Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide. *The FASEB Journal* 10:1518–1523
- Rasmussen TN, Raaberg L, Poulsen SS, Thim L, Holst JJ (1992) Immunohistochemical localization of pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP) in the pig. *Histochemistry* 98:113–119

- Reeves EP, Ali T, Leonard P, Hearty S, O'Kennedy R, May FEB, Westley BR, Josenhans C, Rust M, Suerbaum S, Smith A, Drumm B, Clyne M (2008) Helicobacter pylori lipopolysaccharide interacts with TFF1 in a pH-dependent manner. *Gastroenterology* 135:2043-54, 2054.e1-2
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3116–3120
- Rio MC, Bellocq JP, Daniel JY, Tomasetto C, Lathe R, Chenard MP, Batzenschlager A, Chambon P (1988) Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 241:705–708
- Rose K, Savoy L-A, Thim L, Christensen M, Jørgensen KH (1989) Revised amino acid sequence of pancreatic spasmolytic polypeptide exhibits greater similarity with an inducible pS2 peptide found in a human breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 998:297–300
- Rossez Y, Gosset P, Boneca IG, Magalhães A, Ecobichon C, Reis CA, Cieniewski-Bernard C, Joncquel Chevalier Curt M, Léonard R, Maes E, Sperandio B, Slomianny C, Sansonetti PJ, Michalski J-C, Robbe-Masselot C (2014) The lacdiNAc-specific adhesin LabA mediates adhesion of Helicobacter pylori to human gastric mucosa. *J Infect Dis* 210:1286–1295
- Sasaki M, Tsuneyama K, Saito T, Kataoka H, Mollenhauer J, Poustka A, Nakanuma Y (2004) Site-characteristic expression and induction of trefoil factor family 1, 2 and 3 and malignant brain tumor-1 in normal and diseased intrahepatic bile ducts relates to biliary pathophysiology. *Liver Int* 24:29–37
- Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y (2007) Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem* 42:61–110
- Schiebler TH, Arnold G (1999) *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 119 Tabellen, 8., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Springer-Lehrbuch.* Springer, Berlin
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
- Schreiber S, Scheid P (1997) Gastric mucus of the guinea pig: proton carrier and diffusion barrier. *Am J Physiol* 272:G63-70

- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling H-O, Josenhans C, Suerbaum S (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5024–5029
- Schroeder BO (2019) Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 7:3–12
- Schweitzer R (2018) *Verdauungssystem*, 3. Auflage. Die Heilpraktiker-Akademie, Band 6. Elsevier, München
- Semple J, Newton J, Westley B, May F (2001) Dramatic diurnal variation in the concentration of the human trefoil peptide TFF2 in gastric juice. *Gut* 48:648–655
- Sheehan JK, Kirkham S, Howard M, Woodman P, Kutay S, Brazeau C, Buckley J, Thornton DJ (2004) Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin. *J Biol Chem* 279:15698–15705
- Shi S-Q, Cai J-T, Yang J-M (2006) Expression of trefoil factors 1 and 2 in precancerous condition and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12:3119–3122
- Snary D, Allen A, Pain RH (1970) Structural studies on gastric mucoproteins: lowering of molecular weight after reduction with 2-mercaptoethanol. *Biochem Biophys Res Commun* 40:844–851
- Stürmer R, Müller S, Hanisch F-G, Hoffmann W (2014) Porcine gastric TFF2 is a mucus constituent and differs from pancreatic TFF2. *Cell Physiol Biochem* 33:895–904
- Stürmer R, Harder S, Schlüter H, Hoffmann W (2018) Commercial Porcine Gastric Mucin Preparations, also Used as Artificial Saliva, are a Rich Source for the Lectin TFF2: In Vitro Binding Studies. *ChemBioChem* 19:2598–2608
- Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK (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
- T. C. McIlvaine (1921) A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. *J Biol Chem*:183–186
- Tanaka S, Podolsky DK, Engel E, Guth PH, Kaunitz JD (1997) Human spasmolytic polypeptide decreases proton permeation through gastric mucus in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 272:G1473-80
- Tarentino AL, Gómez CM, Plummer TH (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24:4665–4671

- 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
- Thim L (1989) A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett* 250:85–90
- Thim L (1997) Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci* 53:888–903
- Thim L, Mørtz E (2000) Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 90:61–68
- Thim L, Jørgensen KH, Jørgensen KD (1982) Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): II. Radioimmunological determination of PSP in porcine tissues, plasma and pancreatic juice. *Regul Pept* 3:221–230
- Thim L, Norris K, Norris F, Nielsen PF, Bjørn SE, Christensen M, Petersen J (1993) Purification and characterization of the trefoil peptide human spasmolytic polypeptide (hSP) produced in yeast. *FEBS Lett* 318:345–352
- Thim L, Madsen F, Poulsen SS (2002) Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 32:519–527
- Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P, Lathe R (1990) hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J* 9:407–414
- Toribara NW, Ho SB, Gum E, Gum JR, Lau P, Kim YS (1997) The carboxyl-terminal sequence of the human secretory mucin, MUC6. Analysis Of the primary amino acid sequence. *J Biol Chem* 272:16398–16403
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4354
- Turner BS, Bhaskar KR, Hadzopoulou-Cladaras M, LaMont JT (1999) Cysteine-rich regions of pig gastric mucin contain von willebrand factor and cystine knot domains at the carboxyl terminal(1). *Biochim Biophys Acta* 1447:77–92
- Verdugo P (1991) Mucin exocytosis. *Am Rev Respir Dis* 144:S33-7
- Vinall LE, Hill AS, Pigny P, Pratt WS, Toribara N, Gum JR, Kim YS, Porchet N, Aubert JP, Swallow DM (1998) Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum Genet* 102:357–366

- Walker JM (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*. Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc, Totowa, NJ
- Westley BR, Griffin SM, May FEB (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, Hoffmann W (2001) Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res* 303:109–115
- Wong WM, Poulsom R, Wright NA (1999) Trefoil peptides. *Gut* 44:890–895
- Wright NA, Poulsom R, Stamp G, van Noorden S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C (1993) Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104:12–20
- Xue L, Aihara E, Wang TC, Montrose MH (2011) Trefoil factor 2 requires Na/H exchanger 2 activity to enhance mouse gastric epithelial repair. *J Biol Chem* 286:38375–38382
- Zhang Y, Yu G, Wang Y, Xiang Y, Gao Q, Jiang P, Zhang J, Lee W, Zhang Y (2011) Activation of protease-activated receptor (PAR) 1 by frog trefoil factor (TFF) 2 and PAR4 by human TFF2. *Cell Mol Life Sci* 68:3771–3780
- Znalesniak EB, Salm F, Hoffmann W (2020) Molecular Alterations in the Stomach of Tff1-Deficient Mice: Early Steps in Antral Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 21

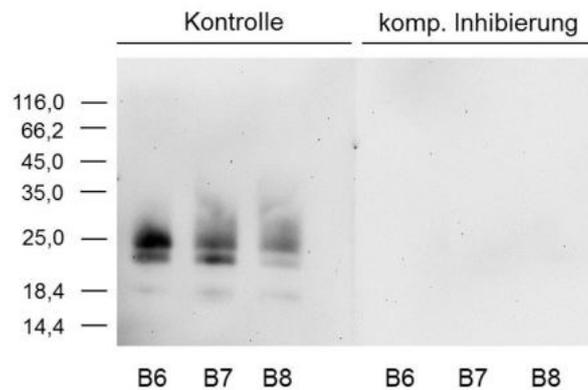
8. Anhang

8.1. Humanes TFF2

8.1.1. TFF2 im humanen Magen

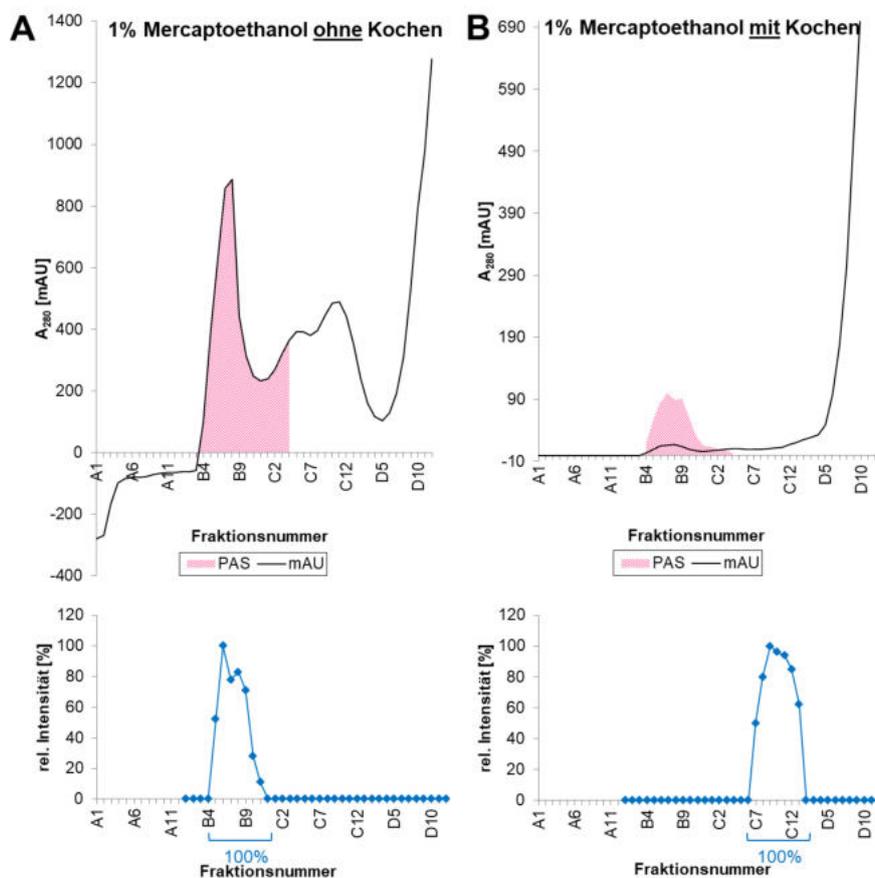
8.1.1.1. S-75HL-Läufe von humanen Magenproben

A: Antrum vs. Korpus- Kompetitive Inhibition



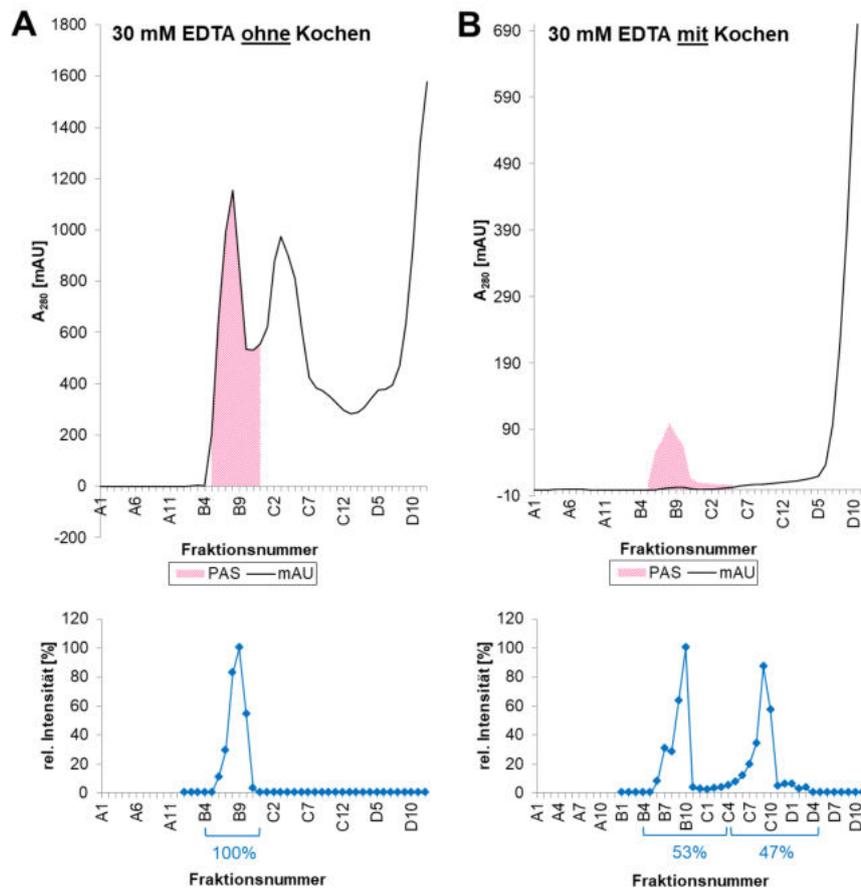
Anhang 1: Kompetitive Inhibition von TFF2 nach S-75HL-Lauf einer humanen Korpusprobe. NR SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen B6-B8 nach S-75HL-Lauf. Links: Kontrolle. Rechts: Kompetitiv inhibiert mit dem synthetischen Peptid (siehe Material und Methoden). Säulenlauf bei pH 7.0 (siehe Abbildung 19). Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

B: Extraktionsmethoden im Korpus



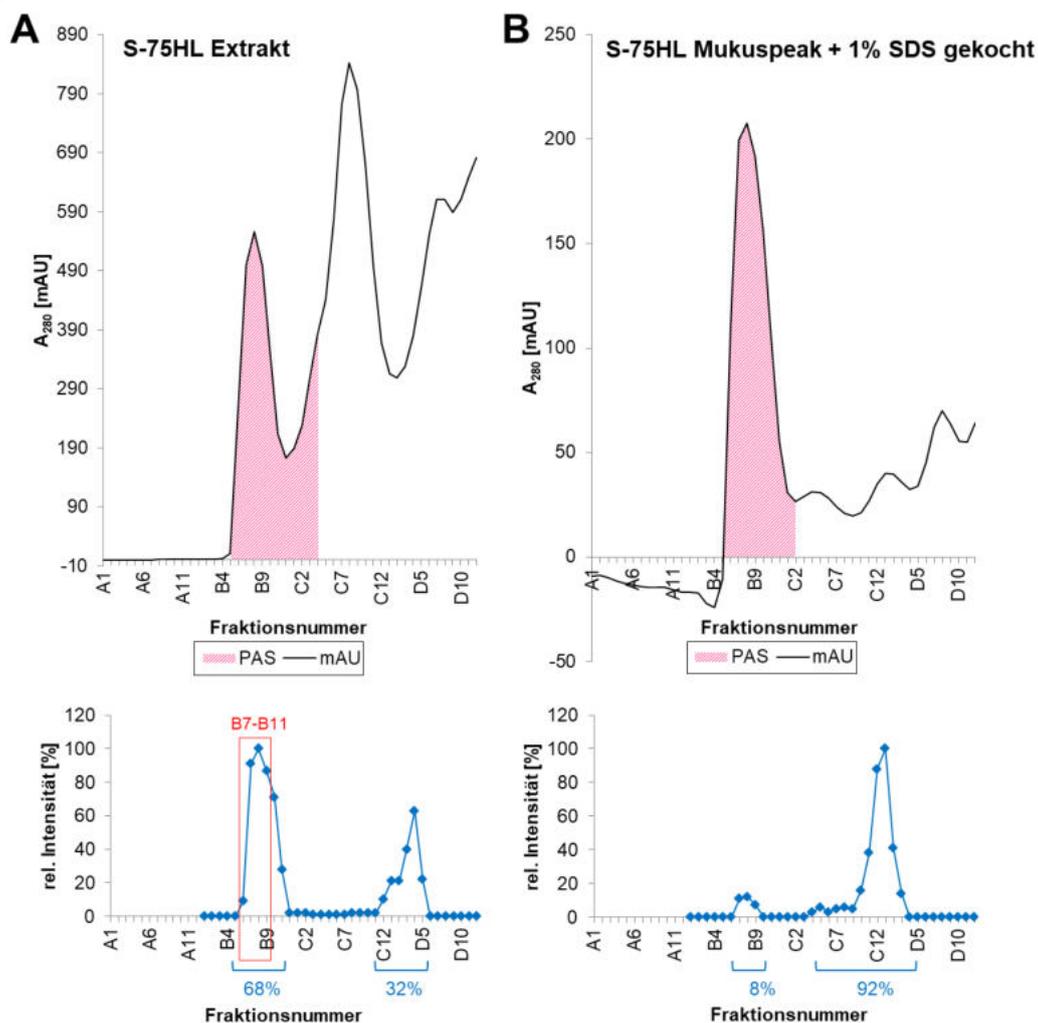
Anhang 2: Vergleich von S-75HL-Läufen einer humanen Korpusprobe (MC383) nach Zugabe von 1% β -Mercaptoethanol +/- Kochen. A: S-75HL-Lauf ohne Kochen. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und die Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). B: S-75HL-Lauf mit Kochen. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve und PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 6.0.

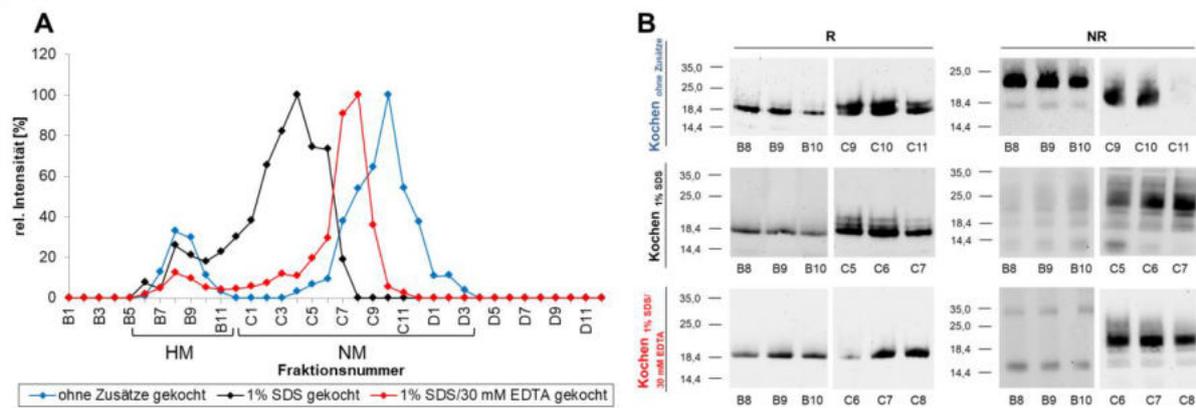


Anhang 3: Vergleich von S-75HL-Läufen einer humanen Korpusprobe (MC383) nach Zugabe von 30 mM EDTA +/- Kochen. A: S-75HL-Lauf ohne Kochen. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-Gele) bzw. PAS (Dot Blot). Säulenlauf bei pH 8.0. **B: S-75HL-Lauf mit Kochen.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Säulenlauf bei pH 6.0.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve und PAS: pinke Fläche.

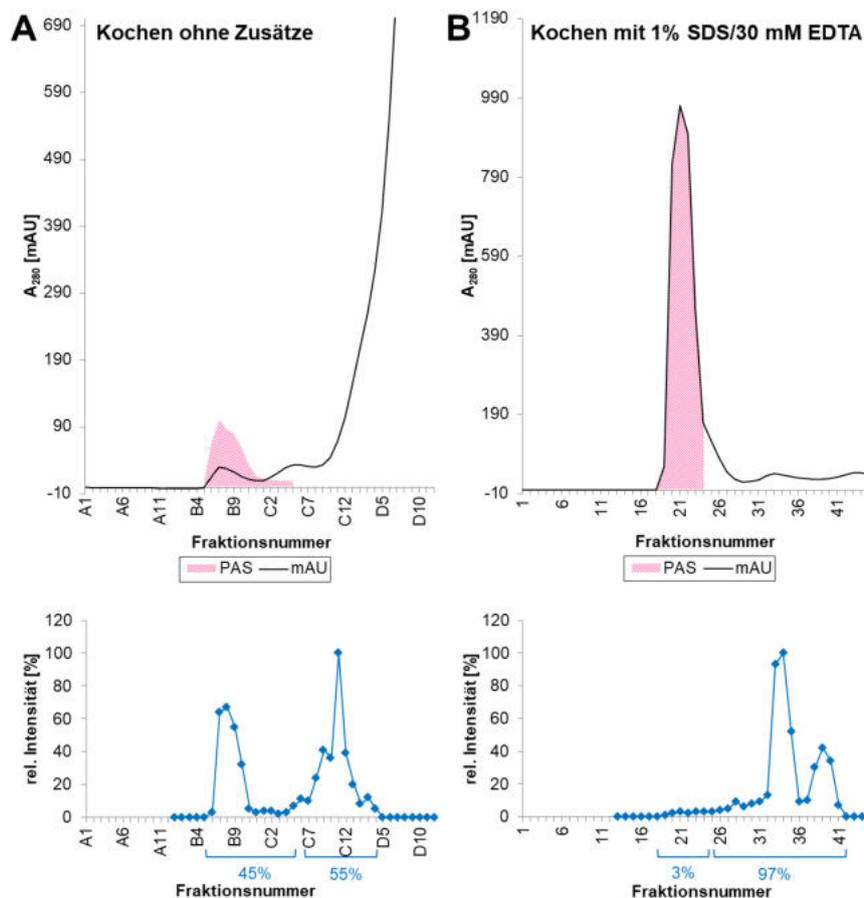


Anhang 4: S-75HL-Lauf nach Kochen eines gereinigten Mukuspeaks einer humanen Korpusprobe mit 1% SDS. A: S-75HL eines humanen Korpusextrakts (MC406A). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktionen des hochmolekularen Bereichs (Fr. B7-B11) wurden vereinigt, mit 1% SDS gekocht und wiederrum über eine S-75HL gereinigt. **B: S-75HL des gereinigten Mukuspeaks nach Kochen mit 1% SDS.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve und PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 7.0.



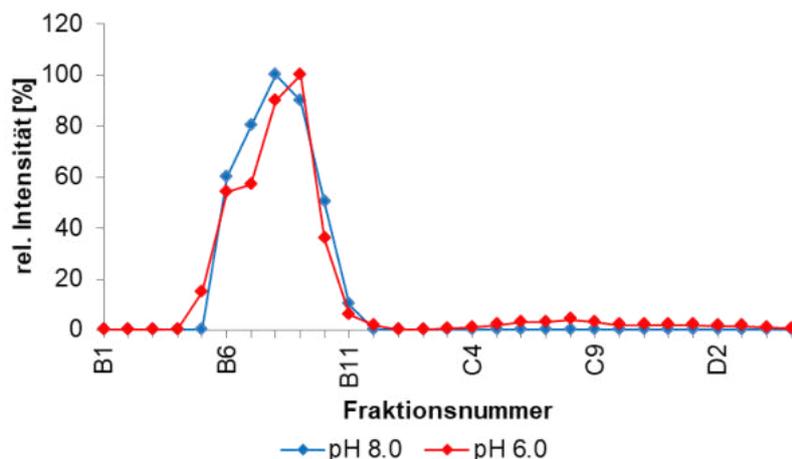
Anhang 5: S-75HL-Läufe von gekochten Korpusextrakten (MC383) unter verschiedenen Bedingungen. A: Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE). Blaue Kurve: Kochen des Extrakts ohne Zusätze (pH 6.0); Schwarze Kurve: Kochen des Extrakts in Anwesenheit von 1% SDS (pH 8.0) und rote Kurve: Kochen des Extrakts in Anwesenheit von 1% SDS/30 mM EDTA (pH 8.0). **B: SDS-PAGE des HM- bzw. NM-Bereichs.** 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 des HM-Bereichs (B8-B10) bzw. des NM-Bereichs (C9-C11: Kochen ohne Zusätze, C5-C7: Kochen mit 1% SDS bzw. C6-C8: Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA der S-75HL-Säulen aus A.

HM: Hochmolekularer Bereich (PAS positiv), NM: niedermolekularer Bereich (PAS negativ). Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.



Anhang 6: S-75HL-Läufe von gekochten humanen Korpusextrakten +/- 1% SDS/30 mM EDTA. A: S-75HL-Lauf nach Kochen ohne Zusätze (MC358). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). **B: S-75HL-Lauf nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA (MC577).** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

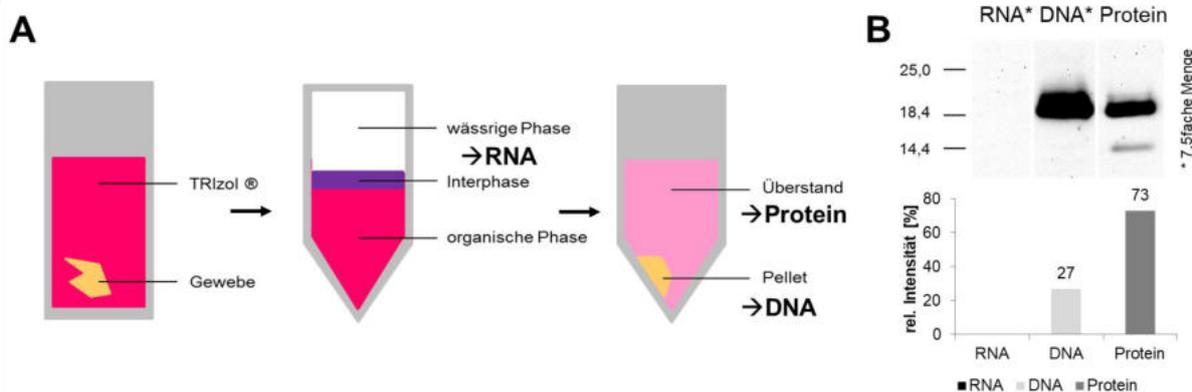
Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve und PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 7.0.



Anhang 7: TFF2-Profil der S-75HL-Läufe einer humanen Korpusprobe (MC383) bei verschiedenen pH-Werten. TFF2-Profile nach semiquantitativer Auswertung (R 15%ige SDS-PAGE). Blau: pH 8.0; Rot: pH 6.0;

	Checked	Accession	Description	Coverage [%]	Unique Peptides	MW [kDa]	Score Sequest HT
D1/II	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	13	5	14,3	104.33
D2/II	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	12	2	14,3	26.62

Anhang 8: Massenspektroskopische Analyse des humanen TFF2_{klein} aus dem Korpus nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. Durchgeführt durch Prof. Dr. H. Schlüter, UKE Hamburg, Zentrum für Diagnostik, Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin.

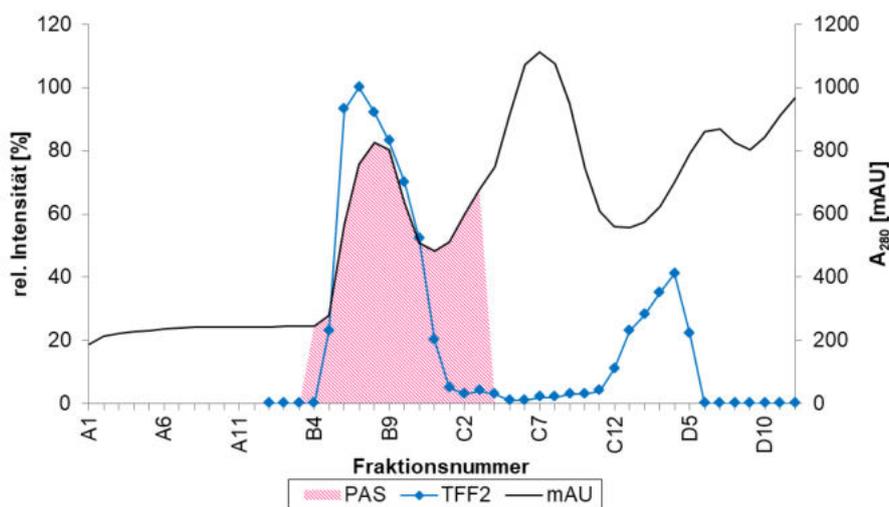


Anhang 9: Verteilung von TFF2 nach TRizol[®]-Extraktion (MC577) in DNA-Pellet, RNA-Phase und Proteinpellet. A: Vereinfachte schematische Darstellung der TRizol[®]-Extraktion. B: R SDS-PAGE der einzelnen Phasen/Pellets nach TRizol[®]-Extraktion. R 15%ige SDS-PAGE und Western Blot bzgl. TFF2 von Proben der RNA-Phase (RNA), des DNA-Pellets (DNA) und des Proteinpellets (Protein) nach TRizol[®]-Extraktion sowie die semiquantitative Auswertung. Von RNA und DNA wurde die 7,5fache Menge aufgetragen. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

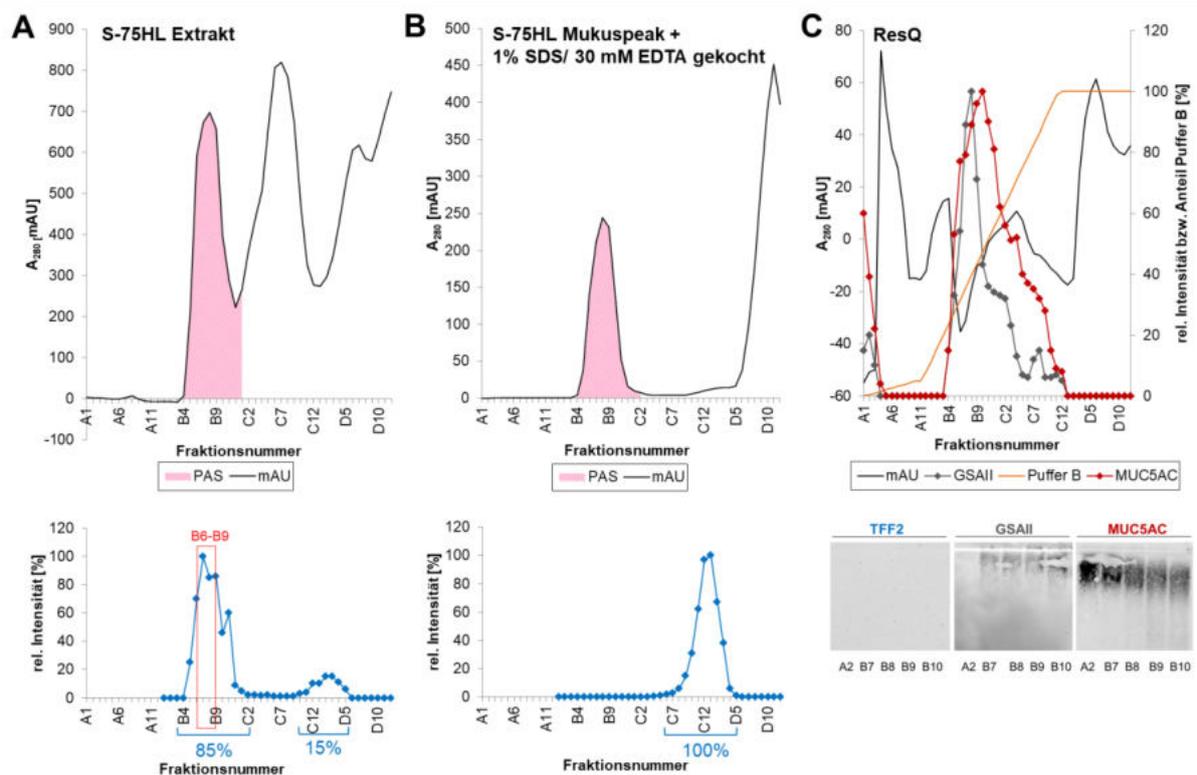
	Checked	Accession	Description	Coverage [%]	Unique Peptides	MW [kDa]	Score Sequest HT
A1	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	23	6	14,3	26,15
A2	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	22	2	14,3	8,1
B1	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	23	4	14,3	16,48
B2	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	22	3	14,3	14,13
C1	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	31	7	14,3	25,94
C2	True	Q03403	Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2	23	8	14,3	23,14

Anhang 10: Massenspektroskopische Analyse des humanen TFF2_{klein} nach TRIZOL®-Extraktion. Die massenspektrometrische Analyse der Banden A1+A2, B1+B2 und C1+C2 erfolgte durch Prof. Dr. H. Schlüter, UKE Hamburg, Zentrum für Diagnostik, Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin.

8.1.1.2. Bindungsstudien mit ¹²⁵I-TFF2



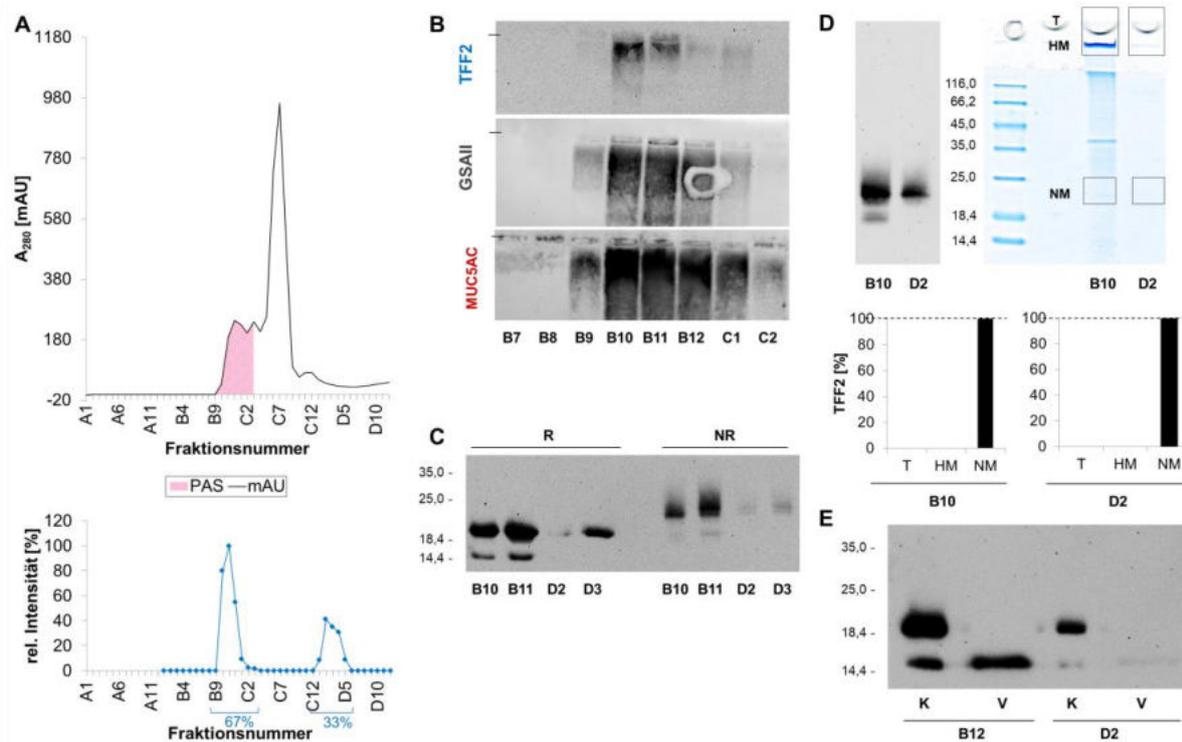
Anhang 11: S-75HL-Lauf eines humanen Korpusextrakts (MC406A). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Säulenlauf bei pH 7.0.



Anhang 12: Generierung von TFF2-freiem Mukus. A: S-75HL eines Korpusextrakts (MC406A). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktionen B6-B9 wurden vereinigt, mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht und auf eine S-75HL aufgetragen. **B: S-75HL-Lauf des gereinigten Mukuspeaks nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Der TFF2-freie Mukuspeak (Fr. B6-B9) wurde anschließend über eine ResQ-Säule gereinigt. **C: ResQ-Lauf des TFF2-freien Mukuspeaks nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung bzgl. TFF2, GSAll und MUC5AC (1%ige AgGE). Außerdem gezeigt sind 1%igen AgGE der Fraktionen A2, B7-B10 nach ResQ-Lauf des gereinigten Mukuspeaks und Western Blot bzgl. TFF2, GSAll und MUC5AC.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, GSAll: dunkelgraue Kurve, MUC5AC: rote Kurve, PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 7.0.

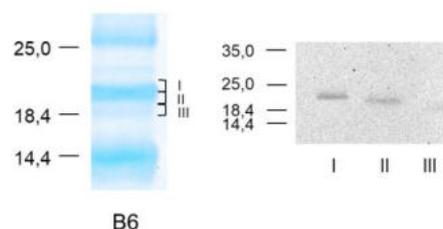
8.1.1.3. Elution von TFF2 aus dem NR Coomassiegel



Anhang 13: Elution von TFF2 aus dem NR Coomassiegel einer Probe nach S-75HL-Lauf. A: S-75HL eines Korpusextrakts (MC577). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). **B: AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSAL1 und MUC5AC.** 1%ige AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSAL1 und MUC5AC der Fraktionen B7-C2 nach S-75HL (siehe A). **C: Vergleichende R und NR SDS-PAGE.** 15%ige R bzw. NR SDS-PAGE der Fraktionen B10-B11 (TFF2_{groß}) und der Fraktionen D2-D3 (TFF2_{klein}) nach S-75HL und Western Blot bzgl. TFF2. **D: Elution aus dem NR Coomassiegel.** NR 15%ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung, sowie eine NR 15%ige SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der Fraktionen B10 und D2 nach S-75HL. Die Banden HM (hochmolekular) und NM (niedermolekular), sowie der Tascheninhalt (T) wurden eluiert und auf eine R 15%iges SDS-PAGE aufgetragen (nicht gezeigt). Gezeigt ist die semiquantitative Auswertung dieser R SDS-PAGE nach Western bzgl. TFF2. **E: N-Glycosidase F-Verdau.** Die Fraktionen B12 (TFF2_{groß}) und D2 (TFF2_{klein}) wurden einem Glycosidase F-Verdau unterzogen. Dargestellt ist eine R 15%ige SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der Proben vor Verdau (K) und nach Verdau (V).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Säulenlauf bei pH 7.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben. Strich: Tasche der Agarosegele

8.1.2. TFF2 im humanen Duodenum

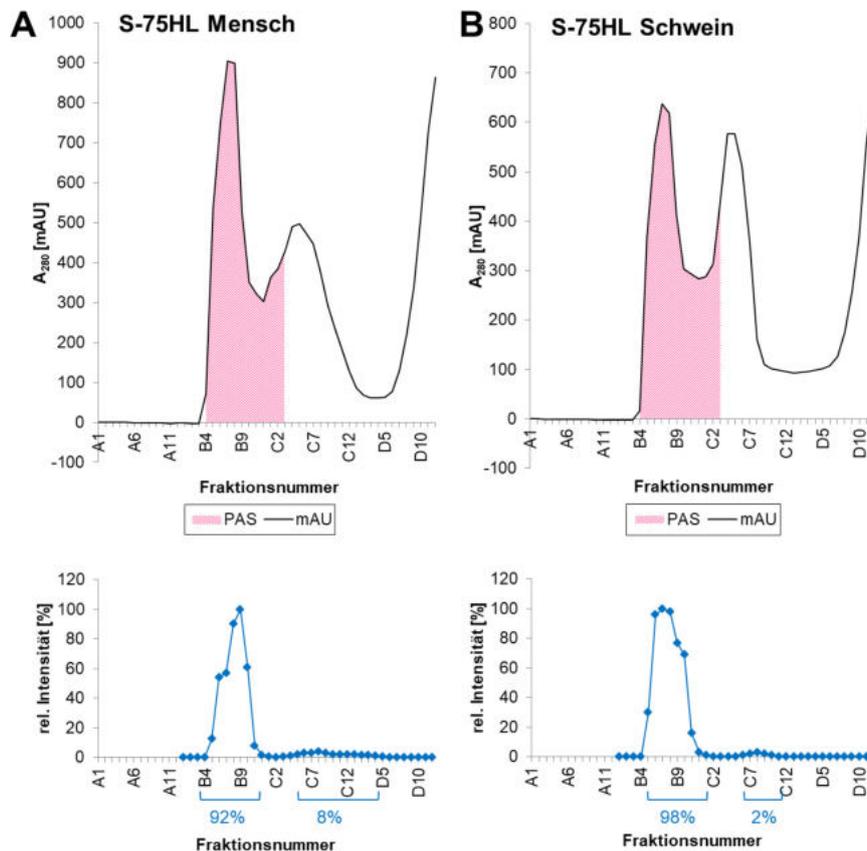


Anhang 14: TFF2_{groß} aus dem humanen Duodenum. Links: R 15%ige SDS-PAGE mit Coomassiefärbung der Fraktion B6 nach S-75HL-Lauf (siehe Abbildung 36). Die Banden I-III wurden eluiert. Rechts: R 15%ige SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF2 der eluierten Banden I-III (siehe links). Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

8.2. TFF2 im Schwein

8.2.1. TFF2 im Magen vom Schwein

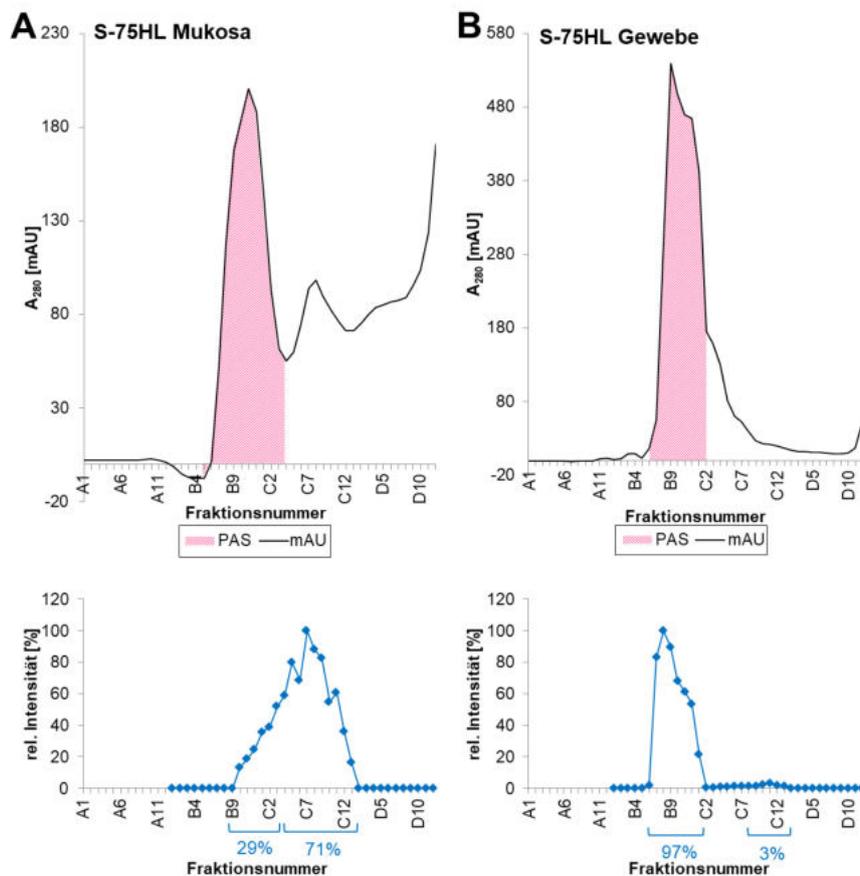
8.2.1.1. Vergleich von TFF2 aus dem Korpus vom Schwein vs. Mensch



Anhang 15: S-75HL-Läufe von Korpusproben aus dem Schwein bzw. aus dem humanen Magen. A:S-75HL humaner Korpus (MC383). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). **B:S-75HL Korpusprobe aus dem Schwein (Schwein 6).** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

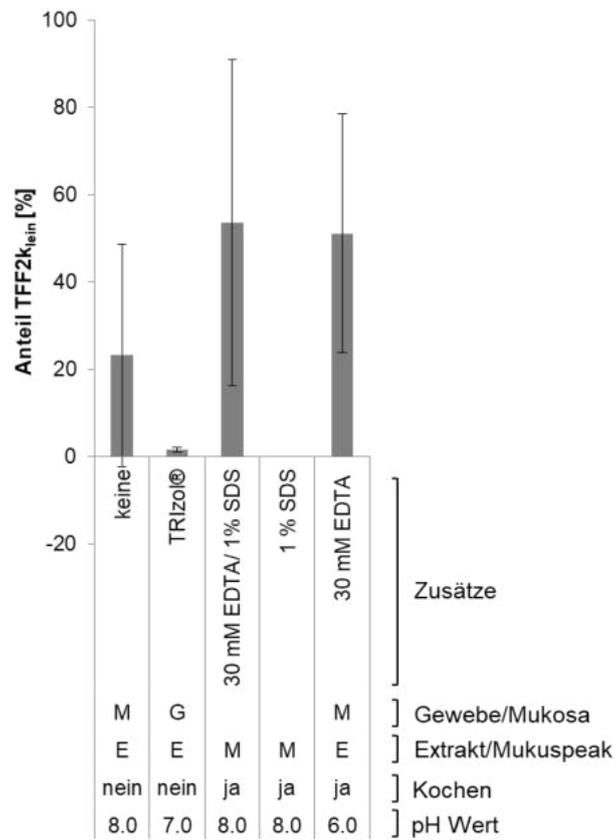
Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Säulenläufe bei pH 6.0. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

8.2.1.2. S-75HL-Läufe von Proben aus dem Schweinemagen

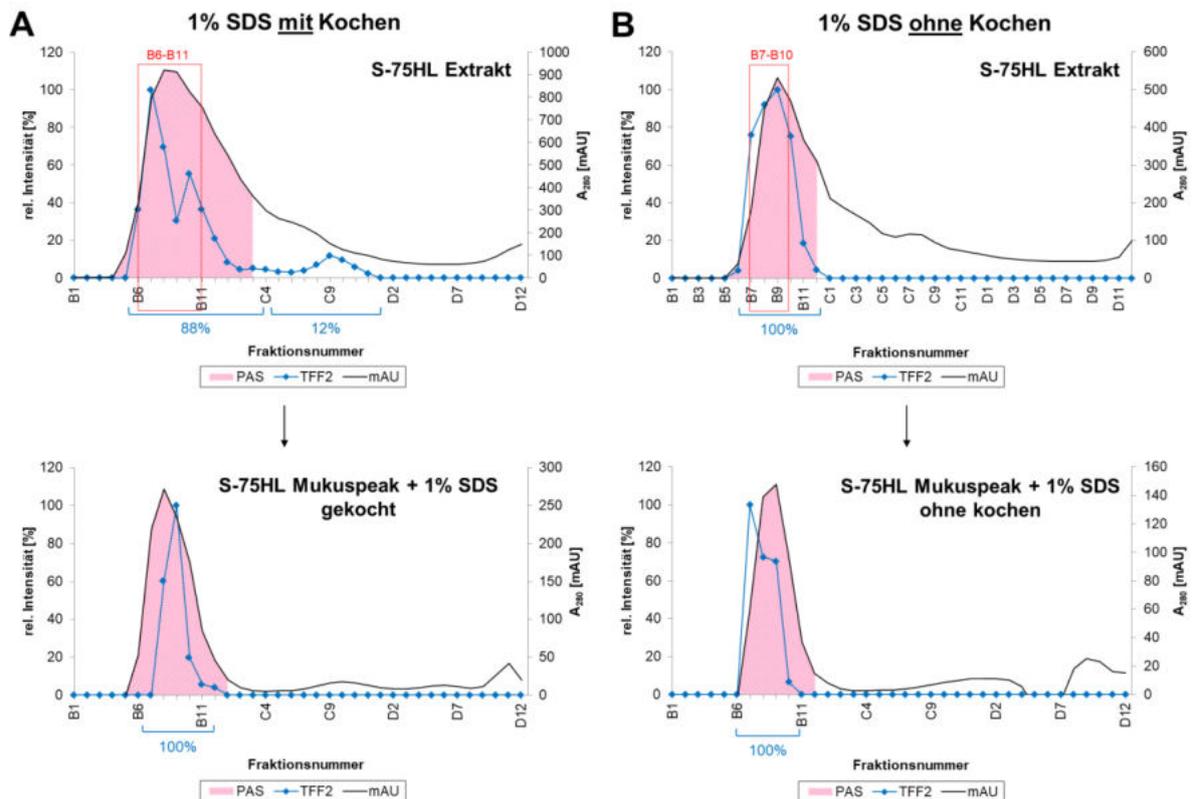


Anhang 16: S-75HL von Schwein Korpus Gewebe vs. abgekratzte Mukosa (Schwein 9). A: Gewebe. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). **B: Mukosa:** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Säulenläufe bei pH 8.0.

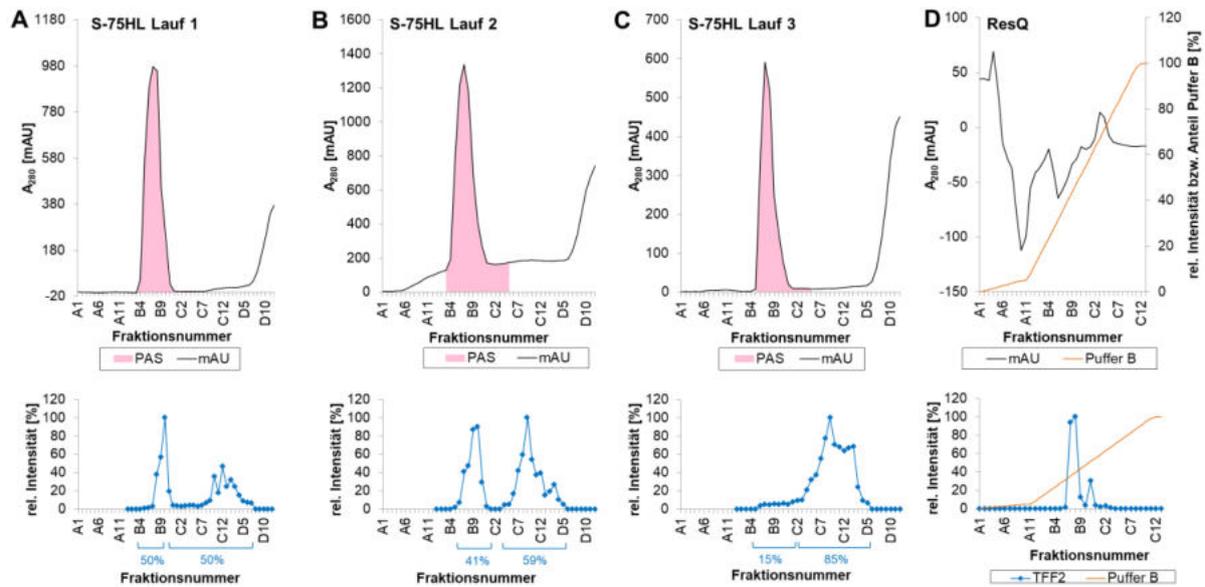


Anhang 17: Statistische Daten zu den Extraktionsmethoden im Korpus vom Schwein. Diagramm für den Anteil an TFF2_{klein} nach S-75HL-Läufen verschiedener Extraktionsmethoden (Anteil an TFF2_{klein} mit Fehlerbalken).



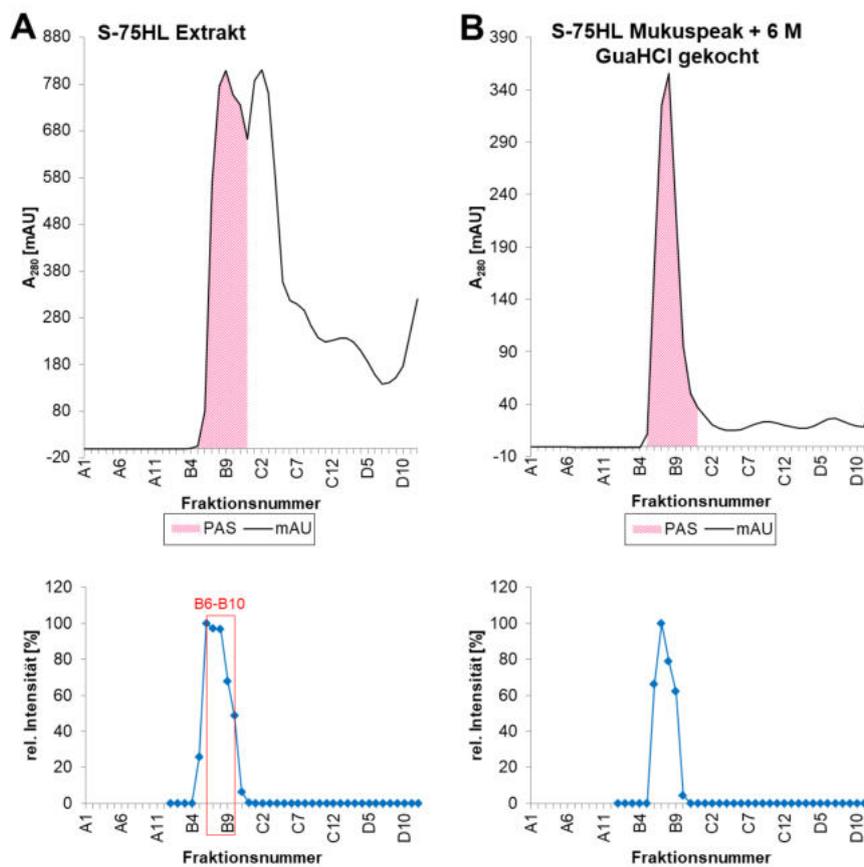
Anhang 18: Extraktion eines gereinigten Mukuspeaks aus dem Korpus Schwein. A: Extraktion durch Kochen mit 1% SDS. Oben: S-75HL Extrakt (abgekratzte Mukosa, Schwein 10). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Unten: S-75HL Mukuspeak (B6-B11). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). B: Extraktion mit 1% SDS ohne Kochen. Oben: S-75HL Extrakt (abgekratzte Mukosa, Schwein 10). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Unten: S-75HL Mukuspeak (B7-B10). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 8.0.



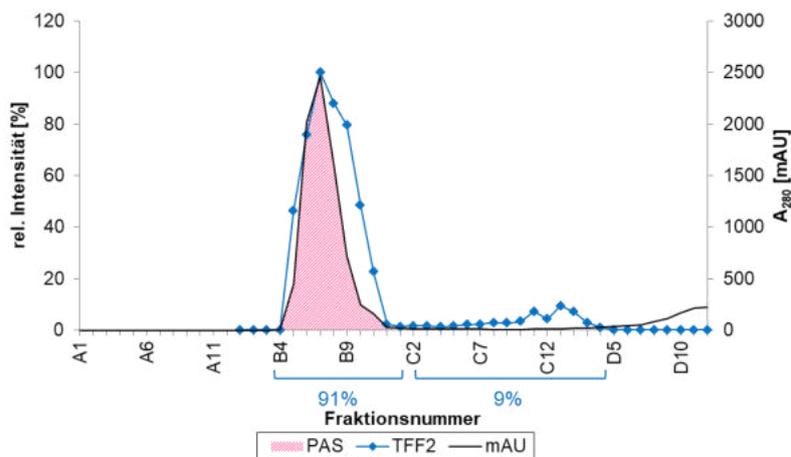
Anhang 19: Extraktion abgekratzter Mukosa aus dem Korpus vom Schwein durch Kochen mit 30 mM EDTA. A-C: S-75HL-Läufe der mit EDTA gekochten Extrakte (Schwein 11). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktionen C8-D3 von Lauf 1, C7-D2 von Lauf 2 und C7-D2 von Lauf 3 wurden vereinigt und über eine ResQ gereinigt. D: ResQ-Lauf von TFF2_{klein} der S-75HL-Läufe A-C nach Kochen mit 30 mM EDTA. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profil der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Puffer B (Salzgradient): orange Kurve. Säulenläufe bei pH 6.0.



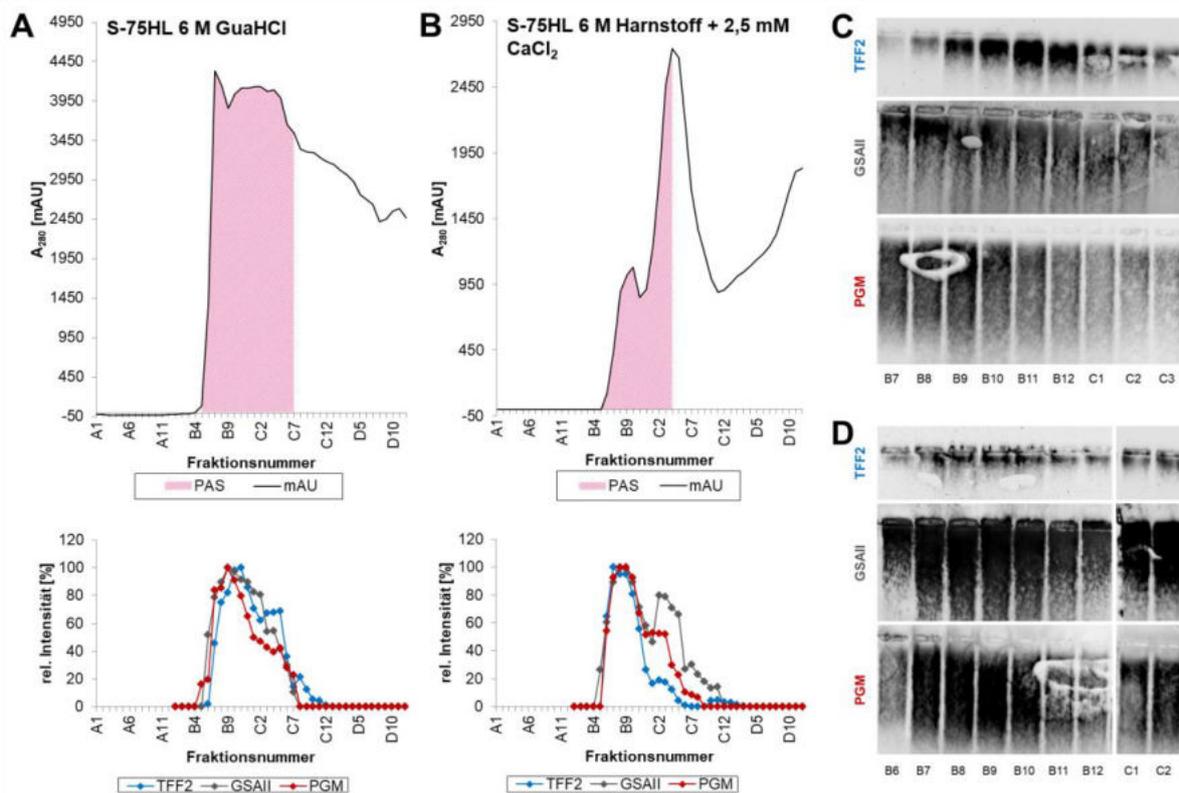
Anhang 20: Extraktion eines gereinigten Mukuspeak aus dem Korpus vom Schwein durch Kochen mit 6 M GuaHCl. A: S-75HL von abgekratzter Mukosa Korpus (Schwein 7). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktionen B6-B10 wurden vereinigt, mit 6 M GuaHCl gekocht und erneut auf eine S-75HL aufgetragen. **B: S-75HL nach Extraktion des gereinigten Mukuspeaks durch Kochen mit 6 M GuaHCl.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 8.0.



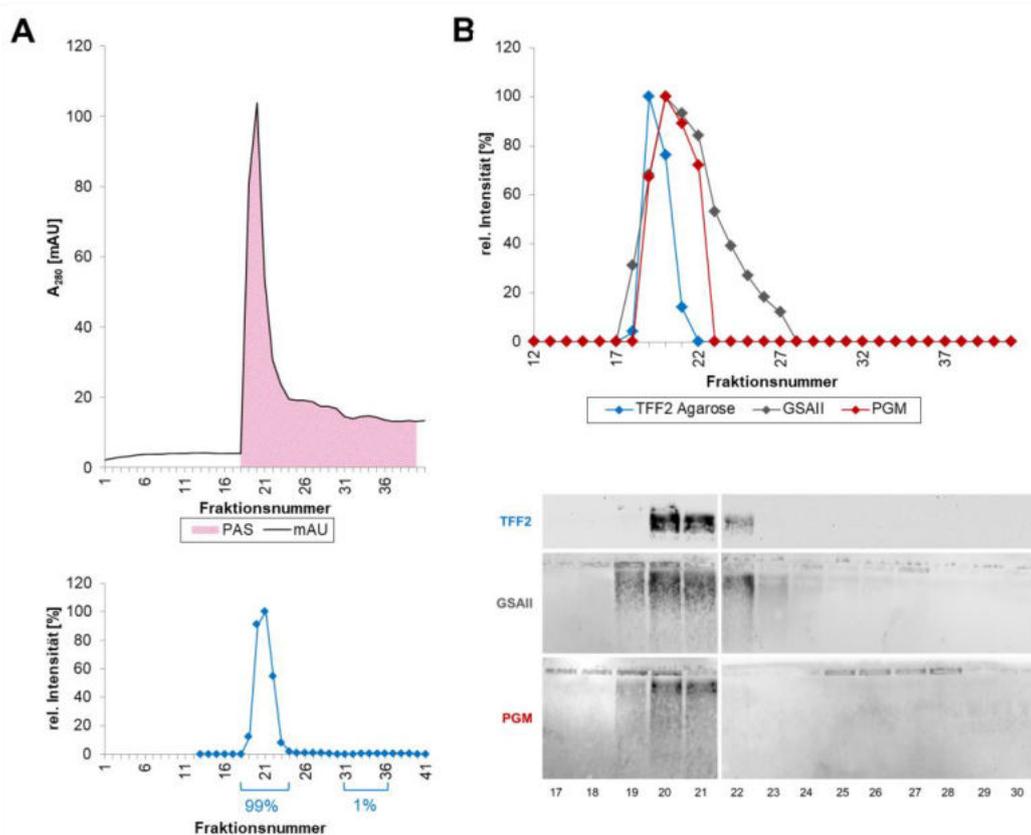
Anhang 21: Extraktion von Korpusgewebe aus dem Schwein (Schwein 6) durch Kochen ohne Zusätze. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve; PAS: pinke Fläche. Säulenlauf bei pH 6.0.



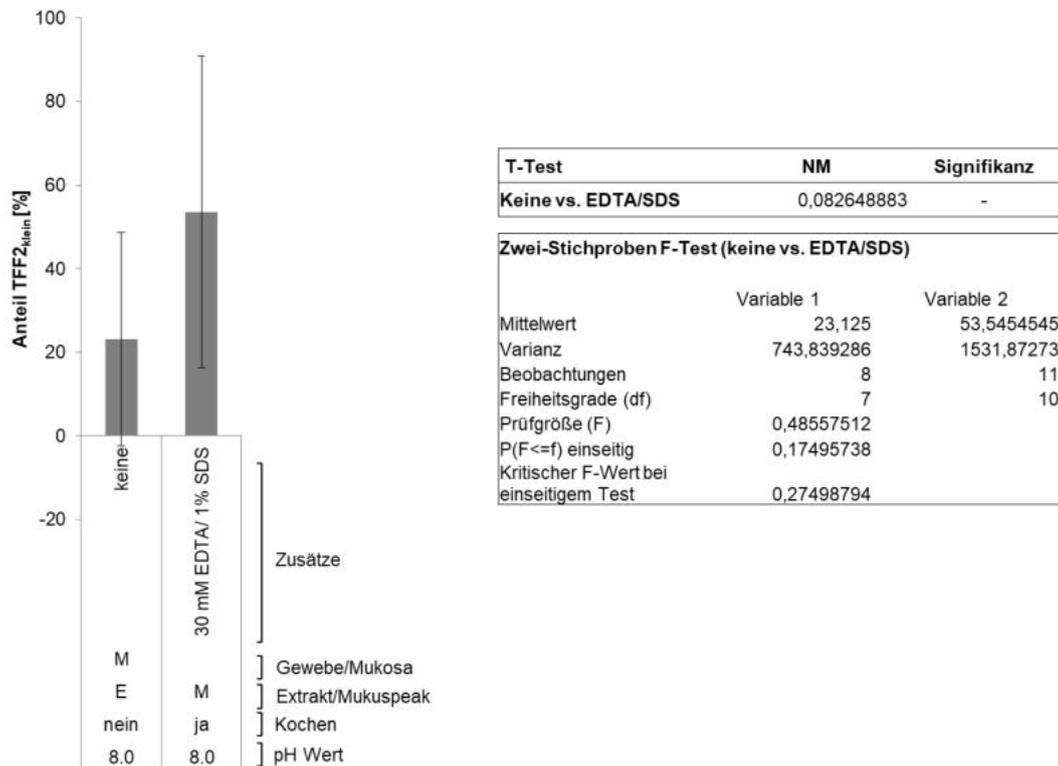
Anhang 22: Extraktion von Korpustgewebe aus dem Schwein (Schwein 6) in Anwesenheit von 6 M GuaHCl bzw. 6 M Harnstoff + 2,5 mM CaCl₂. A: S-75HL nach Extraktion in Anwesenheit von 6 M GuaHCl. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) bzw. TFF2, GSALII und PGM (1%ige AgGE). B: S-75HL nach Extraktion in Anwesenheit von 6 M Harnstoff + 2,5 mM CaCl₂. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für PAS (Dot Blot) bzw. TFF2, GSALII und PGM (1%ige AgGE). C: AgGE der S-75HL nach Extraktion in Anwesenheit von 6 M GuaHCl (A). 1%ige AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSALII und PGM von Fraktionen B7-C3 der S-75HL in A. D: AgGE der S-75HL nach Extraktion in Anwesenheit von 6 M Harnstoff + 2,5 mM CaCl₂. 1%ige AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSALII und PGM von Fraktionen B6-C2 der S-75HL in B.

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, GSALII: graue Kurve, PGM: rote Kurve. Säulenläufe bei pH 6.0.

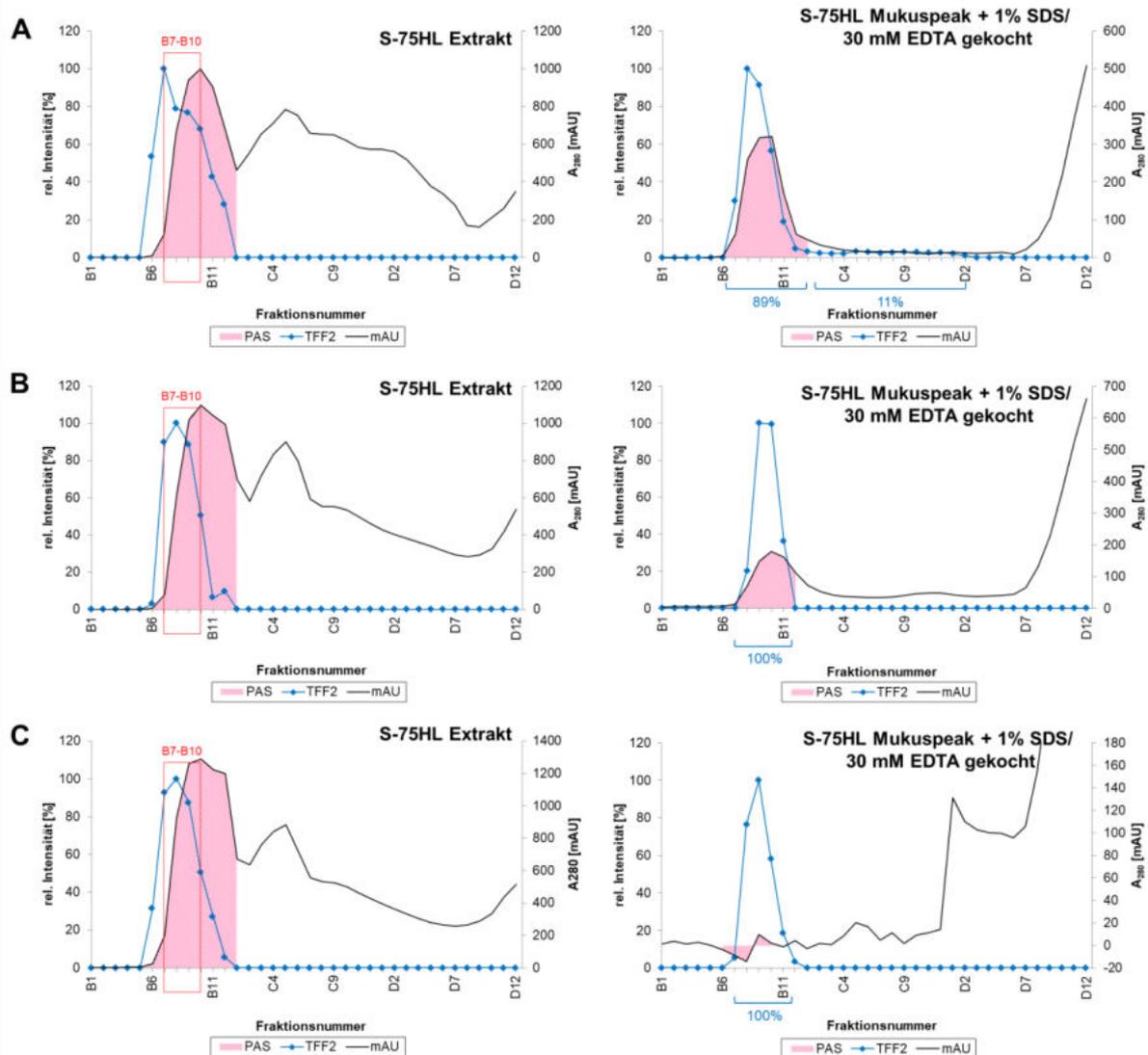


Anhang 23: TRizol[®]-Extraktion (pH 1.0) einer Korpusprobe vom Schwein (Schwein 6). A: S-75HL-Lauf des Proteinpellets nach TRizol[®]-Extraktion. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). B: AgGE und Western Blot bzgl. TFF2, GSAIL und PGM. Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2, GSAIL und PGM (1%ige AgGE). Dargestellt ist ebenfalls die 1%ige AgGE mit Western Blot bzgl. TFF2, GSAIL und PGM der Fraktionen 17-30 nach S-75HL (in A).

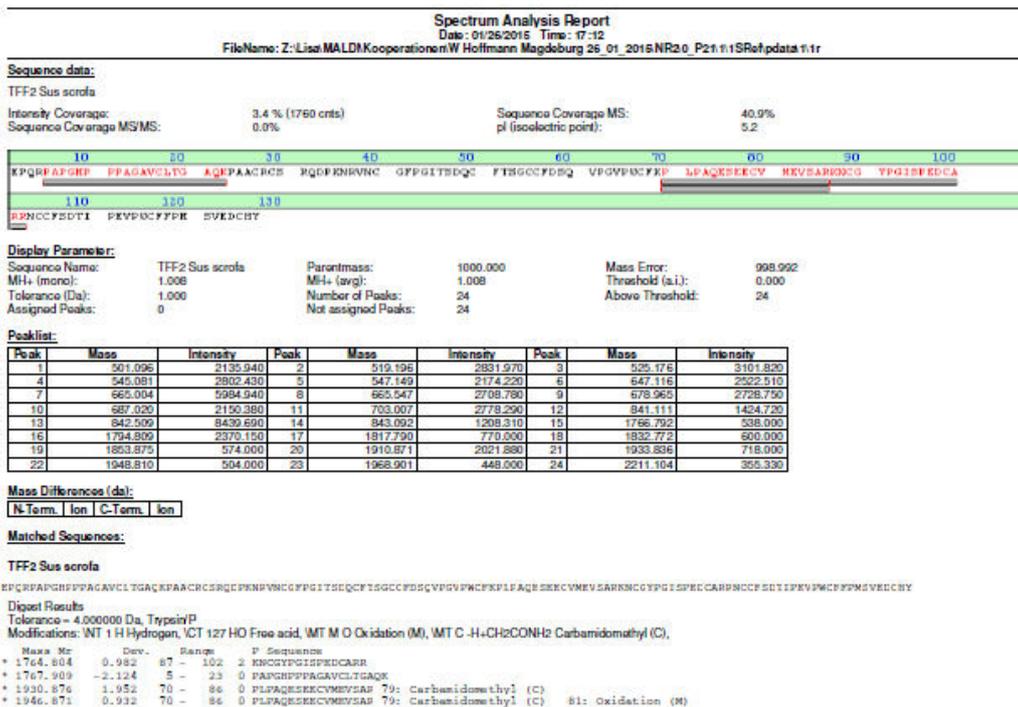
Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, GSAIL: graue Kurve, PGM: rote Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenlauf bei pH 7.0.



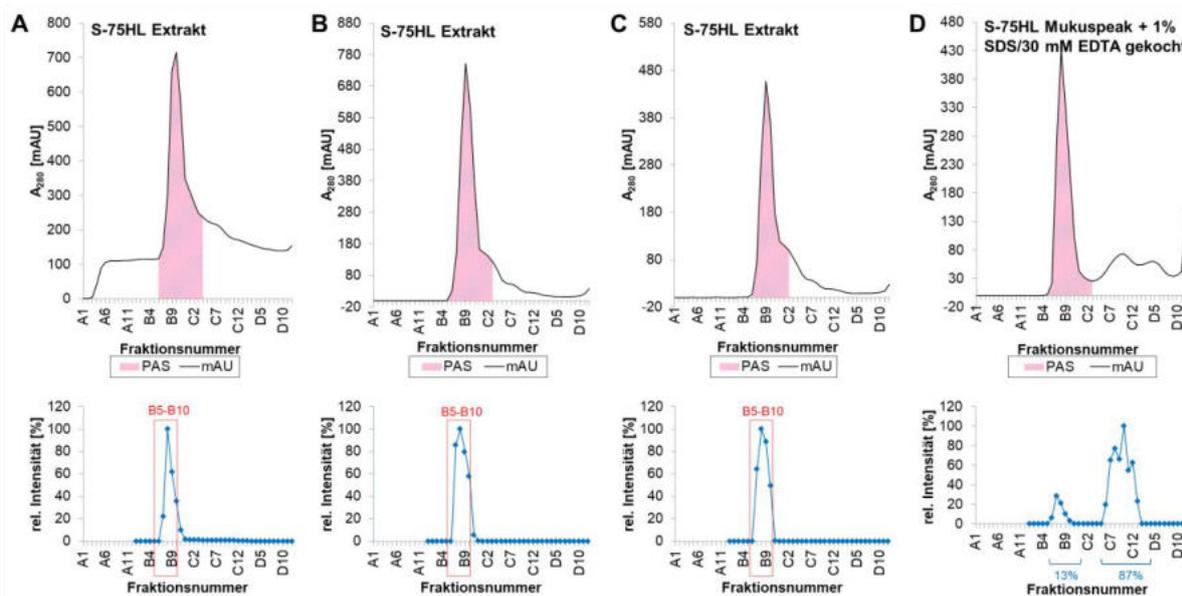
Anhang 24: Statistische Daten der Extraktion des gereinigten Mukuspeaks mit 1%SDS/30 mM EDTA. Vergleich (T-Test, F-Test) Extraktion ohne Zusätze (keine) vs. Extraktion durch Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. Anteil an TFF2_{klein} mit Fehlerbalken.



Anhang 25: Kochen eines gereinigten Mukuspeak aus dem Korpus Schwein mit 1% SDS/30 mM EDTA. A: Schwein 5- Lauf 1. Links: S-75HL Extrakt abgekratzte Mukosa. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Rechts: S-75HL Mukuspeak nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). B. Schwein 5- Lauf 2. Links: S-75HL Extrakt abgekratzte Mukosa. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Rechts: S-75HL Mukuspeak nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). C. Schwein 4: Links: S-75HL Extrakt abgekratzte Mukosa. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Rechts: S-75HL Mukuspeak nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche, Säulenläufe bei pH 8.0.

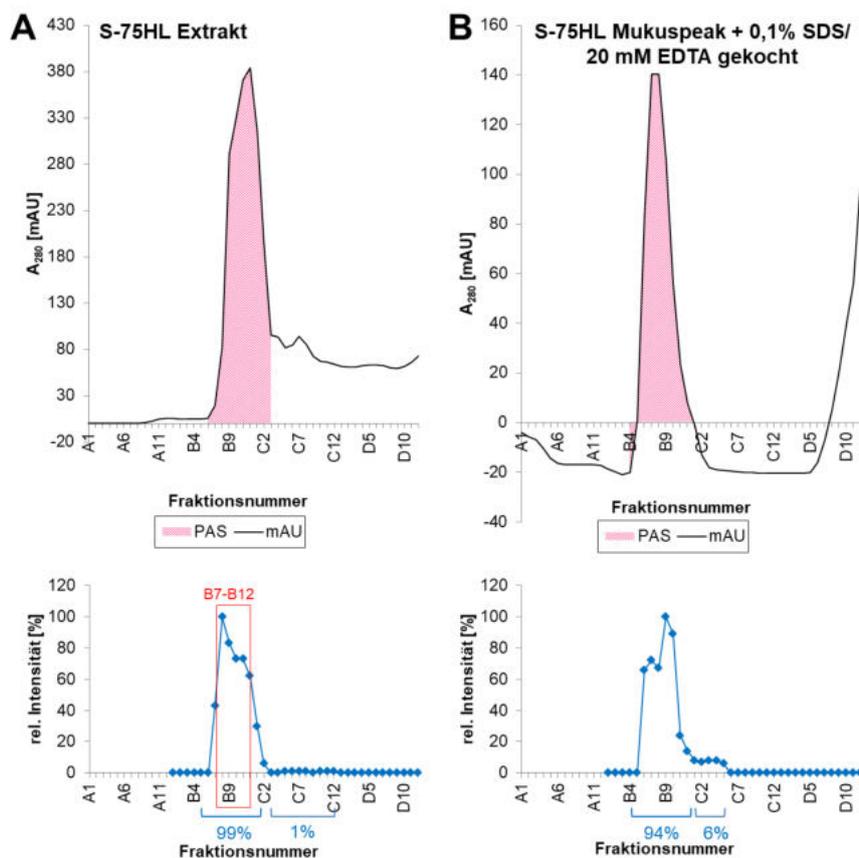


Anhang 26: Analyse von TFF2_{klein} aus dem Korpus vom Schwein nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA. Gezeigt ist das Ergebnis der MALDI Analyse der eluierten Proteinbande nach Silberfärbung der 15%igen SDS-PAGE (siehe Abbildung 45). Analyse durchgeführt von Lisa Kraft, AG Dr. Hubert Kalbacher, Universität Tübingen.



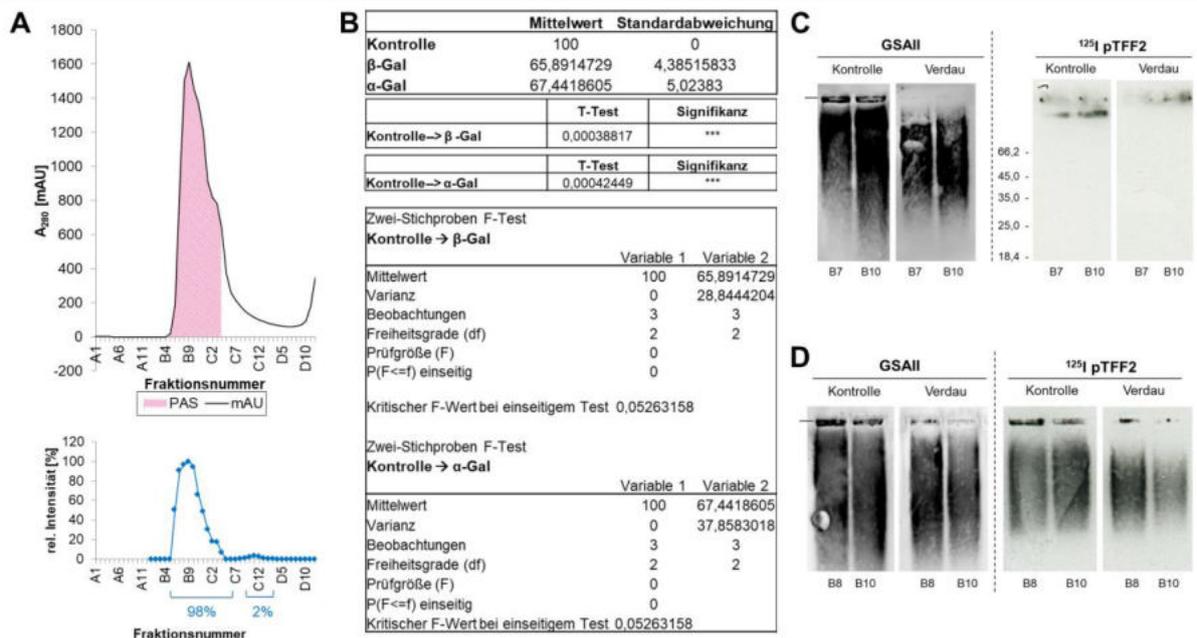
Anhang 27: Extraktion eines gereinigten Mukuspeaks durch Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA aus dem Antrum vom Schwein (Schwein 6). A-C: S-75HL-Läufe von Extrakten abgekratzter Mukosa. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktionen B5-B10 aller Läufe wurden vereinigt, mit 1% SDS/30 mM EDTA gekocht und zusammen erneut über eine S-75HL-Säule gereinigt. **D: S-75HL-Lauf des gereinigten Mukuspeaks nach Kochen mit 1% SDS/30 mM EDTA.** UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: Schwarze Kurve, TFF2: blauen Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 8,0, Probe.



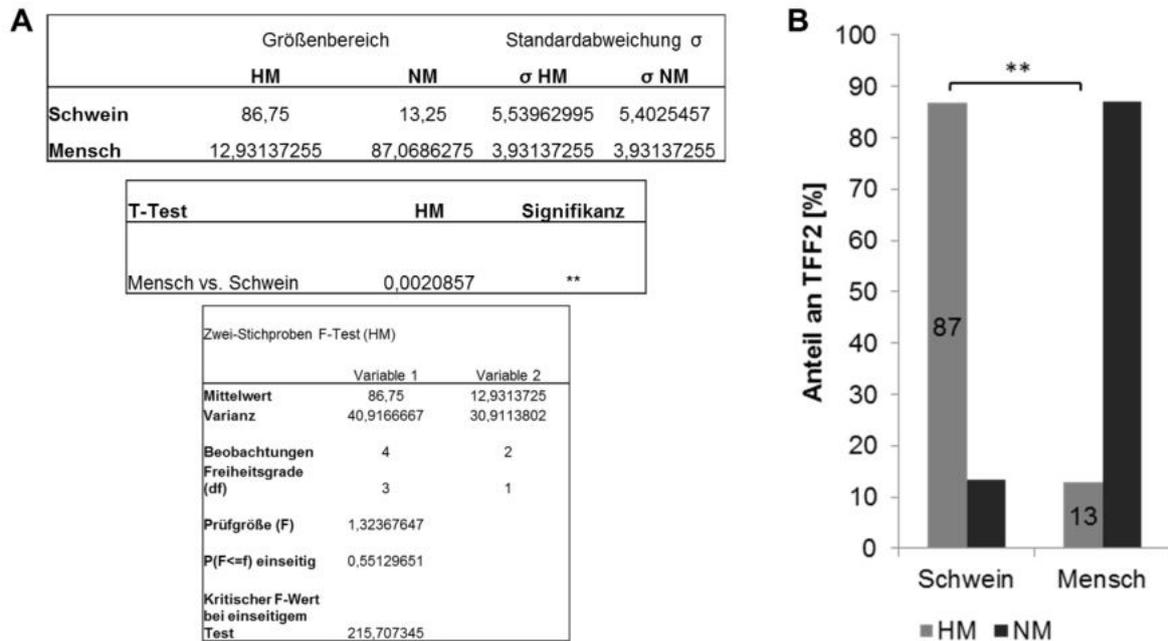
Anhang 28: Extraktion eines gereinigten Mukuspeaks durch Kochen mit 0,1% SDS/20 mM EDTA aus dem Antrum vom Schwein. A: S-75HL-Lauf einer Gewebeprobe (Schwein4). UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktionen B7-B12 wurden vereinigt, mit 0,1% SDS/20 mM EDTA gekocht und erneut über eine S-75HL-Säule gereinigt. B: S-75HL des mit 0,1% SDS/20 mM gekochten Mukuspeaks. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot).

Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenläufe bei pH 8.0.

8.2.1.3. Hybridisierung mit ^{125}I -TFF2

Anhang 29: S-75HL Schwein 6, abgekratzte Mukosa. A: UV-Profil und TFF2-Profil. UV-Profil [mAU] bei 280 nm und Profile der semiquantitativen Auswertung für TFF2 (R 15%ige SDS-PAGE) bzw. PAS (Dot Blot). Die Fraktion B8 wurde genutzt um Bindungsstudien mit ^{125}I -pTFF2 durchzuführen (siehe Abbildung 47). **B: Statistische Auswertung der Bindung von ^{125}I -pTFF2 nach Inhibition mit α - bzw. β -Methylgalaktosid.** Gezeigt sind Diagramme mit Mittelwerten und Standardabweichung, sowie die Ergebnisse von T-Test und F-Test. Sowohl die Inhibition mit α - als auch mit β -Methylgalaktosid liefern signifikante Ergebnisse. **C: Proteinase K Verdau, 5h, 0,1 $\mu\text{g/ml}$.** 1%ige AgGE der Proben B7 und B10 nach Proteinase K-Verdau und Western Blot bzgl. GSAII. Außerdem dargestellt ist eine 15%ige R SDS-PAGE nach Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2. **C: Proteinase K Verdau, 5h, 0,01 $\mu\text{g/ml}$.** 1%ige AgGE der Proben B8 und B10 nach Proteinase K-Verdau und Western Blot bzgl. GSAII. Außerdem dargestellt ist eine 1%ige AgGE der Proben B8 und B10 nach Hybridisierung mit ^{125}I -pTFF2. Absorption: schwarze Kurve, TFF2: blaue Kurve, PAS: pinke Fläche. Säulenlauf bei pH 8,0.

8.2.1.4. Elution von TFF2 aus dem NR SDS-Gel



Anhang 30: Verteilung von TFF2 im NR SDS-Gel Mensch vs. Schwein. A: Statistische Daten Vergleich Mensch vs. Schwein. Oben: Mittelwerte für den Anteil an hochmolekularem und niedermolekularem TFF2 von Schwein im Vergleich zu Mensch ($n_{\text{Mensch}}=2$, $n_{\text{Schwein}}=4$). Ebenfalls angegeben ist die Standardabweichung σ . **Mitte:** Ergebnis des T-Test bzgl. des hochmolekularen TFF2. **Unten:** Ergebnis des F-Tests bzgl. des hochmolekularen TFF2. **B: Diagramm Verteilung TFF2 Vergleich Mensch vs. Schwein.** Dargestellt ist ein Diagramm, welches den Anteil an hochmolekularem TFF2 (hellgrau) bzw. niedermolekularem TFF2 (dunkelgrau) nach Elution aus einem NR 15%igen SDS-Gel zwischen Mensch und Schwein vergleicht. HM: hochmolekular, NM: niedermolekular.

9. Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.



Magdeburg, den 20.08.2020

Franziska Heuer