

Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion von TFF1 im humanen Magen

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 **Jörn Heuer (M. Sc.)**

geb. am 01.04.1986 in Hamburg

Gutachter: Univ.-Prof. Mag. Dr. Werner Hoffmann
Univ.-Prof. Dr. Otmar Huber

eingereicht am: 22.06.2020

verteidigt am: 30.11.2020

Publikationsliste

Teile der Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

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; Jörn Heuer, Franziska Heuer, René Stürmer, Sönke Harder, Hartmut Schlüter, Nayara Braga Emidio, Markus Muttenthaler, Dörthe Jechorek, Frank Meyer, Werner Hoffmann; Int. J. Mol. Sci. 2020, 21:2508

Sowie einzelne Ergebnisse bzw. Mitarbeit bei folgenden Publikationen:

2020

Chemical synthesis of human trefoil factor 1 (TFF1) and its homodimer provides novel insights into their mechanisms of action. Nayara Braga Emidio, Hayeon Baik, David Lee, René Stürmer, Jörn Heuer, Alysha G Elliott, Mark A T Blaskovich, Katharina Hauptenthal, Nicole Tegtmeyer, Werner Hoffmann, Christina I Schroeder, Markus Muttenthaler; Chem. Commun. (Camb.) 2020, im Druck, doi:10.1039/d0cc02321c.

2019

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

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	1
Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	7
Abstract	8
1. Einleitung	9
1.1 Der Aufbau des humanen Magens	9
1.1.1 Aufbau der Magenwand	9
1.1.2 Die Magendrüsen	10
1.2 TFF-Peptide.....	11
1.2.1 TFF1	13
1.3 Muzine.....	16
1.4 FCGBP	17
1.5 Gastrokine	18
1.6 <i>Helicobacter pylori</i>	19
2. Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Chemikalien.....	22
3.1.2 Gewebe.....	22
3.1.3 Antikörper	23
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.2.2 Agarosegelelektrophorese	25
3.2.3 Ligation	25
3.2.4 Transformation	26
3.2.5 Klonierung.....	26
3.2.6 Präparation der Plasmid-DNA.....	26
3.2.7 Restriktionsverdau	27
3.3 Biochemische Methoden	27
3.3.1 Proteinextraktionen.....	27
3.3.2 TRIzol [®] -Extraktion.....	30
3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.3.4 <i>Blue Native</i> Gelelektrophorese	33

3.3.5 SDS-Agarosegelelektrophorese.....	34
3.3.6 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	34
3.3.7 Silberfärbung	35
3.3.8 Western Blot.....	36
3.3.9 Strippen der Membranen	39
3.3.10 Kompetitive Inhibierung	39
3.3.11 Nachweis freier Thiole an Cysteinresten mit PEG-maleimid.....	39
3.3.12 Nachweis von Sulfensäuren mit DCP-Bio1;	40
3.3.13 Trichloressigsäure Fällung	41
3.3.14 PAS (<i>periodic acid Schiff</i>)-Reaktion	41
3.3.15 Größenausschlusschromatographie	42
3.3.16 Ionenaustauschchromatographie	43
3.3.17 Entsalzen der Proben mit Hilfe einer PD-10 Säule	44
3.3.18 Iodierung von TFF1 und Bindungsstudien.....	45
3.4 Computerprogramme und Datenbanken.....	47
4. Ergebnisse	49
4.1 TFF1 im Magen des Menschen	49
4.1.1 Besonderheiten bei der Arbeit mit TFF1	49
4.1.2 Verhältnis von hochmolekularen zu niedermolekularen TFF1-Formen unter verschiedenen Bedingungen.....	51
4.1.3 Analyse der verschiedenen Bindungspartner von TFF1 im Magen Korpus.....	54
4.1.3.1 Trennung verschiedener TFF1-Entitäten durch eine Größenausschlusschromatographie (S75HL).....	54
4.1.3.2 Trennung der mukusassoziierten TFF1-Formen durch eine Größenausschlusschromatographie (S-500)	57
4.1.3.3 Trennung der verschiedenen TFF1-Entitäten über eine Anionenaustauschchromatographie (ResQ)	59
4.1.3.4 TRIzol [®] -Extraktionen und Untersuchung des TFF1-GKN2-Heterodimers	62
4.1.3.5 Experimente zur Untersuchung des TFF1-Homodimers und der Monomere von TFF1 ..	66
4.1.4 Vergleich zwischen Magen Korpus und Magen Antrum	68
4.1.5 TFF1 im Magensaft	73
4.1.6 Bindung von TFF1 an <i>H. pylori</i>	74
4.2 TFF1 im Magen anderer Spezies.....	76
4.2.1 TFF1 in <i>X. laevis</i>	76
4.2.2 TFF1 in der Maus	76
4.2.3 TFF1 im Schwein	78

5. Diskussion	83
5.1 Methodische Aspekte bei der Arbeit mit TFF1	83
5.2 Verhalten von TFF1 bei saurem pH-Wert.....	85
5.3 Die unterschiedlichen Entitäten von TFF1 und die verschiedenen Bindungspartner.....	86
5.3.1 TFF1 und die Bindung an den Mukus	86
5.3.2 Ein neues Heteromer: Die Bindung von TFF1 an FCGBP	90
5.3.3 Die Bindung von TFF1 an ein unbekanntes etwa 50-60 kDa großes Protein	91
5.3.4 TFF1 und die Bindung an GKN2	92
5.3.5 Das TFF1-Homodimer	94
5.3.6 Die zwei Monomere	95
5.4 Die Unterschiede zwischen Korpus und Antrum	98
5.5 TFF1 und die Bindung an <i>H. pylori</i>	100
5.6 Vergleich des Menschen mit anderen Spezies	103
5.7 Zusammenfassung und Ausblick.....	105
6. Literaturverzeichnis	107
7. Anhang	121
7.1 <i>Blue Native</i> Gel	121
7.2 Elution aus dem Coomassiegel.....	122
7.3 Ergänzung für die Trennung durch Größenausschlusschromatographie bei unterschiedlichen pH-Werten.....	123
7.4 Kompetitive Inhibierung der Bindung von TFF1 an Muzine mit TFF-Peptiden	123
7.5 Ergänzung für die Trennung der verschiedenen TFF1-Entitäten nach einer Größenausschlusschromatographie (Kap. 4.1.3.1).....	124
7.6 Ergänzung für die Trennung der verschiedenen TFF1-Entitäten über eine Anionenaustauschchromatographie (Kap. 4.1.3.3)	125
7.7 Mehrstufige Extraktion (E0, E1, E2, E3, E4) des Magen Korpus.....	125
7.8 TRIzol [®] -Extrakte.....	126
7.9 TRIzol [®] -Extraktion (Größenausschlusschromatographie S75HL).....	126
7.10 Massenspektrometrische Analyse	127
Ehrenerklärung	129

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹²⁵ I-TFF1	mit ¹²⁵ Iod gekoppeltes TFF1
Å	Ångström
Abb	Abbildung
abs	absolut
ACM	Acetamidomethyl
AgGE	Agarosegelelektrophorese
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	<i>counts per minute</i>
DCP-Bio1	(3-(2,4-dioxocyclohexyl)propyl 5-((3aR,6S,6aS)-hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)pentanoate)
DD-Hep	D-Glycero-D-Mannoheptose
deion.	deionisiert
Di	Dimer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCGBP	<i>IgG Fc binding protein</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Fuc	Fucose
fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gal	Galactose
GKN	Gastrokin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-acetylglucosamin
GSII	<i>Griffonia simplicifolia agglutinin</i>
h	<i>hour</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HSA	<i>human serum albumin</i>
Ig	Immunglobulin
Kap	Kapitel
kDa	Kilodalton
Kdo	3-Desoxy-D-Manno-Octulosonsäure
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
konz.	konzentriert
l	Liter
LD-Hep	L-Glycero-D-Mannoheptose
LPS (RF / SF)	Lipopolysaccharid (<i>rough form / smooth form</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute

ml	Milliliter
Mon	Monomer
MUC	Muzin
NR	nicht-reduzierend
NRPP	nicht-reduzierender Probenpuffer
PAP-HSA-Konjugate	p-Aminophenyl-Humanalbumin-Konjugate
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	isoelektrischer Punkt
PTS-Region	Prolin-Threonin-Serin reiche Region
R	reduzierend
rek.	rekombinant
ResQ	RESOURCE™ Q6 Säule
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPP	reduzierender Probenpuffer
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i>
S-500	HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-500 HR
S75HL	HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg Säule
sec	<i>second</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sp	Spatelspitze
Tab	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFF	<i>trefoil factor family</i>
TFF1-Monomer(ACM)	synthetisches TFF1-Monomer (Cys-58 geschützt mit Acetamidomethyl)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v	<i>volume</i>
vWF	vonWillebrand-Faktor
w	<i>weight</i>
WT	Wildtyp
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
üN	über Nacht

Zusammenfassung

Das TFF1 ist ein aus 60 Aminosäureresten bestehendes Peptid mit einer charakteristischen Kleeblatt Struktur. Diese Struktur gibt der Peptidfamilie auch ihren Namen (*trefoil factor family*, TFF). TFF1 besitzt sieben Cysteinreste, von denen sechs über Disulfidbrücken (1-5, 2-4, 3-6) verknüpft sind. TFF1 wird hauptsächlich in den Oberflächenepithelzellen des Magens sezerniert und ist ein Bestandteil des Mukus. Dabei übernimmt es eine wichtige Funktion zum Schutz der Magenschleimhaut. Studien mit *Tff1^{KO}*-Mäusen haben gezeigt, dass alle diese Tiere Adenome im Antrum bilden, von denen 30 % zu Karzinomen führen. Außerdem bindet TFF1 an ein Lipopolysaccharid des Klasse I Karzinogens *Helicobacter pylori*. Bisher wurde nur für das TFF1-Homodimer eine biologische Aktivität nachgewiesen. So bindet ebenfalls nur das Homodimer an den Mukus im Magen. TFF1 bildet außerdem ein Heterodimer mit Gastrokin-2 und dieses Heterodimer zeigt in verschiedenen Studien anti-proliferative und pro-apoptische Wirkungen in Magenkrebszellen.

In dieser Arbeit wurde TFF1 aus dem humanen Magen auf unterschiedliche Weisen extrahiert, mittels Chromatographien getrennt und über Western Blots analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Großteil (80-90 %) des TFF1 nicht an den Mukus gebunden vorliegt. Die Hauptentität von TFF1 ist ein Monomer. Es wurde ein neuer Bindungspartner von TFF1 nachgewiesen, das *IgG Fc binding protein*. Außerdem konnten eine zweite monomere TFF1-Form, sowie ein weiteres <66 kDa großes Heteromer nachgewiesen werden. Bindungsstudien mit iodiertem, synthetischen TFF1-Monomer und TFF1-Homodimer zeigten, dass nur das Homodimer an das Muzin MUC6 und an ein Lipopolysaccharid von *H. pylori* lektinartig bindet.

Ein Vergleich zwischen TFF1 im Korpus und Antrum des humanen Magens zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proteinmenge und Verteilung der verschiedenen TFF1-Entitäten. Einzige Ausnahme bildet das TFF1-GKN2-Heterodimer, das im Magen Antrum mehr vorhanden ist als im Korpus.

Es wurden auch drei weitere Organismen auf TFF1 untersucht, der Südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*, die Maus und das Schwein. Dabei wurden bezüglich der verschiedenen TFF1-Entitäten vergleichbare Beobachtungen wie im Menschen gemacht.

Dies alles weist auf eine Rolle des TFF1 beim Schutz der Magenmukosa hin.

Abstract

TFF1 is a 60 amino acid long peptide with a characteristic fold. This disulfide-linked structure was also eponymous („trefoil factor family“, TFF). TFF1 contains seven cysteine residues, six of which are forming covalent disulfide bridges. It is secreted by surface mucous cells of the gastric mucosa and is a mucus constituent. TFF1 plays a key role in the protection of the stomach lining. All *Tff1*^{KO}-mice develop antropyloric adenomas of which about 30% progress to carcinomas. TFF1 homodimer binds the lipopolysaccharide of the class I carcinogen *Helicobacter pylori*. Likewise, only the TFF1 homodimer binds to the mucus in a non-covalent matter. TFF1 also binds covalently to gastrokine 2 forming a disulfide-linked heterodimer. This TFF1-GKN2 heterodimer has been reported to show anti-proliferative and pro-apoptotic effects on gastric cancer cells.

In this study TFF1 was extracted using different methods and was purified by size-exclusion and anion-exchange chromatography. Further analyses were conducted by Western blots. A large proportion (80-90%) of TFF1 was not associated with the mucus. The major portion of TFF1 is present as a monomer. Furthermore, IgG Fc binding protein was identified as a new disulfide-linked binding partner for TFF1. In addition, a second monomeric form of TFF1 and another <66 kDa disulfide-linked heteromer were detected. Binding studies using ¹²⁵I-labeled synthetic TFF1 monomer and homodimer showed binding of the TFF1 dimer to the mucin MUC6 and to lipopolysaccharides of *H. pylori*.

No significant differences were observed in protein levels and distribution of the different TFF1 forms between the gastric corpus and antrum. The only exception was the TFF1-GKN2 heterodimer which was more present in the antrum than in the corpus.

Studies in other organisms such as the African clawed frog *Xenopus laevis*, mouse and pig showed similar results as in human tissue concerning the different TFF1-entities.

Taken together this underlines the importance of TFF1 for the protection of the gastric mucosa.

1. Einleitung

1.1 Der Aufbau des humanen Magens

Der Magen ist ein wichtiger Bestandteil im Verdauungstrakt des Menschen. Dort wird nicht nur die Verdauung eingeleitet sondern er speichert auch die Nahrung um sie in kleineren Mengen an den Darm abzugeben. Die Größe, Form und Lage des Magens sind stark abhängig vom Füllungszustand, Muskeltonus, Lebensalter, Körperlage und Konstitution. Der Magen befindet sich in der Regel im linken und mittleren Oberbauch direkt unter dem Zwerchfell. Seine Form ist leicht gekrümmt. Die kurze Seite bildet die kleine Kurvatur (*Curvatura minor gastricae*) und die lange Magenwand wird von der großen Kurvatur (*Curvatura major gastricae*) gebildet. Der Magen hat eine mittlere Länge von etwa 25-30 cm und kann ein Volumen von 1,2-1,6l fassen. Der Magen ist ein Hohlorgan, welches von einer kräftigen Muskelschicht umgeben ist. Den Eingang des Magens bildet das *Ostium cardiacum*, daran schließt die *Pars cardiaca* (Kardia) an. Dieser Bereich grenzt den Magen von der Speiseröhre ab. An die Kardia schließt nach oben gewölbt der Magen Fundus (*Fundus gastricus*) an. Dieser dient zum Sammeln der bei der Nahrungsaufnahme verschluckten Luft. Unter dem Fundus liegt der Korpus (*Corpus gastricum*), der den Hauptteil des Magens ausmacht. Der Magenausgang (*Pars pylorica*) wird schließlich vom Antrum (*Antrum pyloricum*) und dem Magenschließmuskel (*Pylorus*) am *Ostium pyloricum* gebildet (Arnold 1999).

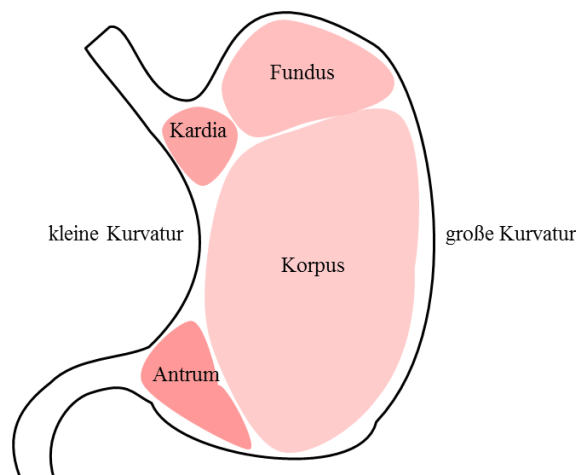


Abb. 1: Schematische Darstellung des Magens.
Nach Arnold 1999

1.1.1 Aufbau der Magenwand

Die Magenwand besteht aus fünf Schichten, der *Tunica mucosa*, *Tela submucosa*, *Tunica muscularis*, *Tela subserosa* und *Tunica serosa*. Die äußerste Schicht bildet die *Tunica serosa*,

sie kleidet den Magen aus und sorgt für eine gute Verschiebbarkeit innerhalb der Bauchhöhle. Die *Tela subserosa* kann Fettgewebe einlagern und ist vor allem wichtig bei Organen deren Füllstand variieren kann. Darunter liegt die *Tunica muscularis*. Dieser Bereich besteht aus verschiedenen Schichten glatter Muskulatur. Daran schließt die *Tela submucosa* an, die aus lockerem Bindegewebe besteht. Dort befinden sich vor allem Lymph- und Blutgefäße, sowie Nervenfaserbündel und Nervenzellen. Die innerste Schicht bildet die *Tunica mucosa*. Sie wird von einem einschichtigen hochprismatischen Epithel ohne Bürstensaum gebildet. Weiter befinden sich hier die verschiedenen Magendrüsen, die sich allerdings in Fundus/Korpus und Antrum unterscheiden. Die Magendrüsen sezernieren den Magenschleim, der reich an Glykanen, sulfatierten Glykanen und Proteinen ist und die Magenwand vor mechanischen, thermischen und enzymatischen Schädigungen schützt (Arnold 1999).

1.1.2 Die Magendrüsen

Alle Magendrüsen liegen in der *Lamina propria mucosae*, wobei sich die Drüsen im Fundus/Korpus, Kardia und im Antrum unterscheiden. Im Fundus bzw. Korpus liegen die *Glandulae gastricae propriae*, die etwa 6 mm lang sind. Auf 1 mm² Schleimhautoberfläche liegen in etwa 100 dieser Drüsenschläuche (Arnold 1999). Die Fundusdrüsen bestehen aus verschiedenen Arten von Zelltypen, den Stamm- und Vorläuferzellen, Nebenzellen, Hauptzellen, Belegzellen und endokrinen Zellen. Zusammen mit der Foveola bilden sie die Funduseinheit (Arnold 1999; Hoffmann 2014; Hoffmann 2015). Die Foveola-Region, in der die Oberflächenepithelzellen liegen, ist im Korpus kleiner als im Antrum. Die Oberflächenepithelzellen sezernieren vor allem das Muzin MUC5AC, aber auch TFF1 und Gastrokine. Die Fundusdrüse setzt sich zusammen aus dem Drüsenhals, dem Drüsengrund und der stark proliferierenden Region, dem Isthmus. Im Drüsenhals werden von den Nebenzellen ebenfalls Muzine sezerniert, vor allem MUC6, aber auch das Peptid TFF2. Die Belegzellen produzieren die Salzsäure für den Magen und liegen im Drüsenhals und Drüsengrund. In den Hauptzellen werden hauptsächlich Pepsinogene produziert, Vorstufen von Pepsin (Arnold 1999; Kouznetsova et al. 2011; Hoffmann 2014). Die *Glandulae pyloricae*, die Pylorus- oder Antrumdrüse, ist deutlich kürzer als die Fundusdrüse. Dafür ist die Foveola-Region des Antrums deutlich länger. Die Antrumdrüse besteht ebenfalls aus Stamm- und Vorläuferzellen, Antrumdrüsenzellen und endokrinen Zellen. Die verschiedenen Zellen sezernieren wie im Magen Korpus vor allem die Muzine MUC5AC (Oberflächenepithelzellen) und MUC6 (Antrumdrüsenzellen). Unter den endokrinen Zellen

befinden sich unter anderem die G-Zellen, die im Antrum Gastrin sezernieren. Gastrin wirkt auf die ECL-Zellen (*Enterochromaffine-like*), die dann Histamin ausschütten, das wiederum die Belegzellen in der Funduseinheit zur Salzsäureproduktion anregt (Arnold 1999; Hoffmann 2014; Kouznetsova et al. 2011).

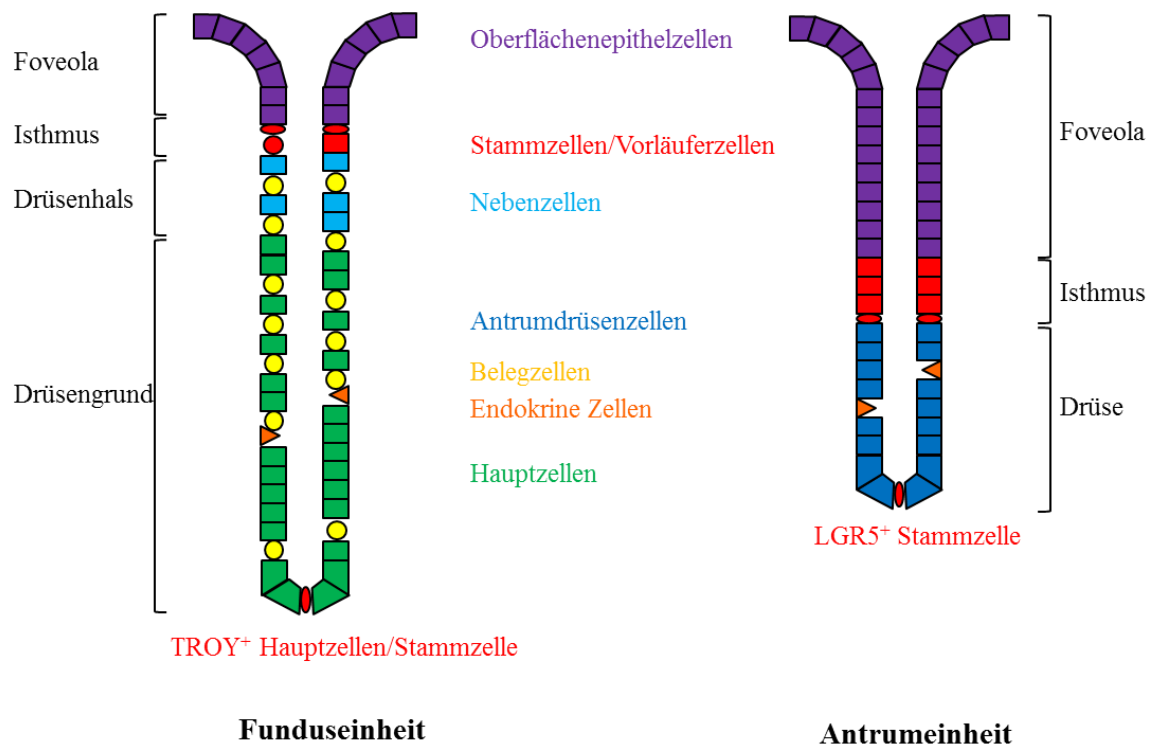


Abb. 2: Schematische Darstellung der beiden wichtigsten Drüsentypen im humanen Magen.
Nach Hoffmann 2014; Hoffmann 2015; Kouznetsova et al. 2011

1.2 TFF-Peptide

Auf der Philipp-Laudat-Conference im Jahr 1996 wurden drei zunächst unterschiedlich benannte Peptide zu einer Gruppe zusammengefasst und einheitlich als die Gruppe der TFF-Peptide (*trefoil factor family*) benannt (Wright et al. 1997). Das Peptid TFF1 wurde zunächst in der Krebszelllinie MCF-7 gefunden und als pS2 bezeichnet (Jakowlew et al. 1984; Masiakowski et al. 1982). Fast zeitgleich wurde TFF2 aus dem Pankreas des Schweins isoliert und als PSP (*pancreatic spasmolytic polypeptide*) bezeichnet (Jørgensen et al. 1982). Das Peptid TFF3 wurde erst 1991 in der Ratte als ITF (*intestinal trefoil factor*) beschrieben (Suemori et al. 1991).

Die Gene für die drei TFF-Peptide liegen auf einer 55 kb langen Region auf dem Chromosom 21q22.3 in der Reihenfolge TFF1-TFF2-TFF3 (Seib et al. 1997). Es wird vermutet, dass die Proteine kosynthetisiert werden und sich teilweise gegenseitig regulieren (Gött et al. 1996;

Kjellev 2009; May and Westley 1997; Taupin et al. 1999). Alle drei Peptide werden über eine Vorstufe synthetisiert mit einer Signalsequenz am N-Terminus, die im Verlauf der Sekretion abgespalten wird (Jakowlew et al. 1984; Jørgensen et al. 1982; Suemori et al. 1991).

Die Biosynthese der Peptide findet in verschiedenen Teilen des humanen Körpers statt, unter anderem im Gehirn, im Verdauungstrakts oder im mukösen Epithel, aber vor allem in den verschiedenen Zelltypen des Gastrointestinaltrakts zusammen mit verschiedenen Muzinen (Braga Emidio et al. 2019; Hoffmann et al. 2001; Hoffmann 2013; Kjellev 2009). TFF1 wird vor allem im humanen Magen von den Oberflächenepithelzellen sezerniert (Kouznetsova et al. 2011; Rio et al. 1988). TFF2 wird im Magen von den Nebenzellen und Antrumdrüsenzellen sezerniert, und teilweise auch von den Brunnerschen Drüsen im Duodenum (Hanby et al. 1993; Kouznetsova et al. 2011). TFF3 dagegen wird im Magen nur in geringem Maß synthetisiert, sondern vorwiegend von den Becherzellen des Dünndarms und des Dickdarms sezerniert (Podolsky et al. 1993). Pathologisch werden TFF-Peptide ektopisch synthetisiert, z. B. in verschiedenen Tumoren (Kjellev 2009).

Die drei Peptide eint eine Kleeblatt-Struktur (TFF-Domäne), die früher auch als P-Domäne beschrieben wurde, und ihnen den Namen gibt. Diese Domäne besteht aus einer etwa 40 Aminosäuren umfassenden Sequenz, die durch Bildung dreier Disulfidbrücken eine feste Struktur aus drei Schleifen bildet. Die Paarung der Disulfide ist dabei immer gleich und in der Reihenfolge Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 und Cys3-Cys6 (vergleiche auch Abb. 4) (Thim 1989). Diese spezielle Struktur macht die TFF-Peptide relativ stabil gegen Proteasen, Hitze und Säure (Jørgensen et al. 1982; Thim and May 2005). Während TFF1 und TFF3 nur eine TFF-Domäne enthalten und aus 60 bzw. 59 Aminosäuren bestehen, besitzt TFF2 zwei TFF-Domänen und hat eine Länge von 106 Aminosäuren. Die Peptide TFF1 und TFF3 enthalten außerdem eine ungerade Anzahl an Cysteinresten (sieben Cysteine), während TFF2 eine gerade Anzahl an Cysteinresten (14 Cysteine) aufweist (Jørgensen et al. 1982; Masiakowski et al. 1982; Suemori et al. 1991). Daher können TFF1 und TFF3 auch kovalente Homodimere über Cys58 bzw. Cys57 bilden. Diese Homodimere weisen eine erhöhte biologische Aktivität gegenüber dem Monomer auf z. B. bei der Wundheilung (Zellmigration) und beim Schutz vor Colitis (Chinery et al. 1995; Marchbank et al. 1998; Muskett et al. 2003; Poulsen et al. 2005; Williams et al. 2001).

Die verschiedenen Funktionen der TFF-Peptide sind noch nicht abschließend geklärt. Alle drei TFF-Peptide weisen Lektineigenschaften auf. Allerdings nur, wenn zwei TFF-Domänen vorhanden sind (Hanisch et al. 2014; Hoffmann 2013; Kastin 2013; Reeves et al. 2008). Da

die TFF-Peptide zusammen mit verschiedenen Muzinen (wie z. B. MUC2, MUC5AC und MUC6) sezerniert werden, könnten sie diese binden und als Quervernetzer dienen (Longman et al. 2000). Der größte Effekt auf die Viskosität und Elastizität des Mukus wurde für TFF2 nachgewiesen (Thim et al. 2002). So bindet TFF2 über eine Lektinbindung an MUC6 (Hanisch et al. 2014; Heuer et al. 2019; Kouznetsova et al. 2007a). Das TFF3-Homodimer hat ebenfalls einen Effekt auf die rheologischen Eigenschaften des Mukus, während TFF1- und TFF3-Monomer keinen Effekt zeigen (Thim et al. 2002). Alle drei Peptide weisen eine motogene Wirkung auf. Wobei allerdings nicht klar ist, wie und über welche Rezeptoren dies geschieht. Dies ist vor allem wichtig beim Prozess der Restitution, bei dem migrierende Zellen eine Läsion des Epithels innerhalb kurzer Zeit schließen. Dennoch ist nicht geklärt wie die TFF-Peptide in diesen Prozess eingreifen (Aihara et al. 2017; Dignass et al. 1994; Le et al. 2016; Marchbank et al. 1998; Playford et al. 1995). Außerdem wirken die TFF-Peptide anti-apoptotisch, eine Voraussetzung für die Restitution (Bossenmeyer-Pourié et al. 2002; Kinoshita et al. 2000; Lalani et al. 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Peptide eine wichtige Rolle in mukosalen Wundheilungsprozessen und Schutzmechanismen spielen (Ebert et al. 1999; Kjellev 2009; Peitz et al. 2004; Reeves et al. 2008; Srivatsa et al. 2002). Um die molekularen Funktionen weiter zu untersuchen ist es daher wichtig, die möglichen Bindungspartner der TFF-Peptide zu finden.

1.2.1 TFF1

Das TFF1-Gen codiert für ein 84 Aminosäuren langes Peptid, mit einer 24 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Signalsequenz. TFF1 wird als ein 6,7 kDa großes Peptid mit 60 Aminosäuren hauptsächlich im humanen Magen von den Oberflächenepithelzellen sezerniert (Jakowlew et al. 1984; Kjellev 2009; Kouznetsova et al. 2011; Rio et al. 1988). TFF1 hat einen relative sauren pI von 3,94 und spielt vermutlich eine wichtige Rolle beim Schutz des Magens (Marchbank et al. 1998; May et al. 2003; Ribieras et al. 1998; Tomasetto and Rio 2005).



Abb. 3: Vergleich der TFF1 Sequenzen aus verschiedenen Organismen.

Verglichen sind die Sequenzen von *X. laevis* (Uni-Prot: Q00222) (Hauser and Hoffmann 1991), Schwein (Uni-Prot: A0A286ZIY1), Maus (Uni-Prot: Q08423) (Lefebvre et al. 1993) und Mensch (Uni-Prot: P04155) (Jakowlew et al. 1984). Im roten Kasten ist die TFF-Domäne markiert. Die jeweilige Signalsequenz ist unterstrichen. Gelb markiert sind die Cysteine und blau die hydrophobe Tasche beim humanen TFF1. Beim Sequenzvergleich steht der Stern für eine identische Aminosäure, der Doppelpunkt für einen konservierten Austausch der Aminosäure und der Punkt für einen halb konservierten Austausch. Graphische Darstellung der Sekundärstrukturen: β -Faltblätter in grün und die α -Helix in grau. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalOmega erstellt (Larkin et al. 2007).

Auch wenn TFF1 in einer Tumorzelllinie entdeckt wurde, wird TFF1 mittlerweile in vielen Arbeiten als Tumorsuppressor beschrieben, da die *TFF1* Expression bei ca. 50 % der Magentumore im Tumorgewebe herunterreguliert ist. (Lefebvre et al. 1996; Luqmani et al. 1989; Park et al. 2000; Shi et al. 2006; Soutto et al. 2011). So bilden alle *Tff1*^{KO}-Mäuse Adenome im Antrum, die zu 30 % zu Karzinomen führen (Lefebvre et al. 1996). Bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen wird TFF1 dagegen hochreguliert und teilweise sogar ektopisch in Geweben sezerniert, so z. B. bei Pankreatitis oder Barrett-Ösophagus (Ebert et al. 1999; Labouvie et al. 1999). Dies führt zu der Annahme, dass TFF1 eine Schutzfunktion hat und auch bei Wundheilungsprozessen des Gewebes eine wichtige Rolle spielt (Kjelle 2009). Dazu passen auch veröffentlichte Ergebnisse, dass TFF1 eine motogene Wirkung hat (Marchbank et al. 1998). Außerdem wird TFF1, wie auch die anderen TFF-Peptide, mit Muzinen zusammen sezerniert (Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Dies stützt die These, dass die TFF-Peptide eine wichtige Rolle für die Mukusbarriere spielen (Marchbank et al. 1998). Aber auch wenn diese Funktionen viel beschrieben sind, ist noch nicht hinreichend geklärt, welcher Mechanismen dahinter stecken.

TFF1 besitzt nur eine TFF-Domäne. Dabei bilden die Aminosäuren 7 bis 17 die erste Schleife, die Aminosäuren 18 bis 32 die zweite, und die dritte Schleife wird von den Aminosäuren 33 bis 44 gebildet. Die TFF-Domäne wird von sechs intramolekularen Disulfidbrücken gebildet, während das siebte Cystein ungepaart an Position 58 des

C-Terminus liegt, in einem Bereich, der sehr beweglich ist und eine hohe Anzahl an Glutaminsäuren (vier) aufweist. TFF1 enthält nur wenig ausgeprägte Sekundärstrukturen, eine kurze α -Helix (23-31) und zwei entgegengesetzt verlaufende β -Faltblätter (33-35, 43-45). Zusätzlich hat das humane TFF1 eine hydrophobe Tasche, die von den Aminosäuren Phe-19, Pro-20, Pro-42 und Trp-43 gebildet wird (Polshakov et al. 1997). Diese Tasche wurde als mögliche Bindungsstelle für Zuckerreste beschrieben und könnte über eine lektinartige Bindung unter anderem Muzine binden (Hanisch et al. 2014; Polshakov et al. 1997). Interessanterweise wird vor allem das TFF1-Homodimer als biologisch aktiv beschrieben z. B. bei der Zellmigration (Marchbank et al. 1998; Thim et al. 2002). Das Homodimer ist über den freien Cysteinrest (Cys-58) über eine Disulfidbrücke verknüpft, wobei beide TFF-Domänen nicht miteinander interagieren. Trotz der Homodimerisierung über eine Disulfidbrücke an Cys-58 bleibt der C-Terminus sehr variabel. Der Abstand des α -C-Atoms von Pro-20 der zwei TFF-Domänen variiert dabei von 36-73 Å und ermöglicht so wahrscheinlich die Bindung verschiedener Proteine (Williams et al. 2001).

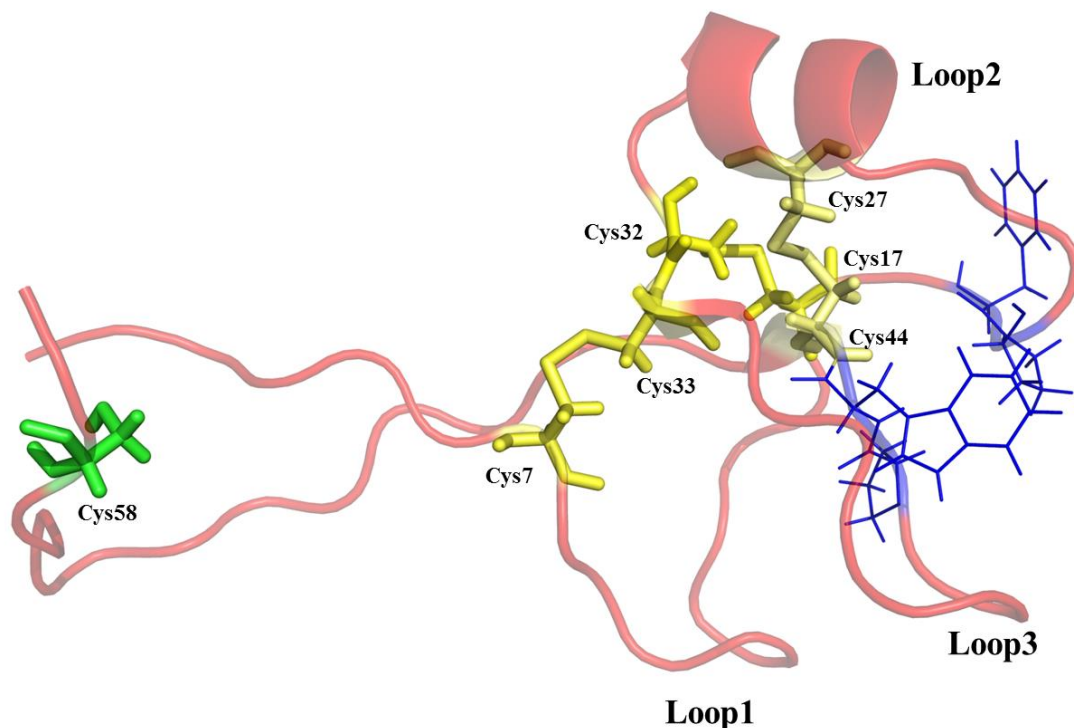


Abb. 4: Darstellung des *trefoil factor family 1* (TFF1) Peptids.

Die sechs Cysteine in der TFF-Domäne sind in gelb dargestellt (Disulfidpaarung: Cys7-Cys33, Cys17-Cys32, Cys27-Cys44). Das siebte Cystein (Cys-58), im Experiment durch ein Serin ersetzt, ist in Grün. Die hydrophobe Tasche ist in Blau dargestellt (Phe-19, Pro-20, Pro-42 und Trp-43). Die Struktur wurde mit PyMOL erstellt (pdb-code: 1PS2). (Polshakov et al. 1997)

Als möglicher Bindungspartner wurde MUC5AC beschrieben, das zusammen mit TFF1 in das Magenumen sezerniert wird (Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Neben dem Homodimer

und dem Monomer von TFF1 wurde auch ein Heterodimer mit Gastrokin-2 (GKN2) beschrieben (Kouznetsova et al. 2007a; May et al. 2009; Westley et al. 2005). GKN2 ist ebenfalls über eine Disulfidbrücke kovalent an TFF1 gebunden. Dieses Heterodimer ist allerdings nicht mit dem Mukus assoziiert (May et al. 2009; Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Bisher sind also drei verschiedene Entitäten des TFF1 beschrieben: ein TFF1-Homodimer, das an das Muzin MUC5AC und an *Helicobacter pylori* bindet (Clyne et al. 2004; Reeves et al. 2008; Ruchaud-Sparagano et al. 2004), ein TFF1-Monomer, für welches noch keine biologische Aktivität bzw. nur geringe biologische Aktivität gezeigt wurde sowie ein TFF1-GKN2-Heterodimer (May et al. 2009; Westley et al. 2005). Das Mengenverhältnis dieser drei Entitäten schwankt dabei in der Literatur (May et al. 2009; Newton et al. 2000; Ruchaud-Sparagano et al. 2004).

1.3 Muzine

Der Mukus kleidet innere Hohlgänge aus und schützt das darunter liegende Epithel gegen äußere Einflüsse, z. B. Säure, Enzyme oder Bakterien. Der Mukus besteht aus Wasser, Salzen, Immunglobulinen, sezernierten Proteinen und vor allem Muzinen (Bansil et al. 1995). Die Muzine sind extrem große, langgestreckte Glykoproteine, die zu mindestens 50 % aus O-glykosidisch gebundenen Zuckern bestehen (Dekker et al. 2002; van Klinken et al. 1998). Der Proteinanteil ist unterschiedlich groß und wird als Apomuzin bezeichnet (Bansil et al. 1995; Strous and Dekker 1992). Die Muzine zeichnen eine PTS-Region (Prolin, Threonin, Serin) aus, die aus *tandem repeats* aufgebaut ist (Pigman et al. 1973). Die *tandem repeats* sind zwischen 8-169 Aminosäuren lang und machen den größten Teil des Apomuzins aus (Gum 1992). An diese Threonin- und Serin-reichen Sequenzen sind dann die Zucker O-glykosidisch gebunden und geben dem Glykoprotein seine langgestreckte Struktur (Dekker et al. 2002). Man unterscheidet dabei zwei Gruppen von Muzinen: die Transmembran-Muzine (wie z. B. MUC1, MUC3 und MUC4) und die sezernierten, gelbildenden Muzine (wie z. B. MUC2, MUC5AC, MUC5B, und MUC6) (Dekker et al. 2002). Die Gene für diese vier sezernierten, gelbildenden Muzine liegen alle auf Chromosom 11p15.5 (Pigny et al. 1996). Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau von den Transmembran-Muzinen. Die sezernierten Muzine haben an N- und C-Terminus von Willebrand-Faktor (vWF)-ähnliche Domänen, sowie weitere charakteristische, Cystein-reiche Regionen am C-Terminus (Perez-Vilar and Hill 1999). Diese Domänen sind konservierter als die PTS-Regionen und wichtig für die

Oligomerisierung der Monomere um eine visköse, schützende Schicht über dem Epithelgewebe zu bilden. (Ambort et al. 2012; Dekker et al. 2002).

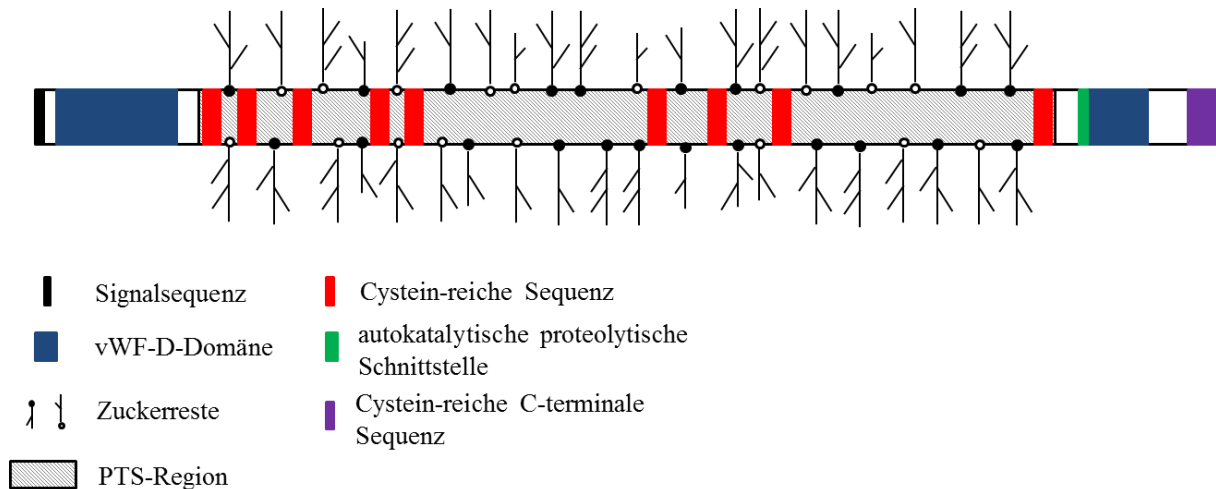


Abb. 5: Schematische Darstellung eines sezernierten Muzins MUC5AC.

Nach Hollingsworth and Swanson 2004; Rose and Voynow 2006

Die im Magen vorkommenden sezernierten Muzine sind MUC5AC und MUC6 (Nordman et al. 2002). MUC2 dagegen kommt hauptsächlich im Darm vor. (Audie et al. 1993; Nordman et al. 2002). MUC5AC wird dabei von den Oberflächenepithelzellen und MUC6 von den Nebenzellen sezerniert. Die gebildete Mukusschicht schützt das Epithel vor der Magensäure und den Verdauungsenzymen (Bolós et al. 1995; Ho et al. 1995; Nordman et al. 2002). MUC6 wird in den gleichen Zellen wie TFF2 synthetisiert und MUC5AC in den gleichen Zellen wie TFF1 (Bolós et al. 1995; Hanby et al. 1993; Kouznetsova et al. 2011; Nordman et al. 2002; Rio et al. 1988). MUC5AC und MUC6 unterscheiden sich dabei in der Größe und der Glykosylierung; dies ist möglicherweise wichtig für die Funktion der Mukusschicht (Nordman et al. 2002).

1.4 FCGBP

FCGBP (*IgG Fc binding protein*) ist ein großes Protein mit 5405 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von über 500 kDa. Wie der Name schon beschreibt kann es den Fc-Teil des Immunglobulin G (IgG) binden; es bindet allerdings keine anderen Immunglobuline wie IgA oder IgM (Harada et al. 1997). Wie die TFFs und Muzine ist FCGBP ebenfalls ein extrazelluläres Protein und wird hauptsächlich von den Becherzellen des Darms und den Oberflächenepithelzellen des Magens sezerniert (Kobayashi et al. 1991). Das Protein besteht zu einem großen Teil aus 13 *tandem repeats*, die jeweils aus etwa 400 Aminosäuren

aufgebaut werden und reich an Cysteinen (8 %) sind. Die 13. Domäne ist allerdings verkürzt gegenüber den anderen 12 Domänen (Albert et al. 2010; Harada et al. 1997; Johansson et al. 2009). Diese Domänen weisen eine große Ähnlichkeit zu den vWF-D-Domänen auf, wie sie z. B. auch in MUC2 vorkommen. Die ersten 11 Domänen enthalten die Aminosäuresequenz GDPHY, eine mögliche Schnittstelle, die autokatalytisch oder durch eine externe Protease gespalten werden kann (Abb. 6) (Albert et al. 2010; Johansson et al. 2009). Die ersten 12 *repeats* enthalten die Sequenz CGLCGN die neben den vWF-Domänen auch typisch für Thioredoxin und der Proteindisulfidisomerase ist (Edman et al. 1985; Harada et al. 1997; Holmgren 1985).



Abb. 6: Schematische Darstellung des FCGBP.

Die Markierungen (I-III) zeigen, dass diese drei Bereiche aus je 3 *tandem repeats* komplett identisch sind. Die roten Pfeile zeigen, dass in diesen Domänen die Aminosäuresequenz GDPHY enthalten ist. Nach Albert et al. 2010; Harada et al. 1997; Johansson et al. 2009

Des Weiteren enthält FCGBP sehr viele Threonin- und Serinreste und hat entsprechend viele mögliche O- und N-Glykosylierungsstellen. Das Protein weist eine ungerade Anzahl an Cysteinen (535) auf, was theoretisch intermolekulare Disulfidbrücken ermöglicht (Harada et al. 1997; Kobayashi et al. 1991). Für FCGBP sind bislang zwei Bindungspartner neben IgG beschrieben: TFF3 und MUC2. Auch wenn die Funktion von FCGBP noch nicht vollständig verstanden ist, deuten die nachgewiesenen Bindungspartner darauf hin, dass FCGBP eine Rolle beim Schutz des Epithels spielt (Albert et al. 2010; Johansson et al. 2009).

1.5 Gastrokeine

Bislang sind drei Gastrokeine bekannt, GKN1, GKN2 und GKN3. Alle sind in etwa 18 kDa groß, haben eine etwa 100 Aminosäure umfassende BRICHOS Domäne und werden fast ausschließlich im Magen sezerniert (Du et al. 2003; Martin et al. 2003; Menheniott et al. 2010; Menheniott et al. 2013). Die Bezeichnung BRICHOS setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der drei Proteine Bri2 (*Integral membrane protein 2B*), Chondromodulin-I und Surfactant Protein C zusammen in denen die Domäne zuerst gefunden wurde (Sánchez-Pulido et al. 2002). Die Gene für diese Gastrokeine liegen in einem Cluster auf Chromosom 2p13.3, wobei im Menschen GKN3 nicht transkribiert wird (Menheniott et al. 2013). GKN1 wurde zunächst unter verschiedenen Namen beschrieben, unter anderem als

CA11, AMP-18 (*Antral Mucosal Protein*), foveolin und TFIZ2 (*trefoil factor interactions(z)*) (Martin et al. 2003; Oien et al. 2004; Westley et al. 2005; Yoshikawa et al. 2000). GKN2 ist ebenfalls von verschiedenen Gruppen entdeckt worden und hat entsprechend auch unterschiedliche Namen wie GDDR (*down-regulated in gastric cancer*), blottin bzw. TFIZ1 (Baus-Loncar et al. 2007; Du et al. 2003; Otto et al. 2006; Westley et al. 2005). Die Gastrokine 1 und 2 werden im Magen, ebenso wie TFF1, von den Oberflächenepithelzellen der Korpus/Fundus- und der Antrumdrüsen sezerniert (Du et al. 2003; Kouznetsova et al. 2007a; Martin et al. 2003). Die für die Funktion der Gastrokine wichtige BRICHOS-Domäne kommt in verschiedenen Proteinfamilien vor. Sie enthält ein konserviertes Paar von Cysteinresten und spielt eine Rolle bei verschiedenen Erkrankungen wie akutem Lungenversagen, Demenz oder Tumorerkrankungen. Proteine mit einer BRICHOS Domäne werden entweder sezerniert oder enthalten eine Transmembrandomäne am N-Terminus. Es wird vermutet, dass sie als Chaperone wirken und eine Funktion bei der Proteinfaltung, beim intrazellulären Transports oder der Sekretion haben könnten (Hedlund et al. 2009; Sánchez-Pulido et al. 2002). Für die Gastrokine (GKN1 und GKN2) wurde gezeigt, dass bei Magentumoren die Genexpression herunterreguliert ist und nach Behandlung von *H. pylori* Infektionen hochreguliert wird (Du et al. 2003; Oien et al. 2004; Resnick et al. 2006). Funktionen wurden bisher hauptsächlich für GKN1 beschrieben. So wirkt GKN1 als Tumorsuppressor indem es die epithelial-mesenchymale Transition verhindert (Yoon et al. 2011). Außerdem konnte für GKN1 eine mitogene und motogene Wirkung gezeigt werden. Dies könnte darauf hin deuten, dass sie ähnlich wie TFF1 eine Rolle bei der Wundheilung spielen (Martin et al. 2003; Menheniott et al. 2013; Toback et al. 2003). GKN2 besitzt im Gegensatz zu GKN1 eine ungerade Anzahl an Cysteinresten (fünf) und kann so intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden. So bindet es z. B. an TFF1 und wirkt als Tumorsuppressor in der heterodimeren Form (May et al. 2009; Westley et al. 2005). Das Heterodimer ist nicht direkt an den Mukus gebunden, ist aber wichtig für den Schutz der darunterliegenden Mukosa. (Kouznetsova et al. 2007a; Otto et al. 2006; Westley et al. 2005).

1.6 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein 3 µm großes, Gram-negatives, mikroaerophiles, spiralförmiges Stäbchenbakterium. Es besitzt 4-6 Geißeln und ist wie alle Gram-negativen Bakterien von einer Lipopolysaccharidschicht (LPS) umgeben (Li et al. 2016; Marshall and Warren 1984). Ungefähr 60 % der gesamten Weltbevölkerung sind mit *H. pylori* infiziert (Hooi et al. 2017).

H. pylori kolonisiert fast ausschließlich den Magen, führt zu Gastritis und kann zu Geschwüren im Zwölffingerdarm führen. Außerdem besteht bei Infektion das Risiko, ein Magenkarzinom auszubilden, weshalb *H. pylori* auch als Klasse I Karzinogen klassifiziert ist (Atherton 2006; Working Group in Lyon 1994). *H. pylori* kolonisiert dabei die tieferen Schichten des Mukus, in denen der pH etwa neutral ist, also knapp oberhalb des Epithels (Schreiber et al. 2004). Dabei ist das Bakterium an MUC5AC und an das TFF1-Homodimer gebunden (Clyne and May 2019; Hidaka et al. 2001; Reeves et al. 2008). Das TFF1-Homodimer interagiert spezifisch über eine lektinartige Bindung mit dem RF-LPS (*rough-form*) von *H. pylori* (Reeves et al. 2008).

2. Zielsetzung

Zunächst in der Brustkrebszelllinie MCF-7 entdeckt, geht man mittlerweile davon aus, dass TFF1 als gastraler Tumorsuppressor wirkt (Jakowlew et al. 1984; Park et al. 2000; Shi et al. 2006; Soutto et al. 2011). So bilden alle *Tff1*^{KO}-Mäuse Adenome im Antrum, die zu 30 % zu Karzinomen führen (Lefebvre et al. 1996). Die genaue Funktion von TFF1 ist nicht vollständig verstanden. Möglicherweise spielt vor allem das TFF1-GKN2-Heterodimer eine entscheidende Rolle, da es anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung zeigt und in der Literatur häufig als die Hauptentität des TFF1 beschrieben ist (Kim et al. 2017; Kouznetsova et al. 2007a; Newton et al. 2000; Westley et al. 2005).

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Biosynthese von TFF1 aufzuklären und besser zu verstehen. Im Mittelpunkt sollte dabei die Identifizierung und Charakterisierung verschiedener TFF1-Formen stehen um Rückschlüsse auf die Funktion von TFF1 ziehen zu können.

Dazu sollte TFF1 aus verschiedenen Gewebeproben von Magen Korpus und Magen Antrum gereinigt und die verschiedenen TFF1-Formen über Western Blots identifiziert werden. Zusätzlich sollten mit Hilfe von *in vitro* Bindungsstudien mit synthetischem TFF1-Monomer und TFF1-Homodimer die Bindung an den Mukus und *H. pylori* charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls 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) in der Reinheit *pro analysis* (p.a.) bezogen. Alle Nährmedien, Lösungen, Gele und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (Ultra Clear TWF Reinstwassersystem, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) hergestellt. Für die chromatographische Proteinreinigung wurden die Puffer mit Hilfe eines Millipore Express® PLUS (PES) Filter (Porengröße 0,22 µm; Merck; Deutschland) filtriert und vor den Säulenläufen 15 min im Ultraschallbad (TranssonicT460/H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen Deutschland) entgast.

3.1.2 Gewebe

Alle Experimente und Versuche wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg genehmigt und folgten den Grundsätzen der Erklärung von Helsinki. Die Patientenaufklärung vor den chirurgischen Eingriffen erfolgte durch Prof. Dr. med. Frank Meyer (Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Magdeburg). Die histopathologischen Untersuchungen der Gewebeproben wurden von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kalinski (ehemals Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg), Frau OÄ Dr. med. A. Lemke (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg) und Frau OÄ Prof. Dr. med. Dörthe Jechorek (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg) durchgeführt. Die Proben wurden nach den histopathologischen Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

Die Gewebeproben vom Schwein (Biohof Gut Glüsig, Gut Glüsig GmbH, Ackendorf, OT Glüsig) wurden, unter der fachlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kalinski (ehemals Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg), selbstständig entnommen und bei -80 °C gelagert.

Die Mägen der Mäuse (WT mit gemischtem Hintergrund aus 129/Sv and C57BL/6 (Fu et al. 2015)) wurden von Herrn Franz Salm (Institut für Molekularbiologie und Medizinische

Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) entnommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Die Magenproben des *Xenopus laevis* (*X. laevis*) wurden von Wolfgang Jagla, ehemaliger Mitarbeiter des Instituts für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, entnommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert (Jagla et al. 1998).

Die Magensaftproben stammen von Herrn Prof. Dr. Peter Malfertheiner (ehemaliger Leiter der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Magdeburg).

Die Zell-Lysate und Lipopolysaccharid (LPS)-Proben von *H. pylori* wurden von Frau Dr. Nicole Tegtmeyer (Lehrstuhl für Mikrobiologie (Prof. Dr. Backert), Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg) bereitgestellt.

3.1.3 Antikörper

Für die immunologischen Nachweise von TFF1 wurden die Antikörper in Tab.3.1 verwendet. Alle Antikörper gegen TFF1 sind polyklonal. Die zur Herstellung verwendeten Peptidsequenzen wurden dazu an das Protein *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) gekoppelt und den Tieren gespritzt. Die Antikörper gegen humanes TFF1 und Tff1 aus der Maus wurden gereinigt, während der Antikörper gegen TFF1 aus dem Schwein als Endserum eingesetzt wurde. Für den Nachweis von GKN2 wurde ebenfalls ein polyklonaler Antikörper verwendet (Tab.3.1). Für die Immunisierung wurden allerdings zwei an KLH gekoppelte Peptidsequenzen injiziert. Der GKN2 Antikörper wurde als Endserum eingesetzt. Für den Nachweis des *Fc fragment of IgG binding protein* (FCGBP) wurde ein kommerzielles polyklonales Antiserum PAP389Hu01 (Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA) in der Verdünnung 1 µg/ml verwendet. Der Nachweis der Primärantikörper erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper anti-Kaninchen-IgG (H+L) (PI-1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Für den polyklonalen Primärantikörper GKN1 wurde der Sekundärantikörper anti-Schaf-IgG (H+L) (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Alle verwendeten Verdünnungen sind in Tab.3.1 angegeben. Für die kompetitiven Inhibierungen sind die für die Immunisierungen verwendeten, synthetischen Peptide eingesetzt worden.

Tab.3.1: verwendete Primär und Sekundärantikörper

Name	Peptid	Kopplung	Verdünnung	Literatur/Hersteller
a-hTTF1-1	FYPNTIDVPPEEECEF	KLH	1:1000/1:200	(Kouznetsova et al. 2007b)
a-pTFF1-1	FNPVAVDDPTDNEECLL	KLH	1:3000	
a-mTFF1-1	FYPNTIDVPPEEECEF	KLH	1:1000	(Fu et al. 2013)
a-xP1-1	FYPRTATPEC	KLH	1:3000	(Jagla et al. 1998)
a-hTFF2-2	FFPNSVEDCHY	KLH	1:1000	(Jagla et al. 2000)
a-hTFF3-8	FKPLQEAECTF	KLH	1:1000	(Jagla et al. 2000)
a-GKN1-1			1:5000	(Oien et al. 2004)
a-hGKN2-1	CSSTTIFDYKHGYIASRV LSRRA (58-80) CKHIPLYKGEVVENTHN VGA (143-162)	KLH	1:3000	(Kouznetsova et al. 2007a)
a-hMUC5AC-2	RNQDQQGPFKMC	KLH	1:2000	(Kouznetsova et al. 2004)
a-hFCGBP	(5176-5344)			Cloud-Clone Corp (PAP389Hu01)
a-Kaninchen (H+L)	-	Peroxidase	1:4000	Vector Laboratories (PI-1000)
a-Schaf (H+L)		Peroxidase	1:5000	Merck KGaA (Calbiochem)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um einen Antikörper für das TFF1-Peptid im Schwein zu generieren, musste zunächst die Sequenz, die für den C-terminalen Bereich des Peptids codiert, überprüft werden. Dafür wurde eine PCR durchgeführt um die bereits am Lehrstuhl vorhandene cDNA (Dr. Eva Znalesniak, Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) für die spätere Ligation zu amplifizieren. Die verwendeten Primer sind in Tab.3.2 angegeben. Die Reaktionszusammensetzung ist in Tab.3.3 angegeben.

Tab.3.2: verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Quelle
MB2156 (fw)	AAGGTGATCGGTGTCCTGG	Metabion
MB2322 (rv)	ACTCTTCCCTCTCCTGAGGC	Metabion
MB2323 (rv)	CAGACAGCGAGTTCAGGCTC	Metabion
oligo dT		ThermoScientific

Tab.3.3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

	Volumen	Quelle
10x Puffer (DreamTaqGreen)	2 µl	ThermoScientific
dNTPs (2mM)	2 µl	ThermoScientific
Primer	je 1 µl	Metabion
cDNA	2 µl	
DreamTaq Polymerase	0,3 µl	ThermoScientific
DEPC-Wasser	11,7 µl	

Um zu verhindern, dass die Komponenten der PCR beim Erhitzen verdampfen, wurde ein Tropfen Öl auf den Ansatz gegeben. Dann wurde die Reaktion im Robocycler Gradient 96 (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) mit dem in Tab.3.4 dargestelltem Programm gestartet.

Tab.3.4: Programm für die PCR

	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Primer-Annealing	60 °C	45 sec
Elongation	72 °C	60 sec
finale Elongation	72 °C	10 min

Das Programm lief mit 35 Zyklen. Um zu überprüfen, ob die cDNA amplifiziert wurde, wurden die erhaltenen PCR-Produkte auf ein 1,5 %iges Agarosegel (Kapitel 3.2.2) aufgetragen und anschließend bei -20 °C gelagert worden.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer (0,5x TAE): 20 mM Tris
0,5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8
10 mM konz. Essigsäure

Standard: GeneRuler 100bp Plus (ThermoScientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Für die Trennung der PCR-Produkte, sowie zur Überprüfung des Restriktionsverdau wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein 1,5 % (w/v) Agarosegel (Agarose for DNA Electrophoresis research grade, Serva, Heidelberg, Deutschland) mit 0,1 % Ethidiumbromid und 0,5x TAE-Puffer gegossen. Das Agarosegel lief für 30 min bei 150 V. Anschließend wurde es mit dem Geldokumentationssystem Herolab E.A.S.Y RH3 (Herolab, Wiesloch, Deutschland) dokumentiert.

3.2.3 Ligation

Die in der PCR erhaltenen Produkte wurden in einen Vektor ligiert. Dazu wurde der in Tab.3.5 beschriebene Ansatz verwendet. Die Komponenten wurden gemischt und 15 min bei RT inkubiert.

Tab.3.5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

	Volumen	Quelle
2x Puffer (rapid ligation)	5 µl	Promega
pGEM-T-Vektor	1 µl	Promega
PCR-Produkt	3 µl	
T4-DNA-Ligase	1 µl	Promega

3.2.4 Transformation

Für die Transformation wurden 10 µl des Ligationsansatzes zu 100 µl kompetenter Zellen *E.coli* TOP10 (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) gegeben und dann für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz für 45 sec bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde 1 ml SOC-Medium (*Super Optimal broth with Catabolite repression*, Biotline, London, England) zum Ansatz gegeben, gemischt und in 15 ml Röhrchen für 1 h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Um die Klone im Blau-Weiß-Screening später unterscheiden zu können wurden auf die Agarplatten (LB-Medium mit Agar (Lennox), SigmaAldrich, St Louis, USA) 40 µl einer 7,5 % X-Gal-Lösung (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und 40 µl einer 100 mM IPTG-Lösung (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) ausgestrichen. Die kompetenten Zellen wurden danach auf die Agarplatten (Ampicillin 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.2.5 Klonierung

Durch das Blau-Weiß-Screening konnten die Klone (weiß) auf der Agarplatte identifiziert werden, die das Plasmid mit dem PCR-Fragment aufgenommen hatten. Diese Klone wurden abgenommen und in ein 2 ml LB-Medium (LB-Medium (Lennox), Ampicillin 100 µg/ml, SigmaAldrich, St Louis, USA) überführt. Dann wurden sie in bei 37 °C und 180 U/min inkubiert.

3.2.6 Präparation der Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit dem Kit peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml Zellkultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand ist verworfen worden. Das Pellet wurde in 250 µl Solution I / RNase resuspendiert, anschließend 250 µl Solution II zugegeben und 10-mal

invertiert. Dann wurden 350 µl Solution III zugegeben und erneut 10-mal invertiert. Danach wurde für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand auf die mitgelieferten Säulen geladen und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Säule ist anschließend gewaschen worden. Dazu wurden 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (10000 x g, 1 min). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule durch erneute Zentrifugation (10000 x g, 2 min) getrocknet. Diese wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl sterilem Wasser, durch Zentrifugation (5000 x g, 1 min), eluiert. Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde mit einem NanoDrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific/PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt und die Plasmide dann bis auf weiteres bei -20 °C gelagert. Nach der Kontrolle durch den Restriktionsverdau wurden die Plasmide mit dem enthaltenen PCR-Fragment zur Sequenzierung (Dr. Martin Meixner, Institut für Biologie, Abt. Genetik, Humboldt Universität Berlin) eingeschickt.

3.2.7 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob das PCR-Fragment tatsächlich in das Plasmid inseriert wurde, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurde der in Tab.3.6 angegebene Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Tab.3.6: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes

	Volumen	Quelle
10x Puffer (EcoRI)	2,5 µl	BioLabs
EcoRI	1 µl	BioLabs
Plasmid-DNA	3 µl	
DEPC-Wasser	18,5 µl	

Nach der Inkubation wurden 9 µl des Verdaus mit 1 µl Probenpuffer gemischt und auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen (Kapitel 3.2.2).

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Proteinextraktionen

Extraktionspuffer 1:
(S75HL)

- 20 mM Tris/HCl, pH 7.0
- 30 mM NaCl
- 0,5 mM Benzamidin
- 0,1 mM Pefabloc SC
- 0,1 µg/ml Leupeptin

Extraktionspuffer 2: (ResQ)	20 mM Tris/HCl, 7.0 0,5 mM Benzamidin 0,1 mM Pefabloc SC 1 µg/ml Leupeptin
--------------------------------	---

Um das humane Gewebe aufzuschließen, wurde zunächst zu dem abgewogenem Gewebe (~0,2 g) das 5fache Volumen (w/v) an Extraktionspuffer zugegeben. Es wurde ein Extraktionspuffer mit pH 7 verwendet, falls es im Ergebnisteil nicht anders erwähnt wurde. Nach Abkühlen mit flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe mit dem Precellys 24 (peqlab Biotechnologie GmbH,

Erlangen, Deutschland) aufgeschlossen (3x10 sec, 6800 rpm, 30 sec Pause). Die übriggebliebenen Gewebeteilchen wurden durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4 °C) (Hettich Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und im Volumenverhältnis 1:1 (v/v) mit Chloroform versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4 °C), um so die Fette abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und entweder auf ein SDS-PAGE aufgetragen (siehe Kap. 3.3.3), oder mittels Chromatographie (siehe Kap. 3.3.15 und 3.3.16) weiter gereinigt. Im Folgenden wurden diese Extrakte als Gesamtextrakt En bezeichnet. Die Gesamtextrakte En von Lymphknoten, Milz, Knochenmark und Thymus des Schweins wurden von Herrn René Stürmer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) bereitgestellt.

Für den schonenden Aufschluss des Gewebes mit Mörser und Pistill (Extraktion Mörser), wurden ~0,2 g Gewebe mit flüssigem Stickstoff versetzt und fein gerieben. Dann wurde das 5fache (w/v) Volumen an Extraktionspuffer zugegeben und zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4 °C). Dies ersetzt den Aufschluss mit dem Precellys 24, ansonsten wurden die gleichen Schritte (siehe oben) durchgeführt.

Als alternative Extraktion der Proteine aus dem humanen Gewebe wurde eine mehrstufige Extraktion durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe wie oben beschrieben mit 5fachem Volumen (w/v) Extraktionspuffer versetzt und für 1 h bei 4 °C im Karussellschüttler inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Extrakt ist im Folgenden als Extrakt E0 bezeichnet. Das Pellet wurde danach erneut mit dem 5fachem Volumen (w/v) an Extraktionspuffer versetzt und mit dem Precellys 24 aufgeschlossen. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4 °C). Dieser Überstand wurde als Extrakt E1 bezeichnet. Das Pellet wurde wieder mit dem 5fachem Volumen (w/v) an Extraktionspuffer versetzt und mit 1 % SDS resuspendiert. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4 °C). Der

Überstand nach Zentrifugation wurde als Extrakt E2 bezeichnet. Da dieser Zwischenschritt keine zusätzliche Trennung ergab wurde er für die hier gezeigten Chromatographien weggelassen. Das Pellet wurde in 2,5fachem Volumen des (w/v) Extraktionspuffer mit 1 % SDS gelöst und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das entstandene Pellet wurde ein weiteres Mal mit 2,5fachem Volumen des (w/v) Extraktionspuffer mit 1 % SDS gemischt und 5 min gekocht. Dann wurde ein letztes Mal zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen (Extrakt E4). Alle fünf erhaltenen Überstände wurden, wie oben beschrieben, mit Chloroform gereinigt. Die Überstände (E3 und E4) der letzten zwei Extraktionsschritte wurden vereinigt. Diese vereinigten Überstände wurden als Extrakt E3-E4 bezeichnet. Falls E3 und E4 getrennt aufgetragen wurden, wurden die Pellets ebenfalls im 5fachen Volumen gelöst. Die erhaltenen Überstände wurden dann entweder auf eine SDS-PAGE (siehe Kap. 3.3.3), ein Agarosegel (siehe Kap. 3.3.4) oder eine Chromatographie-Säule (siehe Kap. 3.3.15 und Kap. 3.3.16) gegeben. Alle Änderungen, die für einzelne Chromatographien vorgenommen wurden sind im Ergebnissteil festgehalten.

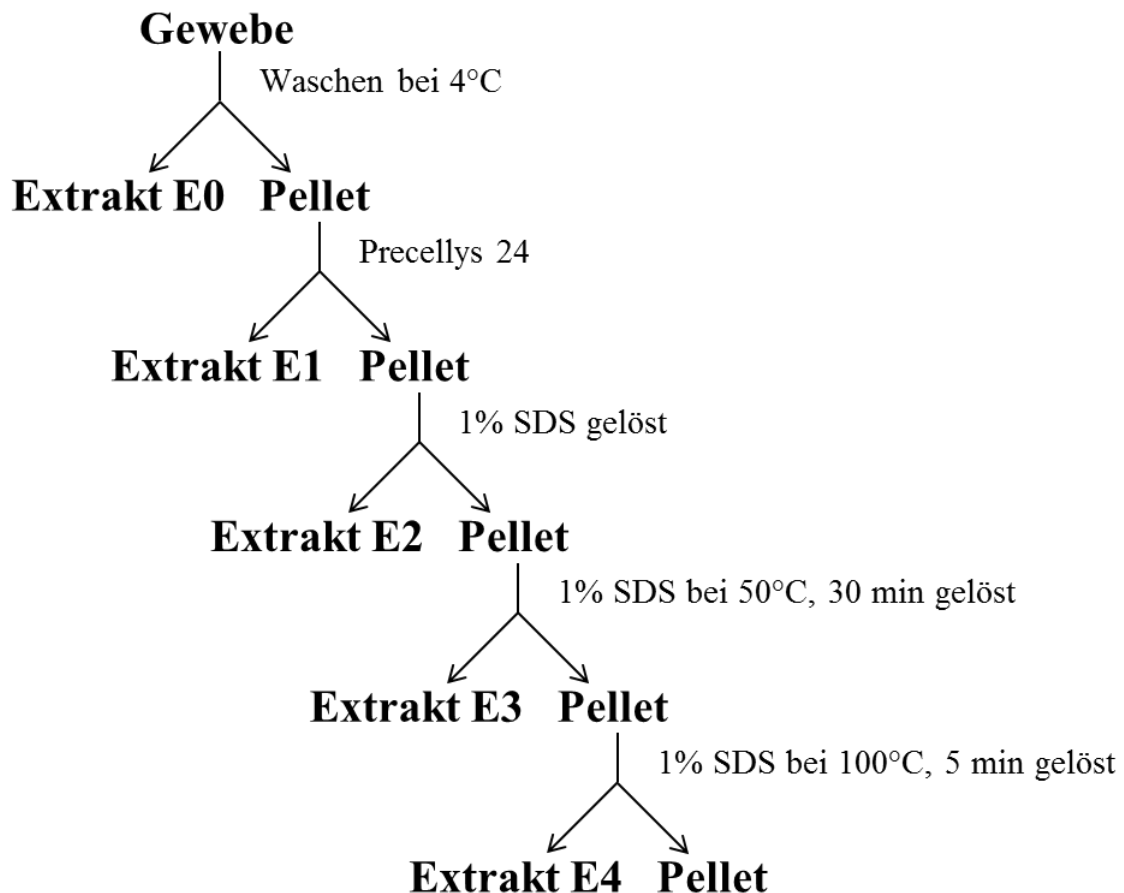


Abb. 7: Schematische Darstellung der mehrstufigen Extraktion.

wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurden 2 ml Ethanol abs. auf das Pellet gegeben und wieder für 20 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (7500 x g, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet etwa 10 min getrocknet und anschließend in Puffer gelöst. Dazu wurden 500 µl Extraktionspuffer mit 1 % SDS zum Pellet gegeben und 1 h bei 50 °C inkubiert bis sich das Pellet nahezu gelöst hat. Die unlöslichen Teile wurden durch eine Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde dann entweder auf eine SDS-PAGE, ein Agarosegel oder eine Chromatographie-Säule gegeben (siehe Kap. 3.3.3, 3.3.4, 3.3.15, 3.3.16).

3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x SDS-Laufpuffer: (nach Laemmli)	25 mM Tris/HCl, pH 8.5 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
4x RPP: (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
4x NRPP: (nichtreduzierender Probenpuffer)	250 mM Tris/HCl, pH 6.8 0,8 % (w/v) SDS 39 % (w/v) Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Proteinstandard:	<i>Unstained Protein Molecular Weight</i> Marker (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
1x PBS-T:	10 mM Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)/KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl 0,1 % Tween20

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt. Dabei überlagert die Ladung von SDS die Eigenladung der Proteine und gibt ihnen eine konstante, negative Ladung. Durch das Kochen werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgespalten und die Proteine verlieren ihre Tertiär- und Sekundärstruktur. Zusätzlich werden reduzierende Thiolverbindungen, wie Dithiothreitol oder β-Mercaptoethanol, zugegeben um die Disulfidbrücken zu spalten. Zur Trennung der Proteine wird ein diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem

eingesetzt (Laemmli 1970). Dabei laufen die Proteine zunächst bei neutralem pH ins Sammelgel ein und werden dort konzentriert. Die Trennung erfolgt dann erst im Trenngel bei einem leicht basischen pH-Wert (Lottspeich and Engels 2006).

Tab. 3.7: Zusammensetzung für 15 % Polyacrylamidgele. Die Angaben reichen für 4 SDS-Gele

	Trenngel (15 %)	Sammelgel (6 %)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	20 ml	2,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8.8	10 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6.8	-	2,5 ml
H₂O_{deionisiert}	10 ml	7,2 ml
20 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	200 µl	100 µl
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	120 µl	100 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	56 µl	10 µl

Die SDS-PAGE wurde verwendet um Gesamtextrakte und gereinigte Proteinfractionen zu analysieren (Laemmli 1970). Die Zusammensetzung der Gele (reicht für vier SDS-Polyacrylamidgele mit einer Größe von 7,5 cm x 10 cm) ist in Tab.3.7 beschrieben. Um die Gele zu gießen wurde zunächst ein Fußgel erzeugt. Dazu wurde 1 ml des Trenngelansatzes mit 5 µl TEMED und 10 µl APS (zwei Gele) versetzt und in die Gelgießvorrichtung gegossen. Nach Polymerisation des Fußgels wurde das Trenngel gegossen und mit einem 1:1 (v/v) Gemisch aus Isopropanol und Wasser überschichtet. Nach gründlichem Ausspülen des Isopropanols wurde das Sammelgel gegossen. Für die Probenvorbereitung wurden alle Proben mit einem 4x reduzierenden Probenpuffer (RPP) oder 4x nicht-reduzierenden Probenpuffer (NRPP) im Verhältnis 3:1 versetzt und 5 min gekocht. Als Molekulargewichtsstandard wurde der *Unstained Protein Molecular Weight* Marker (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet und 5 µl davon aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde in der Gelkammer (*Mini-PROTEAN® Tetra System*) von *Bio-Rad* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) mit 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Zu Beginn wurde eine Spannung von 70 V angelegt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, dann wurde die Spannung auf 100 V erhöht (Netzgerät von Heinzinger Economy Line LNG 35006, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden entweder ein Western Blot (siehe Kap. 3.3.8), eine Silberfärbung (siehe Kap. 3.3.7) oder eine Coomassie-Brillant-Blau-Färbung (siehe Kap. 3.3.6) durchgeführt. Die nicht-reduzierenden SDS-Gele wurden, wenn nicht extra erwähnt, vor dem Elektrolot 5 min bei 55 °C in 1 % β-Mercaptoethanol in 1x PBS-T nachreduziert.

3.3.4 Blue Native Gelelektrophorese

1x Anodenpuffer:	50 mM BisTris-HCl pH 7.0
1x Kathodenpuffer:	50 mM Tricine 15 mM BisTris 0,002 % (w/v) Serva Blue G-Lösung
2x Probenpuffer <i>Blue Native</i> :	1 M 6-Aminocapronsäure 100 mM BisTris-HCl pH 7.0 100 mM NaCl 20 % Glycerin 0,1 % Serva Blue G250
Proteinstandard:	Serva <i>Native Marker Liquid Mix</i> für BN/CN (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Für die *Blue Native* Gelelektrophorese wird das SDS durch Coomassie Brillant Blue G250 ersetzt. Der Farbstoff ist negativ geladen, so dass sich negative Farbstoff-Protein-Komplexe bilden. Dabei bleibt aber im Gegensatz zum SDS-Protein-Komplex die native Struktur der Proteine erhalten. Die Proteine werden dann nur aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt (Schägger and Jagow 1991).

Für die *Blue Native* Gelelektrophorese wurden die Proben 1:1 mit dem 2x Probenpuffer gemischt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des 10x10 cm großen Acrylamidgels (Acrylamidkonzentration: 3-12 % bzw. 4-16 %) gegeben und das Gel für 10 min bei 50 V in dem BlueVertical PrimeTM-System (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) laufen gelassen. Danach wurde die Spannung auf 200 V erhöht und das Gel bis zur gewünschten Länge laufen gelassen. Die Banden wurden anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau oder Silberfärbung gefärbt oder mit Hilfe des Western Blots auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (siehe Kap. 3.3.6 – 3.3.8).

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden die Banden ausgeschnitten und für 10 min im 2x reduzierenden Probenpuffer bei RT inkubiert. Anschließend für 20 sec in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg, Deutschland) aufgeköcht und erneut für 15 min bei RT inkubiert. Die ausgeschnittene Bande wurde dann auf ein Sammelgel ohne Taschen (siehe Kap. 3.3.3) aufgesetzt und die SDS-Gelelektrophorese wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben durchgeführt.

3.3.5 SDS-Agarosegelelektrophorese

1x Agaroselaufpuffer: 40 mM Tris/HCl, pH 8.0
 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
 0,1 % (w/v) SDS

4x Agaroseprobenpuffer: 40 mM Tris/HCl pH 8.0
 1 mM EDTA
 0,1 % (w/v) SDS
 30 % (v/v) Glycerin
 1 Sp Bromphenolblau

Zur Trennung großer Proteine und Proteinkomplexe eignet sich die Agarosegelelektrophorese, da die Poren größer als bei der SDS-PAGE sind und auch Proteine mit einem Molekulargewicht von über 500 kDa in das Agarosegel einwandern können (Lottspeich and Engels 2006).

Dazu wurde ein 1 % (w/v) Agarosegel verwendet. Es wurde die entsprechende Menge peqGOLD MegaBase Agarose (peqlab, Erlangen, Deutschland) eingewogen und in 1x Agaroselaufpuffer in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg, Deutschland) aufgeköcht. Die Agarose wurde dann bei RT auf dem Taumelschüttler (Heidolph Polymax 1040, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) geschüttelt, bis die Agaroselösung in etwa eine Temperatur von 40 °C erreicht hatte. Anschließend wurde ein 7x15 cm Gel gegossen. Für die Probenvorbereitung wurden die Proben in einem Verhältnis von 3:1 mit dem Agaroseprobenpuffer versetzt. Die Agarosegelelektrophorese wurde bei 40 V in einer Bio-Rad *Wide Mini-Sub Cell* GT Gelelektrophoreskammer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) bei einer Laufzeit von 1,75 h, durchgeführt. Nach der Agarosegelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe eines Kapillarblots auf die Nitrocellulosemembran übertragen (siehe Kap. 3.3.8).

3.3.6 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau eignet sich zum Färben von Proteinen in Elektrophoresegelen. Dabei bindet der Farbstoff recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Am wichtigsten für die Färbung sind vor allem die Wechselwirkungen mit Arginin. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 ng Protein und ist damit unempfindlicher als die Silberfärbung (Lottspeich and Engels 2006). Allerdings können die Banden, im Gegensatz zur Silberfärbung, anschließend massenspektrometrisch analysiert werden.

Für die Coomassie-Brillant-Blau-Färbung wurde das Gel zunächst dreimal 5 min mit deion. Wasser gewaschen, bevor es 1 h mit der Coomassie-Brillant-Blau-Lösung (Bio-Safe Coomassie G250, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) gefärbt wurde. Zum Entfärben wurde das Gel mehrfach mit deion. Wasser gewaschen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit einem handelsüblichen Scanner eingescannt.

3.3.7 Silberfärbung

Stop-/Fixierungslösung:	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) konz. Essigsäure
Sensibilisierungslösung:	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Färbelösung:	0,2 % (w/v) Silbernitrat 0,02 % (v/v) Formaldehyd (37 %)
Entwicklungslösung:	3 % (w/v) Natriumcarbonat 0,05 % (v/v) Formaldehyd (37 %)

Die Silberfärbung ist deutlich empfindlicher als die Coomassie-Brillant-Blau Färbung und erreicht Nachweisgrenzen von Subnanogrammmengen. Bei der Färbung binden Silber-Ionen an die Proteine und werden durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. Dies geschieht vor allem durch die funktionellen Gruppen und Peptidbindungen. Durch ein starkes Reduktionsmittel werden die Silber-Ionen in der Nähe der Silberkeime in metallisches Silber umgewandelt. Die Proteinbanden werden als braune und schwarze Banden sichtbar (Blum et al. 1987; Lottspeich and Engels 2006).

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel in der Stop-/Fixierlösung 1 h inkubiert. Danach 2x20 min mit 30 % Ethanol und ein weiteres Mal mit deion. Wasser für 20 min gewaschen. Dann wurde das Gel 1 min lang in die Sensibilisierungslösung gegeben, bevor 3x20 sec mit deion. Wasser gewaschen wurde. Anschließend wurde das SDS-Gel 20 min mit der Färbelösung gefärbt. Erneut wurde das Gel 3x20 sec mit deion. Wasser gewaschen und zum Schluss in der Entwicklungslösung bis zum gewünschten Färbungsgrad entwickelt. Die Entwicklung wurde mit der Stop-/Fixierlösung gestoppt und abschließend 3x10 min mit deion. Wasser gewaschen. Dokumentiert wurde die Silbergefärbung mit einem handelsüblichen Scanner.

3.3.8 Western Blot

Transferpuffer (Elektroblot):	48 mM Tris/HCl, pH 8.8 39 mM Glycin 23 mM SDS 20 % (v/v) Methanol
Transferpuffer (Kapillarblot):	0,6 M NaCl 0,06 M Tri-Natriumcitrat
1x PBS:	10 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl
1x PBS-T:	10 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl 0,1 % Tween 20
1x TBS-T:	20 mM Tris/HCl, pH 7.2 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Fixierungslösung:	10 mM Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7.4 155 mM NaCl 0,2 % Glutaraldehyd
Blockierungslösung:	20 mM Tris/HCl, pH 7.2 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 1 % BSA 1 % Trockenmilch
ECL-Lösung 1:	100 µl 250 mM Luminol 44 µl 90 mM p-Cumarsäure 1000 µl 1 M Tris/HCl, pH 8.5 mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen
ECL-Lösung 2:	6,1 µl 30 % H ₂ O ₂ 1000 µl 1 M Tris/HCl, pH 8.5 mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen

Der Western Blot wurde zeitgleich von Renart und Towbin eingeführt und ist eine Abwandlung des Southern Blots (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979). Die Methode besteht aus der Immobilisierung von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran und anschließender Immundetektion. Dazu werden die Proteine zunächst durch einen Elektroblot bzw. einen Kapillarblot vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der spezifische Nachweis einzelner Proteine erfolgt dann über die Bindung eines Primärantikörpers. Meist

wird dann mit einem Sekundärantikörper inkubiert, der an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet. So kann die Spezifität und die Sensitivität noch weiter erhöht werden. Zur Detektion sind an den Zweitantikörper Fluoreszenzfarbstoffe, Lumineszenzfarbstoffe oder Enzyme gekoppelt (Lottspeich and Engels 2006).

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden mittels Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham™Protran™ 0,1 µm NC, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, England) übertragen. Dazu wurde das Semi-Dry-Blot Verfahren verwendet. Es wurden drei Lagen Filterpapier auf die Anode gelegt, darauf die Nitrocellulosemembran, dann das SDS-Gel und nochmals drei Lagen Filterpapier (Abb. 8). Danach wurde für 70 min mit 90 mA pro Membran geblottet (biostep® GmbH, Jahnsdorf, Deutschland). Die durch SDS-Agarosegelelektrophorese getrennten Proteine wurden dagegen mit einem Kapillarblot auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde ein Filterpapier, das auf beiden Seiten im Transferpuffer lag, über eine Glasplatte gelegt. Darauf wurden das Agarosegel, dann die Nitrocellulosemembran und anschließend sechs Filterpapiere gelegt, bevor Zellstoffpapier und eine weitere Glasplatte aufgelegt wurden. Die Glasplatte wurde zum Schluss noch mit einer gefüllten Glasflasche beschwert (Abb. 8). Die Übertragung der Proteine mittels Kapillarblot fand über Nacht statt.

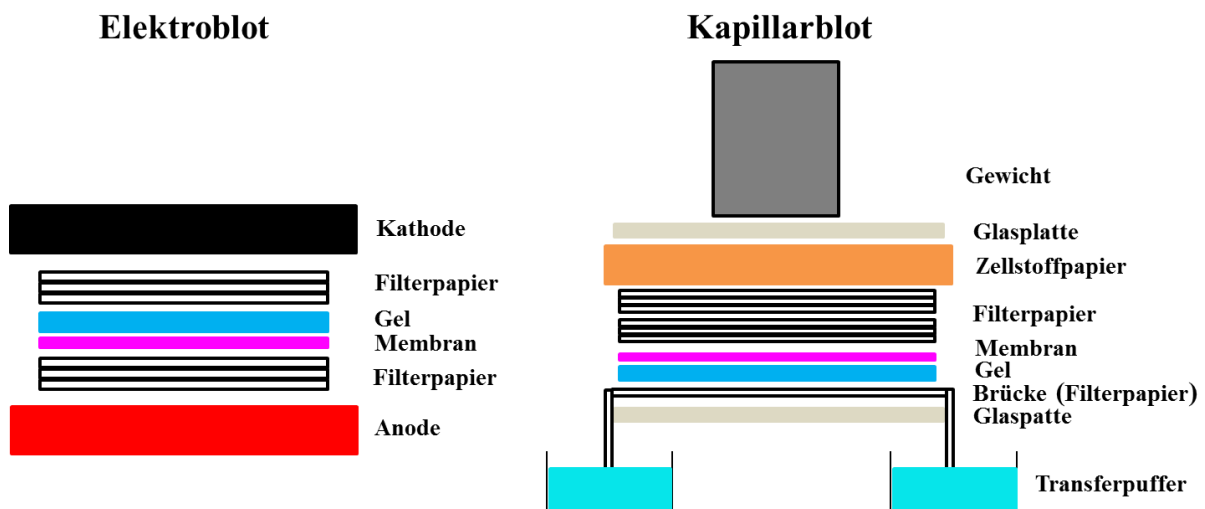


Abb. 8: Vergleich von Elektroblot und Kapillarblot

Die Membranen nach Elektroblot wurden mit Ponceau S-Lösung 5 min gefärbt und mit Wasser wieder entfärbt. Somit konnte die Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft und der *Unstained Protein Molecular Weight* Marker (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) markiert werden. Nach Ponceau S-Färbung bzw. direkt nach dem Kapillarblot wurden die Proteine mit der Fixierungslösung für 30 min auf der Membran

immobilisiert. Dann 2x5 min mit 1x PBS-T und 1x5 min mit 1x TBS-T gewaschen. Dann wurde die Membran für 1 h in die Blockierungslösung gegeben, um störende Hintergrundsignale zu minimieren. Danach wurde mit einem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (siehe Kap. 3.1.3) in 1x TBS-T über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x5 min mit 1x TBS-T gewaschen. An den ersten Antikörper wurde nun ein Sekundärantikörper, gelöst in 1x TBS-T, gebunden. Der 2. Antikörper ist an eine Meerrettichperoxidase (HPR, *horseradish peroxidase*) gekoppelt, wodurch eine Detektion mittels Chemilumineszenz möglich ist. Nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper für 45 min wurde erneut für 2x10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Für die Chemilumineszenzreaktion wurden die zwei ECL-Lösungen (*enhanced chemiluminescence*) im Verhältnis 1:1 gemischt, die Nitrocellulosemembran vollständig bedeckt und für 2 min inkubiert. Zum Schluss wurde die Chemilumineszenz mittels GeneGnome (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) mit einer Expositionszeit von 2x5 min aufgenommen.

Für den Nachweis von MUC6 wurde eine Lektin-Färbung mit GSAII (*Griffonia simplicifolia agglutinin-II*) (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) durchgeführt, mit welchem das Mucin MUC6 nachgewiesen werden kann (Ihida et al. 1988). Für die Färbung wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 1 h bei RT mit 2 % Gelatine, gelöst in 1x TBS-T, blockiert. Anschließend wurde biotinyliertes GSAII (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) mit einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % Gelatine und 1x TBS-T gelöst und die Membran 30 min damit inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit 1x TBS-T gewaschen und weitere zweimal mit 1 % Gelatine in 1x TBS-T. Dann erfolgte die Inkubation mit der Streptavidin-Peroxidase (Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) mit einer 1:2500 Verdünnung in 1 % Gelatine in 1x TBS-T. Zum Schluss wurde die Membran noch viermal mit 1x TBS-T gewaschen bevor die Dokumentation, wie oben beschrieben, über eine Chemilumineszenzreaktion erfolgte.

Für die Färbung der Proben, die mit DCP-Bio1 (3-(2,4-dioxocyclohexyl)propyl 5-((3aR,6S,6aS)-hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)pentanoate) inkubiert wurden, wurde die Membran ebenfalls zunächst mit Ponceau S-Lösung gefärbt und der Standard markiert. Anschließend wurden die Proteine mit der Fixierlösung für 30 min immobilisiert und die Membran danach 2x5 min mit PBS-T sowie 1x5 min mit TBS-T gewaschen. Dann wurde die Membran 1 h mit der Blockierlösung inkubiert und daraufhin für 1 h mit Streptavidin-Peroxidase (Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) in 1x

TBS-T (Verdünnung: 1:2500) inkubiert. Als letzter Schritt wurde die Membran 4x10 min mit 1x TBS-T gewaschen. Die Dokumentation erfolgte ebenfalls über die oben beschriebene ECL-Reaktion.

3.3.9 Strippen der Membranen

Stripping-Puffer:	1,6 % (w/v) SDS 62,5 mM Tris/HCl pH 6.8 0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol
TBS-T:	20 mM Tris/HCl, pH 7.2 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20

Um zwei Immunfärbungen mit einer Membran hintereinander durchzuführen, wurden die Membranen nach der ECL-Färbung getrocknet und für 1 h im Stripping-Puffer bei 55 °C inkubiert. Dann wurden die Nitrocellulosemembranen 3x5 min mit deion. Wasser gewaschen. Anschließend wurde nochmal 3x5 min mit 1x TBS-T gewaschen und dann wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben blockiert und eine Immunfärbung durchgeführt.

3.3.10 Kompetitive Inhibierung

Zur Überprüfung der Spezifität einiger Signale der Immunfärbung wurde eine kompetitive Inhibierung des verwendeten Primärantikörpers durchgeführt. Dazu wurde der 1. Antikörper über Nacht bei 4 °C mit 4 μ g Peptid pro μ l Primärantikörper im Karussellschüttler inkubiert. Anschließend wurde der kompetitiv inhibierte Antikörper nach Blockierung auf die Nitrocellulosemembran gegeben und die Membran wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben weiter behandelt.

3.3.11 Nachweis freier Thiole an Cysteinresten mit PEG-maleimid

Maleimid bindet, wie in Abb. 9 gezeigt, im neutralen pH-Bereich (6,5-7,5) spezifisch an freie Thiolgruppen von Cysteinresten und bildet Thioetherbindungen. Durch das angehängte Polyethylenglycol (PEG) mit einem Molekulargewicht von 5 kDa kommt es zu einer Verschiebung auf der SDS-PAGE und kann so ein Nachweis für oxidierbare Thiolgruppen an Cysteinresten sein.

Zum Nachweis oxidierbarer Cysteinreste wurden einigen Proben mit Methoxypolyethylen glycol maleimide PEG5000 (PEG-maleimid) (63187, Fluka/Sigma Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Für das Experiment wurde PEG-maleimid im entsprechenden Puffer (siehe Kap. 3.3.1, Extraktionspuffer) mit einer Konzentration von 5 mM gelöst. Dann wurde die PEG-maleimid Stammlösung (5 mM) zur Probe gegeben (Endkonzentration von 1 mM PEG-maleimid) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe auf eine SDS-PAGE übertragen und wie in Kapitel 3.3.3 und Kapitel 3.3.8 weiter verfahren.

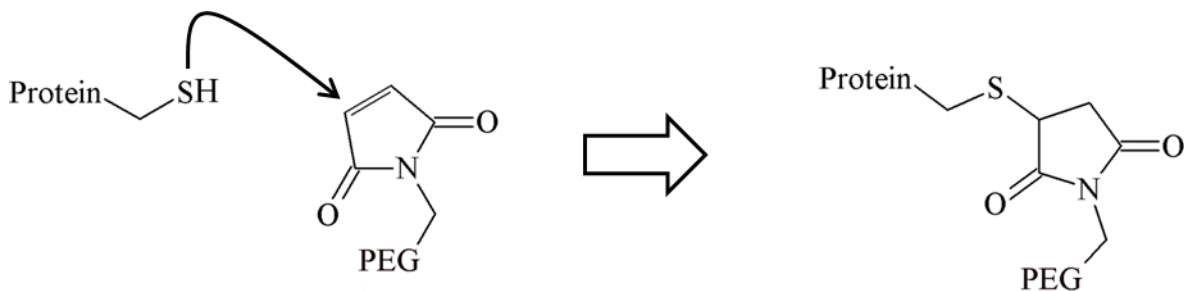


Abb. 9: Reaktion des Thiols eines Cysteinrestes mit Maleimid.

3.3.12 Nachweis von Sulfensäuren mit DCP-Bio1;

DCP-Bio1 (3-(2,4-dioxocyclohexyl)propyl 5-((3aR,6S,6aS)-hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4-d]imidazol-6-yl)pentanoate) (Kerafast Inc, Bosten, USA) bindet spezifisch an Sulfensäuren im physiologischen pH-Bereich (Poole et al. 2007). Durch das angehängte Biotin kann es über Streptavidin spezifisch nachgewiesen werden und zeigt so zu Sulfensäuren oxidierte Cysteinreste an.

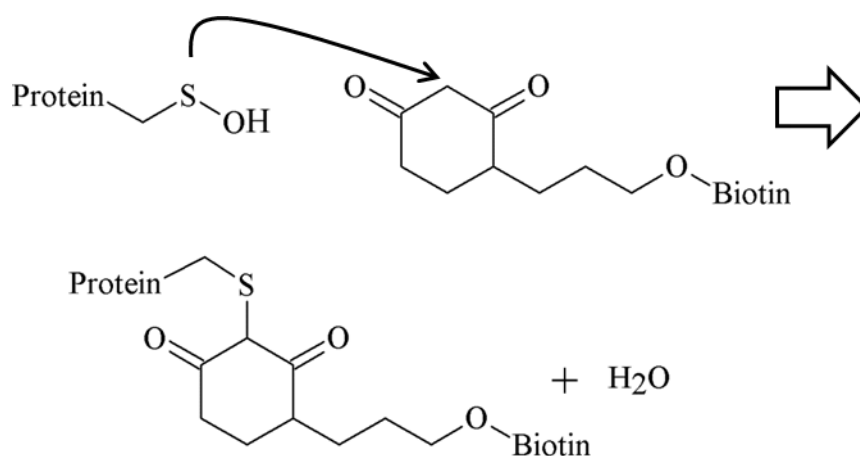


Abb. 10: Reaktion von einer Sulfensäure mit einem Dimedon Derivat.

Zum Nachweis möglicher Sulfensäuren an Cys-58 von TFF1 wurden einigen Proben mit DCP-Bio1 behandelt. Für das Experiment wurde DCP-Bio1 im entsprechenden Puffer (siehe Kap. 3.3.1, Extraktionspuffer) in einer Konzentration von 5 mM gelöst. Dann wurde die DCP-Bio1 Stammlösung (5 mM) zur Probe gegeben (Endkonzentration von 1 mM DCP-Bio1) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe über SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe Kap. 3.3.3 und Kap. 3.3.8).

3.3.13 Trichloressigsäure Fällung

Die Trichloressigsäure(TCA)-Fällung eignet sich um Proteine von anderen Biomolekülen zu trennen. Durch Zugabe von TCA werden die Proteine denaturiert und fallen aus. So lassen sie sich schnell und einfach von ungewünschten Bestandteilen abtrennen (Lottspeich and Engels 2006).

Um das überschüssige PEG-maleimid von den Proteinen zu trennen wurde teilweise eine TCA-Fällung durchgeführt. Dazu wurde eine 20 % TCA-Lösung im Verhältnis 1:1 zur Probe gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann zentrifugiert (16000 x g, 15 min, 4 °C) (Hettich Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Dann wurde das Pellet zweimal mit 300 µl kaltem Aceton gewaschen und anschließend jeweils zentrifugiert (16000 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet getrocknet. Danach wurde das Pellet in Probenpuffer gelöst und 5 min gekocht. Die resuspendierten Proben wurden dann, wie in Kap.3.3.3 beschrieben, auf eine SDS-PAGE aufgetragen und über Western Blot (Kap.3.3.8) analysiert.

3.3.14 PAS (*periodic acid Schiff*)-Reaktion

Lösung 1	1 % (w/v) H_5IO_6 3 % (v/v) Eisessig
Lösung 2	0,1 % (w/v) $Na_2S_2O_5$ 1 mM HCl

Mit der PAS-Reaktion lassen sich oxidierbare Polysaccharide nachweisen. Es ist daher eine geeignete Methode um Glykoproteine wie z. B. Muzine nachzuweisen (Mantle and Allen 1978). Bei der PAS-Reaktion werden 5 µl der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham™ Protran™ 0.1 µm NC, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire,

England) übertragen. Die Membran wird anschließend 30 min mit Lösung 1 inkubiert und anschließend für 2x2 min mit Lösung 2 gewaschen. Dann wird die Membran mit Schiff's Reagenz (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) 15 min gefärbt. Zum Schluss wird noch dreimal für je 2 min mit Lösung 2 gewaschen und die Nitrocellulosemembran anschließend getrocknet. Die Dokumentation erfolgt mit einem handelsüblichen Scanner.

3.3.15 Größenausschlusschromatographie

Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7.0
(S75HL/S-500)	30 mM NaCl
	0,5 mM Benzamidin
	0,1 mM Pefabloc SC
	0,1 µg/ml Leupeptin

Mit der Größenausschlusschromatographie können Moleküle aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt werden. Dabei besteht die stationäre Phase aus porösen Polymeren (z. B. Dextran) in die die kleinen Moleküle einwandern können, während die großen Moleküle mit der wässrigen Phase vorbei fließen (Porath and Flodin 1959). Diese Methode eignet sich vor allem zur Trennung von Proteinkomplexen, zum Entsalzen oder zum Pufferwechsel (Lottspeich and Engels 2006).

Für die Reinigung der Proteine nach der Extraktion wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit Hilfe des ÄKTATM-FPLC Systems (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) oder des ÄKTATMPrime plus Systems (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) gereinigt. Als Säulen wurde die HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 75 pg Säule (S75HL; 120 ml Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) bzw. die HiPrepTM 16/60 Sephacryl® S-500 HR (S-500; 120 ml Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) verwendet. Die Probe wurde mit einer konstanten Flußrate von 1 ml/min auf die HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 75 pg Säule, bzw. mit einer konstanten Flußrate 0,5 ml/min auf die HiPrepTM 16/60 Sephacryl® S-500 HR Säule, mit dem oben genannten Puffer, aufgetragen und eluiert, falls es im Ergebnisteil nicht anders angegeben wurde. Für die Extraktion und die Größenausschlusschromatographie wurde dabei immer der gleiche Puffer verwendet. Das Fraktionsvolumen betrug jeweils 2 ml. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Die gereinigten Fraktionen wurden bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Die Größenausschlusschromatographien wurden zum Teil in Zusammenarbeit mit Frau Franziska

Heuer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) durchgeführt. Die S-500 vom Gesamtextrakt En (MC406A) wurde vollständig von Frau Franziska Heuer durchgeführt. Die Größenausschlusschromatographie und PAS-Färbung mit Proben von Mausmägen bzw. mit kommerziell erwerbbaaren Muzinpräparationen aus dem Schwein (Sigma Muzin; M1778, Mucin from porcine stomach Type III, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurden von Herrn René Stürmer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) und die Größenausschlusschromatographien, sowie die PAS-Färbung von Schweinemagenproben von Frau Franziska Heuer durchgeführt.

3.3.16 Ionenaustauschchromatographie

Puffer A:	20 mM Tris/HCl, 7.0
(ResQ)	0,5 mM Benzamidin
	0,1 mM Pefabloc SC
	1 µg/ml Leupeptin

Puffer B:	20 mM Tris/HCl, 7.0
(ResQ)	1 M NaCl
	0,5 mM Benzamidin
	0,1 mM Pefabloc SC
	1 µg/ml Leupeptin

Die Ionenaustauschchromatographie wird häufig als erster Schritt einer Proteinreinigung eingesetzt. Die stationäre Phase besteht aus einer geladenen Matrix, um die die geladenen Moleküle konkurrieren. Dabei unterscheidet sich der Anionenaustauscher, bei dem die Matrix positiv geladen ist, vom Kationenaustauscher, der eine negative stationäre Phase besitzt. Die Ionenaustauschchromatographie eignet sich zur Trennung von Proteinen, da diese aufgrund ihrer geladenen Seitenketten unterschiedliche isoelektrische Punkte (pI) haben. So können sie bei geeignetem pH sehr gut voneinander getrennt werden. Die Ionenaustauschchromatographie läuft in zwei Schritten ab. Zunächst binden die geladenen Proteine an die fixierte Ladung der stationären Phase, anschließend wird in einem zweiten Schritt das Protein durch eine ansteigende Salzkonzentration (z. B. NaCl) wieder verdrängt und eluiert (Lottspeich and Engels 2006).

Es erfolgte ebenfalls eine Reinigung der Proteine nach der Extraktion über eine Ionenaustauschchromatographie. Dazu wurde ein ÄKTATM-FPLC System (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) mit einer RESOURCETM Q6-Säule

(Anionenaustauschsäule, 6 ml Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K.) verwendet. Die Probe wurde mit einer konstanten Flußrate von 4 ml/min aufgetragen. Der Durchfluss wurde gesammelt und die Säule anschließend mit Puffer A gewaschen. Dann wurde mit einem linearen Gradienten 0 % bis 5 % Puffer B für 1,5 Säulenvolumen eluiert. Anschließend wurde mit einem steileren, linearen Gradienten bis 100 % Puffer B für weitere 4 Säulenvolumen eluiert. Das Fraktionsvolumen für die Elution betrug 1 ml. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen wurden in Eppendorfgefäße übertragen und bis auf weiteres bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Die Ionenaustauschchromatographien wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Franziska Heuer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) durchgeführt.

3.3.17 Entsalzen der Proben mit Hilfe einer PD-10 Säule

Für die Identifizierung der Proteine durch Massenspektrometrie wurden die Proben zunächst entsalzt, um die Proteine anschließend zu konzentrieren und über SDS-PAGE trennen zu können. Dazu wurden die entsprechenden Proben auf die GE Healthcare Life Sciences™ PD-10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, U.K) nach Herstellerangaben aufgetragen.

Die Säule wurde dazu zunächst mit ca. 25 ml deion. Wasser gespült. Dann wurden ca. 2 ml der Proteinproben aufgetragen und ca. 15 Fraktionen mit deion. Wasser eluiert. Wenige µl der Fraktionen wurden dann, wie in Kap.3.3.3 beschrieben, über eine SDS-PAGE getrennt und die TFF1 positiven Proben durch Western Blot (Kap.3.3.8) nachgewiesen. Die TFF1 positiven Proben wurden anschließend vereinigt und konzentriert (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die konzentrierten Proben wurden dann erneut mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie gefärbt, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und an Herrn Univ.-Prof. Dr. Hartmut Schlüter (Massenspektrometrische Proteomanalytik, Inst. für Klinische Chemie & Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) geschickt. Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Herrn Sönke Harder (Massenspektrometrische Proteomanalytik, Inst. für Klinische Chemie & Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt.

3.3.18 Iodierung von TFF1 und Bindungsstudien

Stammlösung 1	0,1 M NaH ₂ PO ₄
Stammlösung 2	0,1 M Na ₂ HPO ₄
Puffer 1	193,5 ml Stammlösung 2 56,5 ml Stammlösung 1 pH 7.4
Puffer 2	100 ml Puffer 1 0,1 % NaN ₃

Iod-125 (¹²⁵I) lässt sich über eine elektrophile Addition an Tyrosinreste und Histidinreste von Proteinen und Peptiden koppeln. Dadurch lassen sich Proteine und Peptide radioaktiv markieren und durch den Gamma-Zerfall nachweisen (Lottspeich and Engels 2006).

Alle folgenden Arbeitsschritte, bei denen direkt mit radioaktivem Material gearbeitet werden musste, wurden von Herrn René Stürmer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) durchgeführt.

Für die Iodierung wurden synthetisches TFF1 (Monomer und Homodimer; chemische Synthese erfolgte durch Frau Nayara Braga Emidio, Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Australien, (Braga Emidio et al. 2020)) und rekombinantes TFF1 (PreproTech GmbH, Hamburg, Deutschland) eingesetzt. Das Cys-58 des synthetischen TFF1-Monomers ist mit einer Acetamidomethyl-Schutzgruppe (ACM) geschützt (TFF1-Monomer(ACM)) (Braga Emidio et al. 2020). Um TFF1 zu markieren, wurden zunächst 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. Von dieser Iodogenlösung wurden 20 μ l in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Um das Iodogen an die Reaktionsgefäßwand zu immobilisieren, wurde das Gas des Dichlormethans mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer Glaspipette abgesaugt. Dann wurden nacheinander 6 μ l einer TFF1-Lösung (Konzentration 1 μ g/ μ l) und 5 μ l Na¹²⁵I (Konzentration: 3700 MBq/ml (100 mCi/ml), Spezifische Aktivität: 74 TBq/mmol (2000Ci/mmol), I-RB-31, Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) in das mit Iodogen beschichtete Gefäß pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für weitere 40 min inkubiert. Anschließend wurde das iodierter TFF1 (¹²⁵I-TFF1) über eine Sephadex[®] G10-Säule gereinigt. Dazu wurden 1,2 g Sephadex[®] G10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zunächst mit 7 ml Puffer 2 gemischt und üN quellen gelassen. Von dieser Lösung wurden dann 5 ml in eine Poly-Prep[®]-Säule (10 mL, Bio-Rad Laboratories Inc.,

Hercules, Kalifornien, USA) gefüllt, die überstehende Flüssigkeit abgelassen und noch dreimal mit 2 ml Puffer 2 gewaschen. Auf die fertige Säule wurde dann der komplette Reaktionsansatz gegeben und mit Puffer 2 eluiert. Dabei wurden ca. 24 Fraktionen gesammelt. Die Aktivität (cpm) der einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe des β -Counters (Hidex 300 SL Automatic Liquid Scintillations Counter, Hidex; Turku, Finnland) gemessen. Dazu wurden 2 μ l jeder Fraktion in 10 μ l Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®] eco plus, LSC-Universalcocktail, Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert. Die Fraktionen, mit der größten Aktivität um den Bereich des Elutionsvolumens von iodiertem TFF1, wurden vereinigt und bei 4 °C im Bleigefäß aufbewahrt.

Bindungspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7.0
	0,5 M NaCl
	2,5 mM CaCl ₂

Für die Bindungsstudien mit ¹²⁵I-TFF1 wurden die Membranen nach dem Western Blot (Kap.3.3.8) für 1 h mit der Blockierungslösung (Kap.3.3.8) inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit 1x TBS-T (Kap.3.3.8) gewaschen. Dann wurde das iodierter TFF1 im Bindungspuffer (ca. 10000 cpm/10 ml) auf die Membran gegeben und für 4-5 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3x5 min gewaschen und getrocknet. Die getrocknete Membran wurde dann in der Dunkelkammer auf einen Carestream[®] Kodak[®] BioMax[®] MS Film (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelegt und in einer Filmkassette bei -80° C exponiert. Die Exposition des Films erfolgte meist für 1-3 Tage, bei sehr schwachen Signalen, vor allem bei humanen Proben, teilweise jedoch für bis zu einer Woche. Zur Entwicklung des Films wurde dieser zunächst ca. 1 min in der Entwicklungslösung (Carestream[®] Kodak[®] autoradiography GBX developer, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) geschwenkt und anschließend mit deion. Wasser gewaschen, bevor der Film für 1 min in der Fixierlösung (Carestream[®] Kodak[®] autoradiography GBX fixer, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert wurde. Zum Schluss wurde der Film erneut mit deion. Wasser gewaschen und getrocknet. Für die Dokumentation wurde der Film mit einem handelsüblichen Drucker eingescannt und mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

Falls im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurde der oben genannte Bindungspuffer verwendet. Für die kompetitive Inhibition mit den TFF-Peptiden wurde zum Bindungspuffer zusätzlich ein 10facher molarer Überschuss an nicht-iodiertem, synthetisiertem TFF1 zum ¹²⁵I-TFF1 dazugegeben, bevor die Membran inkubiert wurde. Für die Versuche mit den Monosacchariden wurde das entsprechende Monosaccharid (α -Methyl-Glukosid, β -Methyl-

ProtParam	Berechnung von physikalischen und chemischen Parametern von Proteinen (Walker 2005)
ClustalOmega	Vergleich von Proteinsequenzen (Larkin et al. 2007)
PyMOL	Strukturdarstellung (DeLano 2002)
ImageJ 1.52a	Auswertung der Bindungsstudien (Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, USA, http://imagej.nih.gov/ij) (Schneider et al. 2012)
ACD/ ChemSketch 2018.1.1	Zeichnen chemischer Formeln (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada)

4. Ergebnisse

4.1 TFF1 im Magen des Menschen

Da TFF1 hauptsächlich im Magen gefunden wurde, werden im Folgenden Ergebnisse für Gewebeproben aus dem Korpus und dem Antrum des humanen Magens gezeigt. Da kaum Antrumproben zur Verfügung standen, wurde der Fokus auf Korpusproben gelegt. Alle Experimente mit anderen Proben wie z. B. Speichel, Duodenum und Kolon waren negativ bzgl. TFF1.

4.1.1 Besonderheiten bei der Arbeit mit TFF1

Das verwendete polyklonale Antiserum anti-hTFF1-1 (Kouznetsova et al. 2007b) wurde gegen ein C-terminales Peptid der humanen Sequenz generiert (Abb. 11).

EAQTETCTVAPRERQNCGFPGVTPSQCANKGCCFDDTVRGVPWC[↓]FYPNTIDVPPEEECEF 60

Abb. 11: Lokalisation des für die Immunisierung verwendeten synthetischen Peptids in der TFF1-Sequenz.

Die Sequenz des Peptids, das für die Immunisierung verwendet wurde, ist fett markiert. Der Pfeil markiert die Aminosäure Phe-48, die über Glutaraldehyd an KLH gekoppelt ist. Cysteine, die Disulfidbrücken (1-5, 2-4, 3-6) bilden, sind in Gelb markiert. Cys-58 ist in Grün markiert.

Das Cystein 58 (Cys-58) ist wichtig für die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken z. B. bei der Bildung von Homodimeren und TFF1-GKN2-Heterodimeren. Außerdem kann das Cys-58 vermutlich durch Oxidation post-translational modifiziert werden (z. B. Sulfen- und Sulfinsäuren). Die Sensitivität des Antikörpers könnte sich in Abhängigkeit des Oxidationszustandes von Cys-58 verändern. Daher ist die Intensität der Banden für die verschiedenen TFF1-Entitäten sehr unterschiedlich, je nachdem wie die Reduktion nach der nicht-reduzierenden SDS-PAGE erfolgte. Diese Unterschiede sind in Abb. 12 gezeigt.

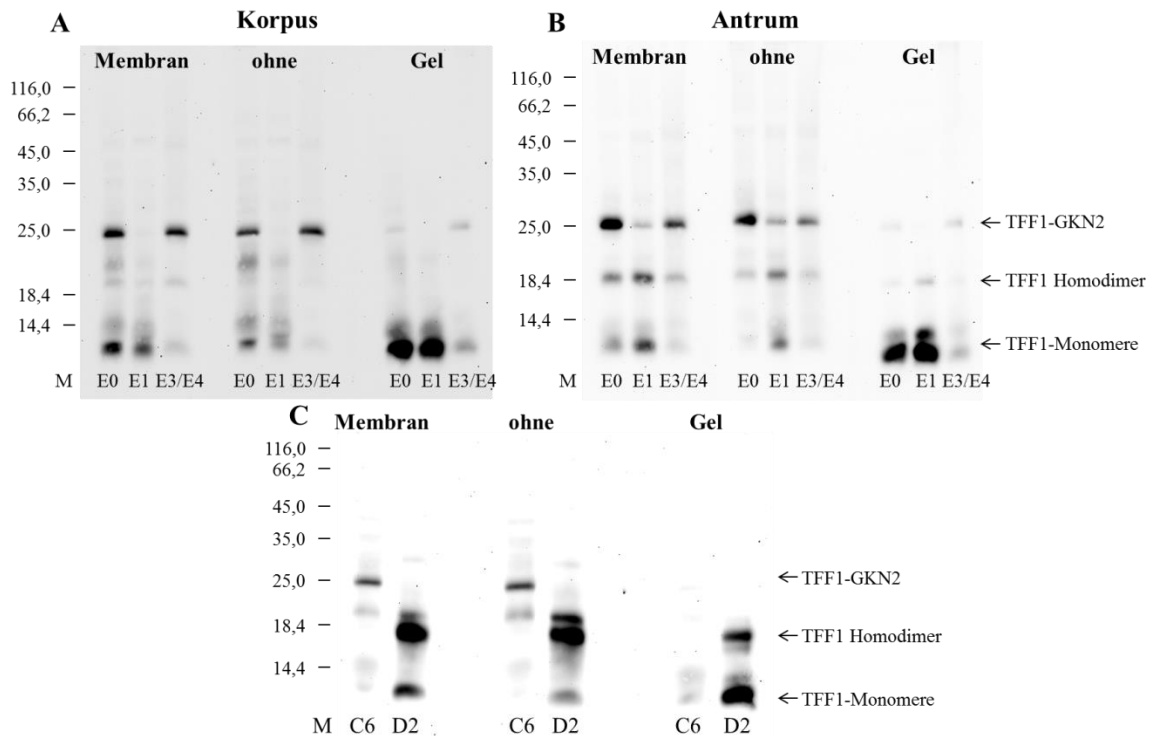


Abb. 12: Unterschiede der Immunreaktivität des humanen TFF1 Antikörpers bei nicht-reduzierenden SDS-PAGES.

A: Extrakte E0, E1, E3+E4 des Magen Korpus (M_C383) nach einer 15 %igen nicht-reduzierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot bzgl. TFF1, mit Reduktion auf der Membran bzw. ohne anschließende Reduktion bzw. Reduktion im Gel. **B:** Extrakte E0, E1, E3+E4 des Magen Antrum (M_A690) nach einer 15 %igen nicht-reduzierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot bzgl. TFF1, mit Reduktion auf der Membran bzw. ohne anschließende Reduktion bzw. Reduktion im Gel. **C:** Gereinigte Fraktionen C6 und D2 nach einer Größenausschlusschromatographie (S75HL) (M_C383 , Abb. 15, Abb. 16) nach einer 15 %igen nicht-reduzierenden SDS-PAGE und anschließendem Western Blot bzgl. TFF1, mit Reduktion auf der Membran bzw. ohne anschließende Reduktion bzw. Reduktion im Gel. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Man sieht, dass nach einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE ohne anschließende Reduktion bzw. nach Reduktion auf der Membran die dimeren Formen vom TFF1-Antiserum deutlich bevorzugt erkannt werden (Abb. 12). Dies trifft sowohl auf das Homodimer von TFF1 (~18 kDa), als auch das Heterodimer von TFF1 mit GKN2 (25 kDa) zu (Heterodimer gezeigt in Abb. 21E, Abb. 22B und D, Abb. 28) (Baus-Loncar et al. 2007; Du et al. 2003; Kouznetsova et al. 2007a; Otto et al. 2006; Westley et al. 2005). Eine anschließende Reduktion im Gel führt dagegen dazu, dass die monomeren Formen vom TFF1-Antiserum bevorzugt erkannt werden. Die Elution der entsprechenden Banden aus dem Coomassiegel zeigen allerdings, dass mehr monomere Formen (14 kDa, <14 kDa) vorliegen (Abb. 16 und Anhang, Abb. 40). Daher werden, wenn nicht anders angegeben, die nicht-reduzierenden Gele mit anschließender Reduktion im Gel gezeigt.

Da TFF-Peptide als temperaturstabil und säurestabil beschrieben wurden (Jørgensen et al. 1982; Thim and May 2005), wurden die Proben zunächst bei 4°C gelagert. Allerdings zeigte

ein Versuch, dass die Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.

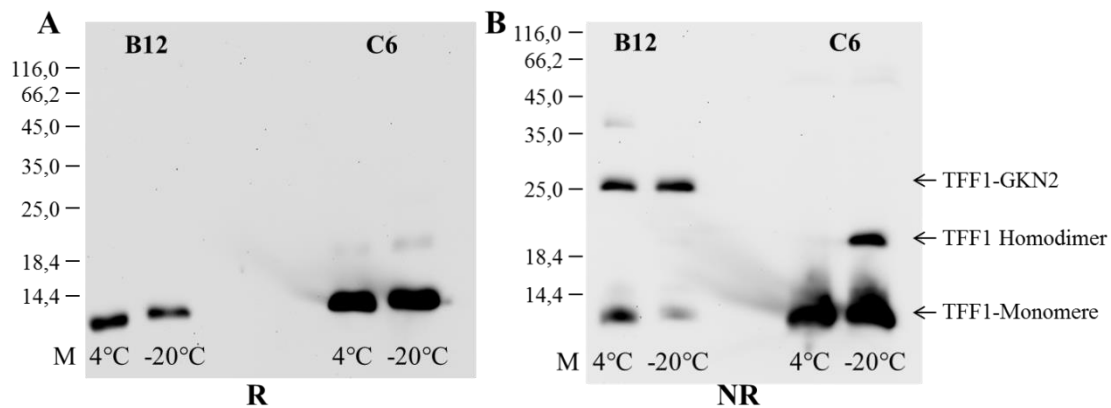


Abb. 13: Lagerung bei 4 °C und -20 °C.

A: Fraktionen B12 und C6 einer ResQ vom E0-Extrakt (Magen Korpus, M_C577) auf einer 15 %igen reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. **B:** Fraktionen B12 und C6 einer ResQ vom E0-Extrakt (Magen Korpus, M_C577) auf einer 15 %igen nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Die Abb. 13B zeigt, dass bei einer Lagerung bei 4 °C nach ca. zwei Wochen das Homodimer (Fraktion C6) nicht mehr nachweisbar ist. Das Monomer in Fraktion B12 zeigt eine leicht schwächere Immunreaktivität bei einer Lagerung von -20 °C. Auch im reduzierenden SDS-Gel kann eine Abnahme der Intensität für TFF1 bei B12 nach Lagerung bei -20 °C festgestellt werden (Abb. 13A). Für die Fraktion C6 bleibt die Menge an TFF1 in etwa gleich, während sich nur das Verhältnis Monomer zu Homodimer zu Gunsten des Monomers verändert. Allerdings zeigte sich, dass sich auch bei einer Lagerung bei -20 °C nach einigen Wochen das Verhältnis von Monomer zu Homodimer auf die Seite des Monomers verschiebt (vgl. Abb. 16 mit Anhang, Abb. 43A). Dass die Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C und -20 °C) einen Einfluss auf das Vorkommen der verschiedenen TFF1-Entitäten haben kann, sollte demnach für die Betrachtung der weiteren Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.1.2 Verhältnis von hochmolekularen zu niedermolekularen TFF1-Formen unter verschiedenen Bedingungen

In der Literatur wird die Bindung von TFF1 an den Mukus, im Speziellen MUC5AC beschrieben (Ruchaud-Sparagano et al. 2004), ebenso wie die Bindung an GKN2 (Westley et al. 2005).

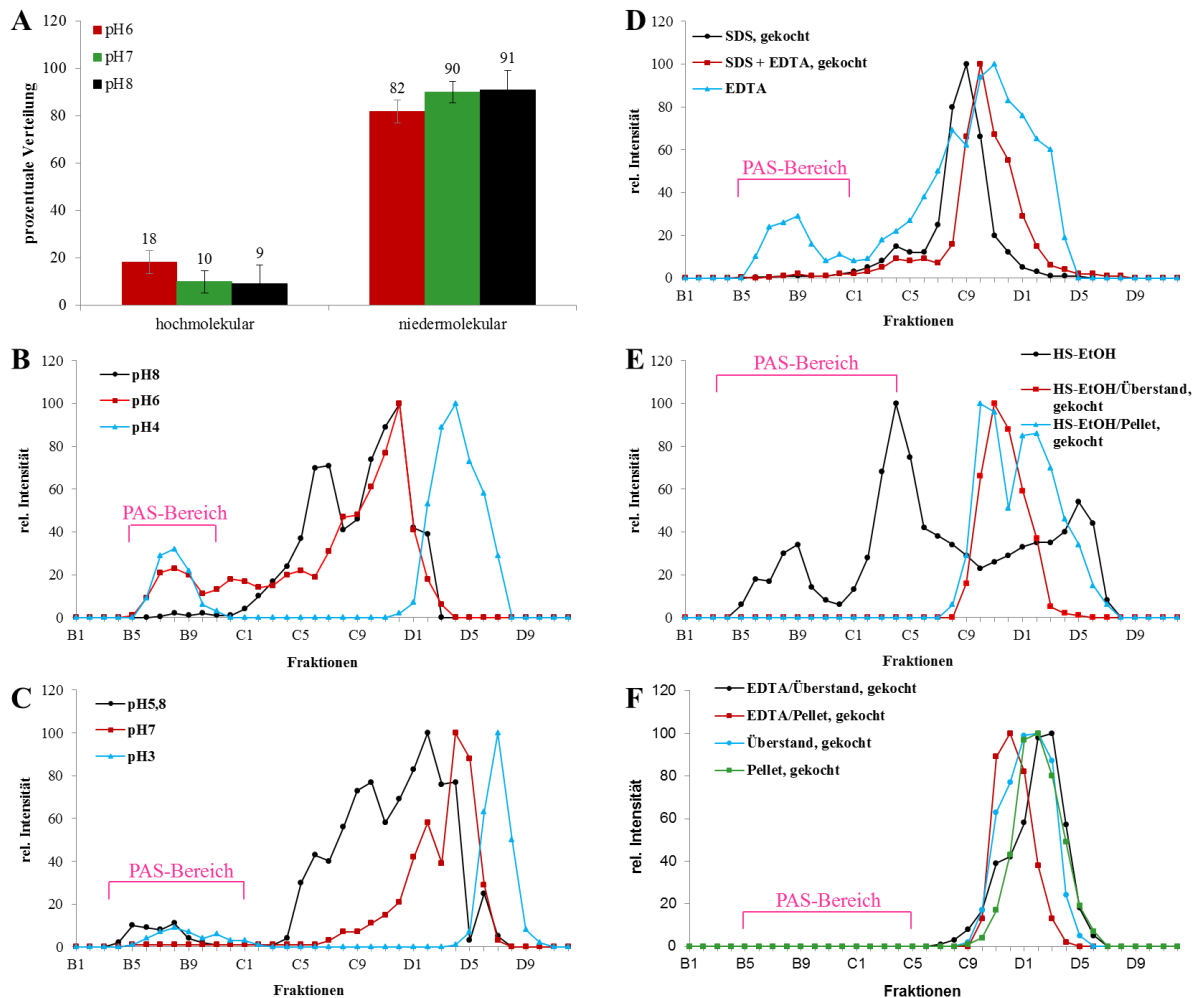


Abb. 14: Größenausschlusschromatographien unter verschiedenen Bedingungen für verschiedene Magen Korpusproben.

A: Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für drei S75HL-Säulen bei pH 6 (rot), acht S75HL-Säulen bei pH 7 (grün) und fünf S75HL-Säulen bei pH 8 (schwarz). Die Puffer bestanden jeweils aus 20 mM Tris/HCl und 30 mM NaCl. Der angegebene pH-Wert wurde mit HCl eingestellt. Bei der Auswertung erfolgte eine Unterteilung in TFF1 des hochmolekularen Bereichs (enthalten in den PAS-positiven Fraktionen, hochmolekular) versus TFF1 des niedermolekularen Bereichs (enthalten in den PAS-negativen Fraktionen, niedermolekular). Aufgetragen ist die prozentuale Verteilung von hochmolekularem TFF1 vs. niedermolekularem TFF1. **B:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für eine S75HL des Magen Korpus (M_C383) bei pH 8 (schwarz), pH 6 (rot) und pH 4 (hellblau, Puffer nach McIlvaine). **C:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für drei S75HL-Säulen des Magen Korpus (M_C383) mit verschiedenen Puffern extrahiert: 20 mM MES pH 5.8 mit 100 mM $CaCl_2$ (schwarz), 20 mM Tris/HCl pH 7 mit 20 mM EDTA, 140 mM NaCl und 20 mM $NaHCO_3$ (rot) und verd. HCl pH 3 mit 50 mM NaCl, 15 mM KCl und 20 mM $NaHCO_3$ (hellblau). **D:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für Magen Korpus Extrakte (M_C383) die über eine S75HL gereinigt wurden und vorher mit 1 % SDS gekocht (schwarz) bzw. mit 1 % SDS und 30 mM EDTA gekocht wurden (rot) oder deren Puffer 30 mM EDTA zugesetzt wurde (hellblau). Der pH-Wert des Puffers betrug jeweils 8. **E:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für drei S75HL-Säulen des Magen Korpus Extrakts (M_C383). Der erste Extrakt wurde mit 1 % β -Mercaptoethanol (HS-EtOH) (schwarz) behandelt. Der zweite Extrakt wurde mit 1 % β -Mercaptoethanol gekocht und der Überstand aufgetragen (rot). Auf die dritte Säule wurde das verbliebene Pellet des zweiten Extraktes mit 1 % SDS gekocht und aufgetragen (hellblau). Der pH-Wert des Puffers betrug jeweils 6. **F:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für vier S75HL-Säulen des Magen Korpus Extrakts (M_C383). Extrakt 1 mit 30 mM EDTA gekocht und als Überstand (schwarz) bzw. Pellet mit 1 % SDS gekocht (rot) aufgetragen. Extrakt 2 ohne Zusätze gekocht und als Überstand (hellblau) bzw. Pellet mit 1 % SDS gekocht (grün) aufgetragen. Der pH-Wert des Puffers betrug jeweils 6. Als Orientierung sind jeweils die PAS-positiven Fraktionen der erstgenannten Größenausschlusschromatographie (schwarz) jedes Diagramms markiert worden. Die angegebenen Puffer wurden sowohl für die Extraktion als auch für die Größenausschlusschromatographie verwendet. SDS, EDTA und β -Mercaptoethanol wurden nur zum Extrakt zugegeben und waren nicht im Puffer für die Größenausschlusschromatographie enthalten.

Um zu überprüfen, in welcher Form TFF1 hauptsächlich vorliegt und um die Verhältnisse zwischen hochmolekularem TFF1 (mukusassoziiert) und niedermolekularem TFF1-Formen (Heterodimer mit GKN2, Homodimer, Monomer) zu bestimmen, wurden Größenausschlusschromatographien (S75HL; HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 pg Säule; S75HL) unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Unter anderem wurden Bedingungen für die Extraktion und Größenausschlusschromatographie gewählt, die den Sekretionsweg von den Sekretgranula über die extrazelluläre Zelloberfläche bis zum Magensaft simulieren sollten (Abb. 14C). Es wurde ebenfalls versucht durch Zugabe von Detergenzien, Kochen oder Zugabe von β -Mercaptoethanol das TFF1-Monomer zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 zusammengefasst. Die Auswertungen zeigen, dass nach Größenausschlusschromatographie nur etwa 10 % bis maximal 20 % des TFF1 in den hochmolekularen Fraktionen (PAS-positive Fraktionen) eluieren (Abb. 14A). Somit liegt TFF1 im Korpus nur wenig mukusassoziiert vor. Diese Beobachtung konnte ebenfalls mit Hilfe einer *Blue Native* Gelelektrophorese bestätigt werden (Anhang, Abb. 39). Das Ergebnis ist für alle durchgeführten Größenausschlusschromatographien, unabhängig von den Bedingungen, wie z. B. dem pH-Wert, zu beobachten. Es fällt ebenfalls auf, dass bei pH 6 der Anteil von mukusassoziiertem TFF1 etwas höher ist, als bei pH 7 oder pH 8 (Abb. 14A). Auch im Vergleich mit der Abb. 14B setzt sich dieser Trend fort, bei geringerem pH steigt der Anteil am mukusassoziiertem TFF1. Außerdem fällt auf, dass bei pH 4 das Hauptmaximum deutlich nach hinten verschoben ist, im Vergleich zu S75HL-Säulen bei pH 6 oder pH 8 (Abb. 14B). Bei der Größenausschlusschromatographie bei pH 3 ist diese Tendenz ebenfalls zu sehen (Abb. 14C). Bei allen S75HL-Säulen ohne Zugabe von Detergenzien bzw. Kochen und einem pH-Wert oberhalb von 5, ist TFF1 in allen Fraktionen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass TFF1 in verschiedenen Formen vorliegt bzw. mehrere verschiedene Bindungspartner hat. Dagegen sind in den zwei Chromatographien bei einem pH-Wert kleiner 5 (pH 4 und pH 3) die Peaks von hochmolekularem und niedermolekularem TFF1 klar getrennt. Dies deutet darauf hin, dass hier möglicherweise TFF1-Formen nicht mehr nachweisbar sind. Die Zugabe von CaCl_2 bzw. EDTA beeinflusst das Verhältnis von hochmolekularem TFF1 zu niedermolekularem TFF1 nicht wesentlich (Abb. 14D, Abb. 14E). Der Anteil an niedermolekularem TFF1 liegt weiterhin bei etwa 90%. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol ohne Kochen verändert zwar die Verteilung von TFF1 auf die einzelnen Fraktionen, konnte TFF1 aber auch nicht aus dem Mukus lösen. Kocht man allerdings die Extrakte, so lässt sich das Verhältnis fast vollständig auf die Seite der niedermolekularen Fraktionen verschieben (Abb. 14E, Abb. 14F). Dabei gibt es keine Unterschiede ob man die Extrakte mit 1 %

β -Mercaptoethanol bzw. 30 mM EDTA bzw. ohne Zugabe von Zusätzen kocht. TFF1 kann nach dem Kochen ausschließlich im niedermolekularen Bereich detektiert werden. Interessanterweise führt das Kochen mit 1 % SDS nicht zu diesem Ergebnis, dort lässt sich TFF1 auch weiterhin in den PAS-positiven Fraktionen detektieren, wenn auch mit einem geringen Anteil von unter 5 % am gesamten TFF1 (Abb. 14D). Außerdem ist hier weiterhin ein Peak (C3-C6) vor dem Hauptpeak zu sehen, der bei allen anderen gekochten Extrakten nicht zu sehen ist.

Die Analyse der einzelnen Fraktionen nach einer Trennung durch eine Größenausschlusschromatographie bzw. einem Anionenaustauscher wird in Kapitel 4.1.3 gezeigt. Dabei wurde, falls nicht anders angegeben, ein pH-Wert von 7 verwendet.

4.1.3 Analyse der verschiedenen Bindungspartner von TFF1 im Magen Korpus

4.1.3.1 Trennung verschiedener TFF1-Entitäten durch eine Größenausschlusschromatographie (S75HL)

Um das Gewebe möglichst schonend aufzuschließen, wurde eine schonende Extraktion (Mörser) unter Zugabe von flüssigem Stickstoff durchgeführt. Die gewonnene Probe wurde anschließend mit einer Größenausschlusschromatographie getrennt und die erhaltenen Fraktionen weiter analysiert.

Das TFF1-Profil nach einer Größenausschlusschromatographie einer Probe aus dem Magen Korpus zeigt drei verschiedene Peaks (Abb. 15B). In den PAS-positiven Fraktionen liegt der erste erkennbare Peak für TFF1 bei B8/B9. Der zweite Peak für TFF1 liegt in der Fraktion C7, hier ist ebenfalls das Maximum an Immunreaktivität für GKN2 nachweisbar. GKN2 ist, wie TFF1, zusätzlich im hochmolekularen Bereich nachweisbar. Die Hauptmenge an TFF1 lässt sich allerdings im niedermolekularen Bereich in den Fraktionen C12-D1 nachweisen. Als Vergleich wurde ebenfalls GKN1 ausgewertet, das Maximum hierfür liegt in den Fraktionen C9-C11. Im hochmolekularen, PAS-positiven Bereich konnten neben TFF1 auch FCGBP, MUC5AC und MUC6 (GSAII) nachgewiesen werden (Abb. 15C, Abb. 15D). Wobei alle Proteine ebenfalls ein Maximum in den Fraktionen B8/B9 zeigen. Die durchgeführten Westen Blots nach Agarosegelelektrophorese zeigen, dass nur die Banden von FCGBP mit denen von TFF1 übereinstimmen (Abb. 15D, Abb. 15E, Anhang Abb. 43B). Das Ergebnis spricht für ein TFF1-FCGBP-Heteromer.

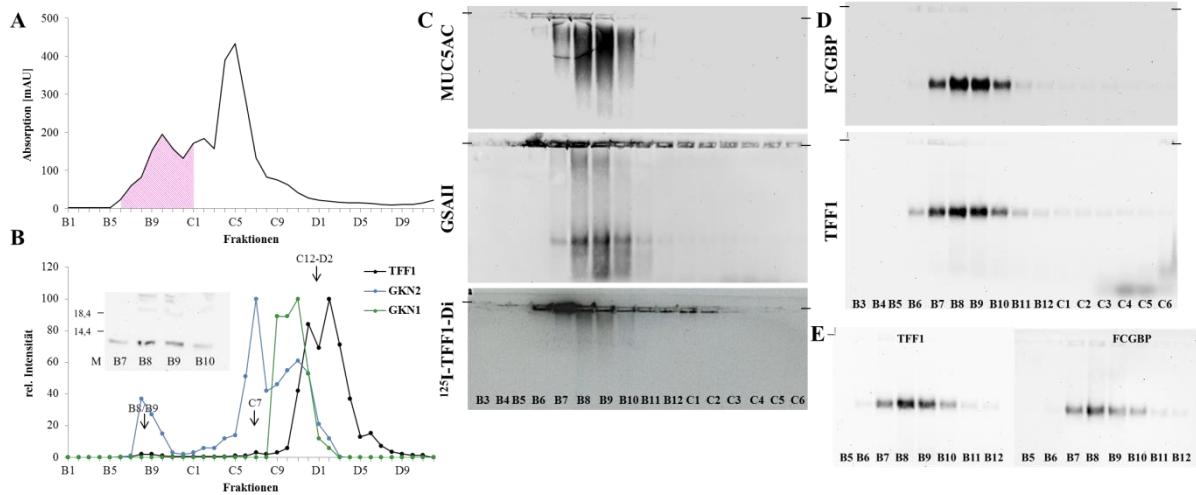


Abb. 15: Größenausschlusschromatographie nach einer schonenden Extraktion (Mörser) des Magen Korpus bei pH 7.

A: UV-Profil bei 280 nm der S75HL-Säule einer Magen Korpusprobe (M_c383). In Pink sind die PAS-positiven Fraktionen eingezeichnet. **B:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 (schwarz), GKN2 (blau) und GKN1 (grün) und Auftragung der relativen Intensitäten der jeweiligen charakteristischen Monomerbande. Ausschnitt einer 15 %igen reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 **C:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. MUC5AC und MUC6 (GSAII). 1 %ige AgGE und Western Blot mit anschließender Inkubation mit synthetischem ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). **D:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. FCGBP und TFF1. **E:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. FCGBP und TFF1 auf einem Agarosegel. Die Striche an den Agarosegeln markieren die Geltaschen.

Bei der GSAII positiven Bande mit dem niedrigerem Molekulargewicht handelt es sich nicht um eine TFF1-Form (vgl. Anhang Abb. 43C). Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Abbauprodukt von MUC6 oder ein anderes Glykoprotein mit einer α - oder β -GlcNAc-Struktur. Die Bindung von synthetischem TFF1 an die PAS-positiven Fraktionen führt zu einem vergleichbaren Muster auf dem Western Blot (nach AgGE) wie die Lektinfärbung mit GSAII (Abb. 15C). Dagegen bindet das synthetische TFF1-Homodimer nicht im Bereich von FCGBP. Dies spricht dafür, dass sich die Bindung von TFF1 an Muzine bzw. die Bindung von TFF1 an FCGBP unterscheiden. Der Anteil an Muzin bzw. FCGBP gebundenem TFF1 liegt dabei unter 5%.

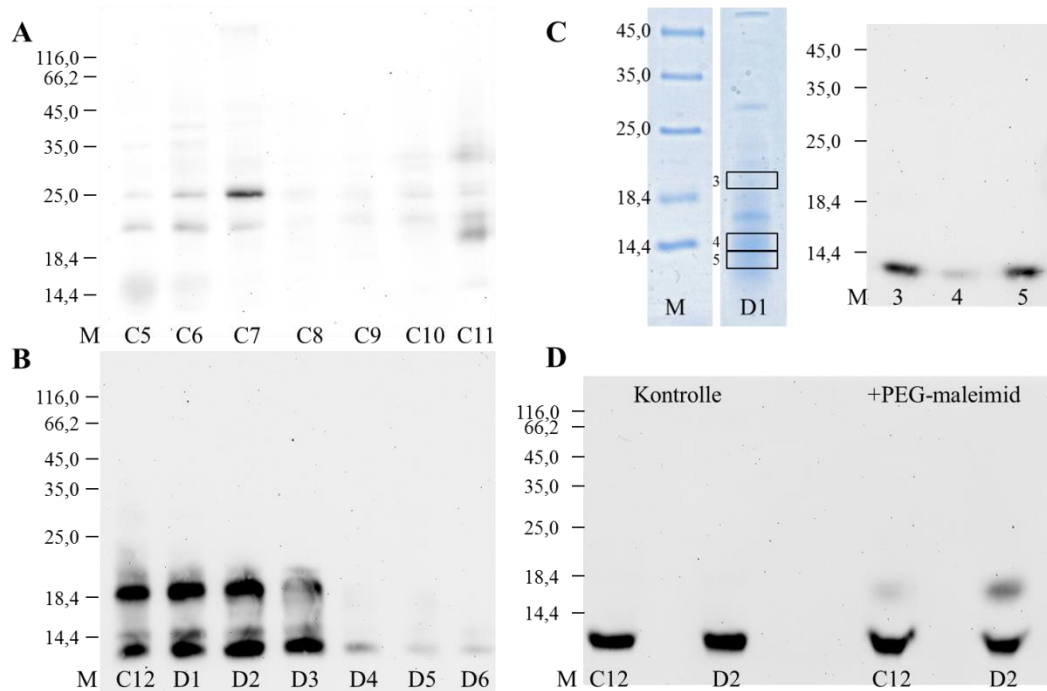


Abb. 16: Größenausschlusschromatographie nach einer schonenden Extraktion (Mörser) des Magen Korpus bei pH 7 (vgl. Abb. 15).

A: Western Blot bzgl. TFF1 einer nicht-reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE mit anschließender Reduktion auf der Membran. **B:** Western Blot bzgl. TFF1 einer nicht-reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE mit anschließender Reduktion im Gel. **C:** 15 %ige SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. 15 %ige reduzierende SDS-PAGE der eluierten Banden 3, 4 und 5 mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. **D:** 15 %ige SDS-PAGE der Proben C12 und D2 mit und ohne Zugabe von 1 mM PEG-maleimid (5 kDa). Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Betrachtet man die Profile von TFF1 und GKN2, so fällt auf, dass bei dem Hauptpeak von GKN2 (C7) ein weiterer Peak für TFF1 zu erkennen ist (Abb. 15B). Daran schließen die beiden TFF1-Maxima bei C12 und D2 an. Da diese Formen recht klein sind lassen sie sich mit Hilfe von nicht-reduzierenden SDS-Gelen weiter untersuchen (Abb. 16).

Die Analyse der niedermolekularen Fraktionen zeigt eine 25 kDa Bande für TFF1 in den Fraktionen C6/C7 (Abb. 16A). Da in der Fraktion C7 das Maximum an GKN2-Immunreaktivität nachweisbar ist, handelt es sich bei der 25 kDa Bande vermutlich um das TFF1-GKN2-Heteromer (Abb. 15B, Abb. 16A). In den Fraktionen C12-D3 (größte Immunreaktivität für TFF1, vgl. Abb. 15B) lassen sich zudem eine 18 kDa Bande, sowie eine Doppelbande bei 14 kDa bzw. <14 kDa für TFF1 nachweisen. Alle drei Banden (18 kDa, 14 kDa, <14kDa) konnten aus einem Coomassiegel eluiert und auf die für TFF1 typische Bande reduziert werden (Abb. 16C). Vermutlich handelt es sich hier um ein TFF1-Homodimer sowie zwei monomere TFF1-Formen. Das Verhältnis von TFF1-Homodimer zu dem kleinerem TFF1-Monomer entspricht in etwa 1:1. Aufgrund der ungeraden Anzahl an Cysteinen des TFF1 wurde überprüft, ob die Monomere freie Thiolgruppen enthalten. Dazu wurden die Fraktionen mit C12 und D2 mit PEG(5 kDa)-maleimid inkubiert und anschließend

unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Es konnte in beiden Fraktionen (C12 und D2) eine Verschiebung um 5 kDa beobachtet werden (Abb. 16D), wobei der Anteil an freien Thiolen in der Fraktion D2 größer war als in der Fraktion C12. Dies deutet darauf hin, dass es TFF1-Monomere mit einem freien Thiol oder einem reversibel oxidierten Thiol gibt.

4.1.3.2 Trennung der mukusassoziierten TFF1-Formen durch eine Größenausschlusschromatographie (S-500)

Um die Bindung von TFF1 an den Mukus weiter zu analysieren, wurden S-500-Läufe durchgeführt, um so MUC5AC von MUC6 zu trennen. Dazu wurden die Extrakte E0 und E1 einer Gewebeprobe aus dem Korpus nach der Extraktion mit 1 % Mercaptoethanol gekocht und anschließend auf eine S-500 Säule aufgetragen (Abb. 17). Die Fraktionen der S-500 vom Gesamtextrakt En wurden von Frau Franziska Heuer erhalten (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg).

Das UV-Profil der Größenausschlusschromatographie (S-500) für den Extrakt E1 nach dem Kochen mit 1 % β -Mercaptoethanol zeigt, dass ein Großteil der Proteine rausgelöst und zu niedermolekularen Fraktionen verschoben wurden (Abb. 17A). TFF1 wird ebenfalls aus dem hochmolekularen Bereich gelöst, wie die semiquantitative Auswertung der reduzierten TFF1-Bande für die mit 1 % Mercaptoethanol gekochten Extrakte E0 und E1 zeigt (Abb. 17B). Für den Extrakt En (ohne kochen) ist TFF1 dagegen im hochmolekularen Bereich nachweisbar (Abb. 17B). Betrachtet man das Agarosegel der S-500 Säule für diesen Extrakt En, so findet man in den vorderen Fraktionen sowohl das mukusassoziierte TFF1 (Fraktion B4-C4) als auch das TFF1-FCGBP-Heteromer (Fraktion B4-C12) (Abb. 17D). Diese TFF1-Formen wurden durch das Kochen der Extrakte E0 und E1 mit 1 % Mercaptoethanol herausgelöst.

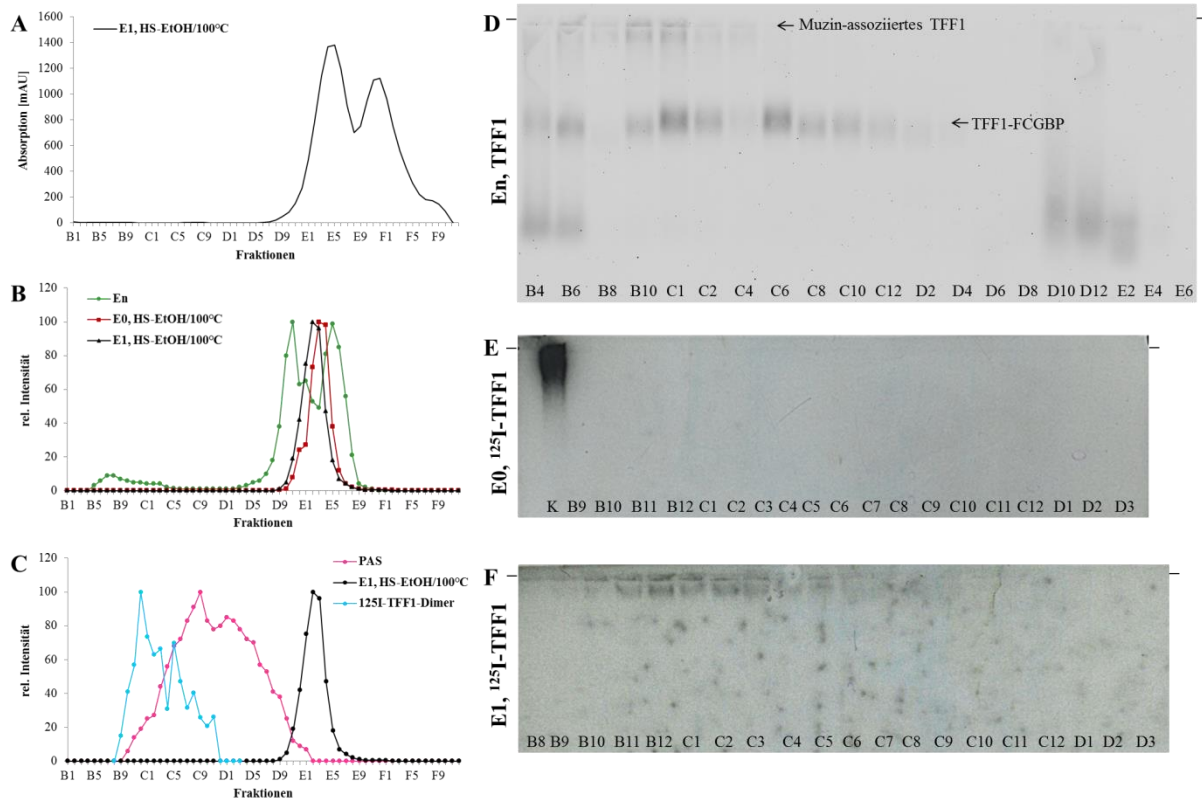


Abb. 17: Größenausschlusschromatographie (S-500) vom Magen Korpus nach der Extraktion bei pH 7.

A: UV-Profil bei 280 nm der S-500 einer Magen Korpusprobe (M_C577 , Extrakt E1) gekocht mit 1 % β -Mercaptoethanol. **B:** Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 dreier Größenausschlusschromatographien (S-500) einer Magen Korpusprobe (En von M_C406A und E0 bzw. E1 von M_C577). Die relativen Intensitäten von TFF1 sind für den Extrakt En (grün), Extrakt E0 mit 1 % β -Mercaptoethanol gekocht (rot) und den Extrakt E1 mit 1 % β -Mercaptoethanol gekocht (schwarz) aufgetragen. **C:** Semiquantitative Auswertung eines Dot-Blots der PAS-positiven Fraktionen der S-500-Säule des Magen Korpus Extraktes E1 (pink). Semiquantitative Auswertung des Western Blots bzgl. TFF1 nach einer reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE der S-500 eines Magen Korpus Extraktes E1 nach Kochen mit 1 % β -Mercaptoethanol (schwarz). Semiquantitative Auswertung der Signale (Autoradiographie) nach Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer der Fraktionen B8-D3 der S-500 des Extraktes E1 nach Kochen mit 1 % β -Mercaptoethanol (türkis). **D:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S-500 des Extraktes En. **E:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot sowie Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer der Fraktionen B9-D3 einer S-500 des Extraktes E0 nach Kochen mit 1 % β -Mercaptoethanol (Autoradiographie). Als Kontrolle (K) ist ein Extrakt E1 eines Magen Antrums (M_A534) aufgetragen. **F:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western-Blot sowie Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer der Fraktionen B8-D3 einer S-500 des Extraktes E1 nach Kochen mit 1 % β -Mercaptoethanol (Autoradiographie). Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

Die Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer dieser Extrakte (E0 und E1) zeigt eine Bindung des Homodimers an den Mukus für E1, nicht aber für E0 (Abb. 17E, Abb. 17F). Dies ist auf den geringen Gehalt an Muzinen, speziell MUC6 im Extrakt E0 zurückzuführen (vgl. Abb. 19). Das Signal für die Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer an den Mukus ist am stärksten in den Fraktionen B10-C5 mit einem Maximum bei B12 (Abb. 17F). Diese Fraktionen sind PAS-positiv, wobei das Maximum der PAS-positiven Fraktionen bei C9 liegt. Da eine positive PAS-Reaktion typisch für Muzine ist, bindet das TFF1-Homodimer vermutlich *in vitro* an eines der Muzine MUC6 bzw. MUC5AC (Abb. 17C). Die semiquantitative Auswertung von GSAII (MUC6) zeigt, dass das Maximum wie bei der Bindungsstudie mit ^{125}I -TFF1-Homodimer bei B12 liegt. Außerdem stimmen die relativen Intensitäten der Signale

des gebundenen TFF1 (Autoradiographie) mit der semiquantitativen Auswertung von GSAII (Western Blot nach AgGE) weitgehend überein. Dagegen eluiert MUC5AC später und ist in den Fraktionen C7-C11 nachweisbar (AgGE und Western Blot bzgl. GSAII und MUC5AC wurden von Frau Franziska Heuer durchgeführt) (Heuer et al. 2019). Dies deutet darauf hin, dass TFF1 an MUC6 bindet und nicht an MUC5AC. Das ^{125}I -TFF1-Monomer(ACM) ließ sich dagegen nicht an die Mukusfraktionen binden, weder für den Extrakt E0 noch den Extrakt E1 (nicht gezeigt, vgl. Abb. 27).

4.1.3.3 Trennung der verschiedenen TFF1-Entitäten über eine Anionenaustauschchromatographie (ResQ)

Es wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit den Extrakten E0, E1 und E3-E4 einer Magen Korpusprobe durchgeführt um möglicherweise eine Trennung von MUC6 und MUC5AC aufgrund eines unterschiedlichen isoelektrischen Punktes zu erreichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 gezeigt.

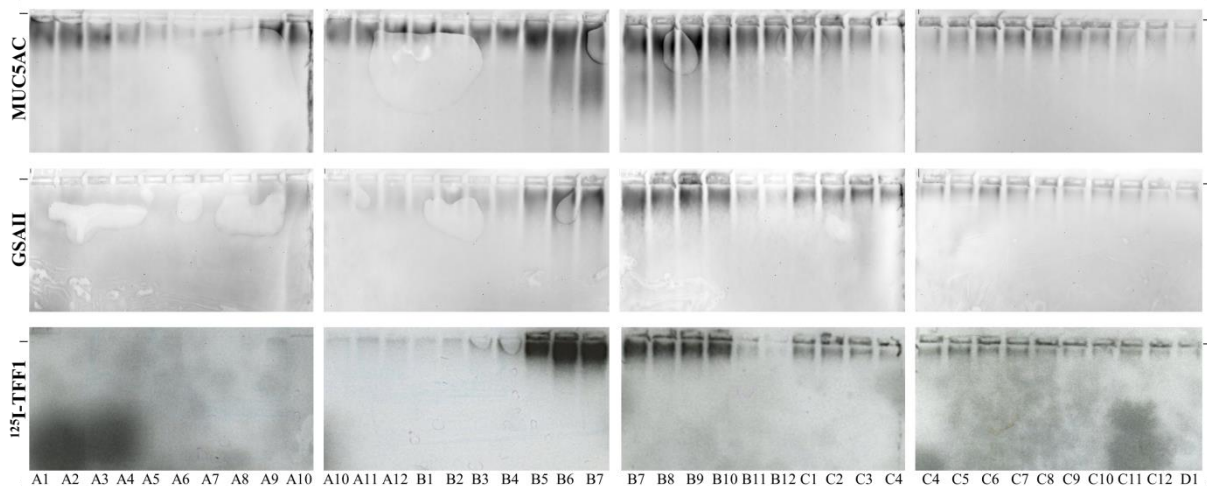


Abb. 18: Muzinprofile nach der Trennung über eine ResQ und Inkubation dieser Fraktionen mit ^{125}I -TFF1-Homodimer für den Extrakt E1 (Mc577).

1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. MUC5AC und Lektinfärbung für MUC6 (GSAII), sowie die Signale der Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

MUC5AC und GSAII weisen deutliche Unterschiede in den Elutionsprofilen der ResQ auf (Abb. 18). MUC5AC ist in allen Fraktionen der ResQ nachweisbar mit einem Peak in den Fraktionen A1-A4, sowie dem Maximum in den Fraktionen B5-C3. MUC6 eluiert dagegen erst in späteren Fraktionen, mit dem Maximum in den Fraktion B5-B10 und einem weiteren Peak bei C1-C4. Dieses Elutionsmuster von MUC6 ist vergleichbar mit dem Muster der Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer an diese Fraktionen. Die Autoradiographie zeigt die stärksten Signale für die Bindung in den Fraktionen B5-B10, sowie weitere positive Signale

in den Fraktionen ab C1. Die 1%igen Agarosegele mit anschließender Immunfärbung (MUC5AC) bzw. Lektinbindung (GSAIL) für die ResQ-Säulen von den Extrakten E0 und E3-E4 wurden ebenfalls ausgewertet und zeigen ein ähnliches Profil, sowohl für MUC5AC als auch MUC6, sowie für die Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer. MUC6 (GSAIL) ist in E0 jedoch ausschließlich in den Taschen nachweisbar. Für die Extrakte E0 und E3-E4 sind deshalb nur die Fraktionen B5-C1 (Maximum der Signale für die Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer) der Anionenaustauschchromatographien im Vergleich zum Extrakt E1 in Abb. 19 gezeigt.

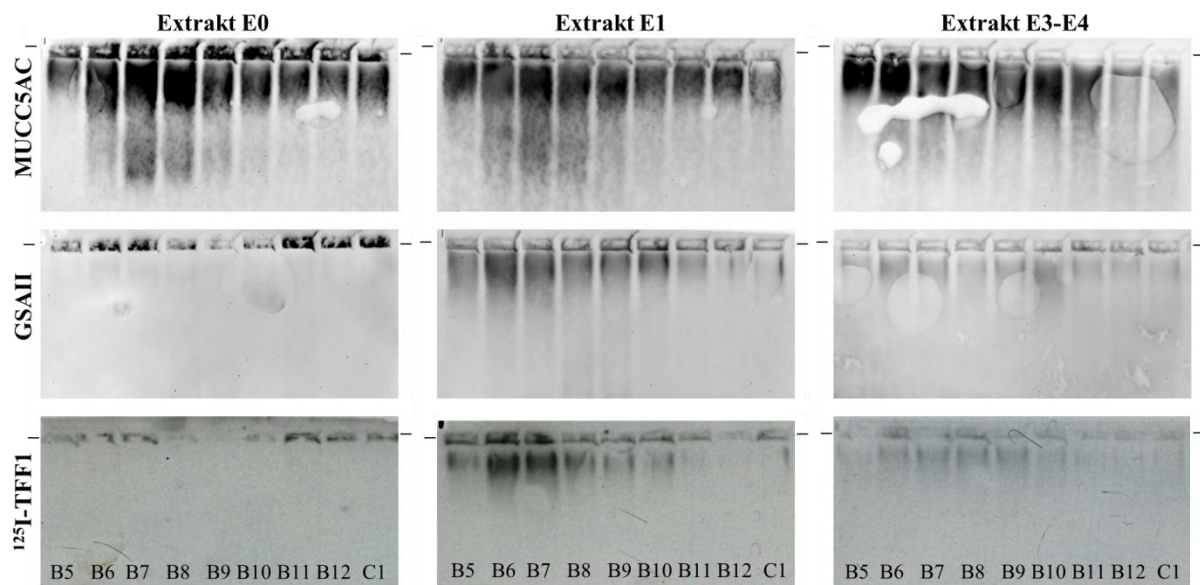


Abb. 19: Vergleich der Muzinprofile der Extrakte E0, E1, E3-E4 (M_{c577}) nach Trennung durch einen Anionenaustauscher ResQ.

1%ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. MUC5AC und Lektinbindung für MUC6 (GSAIL), sowie die Signale der Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

Im Extrakt E0 kann nahezu kein MUC6 (GSAIL) nachgewiesen werden, während MUC5AC gut detektierbar ist. Interessanterweise ist eine Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer hier auch nicht bzw. nur in geringem Maße in den Taschen möglich. Für den Extrakt E1 des Korpus ist MUC6 und MUC5AC nachweisbar. Trotzdem ist das Profil von gebundenem ^{125}I -TFF1-Homodimer dem vom MUC6 deutlich ähnlicher als dem vom MUC5AC. Für den Extrakt E3-E4 zeigte sich das gleiche Bild, die Profile von MUC6 und gebundenem ^{125}I -TFF1-Homodimer gleichen sich, wobei insgesamt die Intensitäten der Signale für MUC6 und gebundenem ^{125}I -TFF1-Homodimer gegenüber dem Extrakt E1 etwas abnimmt. Für MUC5AC sind dagegen die Immunfärbungen der Extrakte E0, E1 und E3-E4 in etwa gleich stark. Die gleichen Fraktionen wurden auch mit ^{125}I -TFF1-Monomer(ACM) inkubiert. Dabei konnte allerdings keinerlei Signal festgestellt werden (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 27).

Die Extrakte E0 und E3-E4, vor dem Auftragen auf die ResQ, zeigen im NR-Gel mit Western Blot bzgl. TFF1 vier verschiedene TFF1-Formen, das TFF1-GKN2-Heterodimer bei 25 kDa, das TFF1-Homodimer bei 18 kDa und zwei TFF1-Monomere bei 14 kDa bzw. <14 kDa (Abb. 20B). Das TFF1-GKN2-Heterodimer kann in diesem Extrakt E1 nicht nachgewiesen werden.

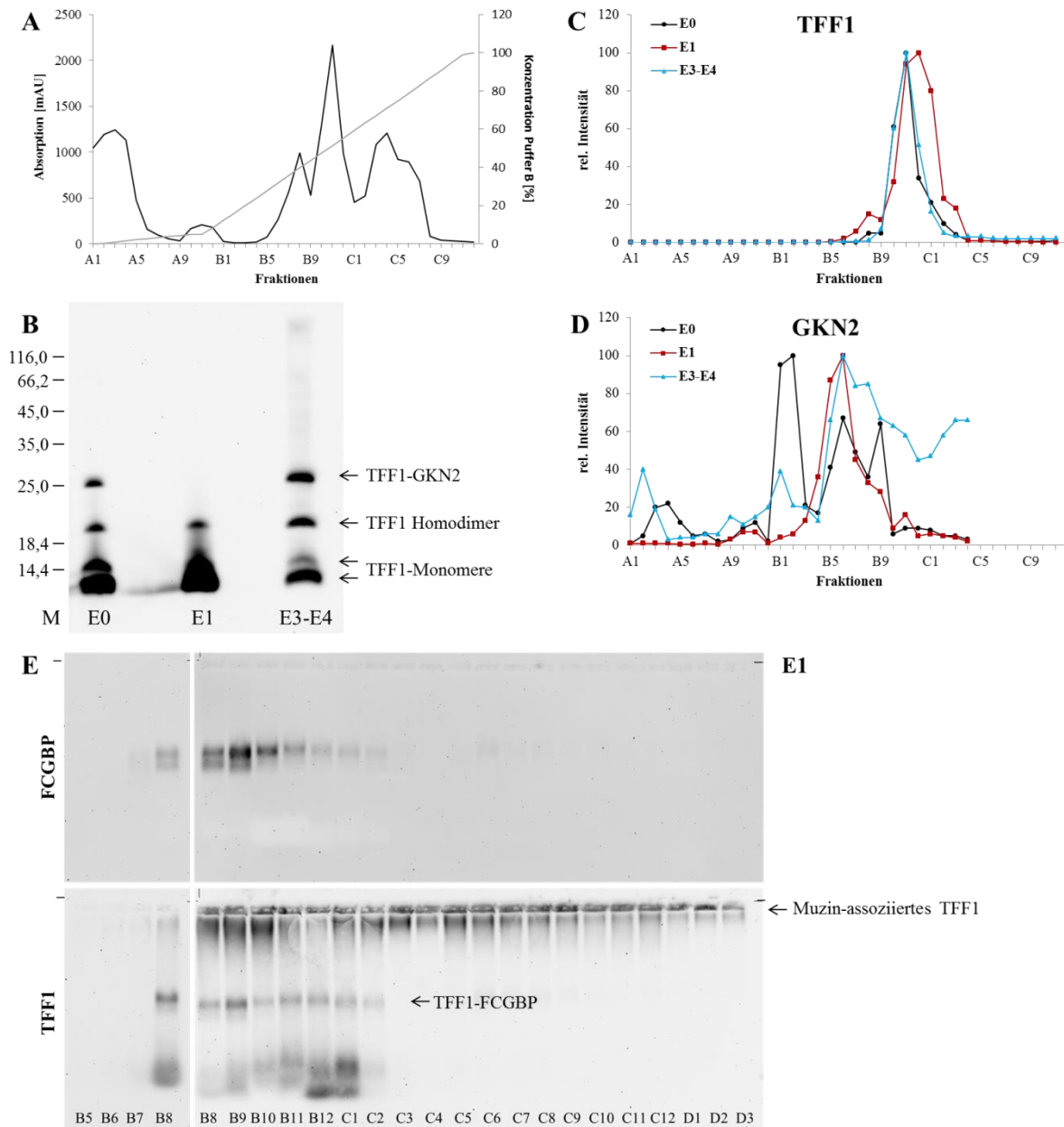


Abb. 20: Anionenaustauschchromatographie für die Extrakte E0, E1 und E3-E4 einer Korpusprobe (M_c577).
A: UV-Profil bei 280 nm der ResQ einer Magen Korpusprobe (M_c577). Eluiert wurde mit einem Salzgradienten (grau). Stellvertretend ist dies für Extrakt E1 gezeigt. **B:** Western Blot für TFF1 einer nicht-reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE der Extrakte (E0, E1, E3-E4) vor dem Auftragen auf die ResQ. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben. **C:** Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließenden Western Blots bzgl. TFF1 der ResQ-Säulen von E0 (schwarz), E1 (rot) und E3-E4 (hellblau). **D:** Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließenden Western Blots für GKN2 der ResQ-Säulen von E0 (schwarz), E1 (rot) und E3-E4 (hellblau). **E:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot für TFF1 und FCGBP von den Fraktionen B5-D3 des Extraktes E1. Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

TFF1 eluiert in den gleichen Fraktionen mit einem Maximum zwischen B8 und C3 bei allen drei ResQ-Säulen der Extrakte E0, E1 und E3-E4 (Abb. 20C). TFF1 ist nur wenig mit GKN2 assoziiert, wie der Vergleich der Elutionsprofile von TFF1 mit den Elutionsprofilen von GKN2 zeigt (Abb. 20C, Abb. 20D). GKN2 eluiert in der ResQ-Säule von E0 mit einem Maximum in den Fraktionen B1 und B2 und mit kleineren Peaks bei B6 bzw. B9. Die Elutionsprofile für GKN2 der ResQ-Säulen von E1 und E3-E4 zeigen ein Maximum bei B6 (Abb. 20D). TFF1 eluiert zusammen mit FCGBP von der ResQ (E1), was auf ein TFF1-FCGBP-Heteromer hinweist (Abb. 20E). Dies wurde ebenfalls für den Extrakt E0 nachgewiesen (Anhang, Abb. 44). Für den Extrakt E1 konnte eine Assoziation an ein hochmolekulares Protein, vermutlich ein Muzin nachgewiesen werden (Abb. 20E). Allerdings unterscheiden sich die Profile des Western Blots für TFF1 und die Signale der Bindungsstudie mit ^{125}I -TFF1-Homodimer voneinander (ResQ-Säule von E1). Die Bindungsstudie mit ^{125}I -TFF1-Homodimer zeigt starke Signale in den Fraktionen B5-B7, während TFF1 auf dem Western Blot nach AgGE in diesen Fraktionen nicht bzw. fast nicht nachweisbar ist (Abb. 18, Abb. 20).

4.1.3.4 TRIzol[®]-Extraktionen und Untersuchung des TFF1-GKN2-Heterodimers

Das TFF1-GKN2-Heterodimer lässt sich nur schwer extrahieren und nachweisen, da es z. T. schwer löslich ist und nur in Gegenwart von SDS gelöst werden kann (vgl. Extrakte von E3-E4; Abb. 12A, Abb. 12B, Abb. 20B). Aus diesem Grund wurde eine TRIzol[®]-Extraktion, die zusätzlich Enzyme durch Denaturierung inhibiert, durchgeführt. Das Pellet nach TRIzol[®]-Extraktion wurde bei 50 °C in 1 % SDS gelöst und dann auf eine S75HL Säule aufgetragen. Die Ergebnisse für eine ausgewählte TRIzol[®]-Extraktion mit anschließender Trennung der Proteine über eine Größenausschlusschromatographie (S75HL) sind in Abb. 21 gezeigt.

Im TFF1-Profil (Abb. 21B) der Größenausschlusschromatographie nach TRIzol[®]-Extraktion zeigt sich ein Unterschied zu den Profilen nach schonender Extraktion (Mörser) bzw. herkömmlichen Extraktionen (Abb. 15B, Abb. 14B). Der charakteristische TFF1-Peak in den Fraktionen B7-B9, in dem mukusassoziiertes TFF1 und das TFF1-FCGBP-Heteromer zu finden sind, fehlt fast völlig.

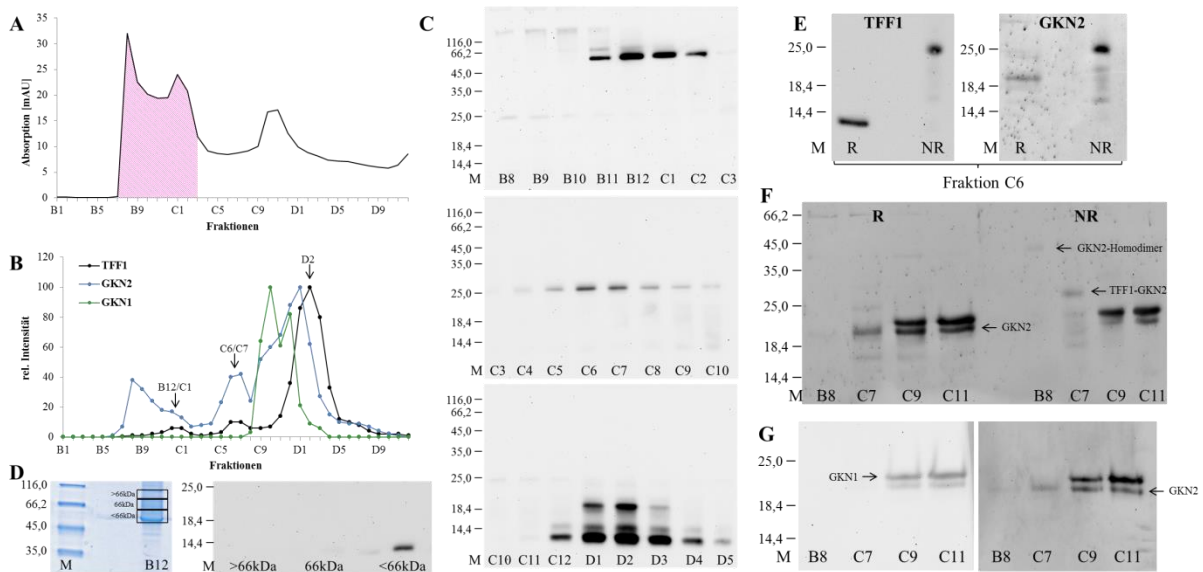


Abb. 21: TRIZol[®]-Extraktion einer Magen Korpusprobe und anschließender Größenausschlusschromatographie (S75HL).

A: UV-Profil bei 280 nm der S75HL nach TRIZol[®]-Extraktion einer Magen Korpus (M_{c577}) Extrakts. Die PAS-positiven Fraktionen sind in Pink schraffiert. **B:** Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließenden Western Blots für TFF1 (schwarz), GKN2 (blau) und GKN1 (grün). **C:** Nicht-reduzierende 15 %ige SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. **D:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung der Fraktion B12. Die markierten Banden (>66 kDa, 66 kDa, <66 kDa) wurden eluiert und auf eine reduzierende 15 %ige-SDS-PAGE aufgetragen, mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. **E:** 15 %ige SDS-PAGE der Fraktion C6 (R: reduzierend, NR: nicht-reduzierend) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 und GKN2. **F:** Reduzierende und nicht-reduzierende 15 %ige SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. GKN2. **G:** Reduzierende 15 %ige SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. GKN1 und GKN2. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Western Blots nach einer Agarosegelelektrophorese für FCGBP zeigen, dass das TFF1-FCGBP-Heteromer fehlt (Anhang, Abb. 47A). Die Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer ist ebenfalls schwächer (Anhang, Abb. 47B), als bei vergleichbaren Proben, die nicht mit TRIZol[®] behandelt wurden. Vermutlich lassen sich die hochmolekularen Proteine durch die Denaturierung mit TRIZol[®] und die damit verbundene Isopropanol-Fällung nicht mehr vollständig lösen. Interessanterweise erscheint nun im TFF1-Profil ein Peak für die Fraktionen B12/C1 (Abb. 21B). In diesen Fraktionen kann eine neue TFF1-Entität bei <66 kDa auf einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 21C). Diese TFF1-Entität lässt sich aus dem Coomassiegel eluieren und reduzieren, was für ein weiteres Disulfid-verknüpftes TFF1-Heteromer spricht (Abb. 21D). Der zweite Peak liegt erneut bei C6/C7 und weist eine, für das TFF1-GKN2-Heteromer typische, 25 kDa Bande auf. Die 25 kDa Bande kann sowohl über eine Immunfärbung mit TFF1-Antiserum, als auch mit GKN2-Antiserum eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 21C, Abb. 21E). Das Maximum im TFF1-Profil liegt für diese Größenausschlusschromatographie bei D2 (Abb. 21B). Die Fraktionen D1-D3 enthalten drei TFF1-Formen, das TFF1-Homodimer (18 kDa) und zwei monomere TFF1-Formen (14 kDa, <14 kDa). Das GKN2-Profil weist ebenfalls drei Peaks (B8, C6/C7, D1) auf (Abb. 21B). Die

GKN2-Form in Fraktion B8 ist vermutlich ein GKN2-Homodimer (~40 kDa) (Abb. 21F). Der zweite Peak (C6/C7) enthält, wie für TFF1 gezeigt, das TFF1-GKN2-Heteromer (Abb. 21E, Abb. 21F). Das Maximum der Immunreaktivität für GKN2 (Fraktion C9-D2) weist ein GKN2-Monomer auf. Diese Fraktionen enthalten auch GKN1 mit einem Maximum bei C10-C12 (Abb. 21B). Die reduzierenden SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. GKN1 bzw. GKN2 zeigen eine Doppelbande für beide Gastrokeine (Abb. 21G). Dies lässt auf eine Kreuzreaktivität der GKN-Antikörper schließen. In Fraktion B8 und C7 kann nur die untere Bande nachgewiesen werden und auch nur mit dem Antiserum für GKN2. Daher kann die untere Bande eindeutig GKN2 zugewiesen werden, die obere Bande entsprechend GKN1 (Abb. 21G).

Es wurde ebenfalls eine Anionenaustauschchromatographie nach TRIzol[®]-Extraktion durchgeführt um die verschiedenen Entitäten von TFF1 zu trennen. Einige (<66 kDa, 14 kDa und <14 kDa) dieser Entitäten wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Univ.-Prof. Dr. Hartmut Schlüter (Massenspektrometrische Proteomanalytik, Inst. für Klinische Chemie & Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) massenspektrometrisch analysiert (Abb. 22).

Die Trennung eines TRIzol[®]-Extraktes einer Korpusprobe durch einen Anionenaustauscher (ResQ) zeigt nur eine geringe Assoziation von TFF1 an GKN2 (Fraktion B12 Abb. 22A). Das Profil von TFF1 (Maximum bei C6/C7) zeigt nur geringe Überschneidungen mit den Profilen von GKN2 (Maximum bei B11/B12) und GKN1 (Maximum bei B11). In den Fraktionen B11/B12 kann das TFF1-GKN2-Heterodimer (25 kDa) nachgewiesen werden (Abb. 22B, Abb. 22D). Nach Western Blot bzgl. GKN2 einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE sogar bis Fraktion C3 (Abb. 22D). In den Fraktionen B10-C3 lässt sich außerdem das GKN2-Monomer nachweisen, sowie ebenfalls eine <66 kDa Bande (Abb. 22D, Pfeil). Diese Bande kann nach Elution allerdings nicht reduziert werden und ist unspezifisch (Daten nicht gezeigt).

In den Fraktionen C3-C5 ist eine <66 kDa Bande detektierbar (Bande 1), sowie die monomeren TFF1-Formen bei 14 kDa (Bande 2) und <14 kDa (Bande 3) in den Fraktionen C4-C10 (Abb. 22C). Diese Banden (Bande 1-3) wurden aus einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. In allen drei Banden konnten Fragmente von TFF1 identifiziert werden. In den Fraktionen C6/C7 ist vermutlich auch das TFF1-Homodimer (18 kDa) nachweisbar. Aufgrund der geringen Menge wurde diese Bande aber nicht analysiert.

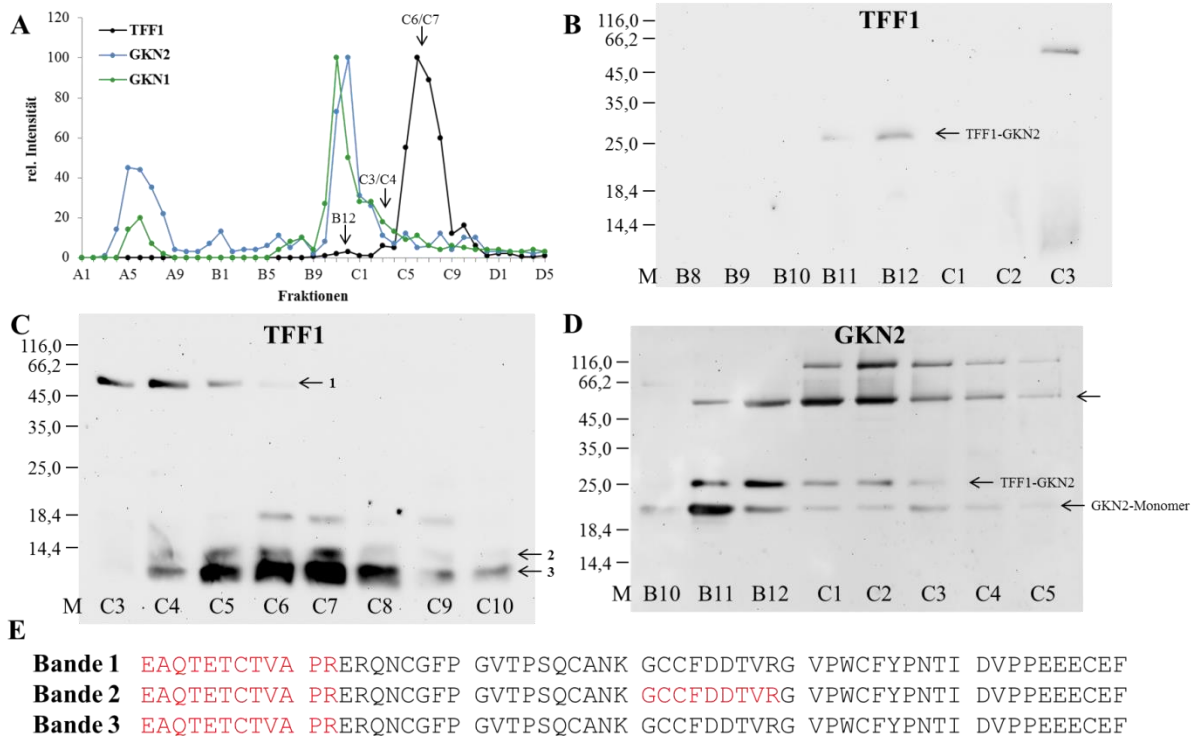


Abb. 22: TRIzol[®]-Extraktion einer Magen Korpusprobe (M_{C577}) mit anschließender Anionenaustauschchromatographie (ResQ).

A: Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließenden Western Blots für TFF1 (schwarz), GKN2 (blau) und GKN1 (grün) der ResQ-Säule nach TRIzol[®]-Extraktion. **B:** 15 %ige nicht reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der Fraktionen B8-C3 **C:** 15 %ige nicht reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der Fraktionen C3-C10. **D:** 15 %ige nicht reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. GKN2 der Fraktionen B10-C5. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben. **E:** Massenspektrometrische Analyse der eluierten Banden aus einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der vereinigten Fraktionen C3/C4 (Bande 1) und C6/C7 (Bande 2, Bande 3). In Rot sind die, nach einem tryptischen Verdau, gefundenen TFF1-Fragmente markiert.

GKN2 ist in erheblicher Menge nach Größenausschlusschromatographien auch in den PAS-positiven Fraktionen zu finden (Abb. 21B). Da diese Fraktionen nach einer TRIzol[®]-Extraktion relativ schwer löslich sind wurde eine mehrstufige Extraktion (E0, E1, E3-E4) und anschließend jeweils eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abb. 23)

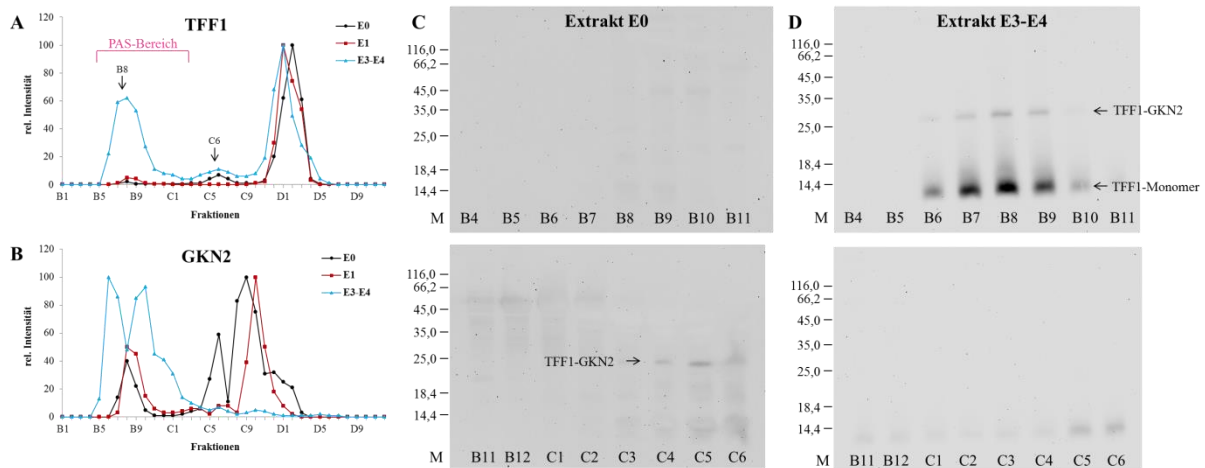


Abb. 23: Größenausschlusschromatographien (S75HL) der Extrakte E0, E1 und E3-E4 einer Magen Korpusprobe (M_c577).

A: Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S75HL-Säulen von E0 (schwarz), E1 (rot) und E3-E4 (hellblau). Es ist der PAS-Bereich vom Extrakt E3-E4 gekennzeichnet. **B:** Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blots bzgl. GKN2 der S75HL-Säulen von E0 (schwarz), E1 (rot) und E3-E4 (hellblau). **C:** 15 %ige nicht reduzierende SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S75HL von E0. **D:** 15 %ige nicht reduzierende SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S75HL von E3-E4. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Die TFF1-Profile der Größenausschlusschromatographien (S75HL) zeigen vor allem Unterschiede für die Extrakte E0, E1 und E3-E4 in den hochmolekularen Fraktionen (PAS-positiv) und dem Bereich um C6 der, wie bereits in Abb. 16A, Abb. 21C, Abb. 21E gezeigt, das TFF1-GKN2-Heteromer enthält (Abb. 23A). Der Extrakt E0 zeigt sowohl im TFF1-Profil, als auch im GKN2-Profil einen Peak in den Fraktionen (C5/C6). In diesen Fraktionen (C5/C6) lässt sich das TFF1-GKN2-Heterodimer (25 kDa) für E0 auf dem Western Blot bzgl. TFF1 entsprechend nachweisen (Abb. 23C). Beim Extrakt E3-E4 eluiert ein großer Teil von TFF1 und GKN2 in den PAS-positiven Fraktionen (Abb. 23A Abb. 23B). In diesen Fraktionen kann das TFF1-GKN2-Heterodimer detektiert werden, sowie ein TFF1-Monomer. Dies spricht dafür, dass das TFF1-GKN2-Heterodimer möglicherweise auch an den Mukus bindet. In den Fraktionen C5/C6 kann das TFF1-GKN2-Heterodimer dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 23D). Zum Vergleich sind die Profile (TFF1, GKN2) vom Extrakt E1 aufgetragen, aber wie in Abb. 20B bereits gezeigt, kann in diesem Extrakt kein bzw. nur extrem wenig TFF1-GKN2-Heterodimer nachgewiesen werden.

4.1.3.5 Experimente zur Untersuchung des TFF1-Homodimers und der Monomere von TFF1

Zur weiteren Untersuchung des TFF1-Homodimers und der TFF1-Monomere wurden vergleichende SDS-PAGEs mit synthetischem TFF1-Monomer(ACM) und TFF1-Homodimer (synthetisiert und erhalten von Nayara Braga Emidio, Institute for Molecular Bioscience,

University of Queensland, Australien; (Braga Emidio et al. 2020)), sowie verschiedene Experimente mit PEG-maleimid (siehe Kap. 3.3.11) und Dimedon (DCP-Bio1, siehe Kap. 3.3.12) durchgeführt (Abb. 24). Maleimid bindet dabei spezifisch nicht-oxidierte Thiole und Dimedon spezifisch an Sulfensäuren.

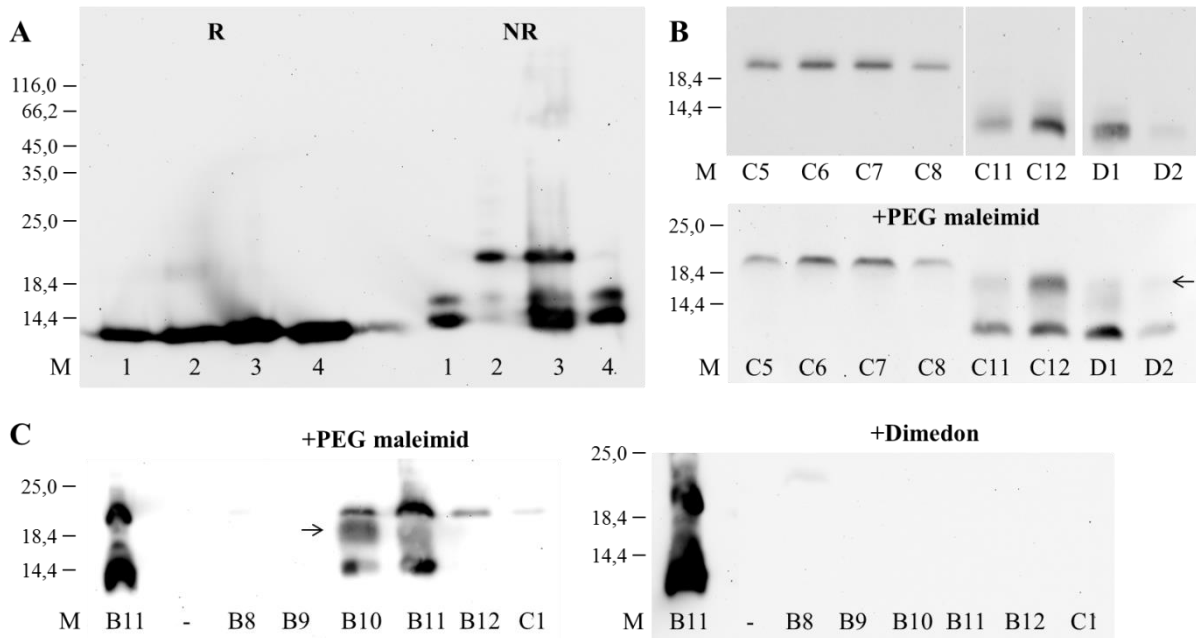


Abb. 24: Analyse des TFF1-Homodimers und der TFF1-Monomere im Magen Korpus.

A: 15 %ige SDS-PAGE (R: reduzierend, NR: nicht-reduzierend) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 von chromatographisch gereinigten Fraktionen mit synthetischem TFF1-Monomer und TFF1-Homodimer. 1: synthetisches TFF1-Monomer, 2: synthetisches TFF1-Homodimer, 3: Fraktion B11 (Hauptfraktion) einer Anionenaustauschchromatographie ResQ (pH 7) eines Extraktes E0 (Abb. 20), 4: Fraktion D1 (Hauptfraktion) einer Größenausschlusschromatographie S75HL (pH 7) nach TRIzol[®]-Extraktion (M_{C577} , vergleichbar mit Abb. 21) **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der zuvor mit bzw. ohne 1 mM PEG-maleimid (5 kDa) üN inkubierten Fraktionen C5-D2. Gezeigt sind die Fraktionen C5-D2 einer Größenausschlusschromatographie S75HL (pH 8). Zuvor wurden die vereinigten Fraktionen C5-C8 (Hauptfraktionen) einer Anionenaustauschchromatographie ResQ (pH 6) von einem Gesamtextrakt En (M_{C390}) auf die S75HL aufgetragen. Der Pfeil markiert die Verschiebung des TFF1-Monomers durch die Reaktion mit PEG-maleimid. **C:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 (PEG-maleimid) bzw. Streptavidin (DCP-Bio1) der zuvor mit 1 mM PEG-maleimid (5 kDa) bzw. 1 mM DCP-Bio1/Dimedon üN inkubierten Fraktionen B8-C1. Als Vergleich dient die Fraktion B11 ohne Behandlung mit PEG-maleimid bzw. DCP-Bio1 (nicht-reduzierende 15 %ige SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1). Gezeigt sind die Fraktionen B8-C1 einer Anionenaustauschchromatographie ResQ (pH 7) eines Extraktes E0 (Abb. 20). Der Pfeil markiert die Verschiebung des TFF1 durch die Reaktion mit PEG-maleimid.

Der Vergleich zwischen dem synthetischen TFF1-Homodimer (Abb. 24A) und den gereinigten Fraktionen zeigt, dass es sich bei der Bande bei ~18 kDa um ein Homodimer handelt. Das gereinigte TFF1-Homodimer reagiert zudem nicht mit PEG-maleimid (Abb. 22B). Dies lässt auf eine kovalente Verknüpfung des TFF1-Homodimers über ein Disulfid am C-Terminus (Cys-58) schließen. Die monomere Doppelbande reagiert dagegen mit PEG-maleimid (Abb. 24B, Abb. 24C). Dies zeigt, dass ein freies Thiol an Cys-58 verfügbar ist. TFF1 reagiert nicht mit Dimedon (DCP-Bio1), was darauf schließen lässt, dass keine Sulfensäuren vorliegen (Abb. 24C). Interessanterweise erscheint auch das synthetische TFF1-Monomer als Doppelbande (14 kDa, <14 kDa), obwohl das siebte Cystein (Cys-58) durch

eine Acetamidomethylgruppe (ACM) geschützt ist und so keine Oxidation möglich ist, die das Laufverhalten in der SDS-PAGE beeinflussen würde (Abb. 24A) (Braga Emidio et al. 2020).

4.1.4 Vergleich zwischen Magen Korpus und Magen Antrum

Da sich Korpus und Antrum in der Biosynthese von Proteinen und Peptiden unterscheiden und *Tff1*^{KO}-Mäuse Tumore nur im Antrum bilden liegt der Verdacht nahe, dass sich das Antrum vom Korpus auch im Vorkommen der TFF1-Entitäten unterscheidet (Lefebvre et al. 1996). Deshalb wurden verschiedene Korpus und Antrum Extrakte miteinander verglichen (Abb. 25).

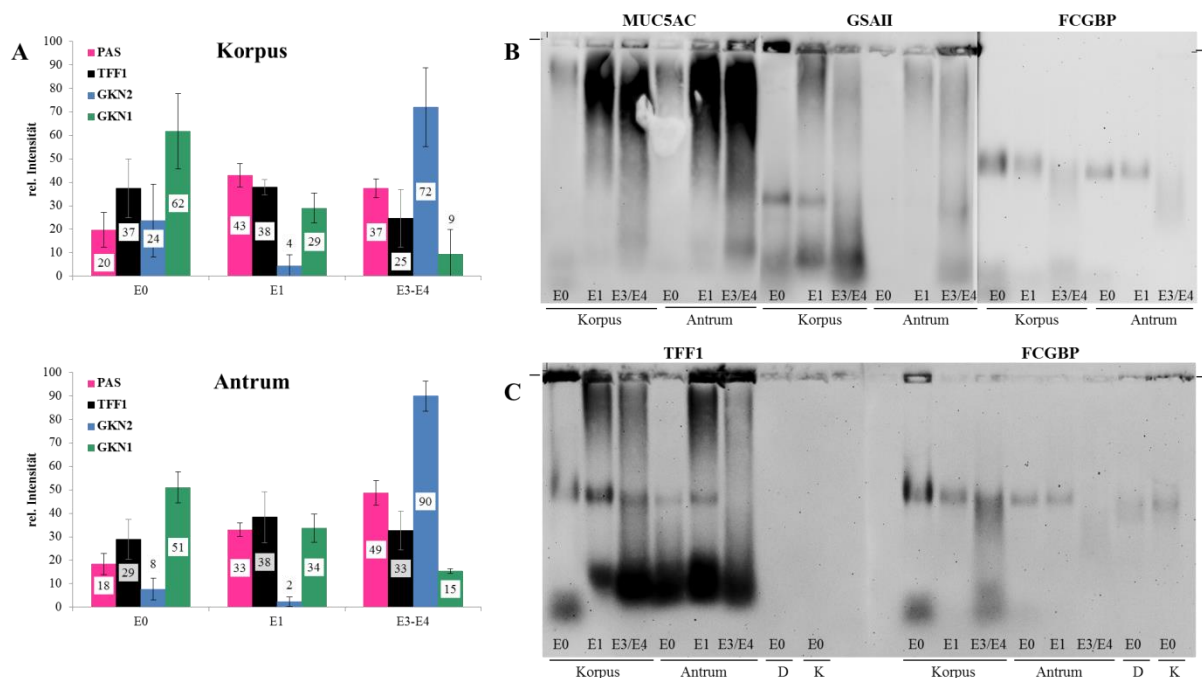


Abb. 25: Vergleich zwischen Magen Korpus und Magen Antrum.

A: Analyse der mehrstufigen Extraktion (E0, E1, E3-E4) von drei Korpus- (M_C383 , M_C687 , M_C688) bzw. drei Antrumproben (M_A250 , M_A679 , M_A690). Semiquantitative Auswertung der Western Blots bzgl. TFF1 (schwarz), GKN2 (blau) und GKN1 (grün) nach einer reduzierenden 15 %igen SDS-PAGE. Die relative Intensität des Muzins wurde über eine PAS-Reaktion durch einen Dot-Blot bestimmt (pink). **B:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot für MUC5AC und FCGBP, sowie Lektinbindung (GSAII) als Nachweis für MUC6 (Korpus: M_C383 , Antrum: M_A690). **C:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot für TFF1 und FCGBP. Als Kontrolle wurden eine Probe (jeweils E0) des Duodenums (D; D680) und des Kolons (K; K681) aufgetragen. Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

Die prozentuale Verteilung von Muzinen (PAS-positiv), TFF1, GKN2 und GKN1 auf die einzelnen Extraktionsschritte (E0, E1, E3-E4) unterscheidet sich nur wenig zwischen Korpus und Antrum (Abb. 25A). Muzine (PAS-positiv) sind generell weniger in dem Extrakt E0 zu finden (ca. 20 %). TFF1 verteilt sich dagegen relativ gleichmäßig auf die drei Extrakte. In E1 ist sowohl im Korpus als auch im Antrum das meiste TFF1 nachzuweisen. Im Korpus ist

dagegen mehr TFF1 im Extrakt E0 zu detektieren, im Antrum mehr TFF1 im schwer löslichen Extrakt E3-E4. GKN2 ist fast ausschließlich im Extrakt E3-E4 zu finden (>70 %), im Antrum sogar zu 90 %. Im Extrakt E1 kann GKN2 fast gar nicht (<5 %) nachweisen werden. GKN1 ist hauptsächlich im Extrakt E0 zu detektieren (>50 %), dagegen kaum im Extrakt E3-E4.

Das Signal für MUC5AC ist für den Extrakt E0 schwächer im Vergleich zu den Extrakten E1 und E3-E4. Die Bindung des Lektins GSII an den Extrakt E0 ist nur auf die Geltaschen beschränkt, während GSII in E1 und E3-E4 auch unterhalb der Geltaschen bindet (Abb. 25B). Ein ähnliches Muster wie bei GSII zeigt sich auch für den Western Blot bzgl. TFF1 nach AgGE. Dort ist TFF1 in E0 ebenfalls in der Geltasche nachweisbar, während es in den Extrakten E1 und E3-E4 auch knapp unterhalb der Geltaschen zu finden ist. Dies lässt auf eine Assoziation von TFF1 mit MUC6 (GSII) schließen. Außerdem lässt sich in allen Extrakten das TFF1-FCGBP-Heteromer nachweisen. Dabei ist im Korpus für E3-E4 auf dem Western Blot bzgl. FCGBP die Bande breiter als in den Extrakten E0 und E1. Im Antrum ist FCGBP im Extrakt E3-E4 fast gar nicht nachzuweisen (Abb. 25C).

Die Analyse der Bindung vom ^{125}I -TFF1-Homodimer an den Mukus zeigt, dass ein sinkender pH-Wert die Bindung des ^{125}I -TFF1-Homodimers hemmt (Abb. 26A). pH 2 verringert die TFF1-Homodimer Bindung um 65 % im Korpus und um 55 % im Antrum, verglichen mit der Bindung bei pH 7. Die Änderung der Ca^{2+} -Konzentration im Bindungspuffer hat dagegen nahezu keinen Effekt auf die Bindung des ^{125}I -TFF1-Homodimers an die Muzine. Die Zugabe von 30 mM EDTA zum Bindungspuffer inhibiert die Bindung des ^{125}I -TFF1-Homodimers an die Muzine allerdings nahezu komplett im Antrum, im Korpus sogar vollständig (Abb. 26B). Die getesteten Monosaccharide zeigen ebenfalls eine Inhibition der Bindung des ^{125}I -TFF1-Homodimers an Muzine, wenn auch geringer als EDTA. Den größten Effekt auf die Bindung hat β -Methylgalaktosid, bei dem die TFF1 Bindung, verglichen mit der Kontrolle, um fast 70 % abnimmt (Abb. 26D). Für die Bindung des ^{125}I -TFF1-Homodimer an Muzine reicht *in vitro* ein Monosaccharid nicht aus, dies zeigt der Versuch mit den an eine Nitrocellulosemembran fixierten PAP-HSA-Konjugaten (Abb. 26C).

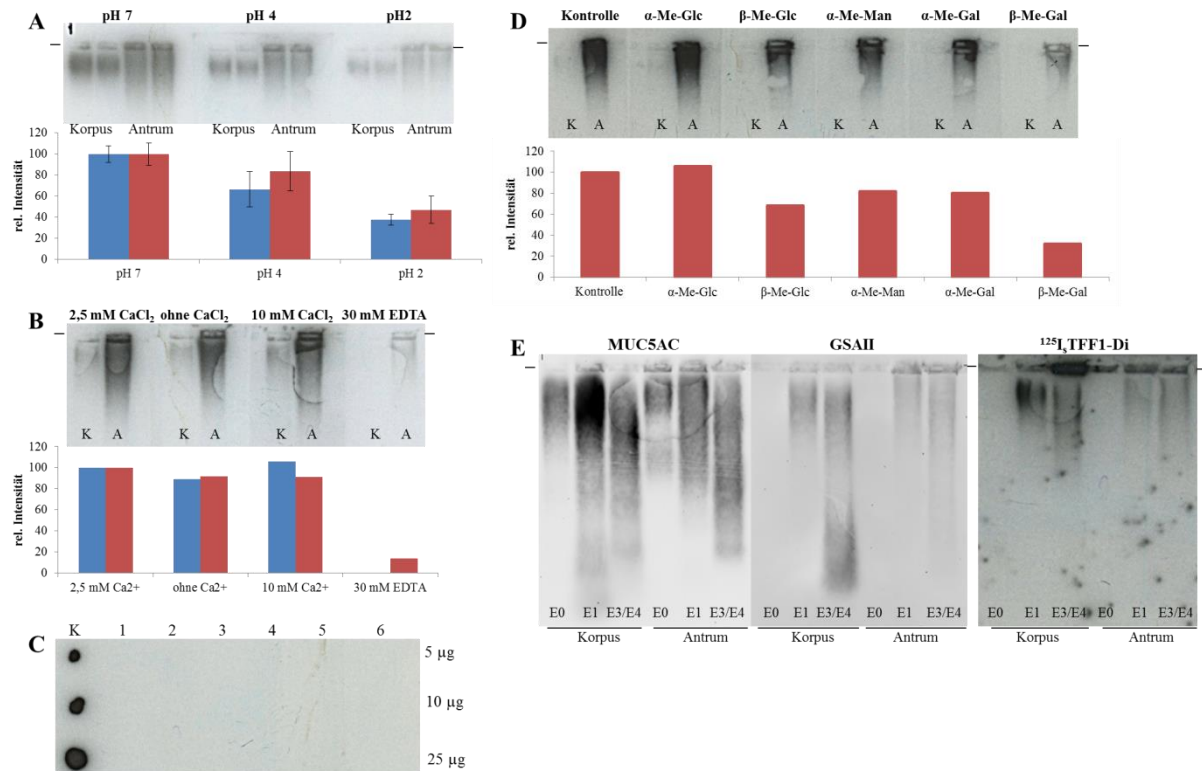


Abb. 26: Vergleich von TFF1 in Magen Korpus und Magen Antrum und Analyse der Bindung an den Mukus.

A: 1 %ige AgGE der Extrakte E1 von Korpus (M_C560) und Antrum (M_A534) mit anschließendem Western Blot. Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 7, pH 4, pH 2) des Bindungspuffers. Gezeigt sind die Signale der Bindung (Autoradiographie) und die semiquantitative Auswertung der Signale (Korpus blau, Antrum rot). **B:** 1 %ige AgGE der Extrakte E1 von Korpus (M_C540) und Antrum (M_A534) mit anschließendem Western Blot. Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer bei unterschiedlichen Ca^{2+} Konzentration bzw. mit EDTA (2,5 mM Ca^{2+} , ohne zusätzliches Ca^{2+} , 10 mM Ca^{2+} , 30 mM EDTA) im Bindungspuffer. Gezeigt sind die Signale der Bindung (Autoradiographie) und die semiquantitative Auswertung der Signale (Korpus blau, Antrum rot). **C:** Dot-Blot mit PAP-HSA-Konjugaten mit verschiedenen Monosacchariden (1: N-Acetylglucose- α -PAP-HSA-Konjugat, 2: N-Acetylglucose- β -PAP-HSA-Konjugat, 3: Galactose- α -PAP-HSA-Konjugat, 4: Galactose- β -PAP-HSA-Konjugat, 5: Mannose- α -PAP-HSA-Konjugat, 6: Mannose- β -PAP-HSA-Konjugat). Es wurden 5 µg, 10 µg bzw. 25 µg des jeweiligen PAP-HSA-Konjugat aufgetragen. Als Kontrolle (K) wurden 1 µl, 2 µl und 5 µl eines Antrumextraktes (E1, M_A534) aufgetragen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit ^{125}I -TFF1-Homodimer inkubiert und die Signale über Autoradiographie detektiert. **D:** 1 %ige AgGE der Extrakte E1 von Korpus (M_C558) und Antrum (M_A250) mit anschließendem Western Blot. Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer sowie 1 mM verschiedener Monosaccharide (α -Methyl-Glukosid, β -Methyl-Glukosid, β -Methyl-Mannosid, α -Methyl-Galaktosid, β -Methyl-Galaktosid). Gezeigt sind die Signale der Bindung (Autoradiographie) und die semiquantitative Auswertung der Signale (Korpus blau, Antrum rot). **E:** 1 %ige AgGE der Extrakte E0, E1, E3-E4 von Korpus (M_C560) und Antrum (M_A561) mit anschließendem Western Blot bzgl. MUC5AC und GSII, sowie Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigen, dass das ^{125}I -TFF1-Homodimer auch im Antrum an Muzine bindet und die Bindung sich im Vergleich zum Korpus nicht unterscheidet. Der Vergleich von der Immunfärbung von MUC5AC bzw. der Lektinbindung des GSII mit den Signalen der Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer zeigt, dass das TFF1-Homodimer *in vitro* vermutlich MUC6 bindet. So ist sowohl für GSII, als auch für das ^{125}I -TFF1-Homodimer nahezu keine Bindung für den Extrakt E0 zu sehen. Die Extrakte in Abb. 26E wurden ebenfalls mit ^{125}I -TFF1-Monomer(ACM) inkubiert, zeigen allerdings erst nach mehreren Wochen ein ganz schwaches Signal. Dies deutet darauf hin, dass das TFF1-Monomer(ACM) nicht an den Mukus bindet oder nur extrem schwach (Abb. 27).

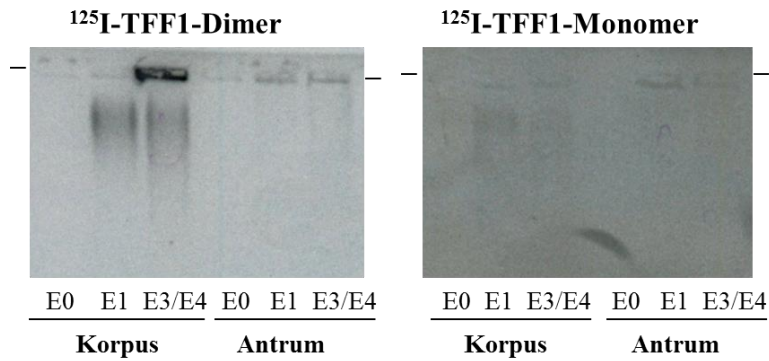


Abb. 27: Vergleich zwischen der Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer und ^{125}I -TFF1-Monomer(ACM).
1 %ige AgGE einer mehrstufigen Extraktion (E0, E1, E3-E4) einer Korpus- (M_{C560}) und einer Antrumprobe (M_{A561}) mit anschließendem Western Blot. Gezeigt sind die Signale (Autoradiographie) nach Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer und ^{125}I -TFF1-Monomer(ACM). Die Striche markieren die Geltaschen.

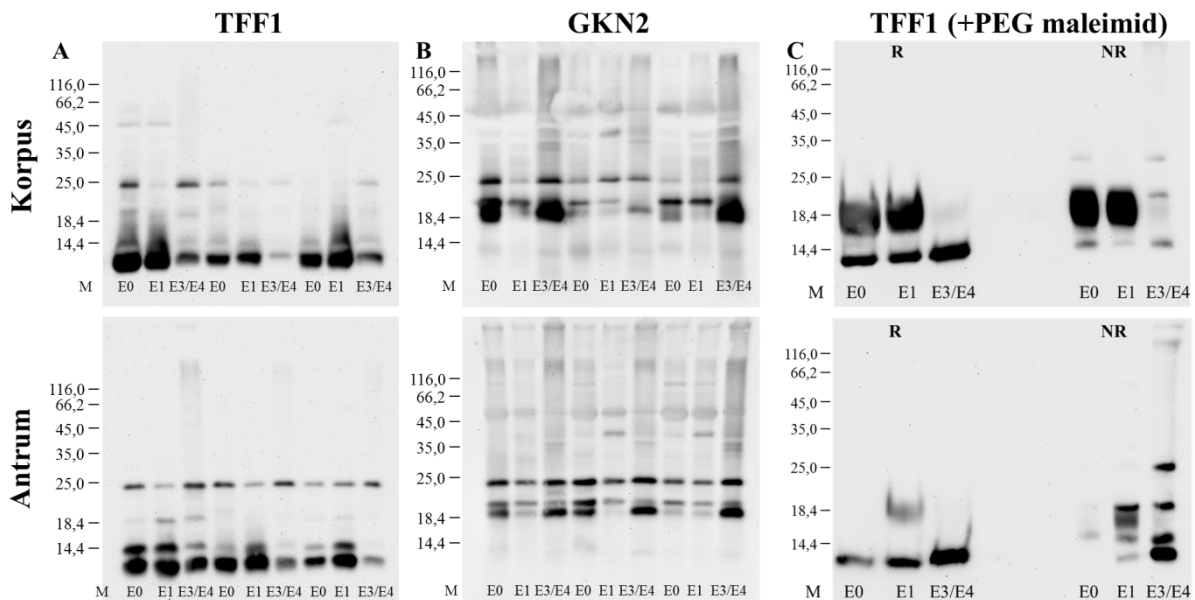


Abb. 28: Vergleich zwischen Magen Korpus und Magen Antrum der mehrstufigen Extraktion (E0, E1, E3-E4).
A: 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 von je drei verschiedenen Korpus- (M_{C383} , M_{C687} , M_{C688}) bzw. drei verschiedenen Antrumproben (M_{A250} , M_{A679} , M_{A690}) der Extrakte E0, E1 und E3-E4.
B: 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. GKN2 von je drei verschiedenen Korpus- (M_{C383} , M_{C687} , M_{C688}) bzw. drei verschiedenen Antrumproben (M_{A250} , M_{A679} , M_{A690}) der Extrakte E0, E1 und E3-E4.
C: 15 %ige SDS-PAGE (R: reduzierend, NR: nicht-reduzierend) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der Extrakte E0, E1, E3-E4 von einer Korpus- (M_{C383}) bzw. einer Antrumprobe (M_{A690}). Die Extrakte wurden zuvor mit 1 mM PEG-maleimid (5 kDa) üN inkubiert.

Die Analyse der Korpus- und Antrumproben zeigt nur geringe Unterschiede in Bezug auf die niedermolekularen TFF1-Formen. So gibt es teilweise größere individuelle Unterschiede innerhalb der Korpusproben als im Vergleich mit den Antrumproben. Es lässt sich sowohl im Korpus als auch im Antrum das TFF1-GKN2-Heteromer (25 kDa), schwach das TFF1-Homodimer (~18 kDa), sowie zwei TFF1-Monomere (14 kDa, <14 kDa) nachweisen (Abb. 28A). Am auffälligsten ist der Unterschied zwischen Korpus und Antrum in Bezug auf das TFF1-GKN2-Heteromer. Im Antrum lässt sich das TFF1-GKN2-Heteromer in allen

Extrakten detektieren, sowohl mit dem TFF1-Antiserum, als auch mit dem GKN2-Antiserum. Im Korpus ist das TFF1-GKN2-Heteromer in den Extrakten E1 dagegen nicht bzw. fast nicht nachweisbar (Abb. 28A, Abb. 28B). Die TFF1-Monomere reagieren im Korpus in den Extrakten E0 und E1 zum Teil mit 1 mM PEG-maleimid, im Extrakt E3-E4 dagegen fast nicht. Im Antrum gibt es nur für den Extrakt E1 eine Verschiebung auf der SDS-PAGE durch die Reaktion von TFF1 mit PEG-maleimid (Abb. 28C). Hierbei sei angemerkt, dass es auch im Korpus teilweise starke Unterschiede bei der Reaktion mit PEG-maleimid gibt (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich nicht eindeutig sagen, welche der beiden monomeren Banden um 5 kDa auf der SDS-PAGE verschoben wurde oder ob möglicherweise beide Monomere teilweise verschoben wurden.

Die Ergebnisse nach schrittweiser Extraktion von diversen Korpus- und Antrumproben zeigen, dass im Antrum die gleichen TFF1-Entitäten wie im Korpus nachweisbar sind, nämlich mukusassoziiertes TFF1, TFF1-FCGBP-Heteromer, TFF1-GKN2-Heterodimer, TFF1-Homodimer und zwei unterschiedliche TFF1-Monomere. Möglicherweise enthält das Magen Antrum aber mehr TFF1-GKN2-Heterodimer als der Magen Korpus. Außerdem könnte es einen Unterschied im Oxidationszustand der TFF1-Monomere geben.

Es wurde auch für einen Magen Antrum Gesamtextrakt (En) eine Größenausschlusschromatographie (S75HL) durchgeführt (Abb. 29).

Die Größenausschlusschromatographie des Magen Antrums zeigt für das reduzierende TFF1-Profil Peaks bei B9/B10, C6/C7, D1/D2 (Abb. 29B). Die hochmolekulare Fraktion B9/B10 enthält wie im Korpus (vgl. Abb. 15) das TFF1-FCGBP-Heteromer (Abb. 29C). In den Fraktionen C5-C7 lässt sich das TFF1-GKN2-Heterodimer nachweisen (Abb. 29D). In den Fraktionen des Hauptpeaks D1/D2 kann die monomere Doppelbande von TFF1 detektiert werden (Abb. 29E). Das TFF1-Homodimer kann in dieser Größenausschlusschromatographie nicht nachgewiesen werden, aber wie in Kapitel 4.1.1 gezeigt, kann es aufgrund der Lagerung der gereinigten Fraktionen zur Verschiebung des Monomer-Homodimer Verhältnisses kommen. Teilweise lässt sich das TFF1-Homodimer bei einer Lagerung der Proben bei 4 °C sogar gar nicht mehr nachweisen.

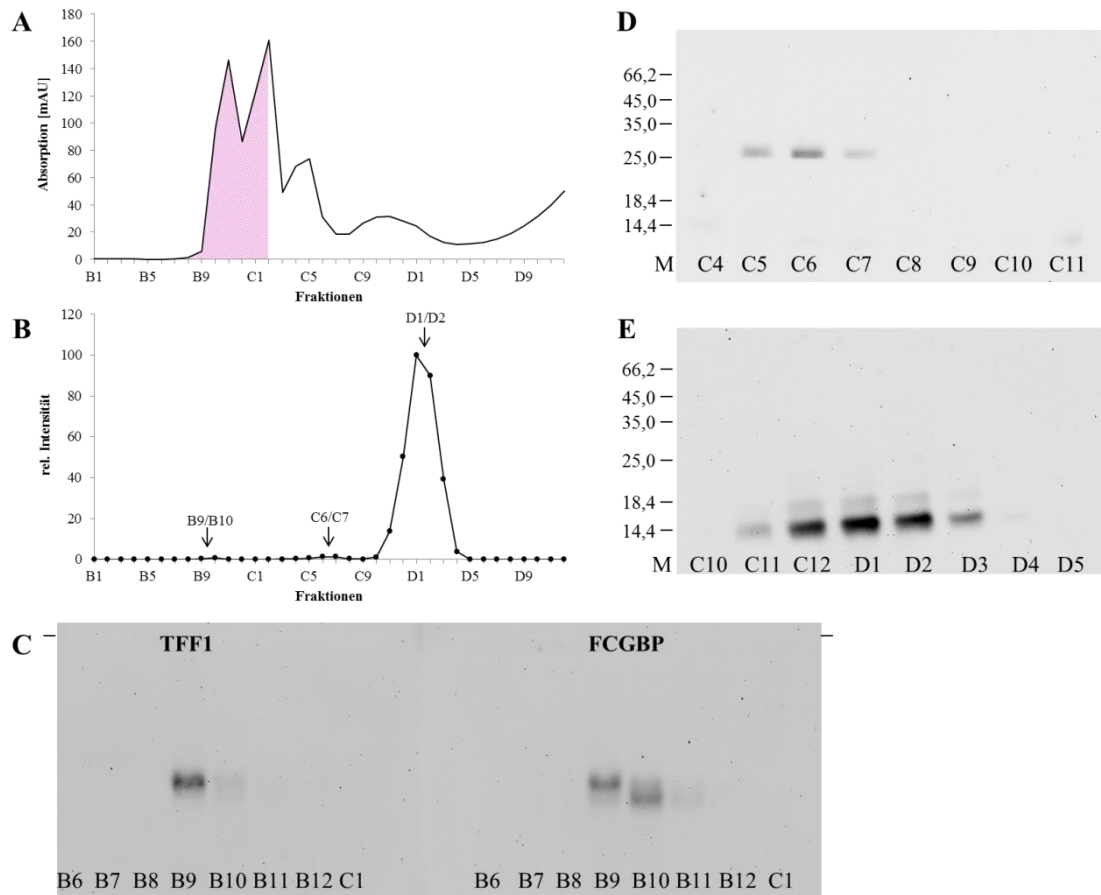


Abb. 29: Größenausschlusschromatographie (S75HL) vom Gesamtextrakt (En) eines Magen Antrums bei pH 8.

A: UV-Profil bei 280 nm der S75HL-Säule vom Gesamtextrakt eines Magen Antrums (M_A322). Die PAS-positiven Fraktionen sind in Pink schraffiert. **B:** Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGES mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S75HL-Säule von En. **C:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 und FCGBP. Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen. **D:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE (Reduktion auf der Membran) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. **E:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE (Reduktion im Gel) mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

4.1.5 TFF1 im Magensaft

Es wurden ebenfalls Proben vom Magensaft bzgl. der TFF-Peptide und GKN2 analysiert und mit einer Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Magensaftproben stammen aus einer Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Peter Malfertheiner (ehemaliger Leiter der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Magdeburg).

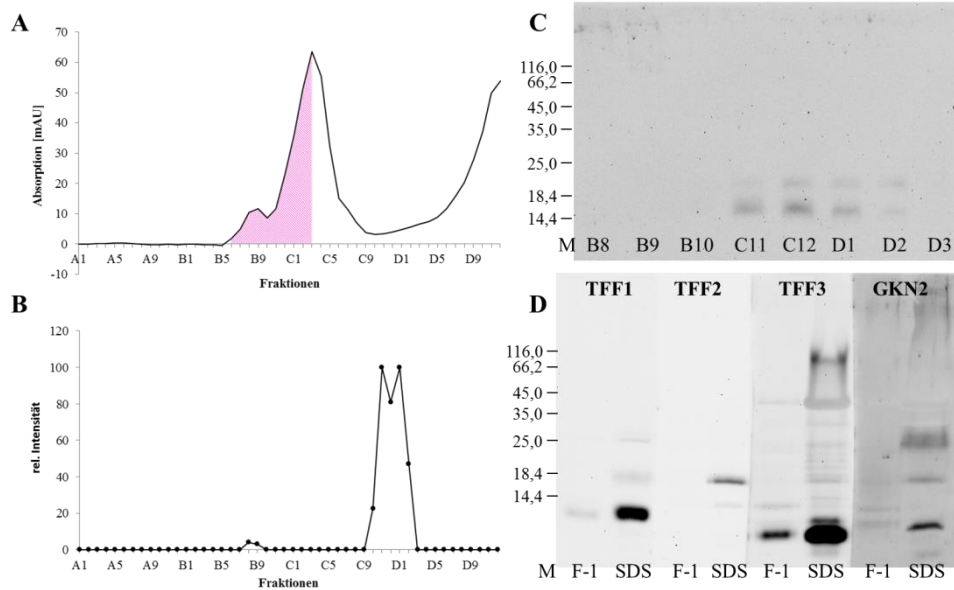


Abb. 30: Größenausschlusschromatographie einer Magensaftprobe bei pH 6.

A: UV-Profil bei 280 nm der S75HL-Säule vom Magensaft (Magensaft 6). Die PAS-positiven Fraktionen sind in Pink schraffiert. **B:** Semiquantitative Auswertung der reduzierenden 15 %igen SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S75HL vom Magensaft. **C:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für ausgewählte Fraktionen. **D:** 15 %ige reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1, TFF2, TFF3 und GKN2 für die Probe F-1 (vor dem Auftragen auf die Säule; 10 µl Probe auf die SDS-PAGE aufgetragen (0,2 %)) und SDS (in 0,1 % SDS gelöstes Pellet nach F-1, Kap. 3.3.1; 37,5 µl Probe auf die SDS-PAGE aufgetragen (1,5 %)). Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Die Größenausschlusschromatographie des Magensaftes zeigt im reduzierenden TFF1-Profil nur zwei Peaks, einen bei B8/B9 und einen bei C11-D1 (Abb. 30B). Der größte Teil (ca. 98 %) des TFF1 ist in den niedermolekularen Fraktionen nachweisbar. Die Analyse der niedermolekularen Fraktionen zeigt zwei Banden (14 kDa und 18 kDa) bei denen es sich vermutlich um das TFF1-Homodimer und eines der zwei TFF1-Monomere handelt (Abb. 30C). Das TFF1-GKN2-Heterodimer kann im Magensaft nicht detektiert werden. GKN2 kann erst nach der Behandlung der Probe mit 0,1 % SDS nachgewiesen werden. Dies gilt ebenfalls für TFF2. Die Mengen an TFF1 und TFF3 im Magensaft sind höher als die von TFF2. Sie lassen sich teilweise auch schon ohne Behandlung mit SDS detektieren. Allerdings ist der größere Teil von TFF1 (ca. 70 %) erst nach Behandlung mit SDS zu detektieren. Bei TFF3 dagegen ist die größte Menge in der leichter löslichen F-1 Fraktion (ca. 65 %) nachweisbar.

4.1.6 Bindung von TFF1 an *H. pylori*

Es wurde ebenfalls getestet, ob das synthetische ^{125}I -TFF1-Homodimer auch *H. pylori* bindet, wie es bereits vorher mit rek. TFF1 aus *E. coli* gezeigt wurde (Reeves et al. 2008). Die Zell-Lysate und LPS-Proben von *H. pylori* wurden von Frau Dr. Nicole Tegtmeyer (Lehrstuhl für

Mikrobiologie (Prof. Dr. Backert), Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg) bereitgestellt.

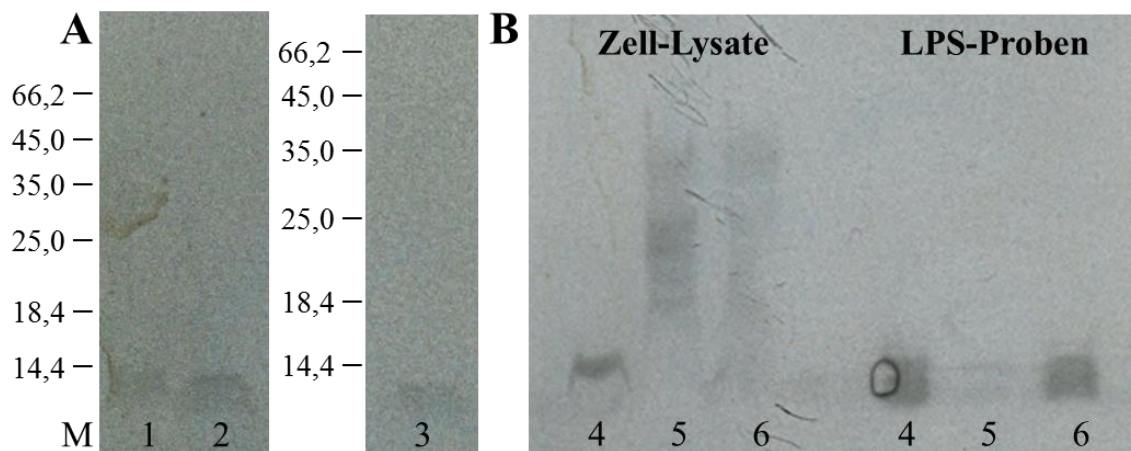


Abb. 31: Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer an verschiedene *H. pylori* Zell-Lysate bzw. LPS-Proben bei pH 7.

A: 15 %ige reduzierende SDS-PAGE der Zell-Lysate von *H. pylori* mit anschließender Inkubation der Western Blots mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). 1: B128 WT 2: 7.13 WT 3: P12 WT. **B:** 15 %ige reduzierende SDS-PAGE der Zell-Lysate und LPS-Proben von *H. pylori* mit anschließender Inkubation der Western Blots mit ^{125}I -TFF1-Homodimer. 4: P12 WT 5: P12 Δ HP1191 Mutante 6: P12 Δ HP479 Mutante. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Das ^{125}I -TFF1-Homodimer bindet die Zell-Lysate von *H. pylori*, genauer gesagt die Lipopolysaccharide (LPS) des Bakteriums (Bande <14 kDa, Abb. 31A) (vgl. Braga Emidio et al. 2020; Clyne et al. 2004; Reeves et al. 2008). Die Analyse der *H. pylori* Mutanten zeigt, dass die Mutante P12 Δ HP1191 das ^{125}I -TFF1-Homodimer nicht mehr bindet. Das Gen HP1191 exprimiert eine LD-Heptosyltransferase, die wichtig für die Synthese der inneren Kernregion des LPS ist (Abb. 38) (Chandan et al. 2007). Dagegen kann die gereinigte LPS Probe der Mutante HP0479 das ^{125}I -TFF1-Homodimer noch binden. Bei dieser Mutante fehlt die D-Glycero-D-Manno-Heptosyltransferase, die wichtig für die Synthese der äußeren Kernregion des LPS ist (Abb. 38) (Hiratsuka et al. 2005).

Es wurde ebenfalls getestet, ob rekombinantes TFF1-Monomer an *H. pylori* binden kann. Allerdings waren die Ergebnisse für die in Abb. 31B gezeigten Proben negativ (Daten nicht gezeigt). Die in Abb. 31A gezeigten drei Zell-Lysate und 16 weitere wurden mit ^{125}I -pTFF2 (Jørgensen et al. 1982) inkubiert, zeigten aber ebenfalls keine positiven Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

4.2 TFF1 im Magen anderer Spezies

Es wurden Extrakte von *Xenopus laevis*, der Maus und dem Schwein analysiert. Das humane TFF1-Antiserum zeigt keine Kreuzreaktivität mit TFF1-Homologen aus anderen Organismen, deshalb wird für jeden Organismus ein eigenes Antiserum benötigt (Daten nicht gezeigt).

4.2.1 TFF1 in *X. laevis*

Zum Vergleich der Ergebnisse des humanen Magens wurden auch Magenproben von *X. laevis* analysiert. Dazu wurde ein Gesamtextrakt (En) des Magens von *X. laevis* auf eine SDS-PAGE aufgetragen und der anschließende Western Blot bzgl. des TFF1-Orthologs xP1 analysiert (Abb. 32) (Hauser and Hoffmann 1991).

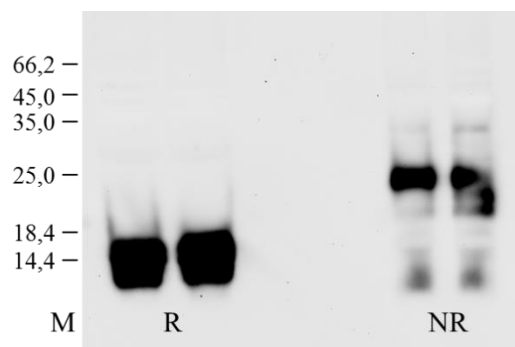


Abb. 32: Magenextrakt En des *X. laevis*.

15%ige SDS-PAGE (R: reduzierend, NR nicht-reduzierend) mit anschließendem Western Blot bzgl. xP1 (a-xP1-1) des Gesamtextraktes En. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Das TFF1 Ortholog xP1 kann im Magen des *X. laevis* nachgewiesen werden. Es zeigen sich Banden bei ca. 14 kDa, in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF1, bei denen es sich vermutlich um monomere Formen des xP1 handelt (Abb. 32). Am deutlichsten ist allerdings eine 25 kDa große Bande detektierbar. Möglicherweise handelt es sich hier um ein Heteromer von xP1 mit einem GKN2 Ortholog.

4.2.2 TFF1 in der Maus

TFF1 wurde ebenfalls im Magen der Maus analysiert, da wie bereits erwähnt, alle *Tff1*^{KO}-Tiere im Antrum Adenome bilden, die zu Tumoren führen können (Lefebvre et al. 1996). Dazu wurden verschiedene Korpusproben aus der Maus mit TRIzol[®] und als Gesamtextrakt En extrahiert und mit Hilfe einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 und GKN2 analysiert (Abb. 33).

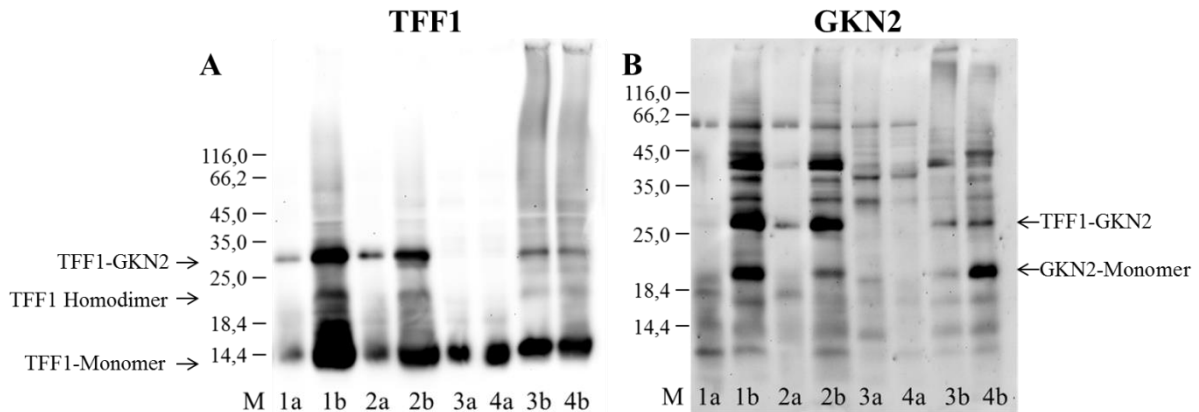


Abb. 33: Vergleich zwischen TRIzol[®]-Extraktion und Gesamtextraktion En.

A: 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 (a-mTFF1-1). **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot bzgl. GKN2. 1 und 2 sind verschiedene Magen Korpusproben (je ~0,1 g) aus der Maus (WT (Fu et al. 2015)) mit TRIzol[®] extrahiert, das Pellet nach Isopropanolfällung wurde geteilt und a: nur in Puffer (20 mM Tris/HCl, 30 mM NaCl) bzw. b: in Puffer mit 1 % SDS gelöst (je 250 µl). 3 und 4 sind verschiedene Korpusproben (je ~0,1 g) des Gesamtextrakts En aus der Maus (WT (Fu et al. 2015)); a entspricht dem Extrakt En, b ist das Pellet nach der Zentrifugation von a mit 1 % SDS gekocht (je 500 µl). Es wurden von 1a und 2a 15 µl (6 %), von 1b und 2b 5 µl (2 %) und von 3a, 4a, 3b und 4b 3 µl (0,6 %) aufgetragen. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

Die Extrakte vom Korpus aus der Maus zeigen ein TFF1-Monomer (<14 kDa), sowie sehr schwach das TFF1-Homodimer (>18 kDa) und das TFF1-GKN2-Heterodimer (25 kDa) (Abb. 33A). Diese drei TFF1-Formen sind allerdings nur nach TRIzol[®]-Extraktion mit anschließendem Resuspendieren des Pellets mit 1 % SDS (1b, 2b), sowie in den in 1 % SDS gelösten Pellets des Gesamtextraktes zu sehen (3b, 4b) (Abb. 33A). In den Gesamtexttrakten (3a, 4a) lässt sich nur ein TFF1-Monomer nachweisen. In den ohne SDS gelösten Pellets der TRIzol[®]-Extrakte (1a, 2a) fehlt die TFF1-Homodimer Bande. Die TFF1-GKN2-Heteromer Bande (25 kDa) lässt sich im Western Blot bzgl. GKN2 ebenfalls nur in den TRIzol[®]-Extrakten detektieren bzw. in den in SDS gelösten Pellets des Gesamtextraktes En (Abb. 33B). Das GKN2-Monomer kann dagegen nur in Extrakten, die mit SDS behandelt wurden, nachgewiesen werden.

Es wurde ebenfalls eine Größenausschlusschromatographie (S75HL) vom gesamten Magen (Korpus und Antrum) der Maus auf TFF1 analysiert. Die Fraktionen der S75HL der Mausmägen wurden von Herrn René Stürmer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) bereitgestellt.

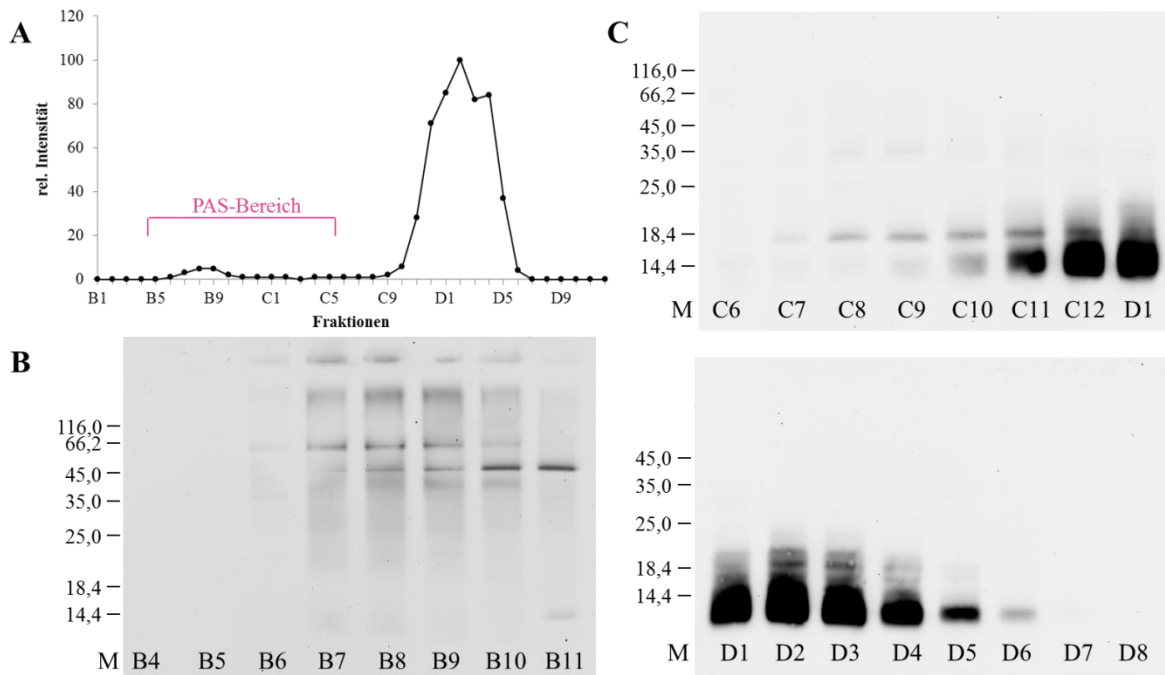


Abb. 34: Größenausschlusschromatographie S75HL bei pH 7 des Gesamtextraktes En von Mausmägen.

A: Semiquantitative Auswertung der 15 %igen reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der S75HL von sechs Mausmägen (WT (Fu et al. 2015)). **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der Fraktionen B4-B11 (hochmolekular). **C:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot für TFF1 der Fraktionen C6-D8 (niedermolekular).

Das TFF1-Profil der Größenausschlusschromatographie zeigt zwei Peaks für TFF1, einen in den hochmolekularen Fraktionen (B8/B9), sowie einen in den niedermolekularen Fraktionen (C12-D4), wobei auch in der Maus über 90 % des TFF1s nicht mukusassoziiert vorliegen (Abb. 34A). Die Analyse der niedermolekularen Fraktionen zeigt eine 18 kDa Bande, sowie eine breite Bande bei etwa 14 kDa. Dies lässt darauf schließen, dass es in der Maus das TFF1-Homodimer gibt, sowie zumindest eines der TFF1-Monomere (Abb. 34C). Das Verhältnis liegt deutlich auf Seiten des Monomers, dies ist aber vermutlich durch die Lagerung bei 4 °C bedingt (vgl. Abb. 13). Das TFF1-GKN2-Heteromer lässt sich in den Fraktionen dieser Chromatographiesäule nicht nachweisen, da ein Extrakt En aufgetragen wurde, der nur wenig bis kein TFF1-GKN2-Heteromer bzw. GKN2 enthält (vgl. Abb. 33).

4.2.3 TFF1 im Schwein

Die vorhergesagte TFF1 Sequenz vom Schwein (Uni-Prot: A0A286ZIIY1) wurde durch Klonierung und anschließender Sequenzierung überprüft (Abb. 3) und bestätigt. Aufgrund dessen wurde dann die Produktion eines Antiserums für den C-Terminus (Tab.3.1) extern in Auftrag gegeben (Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, Deutschland). Dieses Antiserum wurde im Folgenden an verschiedenen Gewebeproben (Gesamtextrakte En) getestet (Abb. 35).

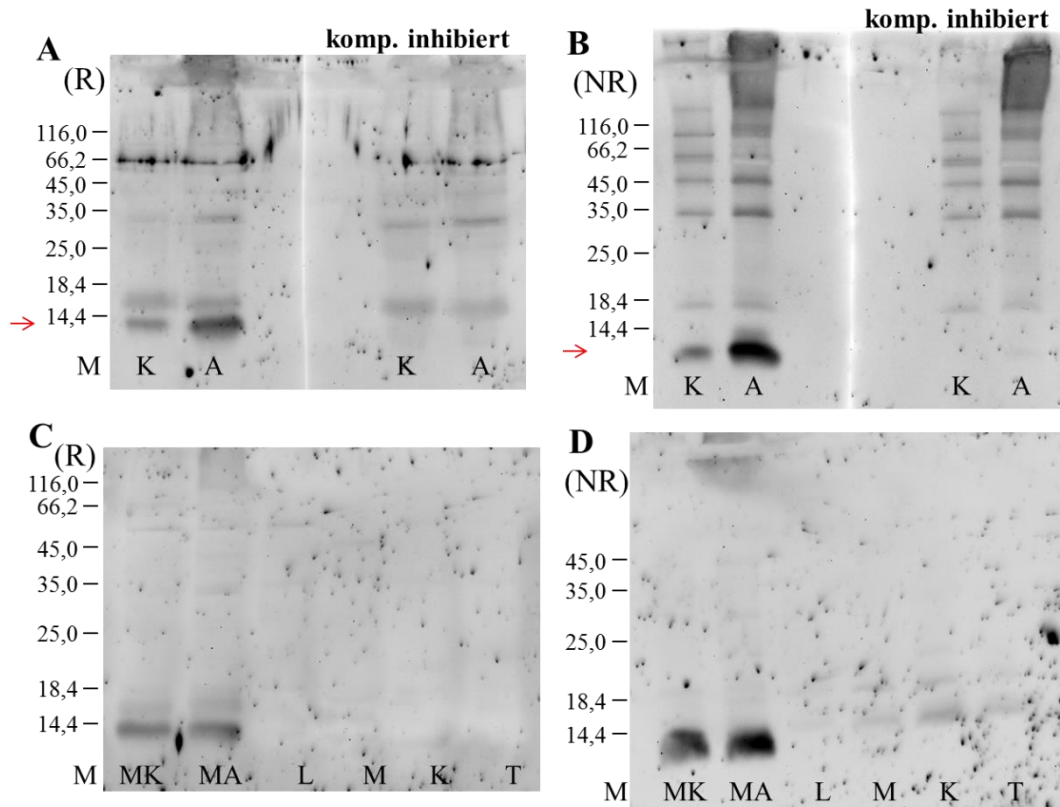


Abb. 35: Gesamtextrakte En vom Schwein und Test des pTFF1-Antiserums.

A: 15 %ige reduzierende SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF1 (a-pTFF1-1) von Gesamtextrakten En von Magen Korpus (K) und Magen Antrum (A). Kompetitive Inhibition des TFF1-Antiserums mit dem für die Herstellung des Antiserums verwendeten Peptids. Der rote Pfeil markiert die spezifische TFF1-Bande. **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF1 von Gesamtextrakten En von Magen Korpus (K) und Magen Antrum (A). Kompetitive Inhibition des TFF1-Antiserums mit dem für die Herstellung des Antiserums verwendeten Peptids. Der Pfeil markiert die spezifische TFF1-Bande. **C:** 15 %ige reduzierende SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF1 von Gesamtextrakten En von Magen Korpus (MK), Magen Antrum (MA), Lymphknoten (L), Milz (M), Knochenmark (K) und Thymus (T). **D:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit Western Blot bzgl. TFF1 von Gesamtextrakten En von Magen Korpus (MK), Magen Antrum (MA), Lymphknoten (L), Milz (M), Knochenmark (K) und Thymus (T).

Das Antiserum a-pTFF1-1 weist spezifisch eine Bande unterhalb von 14 kDa nach (Pfeil, Abb. 35A), bei der es sich um das TFF1 handelt. Allerdings werden vom Antiserum auch unspezifische Banden oberhalb von 14 kDa und bei ca. 35 kDa erkannt (Abb. 35A). Es kann in dieser Korpusprobe nur ein TFF1-Monomer auf der nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 nachgewiesen werden. Im Antrum ist dagegen eine monomere Doppelbande detektierbar (Abb. 35B). Alle anderen sichtbaren Banden lassen sich nicht kompetitiv inhibieren und sind vermutlich unspezifisch. Der Vergleich mit anderen Geweben (Lymphknoten, Milz, Kolon und Thymus) zeigt, dass TFF1 nur im Magen Korpus und im Magen Antrum nachweisbar ist (Abb. 35C). Es kann für beide Extrakte nur die monomere TFF1 Bande detektiert werden (Abb. 35D).

Es wurden ebenfalls zwei Größenausschlusschromatographien (S75HL) für Extrakte (Gesamtextrakt En und TRIzol[®]-Extraktion) des Schweins analysiert um zu untersuchen, ob es Unterschiede gegenüber dem Menschen bzw. der Maus gibt (Abb. 36). Die Fraktionen der

S75HL der TRIzol[®]-Extraktion und des Gesamtextraktes En wurden von Frau Franziska Heuer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) bereitgestellt.

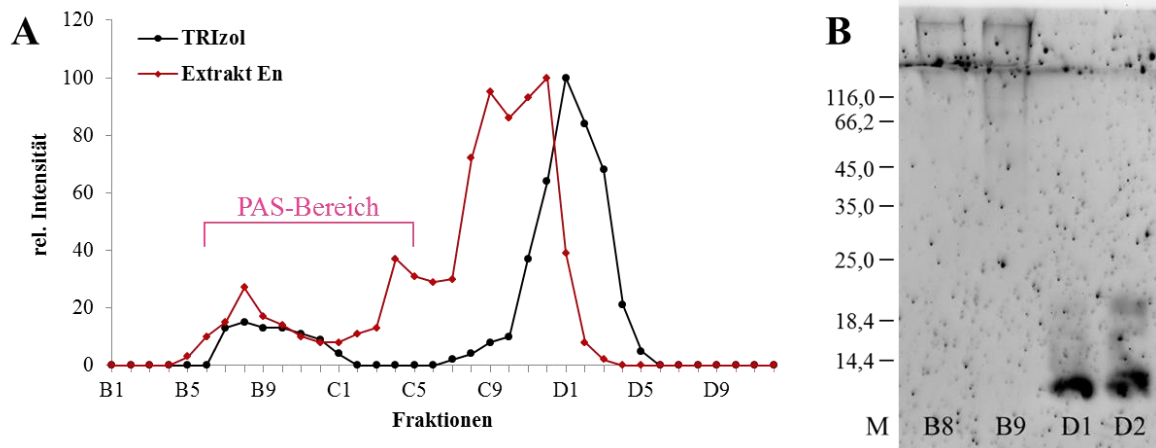


Abb. 36: Größenausschlusschromatographien S75HL von Magen Korpusproben vom Schwein.

A: Semiquantitative Auswertung der 15 %igen reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 einer TRIzol[®]-Extraktion des Magen Korpus (Schwein 6) bei pH 7 (schwarz) und einem Gesamtextrakt En der abgekratzten Mukosa des Magen Korpus (Schwein 10) bei pH 8 (rot). Der PAS-Bereich wurde für die PAS-positiven Fraktionen der S75HL nach TRIzol[®]-Extraktion markiert. **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot auf TFF1 der Hauptpeaks der S75HL nach TRIzol[®]-Extraktion.

Die Auswertung der reduzierenden TFF1-Profile der zwei Größenausschlusschromatographien (TRIzol[®]-Extraktion, Gesamtextrakt En) zeigt, dass im Schwein der größte Teil des TFF1 in den niedermolekularen Fraktionen eluiert (>80 %) (Abb. 36A). Die Analyse der niedermolekularen Fraktionen zeigt eine monomere Bande (<14 kDa) in den Fraktionen D1 und D2. Das TFF1-Homodimer (18 kDa) ist zudem ganz schwach in Fraktion D2 detektierbar (Abb. 36B). Das TFF1-GKN2-Heterodimer kann in den verschiedenen untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden.

Es wurden außerdem Bindungsstudien mit dem ¹²⁵I-TFF1-Homodimer und einer kommerziell erwerblichen Muzinpräparation aus dem Schwein (Sigma Muzin) durchgeführt, da die Bindung von ¹²⁵I-TFF1-Homodimer an Sigma Muzin mit am stärksten war. Dafür wurden Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie (S75HL, mit 1 % β-Mercaptoethanol und 1 % SDS gekocht) verwendet (Abb. 37). Die Fraktionen wurden von Herrn René Stürmer (Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) bereitgestellt.

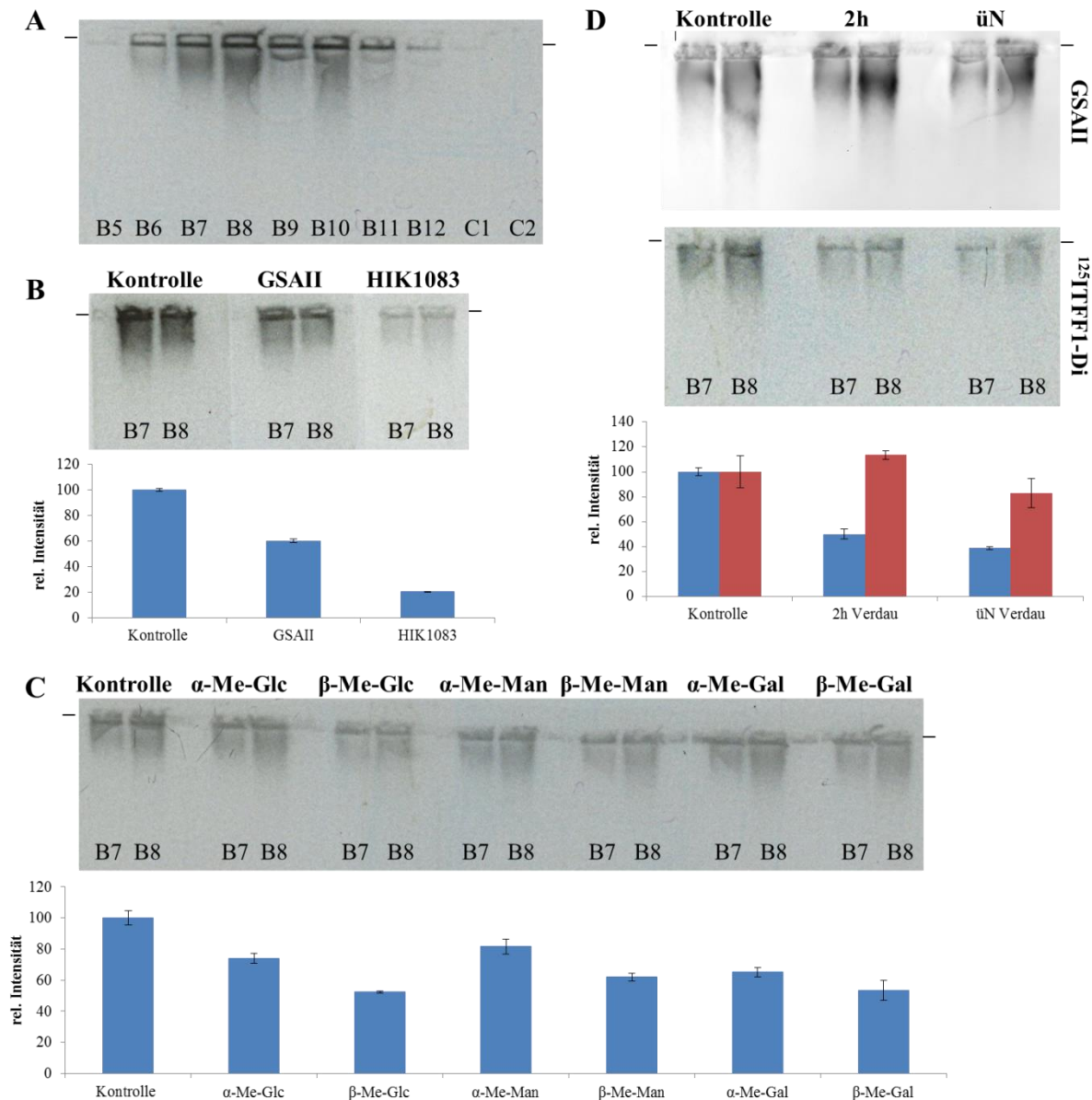


Abb. 37: Bindungsstudien des synthetischen ^{125}I -TFF1-Homodimer nach einer Größenausschlusschromatographie Superdex 75HL pH 7 von Sigma Muzin mit 1 % Mercaptoethanol und 1 % SDS gekocht.

A: 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot der hochmolekularen Fraktionen B5-C2 und Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). **B:** 1 %ige AgGE der Fraktionen B7 und B8 mit anschließendem Western Blot, danach kompetitive Inhibitionen mit dem Lektin GSALII und dem monoklonalen Antikörper HIK1083. Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Gezeigt sind die Signale der Bindung und die semiquantitative Auswertung der Signale (B7 und B8 wurden zusammen ausgewertet). **C:** 1 %ige AgGE der Fraktionen B7 und B8, Western Blot und Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Die Bindungspuffer enthielten je 1 mM der angegebenen Monosaccharide (α -Methyl-Glukosid, β -Methyl-Glukosid, α -Methyl-Mannosid, β -Methyl-Mannosid, α -Methyl-Galaktosid, β -Methyl-Galaktosid). Gezeigt sind die Signale der Bindung und die semiquantitative Auswertung der Signale (B7 und B8 wurden zusammen ausgewertet). **D:** 1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot der Fraktionen B7 und B8 nach einem Verdau mit Proteinase K (1 ng/ml) für zwei Stunden (2h) bzw. über Nacht (üN). Gezeigt ist das Signal für die Bindung nach Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie), sowie die Lektinfärbung mit GSALII, sowie die Auswertung der Signale beider Western Blots (blau: Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer, rot: Lektinfärbung mit GSALII). Die Striche an den Agarosegelen markieren die Geltaschen.

Das ^{125}I -TFF1-Homodimer lässt sich an die hochmolekularen Fraktionen einer Muzinpräparation aus dem Schwein binden, nicht aber das ^{125}I -TFF1-Monomer(ACM) (Abb. 37A, vgl. Abb. 27). Die kompetitive Inhibition mit dem Lektin GSALII und dem monoklonalen Antikörper HIK1083 zeigt eine leichte Inhibition der Bindung durch GSALII und eine starke

Inhibition durch HIK1083 (Abb. 37B). Die Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer an hochmolekulare Muzine kann ebenfalls durch die Zugabe von verschiedenen Monosacchariden leicht inhibiert werden. Dabei zeigen die β -Methyl-Monosaccharide den größeren Effekt auf die Bindung vom ^{125}I -TFF1-Homodimer (Abb. 37C). Dies ist vergleichbar mit den Experimenten mit humanen Extrakten (Abb. 26). Der Proteinase K-Verdau der Proben führt zu einer Abnahme des Signals für die Bindung des ^{125}I -TFF1-Homodimers an die hochmolekularen Muzine, während die relative Intensität der Signale der GSAll-Färbung in etwa gleich bleibt (Abb. 37D).

5. Diskussion

Der Fokus dieser Arbeit lag darauf, nach verschiedenen TFF1-Formen im Magen zu suchen und diese dann weiter zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass TFF1 im Magen Heteromere mit FCGBP und GKN2 bildet, sowie Homodimere. Der Hauptteil des TFF1 liegt allerdings als monomere TFF1-Formen vor. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das TFF1-Homodimer *in vitro* an *H. pylori* und MUC6 bindet, nicht aber das synthetische TFF1-Monomer(ACM). In den untersuchten Proben von Duodenum, Kolon und Speichel konnte kein TFF1 nachgewiesen werden, obwohl es Hinweise gibt, dass TFF1 ebenso wie TFF2 und TFF3 im angrenzenden Duodenum von den Brunnerschen Drüsen und in einigen Becherzellen des Darms sezerniert wird (May et al. 2004). Ebenso wurde die mRNA von TFF1 im Kolon und in Speicheldrüsen nachgewiesen (Madsen et al. 2007). TFF1 wird unter pathologischen Bedingungen auch ektopisch synthetisiert, weshalb es zu Unterschieden bei den untersuchten Geweben kommen kann (Ebert et al. 1999; Labouvie et al. 1999).

5.1 Methodische Aspekte bei der Arbeit mit TFF1

Für TFF1 wurden zu Beginn dieser Arbeit drei verschiedene Entitäten beschrieben, ein TFF1-GKN2-Heterodimer, ein TFF1-Homodimer und ein TFF1-Monomer (Newton et al. 2000). Den größten Anteil an TFF1 macht dabei laut Literatur das TFF1-GKN2-Heterodimer aus (Kouznetsova et al. 2007a; Newton et al. 2000). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, wonach das TFF1-GKN2-Heterodimer nicht die Hauptmenge des TFF1 ausmacht. Allerdings wurde in dieser Arbeit hauptsächlich der Magen Korpus untersucht und nicht wie in der genannten Literatur das Antrum (Kouznetsova et al. 2007a; Newton et al. 2000). Die Ergebnisse der untersuchten Antrumproben deuten darauf hin, dass das TFF1-GKN2-Heterodimer möglicherweise vermehrt im Antrum vorkommt, aber auch dort nicht die Hauptmenge an TFF1 ausmacht (Abb. 28). Die Wahl der Extraktionsmethode hat zudem einen wesentlichen Einfluss auf den Nachweis des TFF1-GKN2-Heterodimers. Das TFF1-GKN2-Heteromer lässt sich in den Extrakten E0, E3-E4 und nach TRIzol[®]-Extraktion besser nachweisen als im Extrakt E1 oder im Gesamtextrakt En (Abb. 21, Abb. 23, Abb. 28). Ein großer Teil des TFF1-GKN2-Heterodimers lässt sich demnach erst mit SDS lösen. Eine TRIzol[®]-Extraktion erschwert dagegen die Analyse von TFF1, das an hochmolekulare Fraktionen gebunden ist, da die hochmolekularen Proteine nach dem Fällen mit Isopropanol nur schwer löslich sind. So kann z. B. das TFF1-FCGBP-Heteromer in den analysierten Größenausschlusschromatographien nicht mehr nachgewiesen werden, auch die

Signale der Bindung sind schwächer als in vergleichbaren Proben (Anhang, Abb. 47). Das Aufbewahren der Proben bei 4 °C führt dazu, dass das TFF1-Homodimer nicht bzw. fast nicht mehr nachgewiesen werden kann (Abb. 13). Ebenso führt das längere Aufbewahren der Proben bei -20 °C dazu, dass der Anteil an TFF1-Homodimer abnimmt (vgl. Abb. 16B mit Abb. 43A).

Zusätzlich kommt hinzu, dass die nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 unterschiedliche Immunreaktivitäten der einzelnen TFF1-Formen zeigt, je nachdem ob die Reduktion mit β -Mercaptoethanol im Polyacrylamidgel, auf der Membran oder gar nicht durchgeführt wird (Abb. 12). Möglicherweise dimerisiert das Peptid, das zur Immunisierung verwendet wurde, über den Cysteinrest, wodurch vermehrt Antikörper gegen ein Dimer gebildet werden, sodass bevorzugt Dimere erkannt werden (vgl. Abb. 11). Erst durch Reduktion des SDS-Polyacrylamidgels werden alle TFF1-Formen gleichermaßen detektiert. Unterschiedliche Immunreaktivitäten für die verschiedenen TFF1-Entitäten wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben. So wurden vorher schon unterschiedliche, allerdings nicht näher beschriebene, Bedingungen für den Nachweis von TFF1-GKN2-Heterodimer und TFF1-Monomer verwendet (Newton et al. 2000). Es wurde ebenfalls darauf hingewiesen, dass es starke individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Proben gab, das TFF1-Monomer machte z. B. etwa 12-40 % des gesamten TFF1 aus (Newton et al. 2000). Monoklonale Antikörper, die gegen verschiedene 10-30 Aminosäure lange Sequenzen des TFF1 hergestellt wurden, konnten nur die reduzierte TFF1-Form, sowie schwach das TFF1-Monomer detektieren, nicht aber das TFF1-Homodimer oder das TFF1-GKN2-Heterodimer (Westley et al. 2005). Ein Antikörper gegen rek. TFF1-Homodimer reagiert dagegen mit dem TFF1-GKN2-Heterodimer, dem TFF1-Homodimer und dem TFF1-Monomer, allerdings nicht mit den reduzierten TFF1-Formen der gleichen Proben (Westley et al. 2005). In einer weiteren Arbeit gab es entgegengesetzte Immunreaktivitäten für Analysen mit ELISA bzw. mit Western Blots (Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Diese Analysen wurden ebenfalls mit einem Antikörper gegen rek. TFF1-Homodimer durchgeführt (Ruchaud-Sparagano et al. 2004). In allen drei Arbeiten ist das TFF1-GKN2-Heterodimer als die dominante TFF1-Form beschrieben, wie es auch die nicht-reduzierenden SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot ohne Reduktion bzw. Reduktion auf der Membran zeigen (Abb. 12) (Newton et al. 2000; Ruchaud-Sparagano et al. 2004; Westley et al. 2005). Allerdings lassen die Elutionen der entsprechenden Banden (25 kDa: TFF1-GKN2-Heterodimer, 18 kDa: TFF1-Homodimer, 14 kDa bzw. <14 kDa: TFF1-Monomere) darauf schließen, dass die nicht-reduzierende SDS-PAGE mit Reduktion im Gel und anschließendem Western Blot die

tatsächlichen Mengenverhältnisse am ehesten widerspiegelt (Abb. 12, Abb. 16 und Anhang, Abb. 40). Ebenso zeigen die Größenausschlusschromatographien einen Hauptpeak für TFF1 in den niedermolekularen Fraktionen (C12-D3), in denen nur das TFF1-Homodimer und die TFF1-Monomere nachgewiesen werden können. Dagegen ist der TFF1-Peak für die Fraktionen C6/C7, in denen das TFF1-GKN2 Heterodimer nachgewiesen werden kann, eher klein (Abb. 15, Abb. 16, Abb. 21). Zusammengefasst bedeutet dies, dass TFF1 im Korpus nur zu einem geringen Teil an GKN2 bindet, der größere Teil liegt ungebunden als monomere Form vor.

5.2 Verhalten von TFF1 bei saurem pH-Wert

Die Ergebnisse der Extraktion bei pH 3 und pH 4 mit anschließender Größenausschlusschromatographie (S75HL) deuten darauf hin, dass TFF1 nicht so säurestabil ist, wie es für TFF2 beschrieben wurde (Abb. 14B, Abb. 14C) (Jørgensen et al. 1982; Thim und May 2005). So fehlen vor allem die TFF1-Formen des TFF1-Peaks bei C6/C7 und in den angrenzenden Fraktionen, also vor allem das TFF1-GKN2-Heterodimer, aber auch das TFF1-Monomer und das TFF1-Homodimer (vgl. mit Abb. 16A, Abb. 21C). Diese Entitäten fehlen ebenfalls bei der Analyse des Magensaftes (Abb. 30). Allerdings lässt sich TFF1 im Magensaft nur relativ schwer lösen. Ein Großteil (70 %) des TFF1 war erst mit SDS löslich und diese Probe ist nicht weiter analysiert worden (Abb. 30D). TFF2 und GKN2 sind ebenfalls nur schwer aus dem Magensaftproben zu lösen, TFF3 dagegen ist zum überwiegenden Teil leicht löslich (Abb. 30D). Die ungewöhnlich hohe Menge an TFF3 im Magensaft kommt vermutlich aus dem Speichel, wie es bereits in einer vorigen Arbeit vermutet wurde (Kouznetsova et al. 2004). Insgesamt ist die TFF1 Gesamtmenge bei Extraktionen unterhalb von pH 5 geringer als bei Extraktionen oberhalb von pH 5. Auffällig ist auch die Verschiebung des Hauptpeaks zu niedermolekularen Fraktionen (Abb. 14B, Abb. 14C). Das veränderte Elutionsverhalten könnte für einen Abbau von TFF1 sprechen. Allerdings ist der C-Terminus noch detektierbar und auf der reduzierenden SDS-PAGE ist auch keine Verkürzung sichtbar (Anhang, Abb. 41). Eine mögliche Erklärung für das veränderte Elutionsverhalten wäre eine Änderung in der Tertiärstruktur des TFF1-Homodimers bzw. des TFF1-Monomers. Da der pH-Wert für diese zwei Größenausschlusschromatographien (pH 3 und pH 4) nahe des isoelektrischen Punktes (pI 3,94), bzw. unterhalb des isoelektrischen Punktes liegt (May et al. 2003). Dadurch ist TFF1 nahezu ungeladen, wodurch sich der hydrodynamische Radius und die Löslichkeit in

wässrigen Puffern verändern könnten. Außerdem ist die vermutete Bindung von zweiwertigen Ionen wie Cu^{2+} und Ca^{2+} an den C-Terminus erschwert, da die Glutamatreste ungeladen sind. Dies könnte ebenfalls zu einer Änderung der Tertiärstruktur, sowie einem geringeren Schutz vor Proteolyse am C-Terminus führen (Ruchaud-Sparagano et al. 2004; Tosco et al. 2007; Tosco et al. 2010). Dies würde die verringerte Gesamtmenge an TFF1 in den Extraktionen bei saurem pH-Wert erklären (Abb. 41). Ein Abbau des TFF1 bei sauren pH-Werten könnte z. B. wichtig sein, um durch reaktive Sauerstoffspezies irreversibel, oxidiertes TFF1 abzubauen (siehe Kap.5.3.6) (Shao et al. 2011). Neben dem Abbau könnte auch eine schlechtere Löslichkeit im Extraktionspuffer, vor allem bei pH 4, zu einer verringerten Gesamtmenge an TFF1 führen, da womöglich die Extraktion erschwert wird oder das TFF1 nach der Säulentrennung ausfällt (Abb. 41). Das Elutionsprofil von TFF1 der Größenausschlusschromatographie (S75HL) des Magensaftes bei pH 6 lässt vermuten, dass der die Verschiebung auslösende Prozess bei sauren pH-Werten reversibel ist. Da das Maximum an TFF1 der S75HL des Magensaftes in den Fraktionen C11-D1 eluiert, also früher als in den S75HL-Säulen bei pH 3 und pH 4 (Abb. 30). Dies spricht für einen veränderten hydrodynamischen Radius oder eine Änderung der Tertiärstruktur bei pH-Werten nahe des isoelektrischen Punktes bzw. im sauren Milieu.

5.3 Die unterschiedlichen Entitäten von TFF1 und die verschiedenen Bindungspartner

5.3.1 TFF1 und die Bindung an den Mukus

Der Mukus kleidet das Magenepithel aus und schützt es so vor der Magensäure, Enzymen und anderen äußeren Einflüssen. Im Mukus wird ein pH-Gradient aufgebaut, von etwa pH 7 knapp oberhalb des Epithels zu pH 2 oder niedriger im Magensaft (Bahari et al. 1982; Lewis et al. 2017; Williams and Turnberg 1981). Es wurden deshalb Extraktionen und Größenausschlusschromatographien (S75HL) bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (Abb. 14). Für pH 7 zeigt sich, dass TFF1 zu einem geringen Teil an hochmolekulare Proteine bindet, im Mittel zu etwa 10 % (Abb. 14). Diese 10 % am Gesamtprotein setzen sich zusammen aus dem TFF1-FCGBP-Heteromer und einem mukusassoziiertem TFF1 (Abb. 15, Abb. 20). Für die S75HL-Säulen bei pH 8 liegt der Gehalt an TFF1 in den PAS-positiven Fraktionen ebenfalls bei etwa 10 %, während der TFF1-Anteil für S75HL-Säulen bei pH 6 bei etwa 20 % liegt. Für die zwei Größenausschlusschromatographien bei pH 4 bzw. pH 3 sind

knapp unter 20 % des TFF1 an hochmolekulare Proteine assoziiert (Abb. 14). Die Ergebnisse werden durch die *Blue-Native* Gele gestützt, in denen erneut nur ein kleiner Teil (ca. 5 %) des TFF1 im hochmolekularen Bereich nachweisbar ist (Anhang, Abb. 39). In der Literatur wird der Anteil, des an den Mukus gebundenen TFF1, sehr unterschiedlich angegeben, von unter 1 % bis zum Großteil mukusassoziiert (Kouznetsova et al. 2007a; Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Allerdings gibt es möglicherweise individuelle Unterschiede der einzelnen Korpusproben im Gehalt an mukusassoziiertem TFF1 (Abb. 15D, Abb. 17D, Abb. 18, Abb. 20E). Interessanterweise ist in Proben mit wenig mukusassoziiertem TFF1 auch die Lektinfärbung mit GSAII schwächer (Abb. 15C, Abb. 15D und Abb. 18 Abb. 20E). Vermutlich hängen diese individuellen Unterschiede mit einer unterschiedlichen Glykosylierung der Muzine zusammen, wie es bereits in einer anderen Arbeit beschrieben wurde (Dunne et al. 2018).

Die *in vitro* Bindungsstudien zeigen eine Bindung des synthetischen ^{125}I -TFF1-Homodimers an den Mukus. Das ACM geschützte, synthetische ^{125}I -TFF1-Monomer bindet dagegen nur extrem schwach (Abb. 27). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von rekombinanten TFF1-Homodimer und Analysen einer Größenausschlusschromatographie (Superose 6HR) (Dunne et al. 2018; Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Die Auswertung der Bindungsstudien von ^{125}I -TFF1-Homodimer an Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie (S75HL) und einer Anionenaustauschchromatographie (ResQ) zeigen ein ähnliches Muster wie die Lektinfärbung mit GSAII auf dem Western Blot (Abb. 15C, Abb. 18, Abb. 19). Am Auffälligsten ist die Ähnlichkeit für die Bindung von GSAII und ^{125}I -TFF1-Homodimer an die Muzine im Extrakt E0, da die Signale jeweils auf die Taschen begrenzt sind (Abb. 19). GSAII bindet spezifisch nicht reduzierende α - und β - verknüpfte N-Acetylglucosamin (GlcNAc) Strukturen und kann daher als Nachweis für MUC6 verwendet werden (Ihida et al. 1988). Dies lässt eine Bindung von TFF1 an MUC6 vermuten, wie es für TFF2 bereits gezeigt wurde (Hanisch et al. 2014; Heuer et al. 2019; Ihida et al. 1988). Diese Vermutung wird gestützt durch eine Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer an die Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie (S-500), bei der MUC5AC und MUC6 durch vorheriges Kochen mit 1 % β -Mercaptoethanol getrennt wurden. ^{125}I -TFF1-Homodimer bindet hier vor allem an GSAII positive Fraktionen (Maximum der Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer und Lektinfärbung (GSAII) jeweils bei B12) und fast nicht an Fraktionen, die MUC5AC enthalten (Abb. 17) (Heuer et al. 2019). Dies steht im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Ergebnissen, bei denen für TFF1 eine Bindung mit MUC5AC beschrieben wurde (Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Aufgrund dessen, dass MUC5AC und TFF1 von den Oberflächenepithelzellen

sezerniert werden, wäre eine Bindung von TFF1 an MUC5AC naheliegend (Bolós et al. 1995; Ho et al. 1995; Kouznetsova et al. 2011; Nordman et al. 2002; Rio et al. 1988). MUC6 wird dagegen zusammen mit TFF2 von den Nebenzellen und Antrumdrüsenzellen sezerniert (Bolós et al. 1995; Ho et al. 1995; Kouznetsova et al. 2011; Nordman et al. 2002). Trotzdem wurde in einer neueren Arbeit bereits gezeigt, dass die Bindung von TFF1 an die Muzine mit der Bindung von GSII an die Muzine korreliert (Dunne et al. 2018). Angemerkt sei hier, dass ^{125}I -TFF1-Homodimer *in vitro* auch an Fraktionen bindet, die kein oder nur wenig TFF1 enthalten und die beim Nachweis über Immunfärbung mit dem TFF1-Antiserum keine Signale im Größenbereich der Muzine zeigen (Abb. 18, Abb. 20E).

Für die weitere Charakterisierung der Bindung von TFF1 an MUC6 wurden verschiedene Analysen durchgeführt. So zeigt sich, dass die Bindung von TFF1 an die Muzine bei niedrigeren pH-Werten geringer ist, bei pH 4 um etwa 20-30 % und bei pH 2 sogar um 50-60 % gegenüber der Kontrolle bei pH 7 (Abb. 26A). Diese Ergebnisse zusammen mit den Auswertungen der Größenausschlusschromatographien (S75HL, siehe oben) deuten darauf hin, dass es möglicherweise ein pH-Optimum für die Bindung von TFF1 an den Mukus bei pH 6 gibt, ähnlich wie es für die Bindung von TFF1 an *H. pylori* (pH-Optimum pH 5 bis pH 6) bereits gezeigt wurde (Reeves et al. 2008). Eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration, bzw. das Fehlen von Ca^{2+} im Bindungspuffer, zeigt keinen großen Effekt auf die Bindung von TFF1 an MUC6 (Abb. 26B). Für TFF2 führt das Fehlen von Ca^{2+} dagegen zu einer verminderten Bindungsaffinität (Heuer et al. 2019). Die Zugabe von 30 mM EDTA führt allerdings zu einer fast vollständigen Inhibierung der Bindung von TFF1 an Muzine, weshalb möglicherweise für die Lektinbindung von TFF1 an MUC6 ein anderes zweiwertiges Ion wie z. B. Cu^{2+} benötigt wird (Abb. 26B) (Tosco et al. 2007; Tosco et al. 2010). Es wird vermutet, dass Cu^{2+} wichtig für die Dimerisierung und die Tertiärstruktur ist und somit entscheidend für die Bindung des TFF1-Homodimers an die Muzine (Tosco et al. 2007; Tosco et al. 2010). Das ^{125}I -TFF1-Homodimer konnte nicht an PAP-HSA-gekoppelten Monosacchariden gebunden werden (Abb. 26C). Dies bedeutet, dass für die Bindung möglicherweise ein Polysaccharid notwendig ist, ähnlich wie es für TFF2 mit der Bindung an das Trisaccharid $\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1$ gezeigt wurde (Hanisch et al. 2014). Die Bindung vom ^{125}I -TFF1-Homodimer ließ sich am besten mit β -Methyl-Galaktosid inhibieren (Abb. 26D). Möglicherweise ist β -Methyl-Gal, wie bei TFF2 auch, entscheidend für die Bindung an die Muzine (Heuer et al. 2019). Die Bindung von ^{125}I -TFF1-Homodimer an Muzine ließ sich nicht durch synthetisches TFF1-Homodimer oder TFF1-Monomer(ACM) inhibieren (Anhang, Abb. 42). Zusammen mit der Beobachtung, dass sich die Signale der Bindung von

¹²⁵I-TFF1-Homodimer und die Signale auf dem Western Blot unterscheiden, spricht dies möglicherweise für eine artifizielle Bindung *in vitro*. So nimmt das angelagerte Iod den Raum eines Phenylrings ein und könnte die Tertiärstruktur dadurch stören und somit die Bindung an MUC6 verändern (Lottspeich and Engels 2006). Es wäre aber auch denkbar, dass nicht alle potenziellen Bindungsstellen von MUC6 *in vivo* besetzt sind und die Bindung über eine Ionenkonzentration von Ca²⁺ oder Cu²⁺ reguliert wird (Tosco et al. 2007; Tosco et al. 2010).

Es wurde mit kommerziell erworbenen Muzinpräparationen aus dem Schwein getestet, ob der monoklonale Antikörper HIK1083 und das Lektin GSAII die Bindung von TFF1 an den Mukus inhibieren, wie es für TFF2 gezeigt wurde (Heuer et al. 2019). Der HIK1083 Antikörper bindet an α -gebundene GlcNAc-Strukturen, während das Lektin GSAII sowohl α - als auch β -gebundene GlcNAc-Strukturen erkennt (Ihida et al. 1988; Ishihara et al. 1996). Interessanterweise inhibiert HIK1083 die Bindung deutlich stärker, als GSAII, was dafür spricht, dass TFF1 *in vitro* α -gebundene GlcNAc-Strukturen erkennt (Abb. 37B). Dies ist vergleichbar mit den veröffentlichten Ergebnissen für TFF2 (Heuer et al. 2019). Der Verdau mit Proteinase K führt zu einem verringerten Signal für die Bindung von ¹²⁵I-TFF1-Homodimer, während die GSAII Färbung keine Veränderungen zeigt (Abb. 37D). Es könnte demnach sein, dass nicht nur die Zuckerreste der Muzine Einfluss auf die Bindung haben, sondern auch die vonWillebrand Faktor Domäne des Muzins (Tomasetto et al. 2000).

Da TFF1 *in vitro* nur als Homodimer eine Bindung an das Muzin MUC6 zeigt, wirkt es vermutlich als Quervernetzer indem je eine TFF-Domäne ein MUC6-Monomer bindet und diese verknüpft. So könnte TFF1 wichtig für die Stabilität der Mukusschicht sein, ähnlich wie es auch für TFF2 vermutet wird (Hanisch et al. 2014; Heuer et al. 2019). Allerdings haben die zwei TFF-Domänen im TFF2 einen festen Abstand zueinander, während im TFF1-Homodimer der Abstand der TFF-Domänen sehr flexibel ist (Gajhede et al. 1993; Williams et al. 2001). TFF2 liegt hauptsächlich an MUC6 gebunden vor, TFF1 dagegen zu einem sehr viel geringeren Teil (Heuer et al. 2019). Diese möglicherweise geringere Affinität, dafür höhere Flexibilität könnte wichtig sein, um zwei verschiedene Proteine zu verbinden oder aber auch *H. pylori* an den Mukus zu fixieren z. B. an MUC6 (Dunne et al. 2018; Williams et al. 2001). Dies könnte ein Schutz gegen die Kolonisation von *H. pylori* sein, da MUC6 eine antimikrobielle Wirkung gegen *H. pylori* hat (Dunne et al. 2018; Hanisch et al. 2014; Kawakubo et al. 2004). Interessanterweise wird MUC6 bei einer *H. pylori* Infektion aberrant synthetisiert und teilweise von Oberflächenepithelzellen sezerniert, also Zellen in

denen auch TFF1 synthetisiert wird (Byrd et al. 1997; Kouznetsova et al. 2011; Rio et al. 1988; Xia et al. 2004).

5.3.2 Ein neues Heteromer: Die Bindung von TFF1 an FCGBP

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TFF1, neben MUC6, noch ein weiteres hochmolekulares Protein bindet, das FCGBP und so ein TFF1-FCGBP-Heteromer bildet (Abb. 15D, Abb. 15E, Abb. 20E, Abb. 25C, Abb. 29C). Für FCGBP wurde bereits eine Bindung an TFF3 nachgewiesen, unter anderem im Kolon (Albert et al. 2010). Der relative Anteil an TFF1-FCGBP-Heteromer ist aber deutlich geringer als es für TFF3 gezeigt wurde (Albert et al. 2010). Sowohl TFF1 als auch FCGBP weisen eine ungerade Anzahl an Cysteinen auf (Jakowlew et al. 1984; Kobayashi et al. 1991). Aufgrund dessen dürfte sich, analog zu TFF3, eine kovalente Disulfidbrücke zwischen TFF1 und FCGBP bilden (Albert et al. 2010). So lässt sich TFF1 durch Kochen der Extrakte mit 1 % SDS und 30 mM EDTA nicht vollständig aus dem hochmolekularen Bereich lösen (Abb. 14D). Aufgrund der Ergebnisse mit TFF2 ist anzunehmen, dass die Bindung zu MUC6 gelöst wird, während die kovalente Bindung an FCGBP intakt bleibt (Heuer et al. 2019). Dies wurde durch das Kochen hochmolekularer Fraktionen und anschließender SDS-AgGE und Western Blot bzgl. TFF1 bestätigt (Anhang, Abb. 43D). Kocht man allerdings die Extrakte ohne Zugabe von SDS, fällt das TFF1-FCGBP-Heteromer irreversibel aus (Anhang, Abb. 43D, Abb. 14F). Dies würde erklären, warum das Heteromer nach einer TRIzol[®]-Extraktion nicht mehr nachweisbar ist, da es während der Extraktion ebenfalls denaturiert wird und nicht mehr gelöst werden kann (Anhang, Abb. 47A).

FCGBP ist stark konserviert und kommt in fast allen Cephalochordaten und Vertebraten vor, die N-Domäne von FCGBP ist sogar noch stärker verbreitet und kommt in verschiedenen Proteinen von Bakterien vor (Lang et al. 2016). Die Funktion von FCGBP ist bislang allerdings noch nicht geklärt, obwohl einiges darauf hindeutet, dass FCGBP eine wichtige Rolle für das mukosale Immunsystem spielt (Harada et al. 1997). So wird z. B. die Genexpression von FCGBP durch Interleukin13, ein von T-Helferzellen produziertes Cytokin, induziert (Zhen et al. 2007). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass FCGBP an einen HIV-1 Antikörperkomplex (*human immunodeficiency virus*) binden kann, indem es an den Fc Teil des IgG Antikörpers bindet, das Virus in der Mukusschicht fixiert und eine weitere Ausbreitung verhindert (Schwartz 2014). FCGBP könnte so auch IgG Antikörper, die an *H. pylori* gebunden sind, binden und so möglicherweise zusammen mit TFF1 *H. pylori* fixieren

(Gong et al. 2017; Reeves et al. 2008). Für TFF1 könnte vor allem das CXXC Motiv des FCGBP wichtig sein. Das CXXC Motiv zeigt eine Disulfidisomerase Aktivität und könnte so die Disulfidbrücken des TFF1 spalten, bilden oder neu verknüpfen (Edman et al. 1985; Harada et al. 1997; Hogg 2003). Für TFF3 wurde bereits postuliert, dass das FCGBP eine Rolle bei der Dimerisierung spielt oder die Disulfidbrücke des TFF3-Homodimers spaltet (Albert et al. 2010).

5.3.3 Die Bindung von TFF1 an ein unbekanntes etwa 50-60 kDa großes Protein

Nach TRIzol[®]-Extraktion kann eine weitere hochmolekulare TFF1-Form nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein <66 kDa großes, über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpftes Heteromer aus TFF1 und einem unbekanntem Protein (Abb. 21C Abb. 22C). Das Heteromer kann nach einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE eluiert und auf die charakteristische TFF1 Monomerbande reduziert werden (Abb. 21D). Außerdem konnte TFF1 in dieser 66 kDa Bande massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abb. 22E, Anhang Tab. 7.1). Ein solches Heteromer (53-63 kDa) aus TFF1 und einem unbekanntem Protein wurde bereits 1997 in MCF-7 Zellen beschrieben (Chadwick et al. 1997).

Bei der massenspektrometrischen Analyse wurden zudem eine Reihe von extrazellulären Proteinen identifiziert, darunter die Proteine Suprabasin, Alpha1B-glycoprotein, Hämopexin und AntithrombinIII, die alle ein Molekulargewicht von 50-60 kDa haben. Allerdings weisen alle vier Proteine eine gerade Anzahl an Cysteinresten auf bzw. haben keine Cysteinreste (Suprabasin). Daher ist eine kovalente Bindung mit einem dieser Proteine eher unwahrscheinlich.

Bei der erweiterten Suche von Proteinen mit 40-50 kDa fielen drei weitere Proteine auf, Alpha-1-Antichymotrypsin, Triacylglycerol Lipase (LIPF) und Alpha-1-Antitrypsin, die aufgrund ihrer Glykosylierungen ebenfalls das nötige Molekulargewicht hätten. Die Magenlipase wird im Magen Korpus ebenso wie TFF1 von den Oberflächenepithelzellen sezerniert und besitzt drei Cysteinreste, wovon zwei über ein Disulfid verknüpft sind (Kouznetsova et al. 2011; Rio et al. 1988; Roussel et al. 1999). Allerdings liegt der freie Cysteinrest tief im aktiven Zentrum, weshalb eine Bindung von TFF1 nahezu ausgeschlossen ist (Roussel et al. 1999). Es wäre allerdings möglich, dass durch die Denaturierung mit Guanidiniumthiocyanat das aktive Zentrum zugänglich wird, TFF1 an den dann freien Cysteinrest bindet und so ein Heterodimer bildet. Ein solches Artefakt kann sich natürlich

auch mit anderen Proteinen durch die Extraktion mit TRIzol[®] bilden. Eine <66 kDa Bande ist auch im hochmolekularen Bereich von Extraktionen ohne TRIzol[®] sichtbar, allerdings zu schwach um diese analysieren zu können (Daten nicht gezeigt). Die zwei hier gefundenen Proteaseinhibitoren (Alpha-1-Antichymotrypsin, Alpha-1-Antitrypsin) haben den freien Cysteinrest jeweils an der Außenseite ihre Struktur zu Beginn von β -Faltblatt Strukturen (Lukacs et al. 1998; Ryu et al. 1996). Hier stellt sich allerdings die Frage, inwieweit diese Proteine ins Magenlumen sezerniert werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass auch mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse dieser Bindungspartner von TFF1 nicht identifiziert werden konnte. Da es neben den hier gezeigten Ergebnissen noch eine weitere Arbeit gibt, die dieses Heteromer gesehen haben, ist davon auszugehen, dass es sich um eine weitere TFF1-Form handelt (Chadwick et al. 1997). Vermutlich macht dieses Heteromer aber den kleinsten Teil am gesamten TFF1 im Magen aus.

5.3.4 TFF1 und die Bindung an GKN2

TFF1 bildet ein über Disulfidbrücken, kovalent verknüpftes, 25 kDa großes Heterodimer mit GKN2. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das TFF1-GKN2-Heterodimer nicht die Hauptentität von TFF1 ist (Abb. 16A, Abb. 20B, Abb. 21E). Dies steht im Gegensatz zu den bislang veröffentlichten Daten in denen das TFF1-GKN2-Heterodimer stets die Hauptentität des TFF1 bildet (Kouznetsova et al. 2007a; May et al. 2009; Newton et al. 2000; Westley et al. 2005). Das Fehlen von GKN2 führt zur Bildung von TFF1-Homodimeren, was die Zellmotilität und die Zellmigration von Tumorzellen erhöht (May et al. 2009). Der Unterschied zwischen den hier gezeigten Ergebnissen und den bereits veröffentlichten Ergebnissen, kommt möglicherweise durch das Verwenden unterschiedlicher Antisera bzw. unterschiedlicher Methoden zustande. Denn wie in Abb. 12 gezeigt, führt schon eine kleine Änderung bei der Reduktion der nicht-reduzierenden SDS-PAGE zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Elution der Banden zeigt aber, dass das TFF1-Monomer die Hauptentität ist (Anhang Abb. 40).

Das TFF1-GKN2-Heterodimer ist zum Teil schwer wasserlöslich und lässt sich am besten nach einer TRIzol[®]-Extraktion nachweisen bzw. in Extrakten die mit SDS behandelt wurden (Abb. 20B, Abb. 21E, Abb. 22B, Abb. 22D, Anhang Abb. 45). Ein kleiner Teil des TFF1-GKN2-Heterodimers ist allerdings sehr leicht löslich und lässt sich durch einfaches

Waschen des Gewebes (Extrakt E0) lösen (Abb. 20B). Dieses im Extrakt E0 enthaltene TFF1-GKN2-Heterodimer ist nicht an den Mukus assoziiert, was mit den bislang veröffentlichten Ergebnissen übereinstimmt (Abb. 23C) (Kouznetsova et al. 2007a; Newton et al. 2000). In den schwerlöslichen Extrakten E3-E4 ist das TFF1-GKN2-Heterodimer nach Größenausschlusschromatographie dagegen in den PAS-positiven Fraktionen nachweisbar und somit wahrscheinlich an den Mukus assoziiert (Abb. 23D). In Korpusproben der Extrakte E1 und Gesamtextrakte En lässt sich das TFF1-GKN2-Heterodimer dagegen nahezu nicht nachweisen (Abb. 20B, Abb. 28A, Abb. 28B). Zumindest im Gesamtextrakt En sollte das TFF1-GKN2-Heterodimer aber detektierbar sein, da die vorangehende Extraktion mit E0 fehlt. Möglicherweise wird das nicht-mukusassoziierte, leicht lösliche TFF1-GKN2-Heterodimer beim Zellaufschluss mit Precellys durch Freisetzen von Reduktionsäquivalenten reduziert oder durch Proteasen, trotz der im Extraktionspuffer enthaltenen Proteaseinhibitoren abgebaut.

Für GKN2 ist neben dem TFF1-GKN2-Heterodimer ebenfalls ein GKN2-Monomer nachweisbar, was aufgrund der ungeraden Anzahl an Cysteinresten (fünf Cys) ungewöhnlich ist (Westley et al. 2005). Das GKN2-Monomer stellt zumindest im Korpus die Haupttität vor dem TFF1-GKN2-Heterodimer dar (Abb. 22F, Abb. 28B). Im Antrum ist das Verhältnis von GKN2-Monomer und TFF1-GKN2-Heterodimer nahezu 1:1 (Abb. 28B). Bislang wurde das TFF1-GKN2-Heterodimer ebenfalls als Haupttität von GKN2 im Magen beschrieben (May et al. 2009). Ein sehr geringer Teil des GKN2 liegt mukusassoziiert als GKN2-Homodimer vor (Abb. 21F). Das GKN2-Monomer und das GKN2-Homodimer wurden in dieser Arbeit aber nicht weiter analysiert, da der Fokus hier auf TFF1 lag.

Trotz seines geringen Anteils spielt das TFF1-GKN2-Heterodimer möglicherweise eine entscheidende Rolle beim Schutz vor Magentumoren. Alle *Tff1*^{KO}-Mäuse bilden im Antrum Adenome, die in 30 % der Fälle zu Karzinomen werden (Lefebvre et al. 1996). *Gkn2*^{KO}-Mäuse bilden zwar spontan keine Tumore, bei chronischen Entzündungen, z. B. induziert durch eine *H. pylori* Infektion, ist das Tumorwachstum aber erhöht (Menheniott et al. 2016). Es wurde außerdem gezeigt, dass das TFF1-GKN2-Heterodimer anti-proliferative Wirkung hat und Apoptose durch Stimulation der Caspase3/7 Aktivität in Magenkrebszellen induziert (Kim et al. 2017).

Für GKN1 konnte keine Bindung an TFF1 nachgewiesen werden, was aufgrund der geraden Anzahl an Cysteinresten (vier Cys) nicht überrascht. Aufgrund des ähnlichen Elutionsprofils von GKN2-Monomer und GKN1, ist GKN1 vermutlich an kein weiteres Protein gebunden

und so lässt sich auf der nicht-reduzierenden SDS-PAGE nur eine Bande für GKN1 nachweisen (Abb. 15B, Abb. 21B, Anhang, Abb. 43B). Dies zeigt, dass es keine Interaktion von TFF1 mit der BRICHOS-Domäne gibt und untermauert das Ergebnis, dass TFF1 und GKN2 kovalent über die freien Cysteinreste (Cys-58 und Cys-38) miteinander verknüpft sind (Westley et al. 2005). Anzumerken ist die Kreuzreaktivität des a-hGKN2-1 Antiserums, das sowohl GKN1, als auch GKN2 erkennt (Abb. 21G). Dies ist vermutlich aufgrund der Ähnlichkeit der zwei BRICHOS-Domänen möglich, gegen deren Sequenz das polyklonale Antiserum entwickelt wurde. GKN1 wird im Tumorgewebe häufig weniger synthetisiert, ebenso wie es für GKN2 und auch TFF1 gezeigt wurde (Du et al. 2003; Lefebvre et al. 1996; Luqmani et al. 1989; Moss et al. 2008; Ren et al. 2006). GKN1 wirkt also möglicherweise auch ohne Bindungspartner als Tumorsuppressor (Yoon et al. 2011; Yoshikawa et al. 2000).

5.3.5 Das TFF1-Homodimer

In der Literatur wurde für das TFF1-Homodimer die größere biologische Funktion gegenüber dem Monomer gezeigt, unter anderem in *in vitro* Zellmigrationstests (Calnan et al. 1999; Marchbank et al. 1998). Gleichzeitig macht das TFF1-Homodimer die geringste Menge am gesamten TFF1 aus (Newton et al. 2000). Dieses Ergebnis konnte nur zum Teil reproduziert werden. Das TFF1-Homodimer kann als 18 kDa Bande in den niedermolekularen Fraktionen der Größenausschlusschromatographien nachgewiesen werden (Abb. 16B, Abb. 21C). Dass es sich bei dieser 18 kDa Bande um das TFF1-Homodimer handelt, kann sowohl durch Elution der Bande mit anschließender Reduktion zur TFF1-Monomerbande, als auch durch den Vergleich mit dem synthetischen TFF1-Homodimer bestätigt werden (Abb. 16C, Abb. 24A) (Braga Emidio et al. 2020). Das TFF1-Homodimer reagiert nicht mit PEG-maleimid, was auf die Dimerisierung über ein Disulfid hinweist (Williams et al. 2001). Die Bindung an den Mukus des TFF1-Homodimers konnte über Western Blot Analysen und über Bindungsstudien gezeigt werden, allerdings anders als bisher, nicht an MUC5AC sondern zumindest *in vitro* an MUC6 (Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20E) (Ruchaud-Sparagano et al. 2004). Der größte Teil des TFF1-Homodimers ist nicht mukusassoziiert und eluiert in den niedermolekularen Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie (Abb. 16B, Abb. 21C). Im Gegensatz zum TFF1-GKN2-Heterodimer, lässt sich das TFF1-Homodimer nach der mehrstufigen Extraktion in allen Extrakten (E0, E1, E3-E4) gleichermaßen nachweisen (Abb. 20B). Hierzu ist anzumerken, dass sich das TFF1-Homodimer in den Extrakten ohne chromatographische Säulen-Trennung teilweise schlechter nachweisen lässt als das TFF1-GKN2-Heterodimer,

nach der Trennung durch Chromatographie aber besser (Abb. 16B, Abb. 21C, Abb. 28A). Dies bedeutet, dass entweder das TFF1-GKN2-Heterodimer während der Säulen-Trennung abgebaut oder reduziert wird oder aber ein Teil der TFF1-Monomere dimerisieren. Allerdings geht das TFF1-Homodimer bei der Lagerung bei 4 °C wieder verloren (Abb. 13). Diese Beobachtungen könnten für einen reversiblen Prozess der Dimerisierung von TFF1 sprechen, der von verschiedenen Faktoren, wie Ionenkonzentration oder pH-Wert, abhängt (Williams et al. 2001). Möglicherweise spielt die Bindung von Cu^{2+} an den C-Terminus bei der Bildung des TFF1-Homodimers eine Rolle (Tosco et al. 2010). Es könnte auch sein, dass die Dimerisierung durch FCGBP extrazellulär induziert wird, so wie es bereits für TFF3 postuliert wurde (Albert et al. 2010). FCGBP enthält das CXXC Motiv, für das Disulfidisomeraseaktivität nachgewiesen wurde und das ebenfalls im vonWillebrand Faktor enthalten ist (Harada et al. 1997; Hogg 2003). Möglicherweise werden durch die Reduktion des TFF1-Homodimers bzw. die Oxidation des TFF1-Monomers unterschiedliche Funktionen aktiviert (Hogg 2003; Yi and Khosla 2016). Die Bildung des TFF1-Homodimers könnte für die Bindung an die Muzine und damit die Stabilität bzw. Flexibilität der Mukusschicht wichtig sein (Williams et al. 2001). Es wäre auch möglich, dass das TFF1-Homodimer bestimmte Signalwege aktiviert, so wurde für TFF2 und TFF3 eine Bindung an Rezeptoren (CXCR4 und CXCR7, *C-X-C chemokine receptor*) beschrieben (Dieckow et al. 2016; Dubeykovskaya et al. 2009). Allerdings bindet TFF3 nur als Homodimer an den Rezeptor CXCR7 (Dieckow et al. 2016). Es wird vermutet, dass TFF1 die TNF- α -vermittelte (*tumor necrosis factor*) NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Aktivierung unterdrückt, da TFF1 die Bindung von TNFR1 (TNF-Rezeptor Typ1) an TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) unterbindet (Soutto et al. 2011).

5.3.6 Die zwei Monomere

In mehreren bislang veröffentlichten Arbeiten wurde ein TFF1-Monomer gefunden, was aufgrund der ungeraden Anzahl an Cysteinresten ungewöhnlich für ein sezerniertes Peptid bzw. Protein ist (Jakowlew et al. 1984; Newton et al. 2000; Westley et al. 2005). Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass es nicht nur eine monomere TFF1-Form gibt, sondern sogar zwei (Abb. 16C, Abb. 22). Nach einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot erscheinen die monomeren TFF1-Formen als Doppelbande bei 14 kDa bzw. <14 kDa. Die massenspektrometrische Analyse zeigt, dass es sich bei beiden Banden um TFF1 handelt (Abb. 22, Anhang Tab. 7.2). Interessanterweise zeigt nicht nur das

gereinigte TFF1 diese Doppelbande, sondern auch das synthetische TFF1-Monomer(ACM) (Abb. 24A). Das siebte Cystein (Cys-58) im synthetischen TFF1-Monomer(ACM) ist an eine Acetamidomethylgruppe gekoppelt, dies macht eine Oxidation von Cys-58 unmöglich (Braga Emidio et al. 2020). Daher ist es unwahrscheinlich, dass sich die zwei TFF1-Monomere durch eine post-translationale Modifikation unterscheiden. Da das synthetische TFF1-Monomer ebenfalls eine Doppelbande bildet, können auch eine Bindung an ein sehr kleines Peptid, sowie ein verändertes Laufverhalten durch die Bindung an zweiwertige Ionen (Ca^{2+} , Cu^{2+}) ausgeschlossen werden (Tosco et al. 2007). Daher ist eine Konformationsänderung die wahrscheinlichste Erklärung, auch wenn bislang eine Änderung der Disulfidpaarung für TFF1 ausgeschlossen wurde (Polshakov et al. 1997). Es wurde allerdings bereits in einer vorherigen Studie eine alternative TFF1-Struktur beschrieben (Rye et al. 1994). Für TFF2 wird ebenfalls eine Konformationsänderung durch Änderung der Disulfidpaarungen vermutet, dabei wird eine Disulfidbrücke (Cys-6, Cys-104) als sensitiv gegenüber Reduktion beschrieben (Heuer et al. 2019; Otto et al. 1996). Allerdings besteht TFF2, im Gegensatz zu TFF1, aus zwei TFF-Domänen und diese Disulfidpaarung (Cys-6, Cys-104) fehlt bei TFF1 (Jakowlew et al. 1984; Jørgensen et al. 1982). Eine extrazelluläre Umstrukturierung der Disulfidpaarung (von inter- zu intramolekularen) wird auch für den vonWillebrand Faktor vermutet, hier womöglich ausgelöst durch freie Thiolgruppen der Cysteinreste im Inneren der Proteinstruktur (Ganderton et al. 2007; Luken 2008). Bei TFF1 könnte die Umstrukturierung der Disulfide auch durch die Disulfidisomerase Aktivität des FCGBP ausgelöst werden (Edman et al. 1985; Harada et al. 1997).

Dennoch bleibt die Frage, wieso es überhaupt ein TFF1-Monomer mit einem ungepaarten Cysteinrest gibt, da freie Thiole als Retentionssignal wirken, was schlussendlich zum Abbau des Proteins bzw. Peptids im Endoplasmatischen Retikulum (ER) führt (Fra et al. 1993). Es gibt Hinweise, dass dieser Prozess durch saure Aminosäuren in der Nähe des Cysteinrestes gestoppt werden kann so z. B. bei der Sekretion von Ig *light chains* (Guenzi et al. 1994; Reddy et al. 1996). TFF1 hat vier Glutamatreste in unmittelbarer Nähe des siebten Cysteinrestes (Cys-58) und könnte dementsprechend vor dem Abbau geschützt sein (Jakowlew et al. 1984). Ein Schutz gegen den Abbau von Ig *light chains* Monomeren im ER bietet die Oxidation des freien Cysteinrestes (Reddy et al. 1996). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass nur ein Teil der Monomere oxidiert wird (Abb. 16D, Abb. 24B, Abb. 24C). Dabei liegt vermutlich keine Oxidation zur Sulfensäure vor, da die Reaktion mit DCP-Bio negativ ist (Abb. 24D). Allerdings sind Sulfensäuren sehr instabil und reaktiv, weshalb sie nicht so leicht nachgewiesen werden können (Le Moan et al.

2006). Es bedarf also weiterer Versuche um die Oxidation zur Sulfensäure komplett auszuschließen. Ein Teil der TFF1-Monomere reagiert dagegen mit PEG-maleimid und bildet Thioether (Abb. 16D, Abb. 24B, Abb. 24C). Das zeigt, dass der Cysteinrest (Cys-58) als freies Thiol vorliegt.

Die Thiolgruppe eines Cysteinrestes hat normalerweise einen pKs-Wert von ca. 8.5, allerdings hängt dieser stark von der chemischen Umgebung ab und kann durch hydrophobe oder saure Aminosäuren erhöht werden (Hennecke et al. 1997; Kyte 2007; Poole 2015). Weil das Cys-58 aber stark exponiert ist, könnte es trotzdem ausreichend reaktiv sein, da die Nucleophilie des Thiols nicht alleine vom pKs abhängt (Guenzi et al. 1994; Poole 2015). Thiole von Cysteinresten sind sehr sensitiv für oxidierende Spezies wie z. B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und können zu Sulfensäuren, Sulfinsäuren, Sulfonsäuren sowie zu gemischten Disulfiden oder S- glutathiolierten Derivaten oxidiert werden (Lugrin et al. 2014; Shao et al. 2011). Die Thiole an Cysteinresten können auch durch reaktive Stickstoffspezies (RNS) modifiziert werden (S-Nitrosothiole) (Foster et al. 2003; Lugrin et al. 2014). ROS und RNS können als *second messenger* fungieren, allerdings führt ein Überschuss an reaktiven Spezies zu oxidativen Stress und entsprechend pathologischen Bedingungen (Murray and van Eyk 2012). ROS entstehen bei verschiedenen enzymatischen Prozessen z. B. durch NADPH-Oxidasen (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) (Lugrin et al. 2014). NADPH-Oxidasen, wie z. B. DUOX (Dual oxidase) werden bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen oder bei Besiedlungen mit Bakterien, wie *H. pylori* aktiviert und produzieren H₂O₂ (Grasberger et al. 2013; Suzuki et al. 2012). TFF1 könnte mit den ROS, wie H₂O₂ reagieren und oxidativen Stress verhindern.

RNS wie z. B. NO werden durch NO-Synthasen (Stickstoffmonoxid-Synthase) produziert, können aber auch durch aufgenommenes Nitrat entstehen (Foster et al. 2003; Lugrin et al. 2014). Aus Nitrat kann über Nitrit auch NO⁺ entstehen, was wiederum zur Bildung von N-Nitroso-Verbindungen führen kann, die Mutagen und Kanzerogen sind (Correa 1992; Kobayashi et al. 2019). Das könnte ein Grund sein warum TFF1 auch im Magensaft vorkommt, vor allem in der monomeren Form (Abb. 30C). Die Reaktion von RNS mit Thiolen an Cysteinresten kann interessanterweise durch flankierende saure und basische Aminosäurereste erleichtert und durch Kupferionen katalysiert werden (Foster et al. 2003; Gu et al. 2002). TFF1 besitzt vier Glutamatreste in der Nähe von Cys-58 und eine Bindung von Cu²⁺ ist bereits beschrieben worden (Jakowlew et al. 1984; Tosco et al. 2010). Es ist also durchaus denkbar, dass TFF1 auch mit RNS reagiert.

TFF1 könnte also beim Schutz der Magenmukosa vor oxidativen Stress eine Rolle spielen. Möglicherweise im Zusammenspiel mit FCGBP, dass das oxidierte TFF1 wieder reduzieren könnte, ähnlich wie es für das intrazelluläre Peroxiredoxin/Thioredoxin-System gezeigt wurde (Harada et al. 1997; Monteiro et al. 2007; Stancill et al. 2019).

TFF1 wurde bislang immer als extrazelluläres Peptid beschrieben, aber es gibt eine Arbeit die zeigt, dass das Fehlen von TFF1 zu einer *unfolded protein response* (UPR) führt und somit eine Funktion von TFF1 im Endoplasmatischem Retikulum (ER) vermuten lässt (Jakowlew et al. 1984; Torres et al. 2002). TFF1 könnte wichtig sein, für die richtige Faltung von Proteinen im Speziellen von Muzinen, so z. B. bei der Bildung von Disulfidbrücken. So zeigten *Tff1^{KO}*-Mäuse im Antrum neben einer verdickten Mukosa, die hauptsächlich aus Vorläuferzellen besteht, auch eine verringerte Mukusschicht (Karam et al. 2008; Lefebvre et al. 1996; Tomasetto and Rio 2005).

5.4 Die Unterschiede zwischen Korpus und Antrum

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich der Magen Korpus analysiert, allerdings wurden auch Proben des Magen Antrums untersucht. Die Extrakte des Antrums zeigen im Wesentlichen die gleichen TFF1-Entitäten wie die Extrakte des Korpus, also eine nicht-kovalente Bindung an MUC6, das TFF1-FCGBP-Heteromer, das TFF1-GKN2-Heterodimer, das TFF1-Homodimer und zwei TFF1-Monomere (Abb. 25, Abb. 28, Abb. 29). Für das Antrum wurde keine TRIzol[®]-Extraktion durchgeführt, weshalb im Antrum keine Aussage in Bezug auf das <66 kDa große Heteromer getroffen werden kann (vgl. Abb. 22C). Die stufenweise Extraktion zeigt eine vergleichbare Verteilung der untersuchten Proteine bzw. Peptide (Muzine (PAS), GKN1, GKN2, TFF1) in den Extrakten E0, E1, E3-E4 von Korpus und Antrum (Abb. 25A). Die Immunfärbung bzw. Lektinfärbung der Western Blots mit MUC5AC, GSALII und FCGBP zeigen ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 25B). Sowohl im Antrum als auch im Korpus ist die Menge an MUC5AC und MUC6 im Extrakt E0 geringer (Abb. 25B). Dagegen lässt sich das TFF1-FCGBP-Heteromer in den untersuchten Korpus bzw. Antrumproben im Extrakt E3-E4 fast nicht nachweisen (Abb. 25C). Die Bindung von TFF1-Homodimer an MUC6 unterscheidet sich *in vitro* ebenfalls nicht in den zwei untersuchten Magenregionen Korpus und Antrum (Abb. 26, Abb. 27).

Auffälligkeiten gibt es dagegen bei der Analyse der niedermolekularen TFF1-Formen, dem TFF1-GKN2-Heterodimer und den TFF1-Monomeren (Abb. 28). Das

TFF1-GKN2-Heterodimer lässt sich im Antrum in allen Extrakten (E0, E1, E3-E4), und deutlich besser als im Korpus nachweisen (Abb. 28A, Abb. 28B). Dies gilt sowohl für die Immunfärbung mit dem TFF1-Antiserum, als auch dem GKN2-Antiserum. GKN2 kommt im Korpus hauptsächlich als Monomer vor, während im Antrum etwa gleiche Mengen an GKN2-Monomer und TFF1-GKN2-Heterodimer vorliegen (Abb. 28B). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Genexpression von *TFF1* und *GKN2*, vor allem im Korpus, nicht parallel sind (Kouznetsova et al. 2011). Dies deutet darauf hin, dass das TFF1-GKN2-Heterodimer im Antrum eine bedeutendere Rolle einnimmt als im Korpus. Antrumdrüsen und Korpusdrüsen unterscheiden sich in den Stammzellen am Drüsengrund, die Antrumeinheit besitzt LGR5⁺ Stammzellen (*leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*), während die Funduseinheit TROY⁺ Stammzellen (TNFRSF19, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 19*) hat (Barker et al. 2010; Hoffmann 2015; Stange et al. 2013). LGR5⁺ Stammzellen sind charakteristisch für Gewebe mit hohem epithelialen Zellumsatz, wie z. B. dem Darm (Barker et al. 2010). So hat auch die Antrummukosa einen höheren Zellumsatz und eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zur Korpusmukosa (Barker et al. 2010; Hoffmann 2015; Kouznetsova et al. 2011; Patel et al. 1993). Dies macht das Antrum vermutlich anfälliger für Tumorbildung und interessanterweise bilden *Tff1*^{KO}-Mäuse Adenome bzw. Tumore ausschließlich in dieser Region des Magens (Lefebvre et al. 1996). Das TFF1-GKN2-Heterodimer könnte mit der nachgewiesenen anti-proliferativen und pro-apoptotischen Wirkung die Tumorbildung vor allem im Antrum unterdrücken (Kim et al. 2017). Neben dem TFF1-GKN2-Heterodimer ist auch das größere TFF1-Monomer (14 kDa) im Antrum im Verhältnis zu den anderen Formen präserter als es im Korpus der Fall ist (Abb. 28A). Wobei sowohl im Korpus als auch im Antrum die TFF1-Monomere vor allem in den leicht löslichen Extrakten E0 und E1 zu finden sind (Abb. 28A). Die TFF1-Monomere reagieren im Korpus (E0, E1) mit PEG-maleimid, im Antrum dagegen fast nicht (nur schwach in E1) (Abb. 28C). Möglicherweise ist beim größeren TFF1-Monomer (14 kDa) das Thiol am Cysteinrest (Cys-58) weniger zugänglich und kann somit nicht mit PEG-maleimid reagieren. Unter der Annahme, dass das freie Thiol von Cys-58 als ROS Fänger dient, könnten diese Unterschiede damit zusammenhängen, dass der ROS Gehalt im Korpus vierfach höher ist als im Antrum, weshalb es im Korpus mehr oxidierbare Thiolgruppen geben sollte (Suzuki et al. 2010).

5.5 TFF1 und die Bindung an *H. pylori*

Das TFF1-Homodimer bindet an die Lipopolysaccharidschicht (LPS) von *H. pylori* (Clyne et al. 2004; Reeves et al. 2008). Um zu überprüfen, ob das hier verwendete, synthetische TFF1-Homodimer ebenfalls an *H. pylori* bindet, wurde es an verschiedene *H. pylori* Stämme, sowie gereinigte LPS-Proben gebunden. Dabei zeigt sich, dass nur das synthetische TFF1-Homodimer, nicht aber das rek. TFF1-Monomer oder pTFF2 an die LPS-Schicht von *H. pylori* bindet (Abb. 31). Dies stimmt mit der bislang veröffentlichten Literatur überein (Clyne et al. 2004; Reeves et al. 2008). Die LPS-Schicht ist Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und besteht aus dem Lipid A, dem inneren- und äußeren Polysaccharidkern, sowie dem O-Ketten Polysaccharid (O-Antigen) (Abb. 38) (Li et al. 2016). Mittlerweile werden der äußere Polysaccharidkern und das O-Antigen zusammengefasst und als O-Antigen bezeichnet, zur besseren Übersicht wurde die alte Darstellung gezeigt (Abb. 38) (Li et al. 2016; Li et al. 2018).

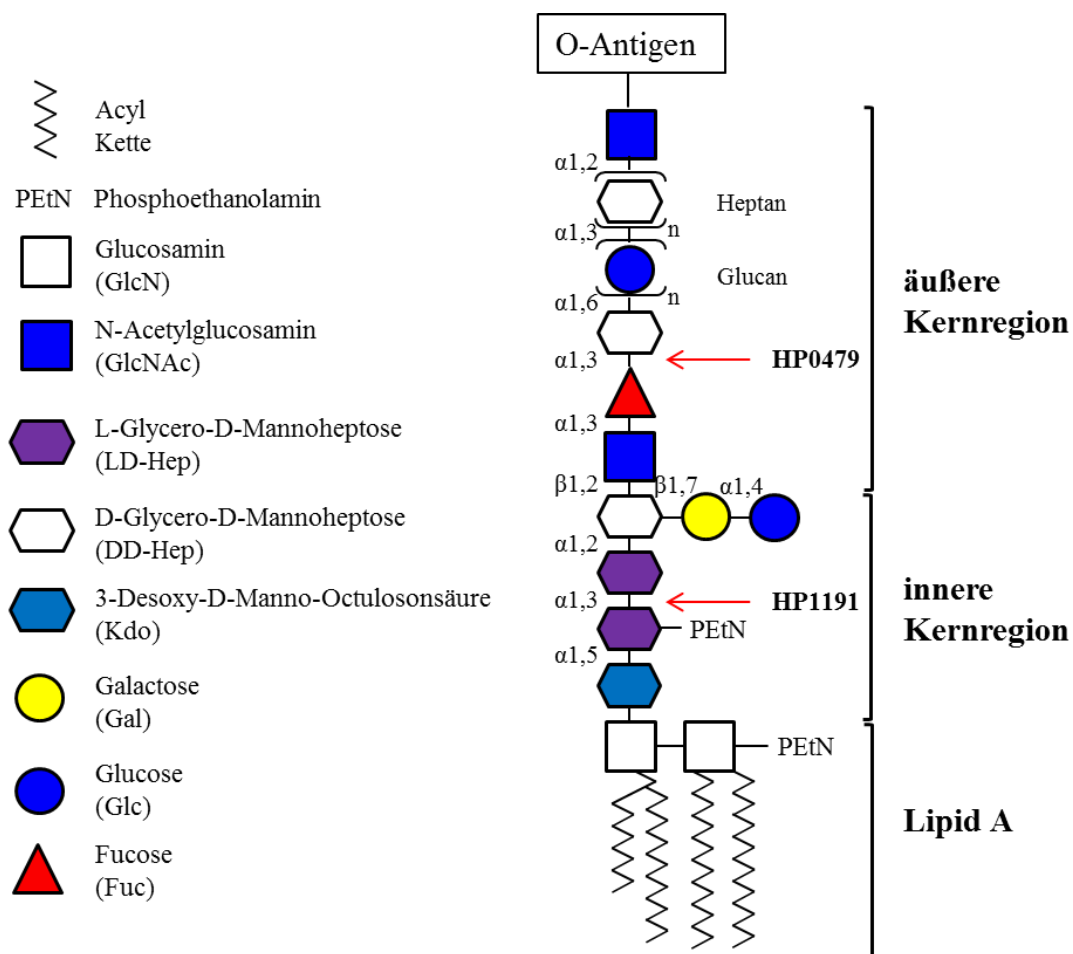


Abb. 38: Schematische Darstellung der LPS-Schicht von *H. pylori* (Stamm 26695).

Die roten Pfeile markieren jeweils die Stelle an der das fehlende Enzym (Transferase) zur Unterbrechung der Polysaccharidkette führt. Nach Li et al. 2016

Das Lipid A verankert das LPS in der äußeren Membran von *H. pylori* (Li et al. 2016). Die innere Kernregion ist sehr konserviert, auch innerhalb verschiedener Bakterien, und enthält üblicherweise zwei L-Glycero-D-Mannoheptosen (LD-Hep), die als HepI und HepII bezeichnet werden (Li et al. 2016; Raetz and Whitfield 2002). D-Glycero-D-Mannoheptose (HepIII) ist dagegen selten und daran ist die einzige Verzweigung mit Glc-Gal gebunden (Altman et al. 2011; Hiratsuka et al. 2005; Li et al. 2016). An HepIII schließt die äußere Kernregion mit dem in den verschiedenen *H. pylori* Stämmen konservierten Trisaccharid aus DD-Hep-Fuc-GlcNAc an (Altman et al. 2011; Li et al. 2016; Li et al. 2018). Daran sind häufig die Homopolymere aus Glucan (Glc) und Heptan (DD-Hep) geknüpft. Dieser Teil ist variabel und kann auch aus anderen Homopolymeren bestehen (Altman et al. 2011; Li et al. 2016). Zum Schluss ist das O-Antigen angehängt das in der Regel verschiedene Lewis-Antigene enthält (Edwards et al. 2000; Li et al. 2016). Das gesamte LPS wird als *smooth-form* LPS (SF-LPS) bezeichnet, fehlt das O-Antigen dann als *rough-form* LPS (RF-LPS) (Clyne and May 2019).

Die Ergebnisse mit den *H. pylori*-Mutanten P12 Δ HP1191 und P12 Δ HP0479 zeigen, dass TFF1 an das RF-LPS bindet und bestätigen damit vorige Studien (Abb. 31B) (Reeves et al. 2008). So kodiert das Gen HP0479 für eine D-Glycero-D-Manno-Heptosyltransferase, welche eine Fucose mit einer D-Glycero-D-Mannoheptose verknüpft (Abb. 38) (Hiratsuka et al. 2005; Li et al. 2016). Dieser Mutante P12 Δ HP0479 fehlt vor allem das O-Antigen, sowie die repetitiven Einheiten der äußeren Kernregion (Hiratsuka et al. 2005; Li et al. 2016). An gereinigte LPS-Proben dieser Mutante (P12 Δ HP0479) kann das TFF1-Homodimer binden (Abb. 31B). Allerdings sei angemerkt, dass keine Bindung an die Zell-Lysate der *H. pylori* Mutante Δ HP0479 gezeigt werden konnte, auch nicht in anderen Stämmen als P12 (Abb. 31B, Daten der anderen Stämme nicht gezeigt). Trotzdem lässt dies vermuten, dass das O-Antigen keine Rolle für die Bindung von TFF1 spielt, sondern die enthaltenen Lewis-Antigene nur eine Erkennung durch das Immunsystem verhindern (Dolan et al. 2012; Edwards et al. 2000; Moran 2008; Reeves et al. 2008). Das Gen HP1191 kodiert dagegen für eine LD-Heptosyltransferase, die die L-Glycero-D-Mannoheptose (HepII) mit der L-Glycero-D-Mannoheptose (HepI) verknüpft (Abb. 38) (Chandan et al. 2007; Li et al. 2016). Bei der Mutante P12 Δ HP1191 fehlt also die gesamte äußere Kernregion und das O-Antigen, sowie Teile der inneren Kernregion (Abb. 38) (Chandan et al. 2007; Li et al. 2016). Die LPS-Schicht ist dementsprechend stark verkürzt und reicht nicht aus um an TFF1 zu binden (Abb. 31B). Außerdem zeigte diese Mutante eine geringere Kolonisation von HT29-MTX-E12 Zellen verglichen mit dem WT Stamm (Dolan et al. 2012). Die Ergebnisse der hier vorgelegten

Arbeit mit den Mutanten Δ HHP1191 und Δ HHP0479 lassen darauf schließen, dass TFF1 zwischen der inneren und der äußeren Kernregion bindet. Die innere Kernregion, sowie das Trisaccharid aus DD-Hep-Fuc-GlcNAc ist konserviert in den verschiedenen isolierten *H. pylori*-Stämmen. Es ist also durchaus plausibel, dass TFF1 gerade in dieser Region bindet (Abb. 38) (Li et al. 2016; Li et al. 2018). Ein Zuckerrest der für die Bindung von TFF1 relevant sein könnte, ist das N-Acetylglucosamin, da es Bestandteil des Trisaccharids (GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1) ist, welches die Bindestelle für TFF2 darstellt (Hanisch et al. 2014). Die Galactose könnte ebenfalls eine Rolle für die Bindung von TFF1 spielen, da β -Me-Galaktose die Bindung an MUC6 am stärksten inhibierte (Abb. 26D). Da TFF1 vermutlich an MUC6 und an *H. pylori* über die hydrophobe Tasche (Phe-19, Pro-20, Pro-42 und Trp-43) bindet, ist anzunehmen, dass gleiche oder zumindest ähnliche Zucker erkannt werden (Polshakov et al. 1997). Es ist sehr wahrscheinlich, dass TFF1 an mehr als einen Zuckerrest von *H. pylori* bindet, da die Versuche mit den PAP-HSA-Konjugaten, darunter auch N-Acetylglucose-PAP-HSA-Konjugate und Galactose-PAP-HSA-Konjugate, alle negativ waren (Abb. 26C). Eine mögliche Bindestelle könnte das konservierte Trisaccharid DD-Hep-Fuc-GlcNAc sein. Das Fehlen von DD-Hep in der *H. pylori* Mutante P12 Δ HHP0479 würde dann dazu führen, dass in den Zell-Lysaten keine Bindung nachweisbar ist, in dem gereinigten LPS reichen möglicherweise die zwei Zuckerreste Fuc-GlcNAc aus, vermutlich aufgrund der höheren Konzentration (Abb. 31).

H. pylori kolonisiert hauptsächlich die Region 0-25 μ m oberhalb der Gewebeoberfläche, also einem Bereich in dem der pH-Wert nahezu neutral ist (Schreiber et al. 2004). Das TFF1-Homodimer zeigt ein pH-Optimum für die Bindung an *H. pylori* bei pH 5 – pH 6 (Reeves et al. 2008). TFF1 sorgt also dafür, dass *H. pylori* nicht weiter in den Mukus eindringt und an die Epithelzellen bindet. Dies führt ansonsten zu schwereren Entzündungen, wie die Versuche mit *Tff1*^{KO}-Mäusen zeigten (Dunne et al. 2018; Soutto et al. 2015). TFF1 fixiert *H. pylori* also an den Mukus, vermutlich an MUC6 und könnte so eine Ausbreitung des Bakteriums verhindern, ähnlich wie es für TFF2 im Mausmodell mit *Escherichia coli* K1 gezeigt wurde (McCarthy et al. 2019). Bei einer *H. pylori* Infektion wird die Biosynthese von MUC6, neben TFF2, erhöht, außerdem zeigt MUC6 antibiotische Wirkung gegen *H. pylori* (Kawakubo et al. 2004; Xia et al. 2004). So könnte *H. pylori* durch TFF1 und MUC6 bekämpft und gleichzeitig die Stabilität des Mukus durch TFF2 erhöht werden, sodass ein Schutz gegen das Bakterium gegeben ist (Heuer et al. 2019; Kawakubo et al. 2004). Allerdings gibt es auch Arbeiten, die zeigen, dass die *TFF1* und *TFF2* Expression im Verlauf

der *H. pylori* Infektion verloren geht und schließlich zu Tumoren führt (Hu et al. 2003; Peterson et al. 2010; Tomita et al. 2011).

5.6 Vergleich des Menschen mit anderen Spezies

Zum Vergleich der Ergebnisse von TFF1 aus humanen Gewebeproben wurden auch drei weitere Spezies untersucht, *X. laevis*, die Maus und das Schwein. In allen drei Spezies kann TFF1 nachgewiesen werden. Dabei zeigen die Antiseren für die verschiedenen TFF1-Orthologen keinerlei Kreuzreaktivität.

Im *X. laevis* ist auf dem Western Blot nach einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE deutlich eine 25 kDa Bande sichtbar, dagegen sind die Monomerbanden und die Homodimerbande deutlich schwächer (Abb. 32). Bisher wurden nur das TFF1-Homodimer und vor allem das TFF1-Monomer im Krallenfrosch beschrieben, sowie eine Assoziation von TFF1 mit dem Mukus (Stürmer et al. 2019). Eine 25 kDa Bande wurde bisher nicht detektiert. Dabei könnte es sich aber durchaus um ein TFF1-GKN-Heterodimer handeln, wie im es im Menschen beschrieben ist (Westley et al. 2005). Zwar ist für *X. laevis* nur ein Gastrokin (GKN1, UniProt: A0A1L8GS44) vorhergesagt, dies enthält aber wie GKN2 im Menschen fünf Cysteinreste und es wäre möglich, dass TFF1 dieses GKN1 kovalent bindet (Session et al. 2016; Westley et al. 2005).

In der Maus können ebenfalls verschiedene Tff1-Entitäten nachgewiesen werden; das Tff1-Gkn2-Heterodimer, das Tff1-Homodimer und zwei Tff1-Monomere (Abb. 33). Allerdings ist die monomere Doppelbande von Tff1 nicht so ausgeprägt wie im humanen Gewebe, trotzdem macht das Monomer den Hauptteil an Tff1 im Magen der Maus aus (Abb. 33A, Abb. 34C). Dies wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit ebenfalls gezeigt (Znalesniak et al. 2020). In der Maus ließ sich das Tff1-Gkn2-Heteromer bei Extraktionen mit SDS sehr gut nachweisen, dies ist vergleichbar mit Extraktionen von humanen Proben (Abb. 21, Abb. 28). Das Tff1-Gkn2-Heterodimer ist also auch in der Maus zu einem großen Teil schwer löslich. Nach einer Größenausschlusschromatographie (S75HL) kann in den PAS positiven Fraktionen ebenfalls etwa 10 % des gesamten Tff1 nachgewiesen werden (Abb. 34). In diesen Fraktionen sind vermutlich das Tff1-Fcgbp-Heteromer und das mukusassoziierte Tff1 enthalten. Interessanterweise zeigt die Literatur das Tff1-Fcgbp-Heteromer nur im Antrum der Maus, während es im humanen Gewebe in der hier vorgelegten Arbeit auch im Korpus nachweisbar ist (Abb. 15E, Abb. 20E) (Znalesniak et al. 2020). In der Maus sind also

die gleichen Tff1-Entitäten nachweisbar wie im humanen Magen, mit Ausnahme des unbekanntes <66 kDa großen Heteromer, das bislang nicht nachgewiesen wurde (Znalesniak et al. 2020). Angemerkt sei noch, dass in der Maus ein weiteres Tff1-X-Heteromer gefunden wurde (Znalesniak et al. 2020). Dass Tff1 auch in der Maus in verschiedenen Entitäten gefunden wurde, unterstreicht die vielseitige Bedeutung von Tff1 im Magen.

Die vermutete Aminosäuresequenz für das TFF1 im Schwein (Uni-Prot: A0A286ZIY1) wurde kloniert, sequenziert und so bestätigt. Aufgrund dieser Sequenz wurde einem Kaninchen ein C-terminales Peptid injiziert, dann ein TFF1-Antiserum gewonnen (Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland) und getestet. Das Antiserum (a-pTFF1-1) bindet, wie das humane Antiserum (a-hTFF1-1), eine Bande mit einem Molekulargewicht knapp unterhalb von 14 kDa auf dem Western Blot nach einer reduzierenden SDS-PAGE (Abb. 35). Diese Bande bei unter 14 kDa ist nach einer kompetitiven Inhibition nicht mehr zu detektieren, was zeigt, dass es sich um ein spezifisches Signal handelt (Abb. 35A). Ähnlich wie im Menschen, kann auch im Schwein TFF1 im Magen Korpus und im Magen Antrum nachgewiesen werden. In den Gesamtextrakten von Korpus und Antrum lässt sich allerdings nur das TFF1-Monomer nachweisen (Abb. 35). In den analysierten Größenausschlusschromatographien (S75HL) dagegen kann ein, aufgrund der Größe (18 kDa) vermutetes, TFF1-Homodimer nachgewiesen werden, wenn auch in geringer Menge (Abb. 36B). Das TFF1-GKN2-Heterodimer kann dagegen nicht detektiert werden, selbst nach einer TRIZOL[®]-Extraktion nicht. Dies schließt ein Vorkommen des TFF1-GKN2-Heterodimers nicht vollständig aus, da es möglicherweise unterschiedliche Affinitäten des Antiserums für die verschiedenen TFF1-Formen gibt, wie es für das humane TFF1 Antiserum hier bereits gezeigt ist (Abb. 12). Die Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographien (S75HL) von Extrakten aus dem Schwein ähneln denen, die mit humanem Gewebe durchgeführt wurden (Abb. 36A, Abb. 15B, Abb. 21B). In den PAS-positiven Fraktionen kann TFF1 nachgewiesen werden, was zeigt, dass TFF1 auch im Schwein zu einem geringen Teil mukusassoziiert vorliegt (Abb. 36A). TFF1 ist daher vermutlich auch im Schwein zu einem geringen Teil nicht-kovalent an Muzine gebunden und kovalent mit FCGBP verknüpft. Einige wenige Ergebnisse deuten darauf hin, dass TFF1 auch im Schwein FCGBP bindet (Daten nicht gezeigt). Es wurden neben dem Magen auch weitere Gewebe untersucht, darunter Extrakte aus Lymphknoten, Milz, Knochenmark und Thymus, in denen allerdings kein TFF1 nachweisbar ist (Abb. 35C, Abb. 35D).

Die Bindungsstudien mit dem synthetischen ^{125}I -TFF1-Homodimer und kommerziell erworbenen Muzinpräparationen (Sigma Muzin) zeigen vergleichbare Ergebnisse wie die Bindungsstudien im Menschen, was daraufhin deutet, dass TFF1 auch im Schwein MUC6 bindet (Abb. 37, Abb. 26). Angemerkt sei, dass bei den Bindungsstudien mit ^{125}I -TFF1-Homodimer an Sigma Muzin die Expositionszeit kürzer war als bei Bindungsstudien mit humanen Proben. Möglicherweise zeigt auch TFF1 im Schwein eine festere Bindung an den Mukus als im Menschen, wie es bereits für TFF2 beschrieben wurde (Heuer et al. 2019).

5.7 Zusammenfassung und Ausblick

In der hier vorgelegten Arbeit konnte ein neuer Bindungspartner für TFF1 gefunden werden. So wurde das erste Mal gezeigt, dass TFF1 durch die Bindung von FCGBP ein Heteromer bildet. Dieses Heteromer muss nun weiter charakterisiert werden, um ein tieferes Verständnis der Funktion des TFF1-FCGBP-Heteromers zu gewinnen. Außerdem wurde gezeigt, dass nur ein kleiner Teil von TFF1 an den Mukus bindet und dieser nicht-kovalente Bindungspartner nicht wie bisher vermutet MUC5AC, sondern MUC6 ist. Allerdings bindet *in vitro* nur das TFF1-Homodimer an MUC6, nicht aber das TFF1-Monomer(ACM). Trotzdem sollte erwähnt werden, dass in den Größenausschlusschromatographien häufig auch eine geringe Menge an TFF1-Monomer in den PAS-positiven Fraktionen detektiert wurde, welches keinem Bindungspartner zugeordnet werden konnte. Hier sollte weiter untersucht werden, warum TFF1 an MUC6 bindet und nicht an MUC5AC, obwohl es gemeinsam mit MUC5AC von den Oberflächenepithelzellen sezerniert wird (Bolós et al. 1995; Kouznetsova et al. 2011; Nordman et al. 2002; Rio et al. 1988). Interessant wären auch Bindungsstudien mit dem TFF1-GKN2-Heterodimer, um zu sehen, ob auch andere TFF1-Dimere den Mukus binden und wie sich die Bindung möglicherweise unterscheidet. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass nicht das TFF1-GKN2-Heterodimer den Großteil am gesamten TFF1 ausmacht, sondern ein TFF1-Monomer. Es sollte weiter untersucht werden, warum das TFF1-GKN2-Heterodimer im Antrum präsenter ist als im Korpus und wie es als Tumorsuppressor wirkt. Außerdem konnte eine zweite monomere Bande entdeckt werden, die zuvor noch nicht beschrieben wurde. Hier müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, inwieweit sich diese zwei TFF1-Monomere unterscheiden. Zusätzlich zu den hier gezeigten Bindungspartnern wurde auch eine Bindung von TFF1 an Piezo1 (286 kDa), ein Membranprotein, beschrieben (Yang et al. 2014). Damit wurden mittlerweile fünf

verschiedene Bindungspartner (Muzine (MUC6), FCGBP, Piezo1, 50-60 kDa Protein, GKN2) für TFF1 gefunden und zusätzlich noch eine Bindung an *H. pylori* beschrieben (Clyne et al. 2004; Ruchaud-Sparagano et al. 2004; Westley et al. 2005; Yang et al. 2014). TFF1 ist dabei zwar fester Bestandteil des Magen Mukus ohne aber fest an die Muzine zu binden; etwa 80-90 % des TFF1 sind nicht direkt an den Mukus gebunden. Dafür spricht auch, dass TFF1 keinen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften des Mukus hat (Thim et al. 2002). Die verschiedenen Bindungspartner deuten darauf hin, dass TFF1 verschiedene Funktionen zum Schutz des Gewebes hat. Die unterschiedlichen, veröffentlichten Ergebnisse zu den Mengenverhältnissen der verschiedenen TFF1-Formen könnten darauf hin deuten, dass die Sekretion der verschiedenen TFF1-Entitäten von unterschiedlichen Bedingungen abhängt, wie z. B. der Besiedlung durch *H. pylori* oder oxidativen Stress durch ROS bzw. RNS. Daher sollte in Zukunft der C-Terminus und seine Reaktivität näher untersucht werden, um vor allem mehr über die Funktion der TFF1-Monomere zu erfahren, die den Großteil des gesamten TFF1 ausmachen.

6. 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
- Altman E, Chandan V, Li J, Vinogradov E (2011) Lipopolysaccharide structures of *Helicobacter pylori* wild-type strain 26695 and 26695 HP0826:Kan mutant devoid of the O-chain polysaccharide component. *Carbohydr Res* 346:2437–2444
- Ambort D, Johansson MEV, Gustafsson JK, Ermund A, Hansson GC (2012) Perspectives on Mucus Properties and Formation--Lessons from the Biochemical World. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a014159-a014159
- Arnold G (1999) Anatomie: Zytologie, Histologie Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen - unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; 119 Tabellen, 8., vollst. überarb. und aktual. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg, Berlin
- Atherton JC (2006) The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 1:63–96
- Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP (1993) Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 41:1479–1485
- 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, Stanley E, LaMont JT (1995) Mucin biophysics. *Annu Rev Physiol* 57:635–657
- Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H (2010) Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6:25–36
- Baus-Loncar M, Lubka M, Pusch CM, Otto WR, Poulsom R, Blin N (2007) Cytokine Regulation of the Trefoil Factor Family Binding Protein GKN2 (GDDR/TFIZ1/blottin) in Human Gastrointestinal Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem* 20:193–204
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99
- Bolós C de, Garrido M, Real FX (1995) MUC6 apomucin shows a distinct normal tissue distribution that correlates with Lewis antigen expression in the human stomach. *Gastroenterology* 109:723–734
- 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

- Braga Emidio N, Baik H, Lee D, Stürmer R, Heuer J, Elliott AG, Blaskovich MAT, Hauptenthal K, Tegtmeyer N, Hoffmann W, Schroeder CI, Muttenthaler M (2020) Chemical synthesis of human trefoil factor 1 (TFF1) and its homodimer provides novel insights into their mechanisms of action. *Chem Commun (Camb)* im Druck, doi:10.1039/d0cc02321c.
- Byrd JC, Yan P, Sternberg L, Yunker CK, Scheiman JM, Bresalier RS (1997) Aberrant expression of gland-type gastric mucin in the surface epithelium of *Helicobacter pylori*-infected patients. *Gastroenterology* 113:455–464
- Calnan DP, Westley BR, May FE, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ (1999) The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* 188:312–317
- 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 (Pt 1):117–123
- Chandan V, Logan SM, Harrison BA, Vinogradov E, Aubry A, Stupak J, Li J, Altman E (2007) Characterization of a waaF mutant of *Helicobacter pylori* strain 26695 provides evidence that an extended lipopolysaccharide structure has a limited role in the invasion of gastric cancer cells. *Biochem Cell Biol* 85:582–590
- Chinery R, Bates PA, De A, Freemont PS (1995) Characterisation of the single copy trefoil peptides intestinal trefoil factor and pS2 and their ability to form covalent dimers. *FEBS Lett* 357:50–54
- Clyne M, May FEB (2019) The Interaction of *Helicobacter pylori* with TFF1 and Its Role in Mediating the Tropism of the Bacteria Within the Stomach. *Int J Mol Sci* 20
- Clyne M, Dillon P, Daly S, O'Kennedy R, May FEB, Westley BR, Drumm B (2004) *Helicobacter pylori* interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7409–7414
- Correa P (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52:6735–6740
- Dekker J, Rossen JWA, Büller HA, Einerhand AWC (2002) The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 27:126–131
- DeLano (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA.
- Dieckow J, Brandt W, Hattermann K, Schob S, Schulze U, Mentlein R, Ackermann P, Sel S, Paulsen FP (2016) CXCR4 and CXCR7 Mediate TFF3-Induced Cell Migration Independently From the ERK1/2 Signaling Pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:56–65
- 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
- Dolan B, Naughton J, Tegtmeyer N, May FEB, Clyne M (2012) The interaction of *Helicobacter pylori* with the adherent mucus gel layer secreted by polarized HT29-MTX-E12 cells. *PLoS ONE* 7:e47300
- Du J-j, Dou K-f, Peng S-y, Wang W-z, Wang Z-h, Xiao H-s, Guan W-x, Liu Y-b, Gao Z-q (2003) Down-regulated full-length novel gene GDDR and its effect on gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83:1166–1168

- 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
- Dunne C, Naughton J, Duggan G, Loughrey C, Kilcoyne M, Joshi L, Carrington S, Earley H, Backert S, Robbe Masselot C, May FEB, Clyne M (2018) Binding of *Helicobacter pylori* to Human Gastric Mucins Correlates with Binding of TFF1. *Microorganisms* 6
- Ebert M, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid R, Wagner M, Adler G, Schulz H, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P (1999) Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor α . *Gut* 45:105–111
- Edman JC, Ellis L, Blacher RW, Roth RA, Rutter WJ (1985) Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317:267–270
- Edwards NJ, Monteiro MA, Faller G, Walsh EJ, Moran AP, Roberts IS, High NJ (2000) Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. *Mol Microbiol* 35:1530–1539
- Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 9:160–168
- Fra AM, Fagioli C, Finazzi D, Sitia R, Alberini CM (1993) Quality control of ER synthesized proteins: an exposed thiol group as a three-way switch mediating assembly, retention and degradation. *EMBO J* 12:4755–4761
- Fu T, Kalbacher H, Hoffmann W (2013) TFF1 is differentially expressed in stationary and migratory rat gastric epithelial cells (RGM-1) after in vitro wounding: influence of TFF1 RNA interference on cell migration. *Cell Physiol Biochem* 32:997–1010
- Fu T, Znalesniak EB, Kalinski T, Möhle L, Biswas A, Salm F, Dunay IR, Hoffmann W (2015) TFF Peptides Play a Role in the Immune Response Following Oral Infection of Mice with *Toxoplasma Gondii*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 5:221–231
- 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
- Ganderton T, Berndt MC, Chesterman CN, Hogg PJ (2007) Hypothesis for control of von Willebrand factor multimer size by intra-molecular thiol-disulphide exchange. *J Thromb Haemost* 5:204–206
- Gong Y, Li Q, Yuan Y (2017) Accuracy of testing for anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine for *H. pylori* infection diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7:e013248
- 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
- Grasberger H, El-Zaatari M, Merchant JL (2013) Dual Oxidases Control Release of Hydrogen Peroxide by the Gastric Epithelium to Prevent *Helicobacter felis* Infection and Inflammation in Mice. *Gastroenterology* 145:1045–1054
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297:1186–1190

- Guenzi S, Fra AM, Sparvoli A, Bet P, Rocco M, Sitia R (1994) The efficiency of cysteine-mediated intracellular retention determines the differential fate of secretory IgA and IgM in B and plasma cells. *Eur J Immunol* 24:2477–2482
- Gum JR (1992) Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:557–564
- Hanby AM, Poulsom R, Elia G, Singh S, Longcroft JM, Wright NA (1993) The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmodic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'. *J Pathol* 169:355–360
- Hanisch F-G, Bonar D, Schloerer N, Schrotten 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
- Harada N, Iijima S, Kobayashi K, Yoshida T, Brown WR, Hibi T, Oshima A, Morikawa M (1997) Human IgGFc Binding Protein (FcyBP) in Colonic Epithelial Cells Exhibits Mucin-like Structure. *J. Biol. Chem.* 272:15232–15241
- Hauser F, Hoffmann W (1991) xP1 and xP4. P-domain peptides expressed in *Xenopus laevis* stomach mucosa. *J. Biol. Chem.* 266:21306–21309
- Hedlund J, Johansson J, Persson B (2009) BRICHOS - a superfamily of multidomain proteins with diverse functions. *BMC Res Notes* 2:180
- Hennecke J, Spleiss C, Glockshuber R (1997) Influence of acidic residues and the kink in the active-site helix on the properties of the disulfide oxidoreductase DsbA. *J Biol Chem* 272:189–195
- Heuer F, Stürmer R, Heuer J, Kalinski T, Lemke A, Meyer F, Hoffmann W (2019) Different Forms of TFF2, A Lectin of the Human Gastric Mucus Barrier: In Vitro Binding Studies. *Int J Mol Sci* 20:5871
- Hidaka E, Ota H, Hidaka H, Hayama M, Matsuzawa K, Akamatsu T, Nakayama J, Katsuyama T (2001) *Helicobacter pylori* and two ultrastructurally distinct layers of gastric mucous cell mucins in the surface mucous gel layer. *Gut* 49:474–480
- Hiratsuka K, Logan SM, Conlan JW, Chandan V, Aubry A, Smirnova N, Ulrichsen H, Chan KHN, Griffith DW, Harrison BA, Li J, Altman E (2005) Identification of a D-glycero-D-manno-heptosyltransferase gene from *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 187:5156–5165
- Ho SB, Robertson AM, Shekels LL, Lyftogt CT, Niehans GA, Toribara NW (1995) Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterology* 109:735–747
- Hoffmann W (2013) Chapter 182 - TFF Peptides. In: Kastin AJ (ed) *Handbook of Biologically Active Peptides*, 2 Aufl. Academic Press Inc, [Erscheinungsort nicht ermittelbar], pp 1338–1345
- Hoffmann W (2014) Kontinuierliche Regeneration des Magenepithels durch Zelldifferenzierung : Bedeutung für die Karzinogenese (Continual self-renewal of the gastric epithelium by cell differentiation: implications for carcinogenesis). *Pathologe* 35 Suppl 2:202–206
- Hoffmann W, Jagla W, Wiede A (2001) Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 16:319–334
- Hoffmann W (2015) Current Status on Stem Cells and Cancers of the Gastric Epithelium. *Int J Mol Sci* 16:19153–19169

- Hogg PJ (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* 28:210–214
- Hollingsworth MA, Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4:45–60
- Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54:237–271
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG, Ng SC (2017) Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 153:420–429
- Hu G-Y, Yu B-P, Dong W-G, Li M-Q, Yu J-P, Luo H-S, Rang Z-X (2003) Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 9:910–914
- Ihida K, Suganuma T, Tsuyama S, Murata F (1988) Glycoconjugate histochemistry of the rat fundic gland using *Griffonia simplicifolia* agglutinin-II during the development. *Am J Anat* 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
- 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, Dietzmann K, Rutkowski K, Hoffmann W (2000) Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. *FASEB J* 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
- Johansson MEV, Thomsson KA, Hansson GC (2009) Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J Proteome Res* 8:3549–3557
- Jørgensen KH, Thim L, Jacobsen HE (1982) Pancreatic Spasmolytic Polypeptide (PSP): I. Preparation and Initial Chemical Characterization of a New Polypeptide From Porcine Pancreas. *Regul Pept* 3
- Karam SM, Tomasetto C, Rio M-C (2008) Amplification and invasiveness of epithelial progenitors during gastric carcinogenesis in trefoil factor 1 knockout mice. *Cell Prolif* 41:923–935
- Kastin AJ (ed) (2013) *Handbook of Biologically Active Peptides*, 2 Aufl. Academic Press Inc, [Erscheinungsort nicht ermittelbar]
- Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S, Fukuda MN, Fukuda M, Katsuyama T, Nakayama J (2004) Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science* 305:1003–1006
- Kim O, Yoon JH, Choi WS, Ashktorab H, Smoot DT, Nam SW, Lee JY, Park WS (2017) Heterodimeric interaction between GKN2 and TFF1 entails synergistic antiproliferative and pro-apoptotic effects on gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 20:772–783

- 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
- Kjellek S (2009) The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 66:1350–1369
- Kobayashi K, Hamada Y, Blaser MJ, Brown WR (1991) The molecular configuration and ultrastructural locations of an IgG Fc binding site in human colonic epithelium. *J Immunol* 146:68–74
- Kobayashi J, Uchida H, Ito J (2019) Long-term proton pump inhibitor use after *Helicobacter pylori* eradication may create a gastric environment for N-nitrosamine formation and gastric cancer development. *Gut* 68:1131
- 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
- Kyte J (2007) *Structure in protein chemistry*, 2. ed. Garland Science, New York, NY
- Labouvie C, Machado JC, Carneiro F, Sarbia M, Vieth M, Porschen R, Seitz G, Blin N (1999) Differential expression of mucins and trefoil peptides in native epithelium, Barrett's metaplasia and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:71–76
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lalani EN, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Siu LS, Koumariou A, Playford R, Stamp GW (1999) Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab Invest* 79:537–546
- Lang T, Klasson S, Larsson E, Johansson MEV, Hansson GC, Samuelsson T (2016) Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components-Mucins and FCGBP. *Mol Biol Evol* 33:1921–1936
- 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
- Le J, Zhang DY, Zhao Y, Qiu W, Wang P, Sun Y (2016) ITF promotes migration of intestinal epithelial cells through crosstalk between the ERK and JAK/STAT3 pathways. *Sci Rep* 6:33014

- Le Moan N, Clement G, Le Maout S, Tacnet F, Toledano MB (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J. Biol. Chem.* 281:10420–10430
- Lefebvre O, Wolf C, Kédinger M, Chenard MP, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC (1993) The mouse one P-domain (pS2) and two P-domain (mSP) genes exhibit distinct patterns of expression. *J Cell Biol* 122:191–198
- 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
- Lewis OL, Keener JP, Fogelson AL (2017) A physics-based model for maintenance of the pH gradient in the gastric mucus layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 313:G599–G612
- Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson H-O, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M (2016) Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 21:445–461
- Li H, Tang H, Debowski AW, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M (2018) Lipopolysaccharide Structural Differences between Western and Asian *Helicobacter pylori* Strains. *Toxins (Basel)* 10
- Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulson R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA (2000) Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 47:792–800
- Lottspeich F, Engels JW (2006) *Bioanalytik*, 2. Aufl. Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg
- Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L (2014) The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem* 395:203–230
- Lukacs CM, Rubin H, Christianson DW (1998) Engineering an anion-binding cavity in antichymotrypsin modulates the "spring-loaded" serpin-protease interaction. *Biochemistry* 37:3297–3304
- Luken BM (2008) Extracellular control of VWF multimer size and thiol-disulfide exchange. *J Thromb Haemost* 6:1131–1134
- Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, Corbishley CM, Rio MC, Chambon P, Ryall G (1989) Expression of the pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach. *Int J Cancer* 44:806–812
- Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U (2007) Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem* 55:505–513
- Mantle M, Allen A (1978) A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain proceedings. *Biochem Soc Trans* 6:607–609
- Marchbank T, Westley BR, May FE, Calnan DP, Playford RJ (1998) Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* 185:153–158
- Marshall B, Warren JR (1984) UNIDENTIFIED CURVED BACILLI IN THE STOMACH OF PATIENTS WITH GASTRITIS AND PEPTIC ULCERATION. *The Lancet* 323:1311–1315
- Martin TE, Powell CT, Wang Z, Bhattacharyya S, Walsh-Reitz MM, Agarwal K, Toback FG (2003) A novel mitogenic protein that is highly expressed in cells of the gastric antrum mucosa. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 285:G332–G343

- 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, Westley BR (1997) Close physical linkage of the genes encoding the pNR-2/pS2 protein and human spasmodic protein (hSP). *Hum Genet* 99:303–307
- May FEB, Church ST, Major S, Westley BR (2003) The closely related estrogen-regulated trefoil proteins TFF1 and TFF3 have markedly different hydrodynamic properties, overall charge, and distribution of surface charge. *Biochemistry* 42:8250–8259
- May FEB, Semple JI, Prest SJ, Westley BR (2004) Expression and motogenic activity of TFF2 in human breast cancer cells. *Peptides* 25:865–872
- 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
- Menheniott TR, Peterson AJ, O'Connor L, Lee KS, Kalantzis A, Kondova I, Bontrop RE, Bell KM, Giraud AS (2010) A novel gastrokine, Gkn3, marks gastric atrophy and shows evidence of adaptive gene loss in humans. *Gastroenterology* 138:1823–1835
- 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
- Menheniott TR, O'Connor L, Chionh YT, Däbritz J, Scurr M, Rollo BN, Ng GZ, Jacobs S, Catubig A, Kurklu B, Mercer S, Minamoto T, Ong DE, Ferrero RL, Fox JG, Wang TC, Sutton P, Judd LM, Giraud AS (2016) Loss of gastrokine-2 drives premalignant gastric inflammation and tumor progression. *J Clin Invest* 126:1383–1400
- Monteiro G, Horta BB, Pimenta DC, Augusto O, Netto LES (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4886–4891
- Moran AP (2008) Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydr Res* 343:1952–1965
- Moss SF, Lee J-W, Sabo E, Rubin AK, Rommel J, Westley BR, May FEB, Gao J, Meitner PA, Tavares R, Resnick MB (2008) Decreased expression of gastrokine 1 and the trefoil factor interacting protein TFIZ1/GKN2 in gastric cancer: influence of tumor histology and relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 14:4161–4167
- Murray CI, van Eyk JE (2012) Chasing Cysteine Oxidative Modifications: Proteomic Tools for Characterizing Cysteine Redox-Status. *Circ Cardiovasc Genet* 5:591
- Muskett FW, May FEB, Westley BR, Feeney J (2003) Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil factor (TFF3): the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry* 42:15139–15147

- Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE (2000) The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 46:312–320
- 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
- Oien KA, McGregor F, Butler S, Ferrier RK, Downie I, Bryce S, Burns S, Keith WN (2004) Gastrokine 1 is abundantly and specifically expressed in superficial gastric epithelium, down-regulated in gastric carcinoma, and shows high evolutionary conservation. *J Pathol* 203:789–797
- 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
- Otto WR, Patel K, McKinnell I, Evans MD, Lee C-Y, Frith D, Hanrahan S, Blight K, Blin N, Kayademir T, Poulsom R, Jeffery R, Hunt T, Wright NA, McGregor F, Oien KA (2006) Identification of blottin: A novel gastric trefoil factor family-2 binding protein. *Proteomics* 6:4235–4245
- Park WS, Oh RR, Park JY, Lee JH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Kim YS, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY (2000) Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* 119:691–698
- Patel S, Rew DA, Taylor I, Potten CS, Owen C, Roberts SA (1993) Study of the proliferation in human gastric mucosa after in vivo bromodeoxyuridine labelling. *Gut* 34:893–896
- 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
- Peterson AJ, Menheniott TR, O'Connor L, Walduck AK, Fox JG, Kawakami K, Minamoto T, Ong EK, Wang TC, Judd LM, Giraud AS (2010) *Helicobacter pylori* infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology* 139:2005–2017
- Pigman W, Moschera J, Weiss M, Tettamanti G (1973) The occurrence of repetitive glycopeptide sequences in bovine submaxillary glycoprotein. *Eur J Biochem* 32:148–154
- 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
- Playford RJ, Marchbank T, Chinery R, Evison R, Pignatelli M, Boulton RA, Thim L, Hanby AM (1995) Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology* 108:108–116

- Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, DeBeaumont 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* 268:6694–6702
- 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
- Poole LB, Klomsiri C, Knaggs SA, Furdul CM, Nelson KJ, Thomas MJ, Fetrow JS, Daniel LW, King SB (2007) Fluorescent and affinity-based tools to detect cysteine sulfenic acid formation in proteins. *Bioconjug Chem* 18:2004–2017
- Porath J, Flodin P (1959) Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* 183:1657–1659
- 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
- Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71:635–700
- Reddy P, Sparvoli A, Fagioli C, Fassina G, Sitia R (1996) Formation of reversible disulfide bonds with the protein matrix of the endoplasmic reticulum correlates with the retention of unassembled Ig light chains. *EMBO J* 15:2077–2085
- 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
- Ren J-L, Luo J-Y, Lu Y-P, Wang L, Shi H-X (2006) Molecular forms of trefoil factor 1 in normal gastric mucosa and its expression in normal and abnormal gastric tissues. *World J Gastroenterol* 12:7361–7364
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3116–3120
- Resnick MB, Sabo E, Meitner PA, Kim SS, Cho Y, Kim HK, Tavares R, Moss SF (2006) Global analysis of the human gastric epithelial transcriptome altered by *Helicobacter pylori* eradication in vivo. *Gut* 55:1717–1724
- Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC (1998) The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1378:F61-77
- 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 MC, Voynow JA (2006) Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 86:245–278

- Roussel A, Canaan S, Egloff MP, Rivière M, Dupuis L, Verger R, Cambillau C (1999) Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J Biol Chem* 274:16995–17002
- Ruchaud-Sparagano M-H, Westley BR, May FEB (2004) The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci* 61:1946–1954
- Rye PD, Keyte J, Sutcliffe MJ, Bailey K, Walker RA (1994) Solid phase synthesis of the pS2 peptide: suggestion of an alternative trefoil structure. *Protein Pept. Lett.* 1:54–59
- Ryu S-E, Choi H-J, Kwon K-S, Lee KN, Yu M-H (1996) The native strains in the hydrophobic core and flexible reactive loop of a serine protease inhibitor: crystal structure of an uncleaved α 1-antitrypsin at 2.7 Å. *Structure* 4:1181–1192
- Sánchez-Pulido L, Devos D, Valencia A (2002) BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci* 27:329–332
- Schägger H, Jagow G von (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223–231
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675
- 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
- Schwartz JL (2014) Fcgbp - A Potential Viral Trap in RV144. *Open AIDS J* 8:21–24
- Seib T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang KD, Welter C (1997) The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 40:200–202
- Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, Toyoda A, Takahashi S, Fukui A, Hikosaka A, Suzuki A, Kondo M, van Heeringen SJ, Quigley I, Heinz S, Ogino H, Ochi H, Hellsten U, Lyons JB, Simakov O, Putnam N, Stites J, Kuroki Y, Tanaka T, Michiue T, Watanabe M, Bogdanovic O, Lister R, Georgiou G, Paranjpe SS, van Kruijsbergen I, Shu S, Carlson J, Kinoshita T, Ohta Y, Mawaribuchi S, Jenkins J, Grimwood J, Schmutz J, Mitros T, Mozaffari SV, Suzuki Y, Haramoto Y, Yamamoto TS, Takagi C, Heald R, Miller K, Haudenschild C, Kitzman J, Nakayama T, Izutsu Y, Robert J, Fortriede J, Burns K, Lotay V, Karimi K, Yasuoka Y, Dichmann DS, Flajnik MF, Houston DW, Shendure J, DuPasquier L, Vize PD, Zorn AM, Ito M, Marcotte EM, Wallingford JB, Ito Y, Asashima M, Ueno N, Matsuda Y, Veenstra GJC, Fujiyama A, Harland RM, Taira M, Rokhsar DS (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature* 538:336–343
- Shao D, Oka S-i, Brady CD, Haendeler J, Eaton P, Sadoshima J (2011) Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 52:550–558
- 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
- Soutto M, Belkhiri A, Piazuolo MB, Schneider BG, Peng D, Jiang A, Washington MK, Kokoye Y, Crowe SE, Zaika A, Correa P, Peek RM, El-Rifai W (2011) Loss of TFF1 is associated with activation of NF-

- κB-mediated inflammation and gastric neoplasia in mice and humans. *J Clin Invest* 121:1753–1767
- Soutto M, Chen Z, Katsha AM, Romero-Gallo J, Krishna US, Piazuolo MB, Washington MK, Peek RM, Belkhiri A, El-Rifai WM (2015) Trefoil factor 1 expression suppresses *Helicobacter pylori*-induced inflammation in gastric carcinogenesis. *Cancer* 121:4348–4358
- Srivatsa G, Giraud AS, Ulaganathan M, Yeomans ND, Dow C, Nicoll AJ (2002) Biliary epithelial trefoil peptide expression is increased in biliary diseases. *Histopathology* 40:261–268
- Stancill JS, Broniowska KA, Oleson BJ, Naatz A, Corbett JA (2019) Pancreatic β-cells detoxify H₂O₂ through the peroxiredoxin/thioredoxin antioxidant system. *J Biol Chem* 294:4843–4853
- Stange DE, Koo B-K, Huch M, Sibbel G, Basak O, Lyubimova A, Kujala P, Bartfeld S, Koster J, Geahlen JH, Peters PJ, van Es JH, van de Wetering M, Mills JC, Clevers H (2013) Differentiated Troy⁺ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell* 155:357–368
- Strous GJ, Dekker J (1992) Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:57–92
- Stürmer R, Reising J, Hoffmann W (2019) The TFF Peptides xP1 and xP4 Appear in Distinctive Forms in the *Xenopus laevis* Gastric Mucosa: Indications for Different Protective Functions. *Int J Mol Sci* 20
- 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
- Suzuki M, Suzuki H, Minegishi Y, Ito K, Nishizawa T, Hibi T (2010) *H. pylori*-Eradication Therapy Increases RUNX3 Expression in the Glandular Epithelial Cells in Enlarged-Fold Gastritis. *J Clin Biochem Nutr* 46:259–264
- Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T (2012) Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr* 50:35–39
- Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK (1999) The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 103:R31-8
- 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, May FEB (2005) Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 62:2956–2973
- 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
- Toback FG, Walsh-Reitz MM, Musch MW, Chang EB, Del Valle J, Ren H, Huang E, Martin TE (2003) Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G344-53
- Tomasetto C, Rio M-C (2005) Pleiotropic effects of Trefoil Factor 1 deficiency. *Cell Mol Life Sci* 62:2916–2920

- Tomasetto C, Masson R, Linares JL, Wendling C, Lefebvre O, Chenard MP, Rio MC (2000) pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* 118:70–80
- Tomita H, Takaishi S, Menheniott TR, Yang X, Shibata W, Jin G, Betz KS, Kawakami K, Minamoto T, Tomasetto C, Rio M-C, Lerkowit N, Varro A, Giraud AS, Wang TC (2011) Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone gastrin is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 140:879–891
- Torres L-F, Karam SM, Wendling C, Chenard M-P, Kershenovich D, Tomasetto C, Rio M-C (2002) Trefoil factor 1 (TFF1/pS2) deficiency activates the unfolded protein response. *Mol Med* 8:273–282
- Tosco A, Monti MC, Fontanella B, Rio M-C, Gomez-Paloma L, Leone A, Marzullo L (2007) Copper-binding activity of Trefoil factor 1 (TFF1): a new perspective in the study of the multifunctional roles of TFFs. *Peptides* 28:1461–1469
- Tosco A, Monti MC, Fontanella B, Montefusco S, D'Andrea L, Ziaco B, Baldantoni D, Rio M-C, Marzullo L (2010) Copper binds the carboxy-terminus of trefoil protein 1 (TFF1), favoring its homodimerization and motogenic activity. *Cell Mol Life Sci* 67:1943–1955
- 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
- van Klinken BJ, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J (1998) Strategic biochemical analysis of mucins. *Anal Biochem* 265:103–116
- 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
- Williams MA, Westley BR, May FE, Feeney J (2001) The solution structure of the disulphide-linked homodimer of the human trefoil protein TFF1. *FEBS Lett* 493:70–74
- Williams SE, Turnberg LA (1981) Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa: evidence for a 'mucus-bicarbonate' barrier. *Gut* 22:94–96
- Working Group in Lyon (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 61:1–241
- Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L (1997) Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 408:121–123
- Xia HH-X, Yang Y, Lam SK, Wong WM, Leung SY, Yuen ST, Elia G, Wright NA, Wong BC-Y (2004) Aberrant epithelial expression of trefoil family factor 2 and mucin 6 in *Helicobacter pylori* infected gastric antrum, incisura, and body and its association with antralisation. *J Clin Pathol* 57:861–866

- Yang X-N, Lu Y-P, Liu J-J, Huang J-K, Liu Y-P, Xiao C-X, Jazag A, Ren J-L, Guleng B (2014) Piezo1 is as a novel trefoil factor family 1 binding protein that promotes gastric cancer cell mobility in vitro. *Dig Dis Sci* 59:1428–1435
- Yi MC, Khosla C (2016) Thiol-Disulfide Exchange Reactions in the Mammalian Extracellular Environment. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 7:197–222
- Yoon JH, Kang YH, Choi YJ, Park IS, Nam SW, Lee JY, Lee YS, Park WS (2011) Gastroke 1 functions as a tumor suppressor by inhibition of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 137:1697–1704
- Yoshikawa Y, Mukai H, Hino F, Asada K, Kato I (2000) Isolation of Two Novel Genes, Down-regulated in Gastric Cancer. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:459–463
- Zhen G, Park SW, Nguyenvu LT, Rodriguez MW, Barbeau R, Paquet AC, Erle DJ (2007) IL-13 and epidermal growth factor receptor have critical but distinct roles in epithelial cell mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:244–253
- 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

7. Anhang

7.1 Blue Native Gel

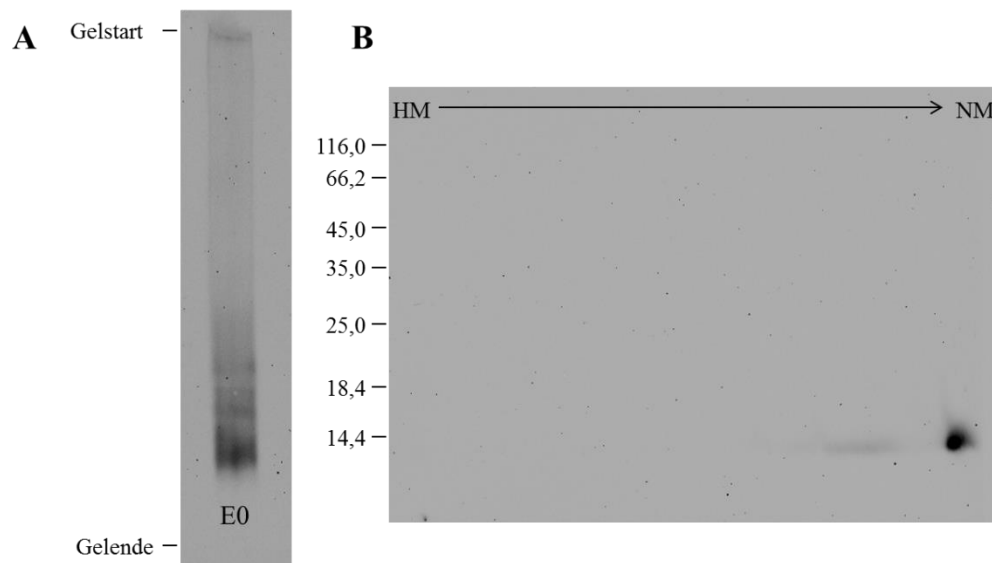


Abb. 39: Blue Native Gel für den Extrakt E0 des Magen Korpus Mensch.

A: Erste Dimension: *Blue Native Gel* nach Serva (Gradient 4-16%). Aufgetragen sind 10 μ l eines Extraktes E0 des Magen Korpus (M_c577). **B:** Zweite Dimension: 15 %ige reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. Nach einem *Blue Native Gel* (Gradient 4-16%) eines Extraktes E0 (15 μ l) des Magen Korpus. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

7.2 Elution aus dem Coomassiegel

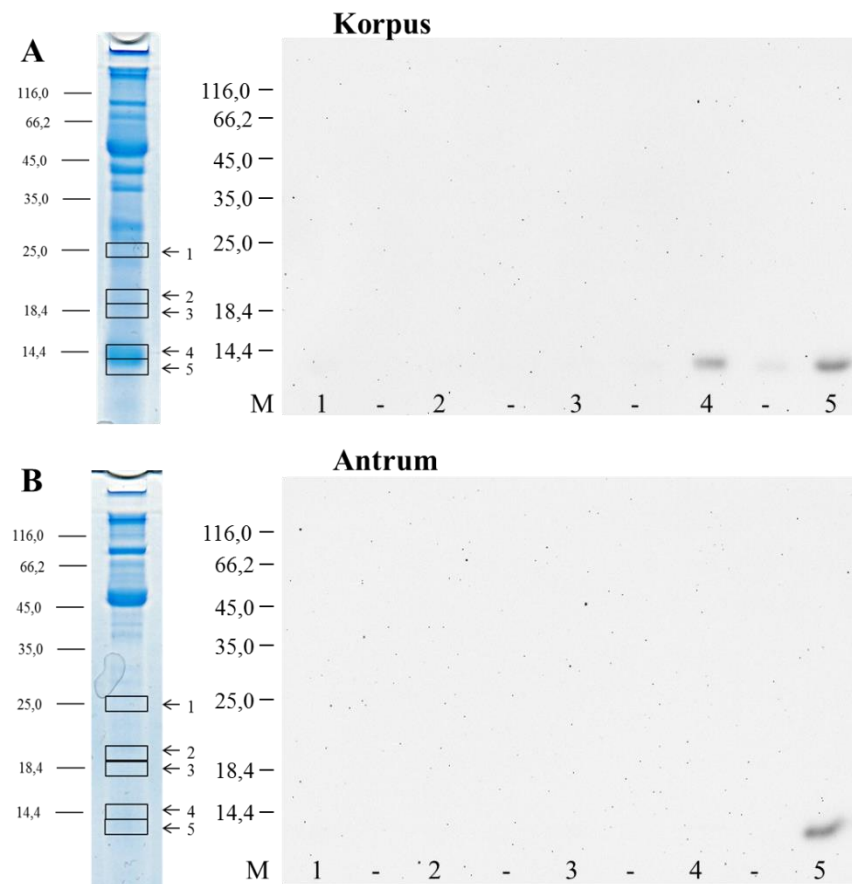


Abb. 40: Elution der Banden (25 kDa, 18 kDa, 14 kDa, <14 kDa) aus dem Korpus und Antrum.

A: 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE von E0 eines Magen Korpus (M_C383) mit anschließender Coomassie-Färbung (vgl. Abb. 12). Die markierten Banden (1: 25 kDa, 2: >18 kDa, 3: 18 kDa, 4: 14 kDa, 5: <14 kDa) wurden eluiert und auf eine 15 %ige reduzierende SDS-PAGE aufgetragen mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE von E0 eines Magen Antrum (M_A690) mit anschließender Coomassie-Färbung (vgl. Abb. 12). Die markierten Banden (1: 25 kDa, 2: >18 kDa, 3: 18 kDa, 4: 14 kDa, 5: <14 kDa) wurden eluiert und auf eine 15 %ige reduzierende SDS-PAGE aufgetragen mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

7.3 Ergänzung für die Trennung durch Größenausschlusschromatographie bei unterschiedlichen pH-Werten

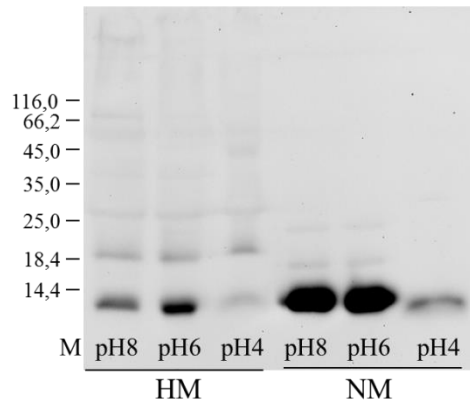


Abb. 41: Verschiedene Größenausschlusschromatographie (S75HL) von Gesamtextrakten En des Magen Korpus (M_C383) bei pH 8, pH 6 und pH 4.

15 %ige reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 für drei verschiedene S75HLs bei pH 8 (hochmolekular, HM: Fraktion B8; niedermolekular, NM: Fraktion C12), pH 6 (HM: B8; NM: C12) und pH 4 (HM: B9; NM: D2). Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben. (vgl. Abb. 14B).

7.4 Kompetitive Inhibierung der Bindung von TFF1 an Muzine mit TFF-Peptiden

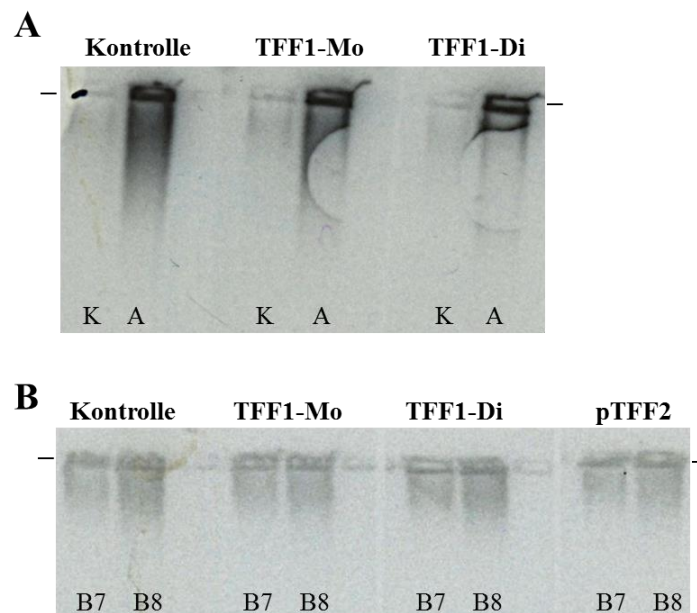


Abb. 42: Kompetitive Inhibierung der Bindung von TFF1 mit verschiedenen TFF-Peptiden.

A: 1 %ige AgGE einer Korpus- (M_C540 , E1) und Antrumprobe (M_A534 , E1) mit anschließendem Western Blot und Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Der Bindungspuffer enthielt einen 10-fachen molaren Überschuss an synthetischem TFF1-Monomer(ACM) und TFF1-Homodimer. **B:** 1 %ige AgGE der Fraktionen B7 und B8 einer S75HL von Sigma Muzin mit 1 % Mercaptoethanol und 1 % SDS gekocht. Anschließender Western Blot und Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer (Autoradiographie). Der Bindungspuffer enthielt einen 10-fachen molaren Überschuss an synthetischem TFF1-Monomer(ACM), TFF1-Homodimer und pTFF2. Die Striche markieren die Taschen der Agarosegele.

7.5 Ergänzung für die Trennung der verschiedenen TFF1-Entitäten nach einer Größenausschlusschromatographie (Kap. 4.1.3.1)

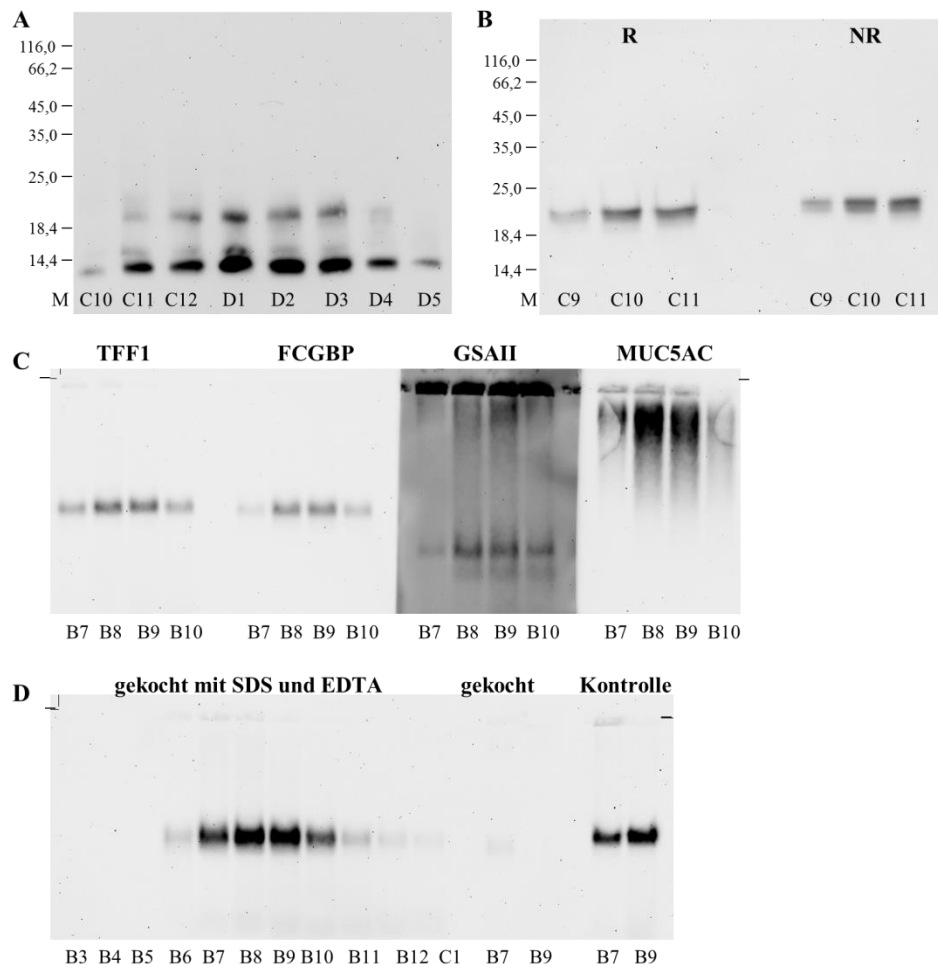


Abb. 43: Größenausschlusschromatographie (S75HL) nach schonender Extraktion des Magen Korpus mit Mörser bei pH 7.

A: 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der Fraktionen 34-41 der S75HL nach Extraktion eines Magen Korpus (M_C383) mit Mörser. Durchgeführt einige Wochen nach dem in Abb. 16B gezeigten Western Blot einer 15 %igen nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit ähnlichen Fraktionen. **B:** 15 %ige SDS-PAGE (R: reduzierende, NR: nicht-reduzierende) mit anschließendem Western Blot bzgl. GKN1 der Fraktionen 33-35 der S75HL nach Extraktion eines Magen Korpus (M_C383) mit Mörser. Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben. **C:** 1 %ige AgGE mit anschließender Western Blot Analyse für TFF1, FCGBP, MUC5AC und MUC6 (GSAII) der hochmolekularen Fraktionen 19-22. Der Nachweis erfolgte auf einem Agarosegel. **D:** 1 %ige AgGE mit anschließender Western Blot Analyse für TFF1, FCGBP, MUC5AC und MUC6 (GSAII) der hochmolekularen Fraktionen 15-25. Die Fraktionen 15-25 wurden 5 min mit 1 % SDS und 30 mM EDTA gekocht. Die Fraktionen 19 und 20 wurden nur 5 min gekocht bzw. unbehandelt (Kontrolle) aufgetragen. Die Striche markieren die Taschen der Agarosegele.

7.6 Ergänzung für die Trennung der verschiedenen TFF1-Entitäten über eine Anionenaustauschchromatographie (Kap. 4.1.3.3)

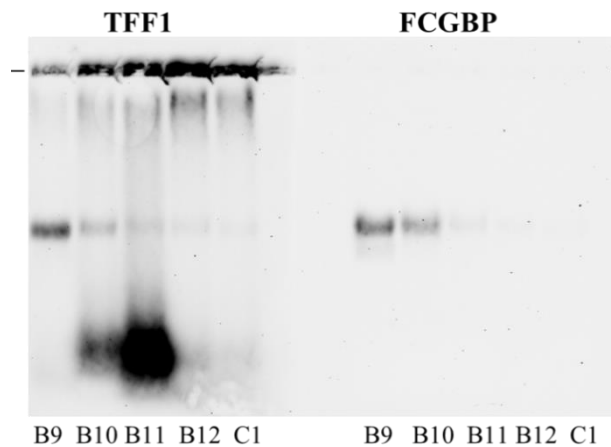


Abb. 44: Anionenaustauschchromatographie für den Extrakt E0 eines Magen Korpus (M_C577).

1 %ige AgGE mit anschließendem Western Blot für TFF1 und FCGBP für die Fraktionen B9-C1 des Extraktes E0 gezeigt. Die hier gezeigten Signale auf dem Western Blot für TFF1 lassen sich vollständig kompetitiv inhibieren (Daten nicht gezeigt). Die Striche markieren die Taschen der Agarosegele.

7.7 Mehrstufige Extraktion (E0, E1, E2, E3, E4) des Magen Korpus

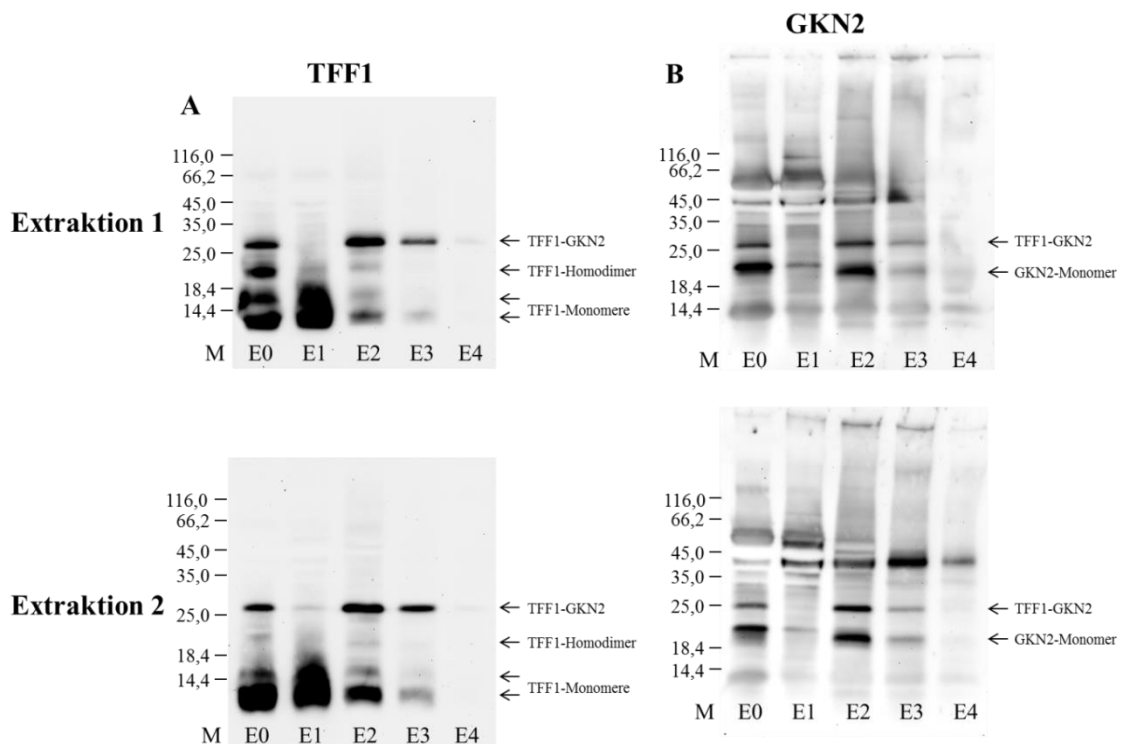


Abb. 45: Mehrstufige Extraktion (E0, E1, E2, E3, E4) des Magen Korpus.

A: 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. TFF1 der Extrakte E0 (waschen), E1 (Aufschluss mit Precellys), E2 (Resuspendieren in 1 % SDS), E3 (mit 1 % SDS bei 50 °C 1 h inkubiert), E4 (mit 1 % SDS 5 min gekocht) eines Magen Korpus (M_C577, zwei Extraktionen der selben Probe). **B:** 15 %ige nicht-reduzierende SDS-PAGEs mit anschließendem Western Blot bzgl. GKN2 der Extrakte E0 (waschen), E1 (Aufschluss mit Precellys), E2 (Resuspendieren in 1 % SDS), E3 (mit 1 % SDS bei 50 °C 1 h inkubiert), E4 (mit 1 % SDS 5 min gekocht) eines Korpus (zwei Extraktionen der selben Probe). Der Molekularstandard (M) ist in kDa angegeben.

7.8 TRIzol[®]-Extrakte

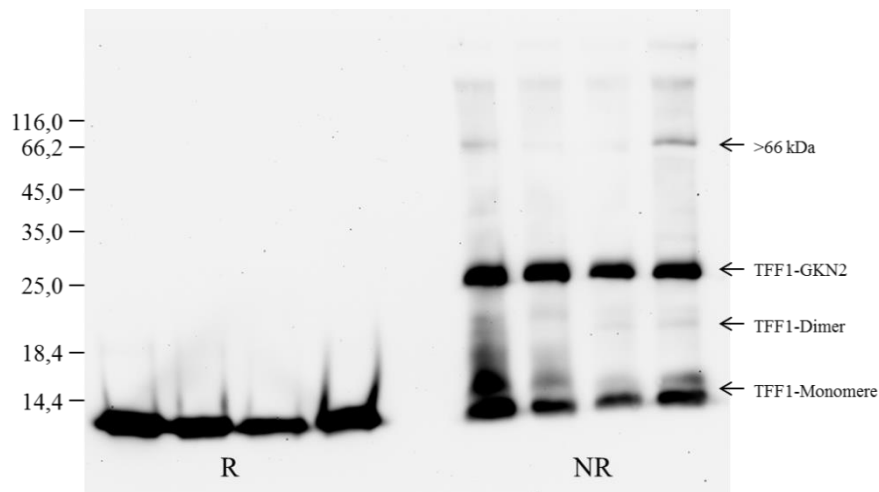


Abb. 46: TRIzol[®]-Extrakte des Magen Korpus des Menschen.

Vier verschiedene Gewebeprouen aus dem Magen Korpus (M_C558 , M_C577 , M_C675 , M_C687) des Menschen. Mit Hilfe von TRIzol[®] gereinigt und auf eine reduzierende (R) bzw. nicht-reduzierende (NR) SDS-PAGE aufgetragen. Western Blot auf TFF1. Markiert sind die für TFF1 bestätigten Banden. Der Molekularstandard ist in kDa angegeben.

7.9 TRIzol[®]-Extraktion (Größenausschlusschromatographie S75HL)

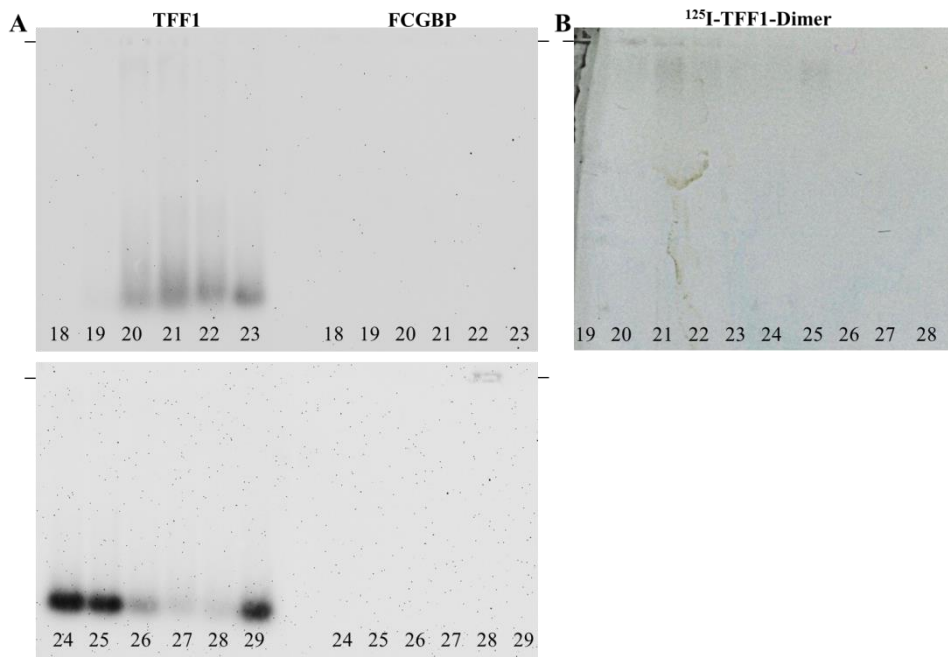


Abb. 47: TRIzol[®]-Extraktion von Magen Korpus Mensch mit anschließender Größenausschlusschromatographie (S75H) pH7.

A: 1 %ige AgGE und Western Blot bzgl. TFF1 und FCGBP. **B:** 1 %ige AgGE der Fraktionen der S75HL und Western Blot mit anschließender Inkubation mit ^{125}I -TFF1-Homodimer. Der Nachweis erfolgte über Autoradiographie. Die Striche markieren die Taschen der Agarosegele.

7.10 Massenspektrometrische Analyse

Tab.7.1: Massenspektrometrische Analyse der Bande 1 (<66 kDa). (Kooperation mit Herrn Univ.-Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Massenspektrometrische Proteomanalytik, Inst. für Klinische Chemie & Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf). Aufgelistet sind nur extrazelluläre Proteine und Proteine aus der Plasmamembran.

Accession	Description	Coverage	MW [kDa]	Score Sequest HT
P02768	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	53,04	69,32	383,04
O94759	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2 OS=Homo sapiens GN=TRPM2 PE=1 SV=2	3,19	171,09	189,31
P01009	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	41,15	46,71	43,21
P02790	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2	24,89	51,64	26,13
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	22,22	47,62	23,39
Q7Z2W7	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 OS=Homo sapiens GN=TRPM8 PE=1 SV=2	1,18	127,60	21,57
P01008	Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	14,44	52,57	18,97
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=5	4,00	51,87	13,38
P35030	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	7,57	32,51	9,06
P01042	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	9,16	71,91	7,72
P07478	Trypsin-2 OS=Homo sapiens GN=PRSS2 PE=1 SV=1	8,10	26,47	5,97
P07477	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	8,10	26,54	5,97
Q8NHM4	Putative trypsin-6 OS=Homo sapiens GN=PRSS3P2 PE=5 SV=2	8,10	26,52	5,97
P51884	Lumican OS=Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	8,88	38,41	5,94
P25815	Protein S100-P OS=Homo sapiens GN=S100P PE=1 SV=2	17,89	10,39	5,23
Q9Y490	Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3	0,83	269,60	4,98
P68871	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	15,65	15,99	4,91
P04217	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	4,85	54,22	4,80
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	3,25	50,11	3,64
P10599	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3	12,38	11,73	3,49
P81605	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	12,73	11,28	3,08
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	2,72	39,30	3,07
P04155	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1	14,29	9,14	2,97

Q5VSP4	Putative lipocalin 1-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=LCN1P1 PE=5 SV=1	6,79	17,91	2,21
P31025	Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1	6,25	19,24	2,21
Q6UWP8	Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=2 SV=2	3,05	60,51	2,20
P05109	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	11,83	10,83	2,20
P01877	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	5,00	36,50	2,19
P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	4,82	37,63	2,19
Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=CALML5 PE=1 SV=2	5,48	15,88	2,09
P61626	Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1	8,11	16,53	2,06
P69892	Hemoglobin subunit gamma-2 OS=Homo sapiens GN=HBG2 PE=1 SV=2	6,80	16,12	2,02
P02042	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2	6,80	16,05	2,02
P02100	Hemoglobin subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=HBE1 PE=1 SV=2	6,80	16,19	2,02
P69891	Hemoglobin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=HBG1 PE=1 SV=2	6,80	16,13	2,02
P07098	Gastric triacylglycerol lipase OS=Homo sapiens GN=LIPF PE=1 SV=1	3,02	45,21	1,97

Tab.7.2: Massenspektrometrische Analyse der Bande 2 (14 kDa) und 3 (<14 kDa). (Kooperation mit Herrn Univ.-Prof. Dr. Hartmut Schlüter, Massenspektrometrische Proteomanalytik, Inst. für Klinische Chemie & Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Accession	Description	Coverage	MW [kDa]	Score Sequest HT
P04155	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1 (Bande 2)	25	9,14	2,67
P04155	Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1 (Bande 3)	14,29	9,14	2,75

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 widersprüchlich 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 22.06.2020

Jörn Heuer