

Etablierung eines Reinigungsprotokolls für humanes TFF2 aus dem Magen: nicht-kovalente Bindung an Muzine und Untersuchung der N-Glykosylierung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

von Dipl.-Biochem. Hubert Ragge

geb. am 16.09.1974 in Herne

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

eingereicht am: 19.01.2022

verteidigt am: 17.06.2022

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Human gastric TFF2 peptide contains an N-linked fucosylated N,N'-diacetyllactosediamine (LacdiNAc) oligosaccharide

Hanisch FG, Ragge H, Kalinski T, Meyer F, Kalbacher H, Hoffmann W
Glycobiology. 2013 Jan; 23(1): 2-11

Inhaltsverzeichnis

Publikationsliste	1
Inhaltsverzeichnis	2
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	5
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. TFF-Peptide.....	9
1.1.1. Entdeckung und Struktur von TFF2.....	9
1.1.2. Vorkommen und Lokalisation von TFF2.....	11
1.1.3. TFF2-Homologe in <i>Xenopus laevis</i>	13
1.1.4. Ektopische TFF2-Expression bei pathologischen Prozessen.....	14
1.1.4.1. Innerhalb des Gastrointestinaltraktes.....	14
1.1.4.2. Außerhalb des Gastrointestinaltraktes	15
1.1.5. Mögliche Funktionen des TFF2-Peptids.....	15
1.1.5.1. Wechselwirkungen von TFF2 mit der Mukusschicht des Magens.....	15
1.1.5.2. Rolle von TFF2 im Rahmen einer Infektion mit <i>H. pylori</i>	16
1.1.5.3. Motogene und andere Effekte, mögliche TFF2-Rezeptoren.....	17
1.2. Die gastrale Mukusschicht und Muzine des Magens.....	18
1.3. Ziele der Dissertation.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Chemikalien.....	21
2.1.2. Gewebe.....	21
2.1.3. Antikörper zum Nachweis von TFF2.....	22
2.1.4. Lektine zum Nachweis spezifischer Zuckerstrukturen.....	22
2.1.5. Datenbanken.....	23
2.2. Biochemische Methoden.....	23
2.2.1. Gewinnung von Protein-Rohextrakten aus Gewebeprobe n	23
2.2.2. Proteinreinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie (klassisch)....	24
2.2.3. Proteinreinigung durch Größenausschluss-Chromatographie (FPLC).....	25

2.2.4. Proteinreinigung durch Ionenaustauschchromatographie.....	26
2.2.5. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.6. Native SDS-Agarose-Gelelektrophorese (SDS-AgGE).....	30
2.2.7. Western Blotting.....	31
2.2.7.1. Elektroblot.....	31
2.2.7.2. Kapillarblot.....	33
2.2.7.3. Dot-Blot.....	34
2.2.8. Ponceau-Färbung von Proteinen.....	34
2.2.9. Nachweis der geblotteten Proteine mittels Antikörper / <i>Enhanced</i> <i>Chemiluminescence</i> (ECL).....	34
2.2.10. Nachweis spezifischer Glykostrukturen mittels biotinylierter Lektine.....	36
2.2.11. ECL-Färbung.....	36
2.2.12. Semiquantitative Westernblot-Analyse.....	38
2.2.13. Silberfärbung von Proteinen.....	39
2.2.14. Coomassie-Brillantblau-Färbung von Proteinen.....	40
2.2.15. Protokoll der massenspektrometrischen Untersuchungen.....	40
2.2.16. Verdau von glykosyliertem TFF2 mit <i>Peptide:N-glycosidase F</i>	42
3. Ergebnisse.....	43
3.1. Etablierung eines Reinigungsprotokolls für TFF2 aus dem menschlichen Magen und proximalen Duodenum.....	43
3.1.1. Reinigung von TFF2 mittels Sephadex G-200 SEC und Anionentauscher.....	44
3.1.1.1. Reinigung von TFF2 aus der Duodenumprobe 369D _{Pr}	44
3.1.1.2. Reinigung von TFF2 aus der Antrumprobe 323M _A	46
3.1.1.3. Reinigung von TFF2 aus den Antrumproben 333M _A und 337M _A	50
3.1.1.4. Optimierung des Gradientenverlaufs des Resource Q- Anionentauschers.....	53
3.1.2. Reinigung von TFF2 aus einer Antrum-Gewebeprobe mittels ResourceQ-Anionentauscher und Superose 6 10/300 SEC.....	56
3.1.3. Reinigungseffizienz von Sephacryl-Säulen bei der TFF2-Reinigung.....	59
3.1.3.1. Sephacryl S-500 HR.....	59
3.1.3.2. Sephacryl S-300 HR.....	60
3.2. Bestimmung der N-Glykosylierung von TFF2 mittels Lektinen.....	61

3.2.1. Reinigung geeigneter Gewebeproben für Lektinanalysen.....	62
3.2.2. Verdau des gereinigten TFF2 mit PNGase-F.....	63
3.2.3. Untersuchungen der gereinigten Extrakte mit Hilfe von Antikörpern bzw. Lektinen.....	64
3.3. Agarose Gelelektrophorese gereinigter TFF2-Komplexe.....	66
3.4. Untersuchungen zur Wechselwirkung von TFF2 und Muzinen.....	69
4. Diskussion.....	71
4.1. Erstellung eines Reinigungsprotokolls für TFF2.....	71
4.1.1. Größenausschluss-Chromatographie.....	71
4.1.2. Anionenaustauschchromatographie.....	72
4.1.3. Verminderung der TFF2-Immunreaktivität unter nicht-reduzierenden Bedingungen.....	75
4.2. Glykosylierung des TFF2 mit LacdiNAc.....	75
4.2.1. Vorkommen und Bildung der LacdiNAc-Struktur.....	75
4.2.2. Ergebnisse der Lektinanalyse.....	77
4.2.3. Physiologische Funktionen der LacdiNAc-Struktur.....	79
4.2.4. Expression von LacdiNAc im Rahmen von Krebserkrankungen.....	80
4.3. Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen TFF2 und der hochmolekularen Muzinfraktion.....	80
4.3.1. Eigene Ergebnisse.....	80
4.3.2. Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung und Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung.....	84
5.1. Abstract.....	85
6. Literaturverzeichnis.....	86
7. Anhang.....	101
7.1. Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen (323MA)	101
7.2. Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen (343Mc).....	116
8. Ehrenerklärung.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Sekundärstruktur von TFF2	10
Abb. 2: Anatomie des Magens.....	11
Abb. 3: Anatomie des Duodenums.....	11
Abb. 4: Schematischer Aufbau der Fundus- und Antrumdrüse.....	12
Abb. 5: Schematischer Aufbau des „semi-dry“-Elektroblots.....	32
Abb. 6: Schematischer Aufbau des Kapillarblots.....	33
Abb. 7: Reaktion des Luminols mit Sauerstoff.....	37
Abb. 8: Beispielhafte semi-quantitative Analyse der Immunreaktivität eines Westernblots.	38
Abb. 9: Westernblots von Rohextrakten aus dem Antrum, Fundus/Corpus und prox. Duodenum.....	43
Abb. 10: SEC des Duodenum-Rohextraktes 369D _{Pr} (Sephadex G-200).....	45
Abb. 11: Resource Q-Profil der TFF2-positiven SEC-Fractionen des Duodenum-Rohextraktes 369D _{Pr}	46
Abb. 12: Präparative SEC des Antrum-Rohextraktes 323M _A (Sephadex G-200).....	47
Abb. 13: Resource Q-Profil der TFF2-positiven SEC-Fractionen des Antrum-Rohextraktes 323M _A	47
Abb. 14: SDS-PAGE und Westernblot der gereinigten Probe 323M _A	48
Abb. 15: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der gereinigten Probe 323M _A	48
Abb. 16: SEC des Antrum-Rohextraktes 333M _A (Sephadex G-200).....	50
Abb. 17: Resource Q-Profil der TFF2-positiven SEC-Fractionen des Antrum-Rohextraktes 333M _A	51
Abb. 18: SEC des Antrum-Rohextraktes 337M _A (Sephadex G-200).....	52
Abb. 19: Resource Q-Profil der TFF2-positiven SEC-Fractionen des Antrum-Rohextraktes 337M _A	53
Abb. 20: TFF2-Reinigung der Gewebeprobe 343M _C (Sephadex G-200 und Resource Q).....	54
Abb. 21: Resource Q des vorgereinigten Corpusextraktes 343M _C mit 100%-NaCl-Stufe.....	55
Abb. 22: Vergleich der Resource Q-Elutionsprofile von 343M _C bei unterschiedlichem Gradientenverlauf.....	56
Abb. 23: TFF2-Reinigung des Rohextraktes 358M _A (Resource Q).....	57
Abb. 24: SEC der „nicht gebundenen“ Resource Q-Fraktion von 358M _A (Superose 6 10/300).....	58
Abb. 25: SEC der „gebundenen“ Resource Q-Fraktion von 358M _A (Superose 6 10/300).....	58
Abb. 26: SEC des Corpus-Rohextraktes 382M _C (Sephacryl S-500 HR).....	59
Abb. 27: SEC des Corpus-Rohextraktes 400M _A (Sephacryl S-300 HR).....	60
Abb. 28: 15% SDS-PAGE-Gele der gereinigten Magenextrakte 323M _A bzw. 382M _C (Coomassiefärbung).....	61
Abb. 29: LactiNac-Glykanstruktur bei TFF2 aus dem Antrum/Corpus.....	62
Abb. 30: SEC-Elutionsprofile der Proben 257M _A (Superose 6 10/300) und 381M _A (S-300).....	63
Abb. 31: PNGase-F-Verdau der gereinigten Probe 461M _F	64
Abb. 32: Westernblot (anti-hTFF2-1 bzw. anti-hTFF2-3); je 3 Proben aus dem Antrum und Fundus.....	65
Abb. 33: Lektinanalyse der Westernblots; je 3 Proben aus dem Antrum und Fundus.....	65
Abb. 34: Westernblot (SDS-PAGE) eines Konzentrats des gereinigten Extraktes 343M _C	66
Abb. 35: Westernblot (1% Agarosegel) eines Konzentrat des gereinigten Extraktes 343M _C	67
Abb. 36: Red. SDS-PAGE des Tascheninhalts eines Agarosegels (Westernblot und Coomassiefärbung).....	68
Abb. 37: SEC-Profile (S-300) der Magenprobe 450M _F unter verschiedenen Bedingungen.....	69
Abb. 38: Schematische Darstellung der Reinigungsergebnisse der Probe 358M _A	74
Abb. 39: Synthese der LactiNac-Struktur.....	76

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Nomenklatur der TFF-Peptide	9
Tab. 2: Systemdaten des Ultra Clear TWF Reinstwassersystems	21
Tab. 3: Verwendete Gewebeprobe.....	22
Tab. 4: Spezifität der verwendeten Lektine.....	23
Tab. 5: Zusammensetzung des Extraktionspuffers.....	24
Tab. 6: Mit dem Äkta-FPLC System verwendete SEC-Säulen.....	26
Tab. 7: Zusammensetzung des reduzierenden SDS-Probenpuffers.....	27
Tab. 8: Zusammensetzung des Sammelgels (6%, 2 Gele)	28
Tab. 9: Zusammensetzung des Trenngels (15%, 2 Gele)	28
Tab. 10: „Lämmli“-Elektrophoresepuffer.....	29
Tab. 11: pEqGOLD Protein-Marker I.....	30
Tab. 12: Laufpuffer für die SDS-AgGE.....	31
Tab. 13: Transferpuffer für den Elektrolot	32
Tab. 14: Transferpuffer für den Kapillarlot.....	33
Tab. 15: Zusammensetzung der Ponceau S-Lösung	34
Tab. 16: 1x PBS-Lösung und 1x PBS-T.....	35
Tab. 17: 1x TBS-T-Lösung.....	36
Tab. 18: Protokoll für die Lektinfärbung.....	36
Tab. 19: ECL-Lösung 1.....	37
Tab. 20: ECL-Lösung 2	38
Tab. 21: Protokoll für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	39
Tab. 22: Bei der SEC verwendete Säulenmaterialien	44
Tab. 23: Durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine (323M _A).....	49
Tab. 24: SEC der Magenproben für die Lektinanalyse.....	63
Tab. 25: Durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine (343M _C).....	68

Abkürzungsverzeichnis

β-GalNAc	N-Acetyl-beta-D-galaktosamin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AgGE	Agarose-Gelelektrophorese
anti-h	anti-human
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Da	Dalton
deion.	deionisiertes, gereinigtes Wasser
DMBT1	<i>deleted in malignant brain tumors 1</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Natrium-Dextransulfat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ExpASy	Expert Protein Analysis System
Fc	Fc-Fragment ("crystallizable fragment")
FCGBP	<i>IgG Fc binding protein</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung/Gramm
HPR	<i>Horseradish peroxidase</i>
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
L	Liter
LacdiNAc	N,N'-Diacetyllaktosamin
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
MNC	<i>Mucous Neck Cell</i> (Nebenzelle)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MUC	Muzin

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NR	nicht-reduzierende Bedingungen
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline + Tween 20</i>
R	Reduzierende Bedingungen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Drehzahl)
rSP	<i>rat spasmodic peptide</i> (TFF2-Ortholog in der Ratte)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SMC	<i>Surface Mucous Cell</i> (Oberflächenepithelzelle)
SPEM	<i>spasmodic polypeptide-expressing metaplasia</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline + Tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFF	<i>Trefoil Factor Family</i>
TGF α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TOC	<i>total organic carbon</i>
TOF-MS	<i>time-of-flight mass spectrometry</i> (Flugzeitmassenspektrometrie)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UACL	<i>ulcer-associated cell lineage</i>
UniProtKB	Universal Protein Database Knowledgebase
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western Blot
w/v	<i>weight per volume</i>

1. Einleitung

Im Folgenden wird der Kenntnisstand bezüglich der TFF-Peptide und insbesondere TFF2 vor allem zu Beginn der Dissertation im Jahre 2010 dargestellt, da die Planung des experimentellen Teiles der vorliegenden Arbeit vor diesem Hintergrund erfolgte. Die praktischen Arbeiten wurden im April 2013 beendet. Der aktuelle Forschungsstand sowie der Beitrag der hier vorgestellten Ergebnisse für die in der Folgezeit gewonnenen Erkenntnisse auf dem Gebiet der TFF2-Forschung werden dann in der Diskussion erörtert.

1.1. TFF-Peptide

1.1.1. Entdeckung und Struktur von TFF2, Nomenklatur von TFF-Peptiden

TFF2 wurde zuerst aus der Bauchspeicheldrüse des Schweins isoliert und als „pancreatic spasmolytic polypeptide“ (PSP bzw. SP) bezeichnet (Jorgensen *et al.* 1982; Rose *et al.* 1989); es handelt sich bei TFF2 um ein sezerniertes, aus 106 Aminosäuren bestehendes Peptid (Tomasetto *et al.* 1990; Gött *et al.* 1996; May *et al.* 2000). Die Bezeichnung „spasmolytic“ resultiert dabei aus den Ergebnissen anfänglich durchgeführter Experimente, bei denen sowohl oral als auch parenteral verabreichtes TFF2 die Motilität des Magen-Darm-Traktes und auch die Sekretion der Magensäure inhibierte (Jorgensen *et al.* 1982). Nach Aufklärung der Primärstruktur und durch Sequenzvergleiche stellte sich heraus, dass SP gemeinsam mit den beiden Peptiden „intestinal trefoil factor“ (hP1.B; heute: TFF3) und pS2 (heute: TFF1) zu einer Familie gehört, die eine cysteinreiche Proteindomäne ausbildet, welche in der Sekundärstruktur Ähnlichkeit mit einem dreiblättrigen Kleeblatt („trefoil“) aufweist. Bemerkenswert ist, dass TFF2 als einziges Peptid dieser Familie über zwei dieser Proteindomänen verfügt, während die anderen beiden Peptide diese Domäne nur einmal besitzen. Auf der *Conference Philippe Laudat* wurde 1996 beschlossen, die Domäne als „TFF-Domäne“ zu bezeichnen, die Peptidfamilie als „Trefoil Factor Family“ (TFF) und die Nomenklatur der drei Peptide zu vereinheitlichen (Tab. 1).

Tab. 1: Nomenklatur der TFF-Peptide (Wright *et al.* 1997)

ursprüngliche Bezeichnung	neue Bezeichnung	Anzahl der TFF-Domänen
pS2 (Masiakowski <i>et al.</i> 1982)	TFF1	1
SP, PSP (Jorgensen <i>et al.</i> 1982)	TFF2	2
Intestinal trefoil factor, hP1.B (Suemori <i>et al.</i> 1991, Hauser <i>et al.</i> 1993)	TFF3	1

Die TFF-Domäne, früher als „P-Domäne“ bezeichnet (Hoffmann und Hauser 1993), ist ein etwa 40 Aminosäuren umfassendes Motiv (Carr *et al.* 1994), innerhalb dessen sechs konservierte Cysteinreste nach dem Prinzip Cys^I-Cys^V, Cys^{II}-Cys^{IV} und Cys^{III}-Cys^{VI} drei Disulfidbrücken ausbilden (Abb. 1). In jeder TFF-Domäne befindet sich zudem vor Cys^{VI} ein konservierter Tryptophanrest (Hoffmann und Hauser 1993; Thim 1989; Gajhede *et al.* 1993). Neben den jeweils drei Disulfidbrücken der beiden TFF-Domänen bildet TFF2 noch eine siebente Disulfidbrücke zwischen Cys-6 und Cys-104 aus, welche den C- mit dem N-Terminus verbindet. Dies führt zu einer zyklischen, kompakten Struktur des TFF2-Peptids, die für die Resistenz von TFF2 gegenüber dem Magensaft verantwortlich sein dürfte (Kjellev 2009). Menschliches TFF2 besitzt an Asn-15, welches sich innerhalb der ersten TFF-Domäne befindet, eine N-Glykosylierungsstelle, die bei den homologen Proteinen aus dem Schwein, der Maus und der Ratte fehlt.

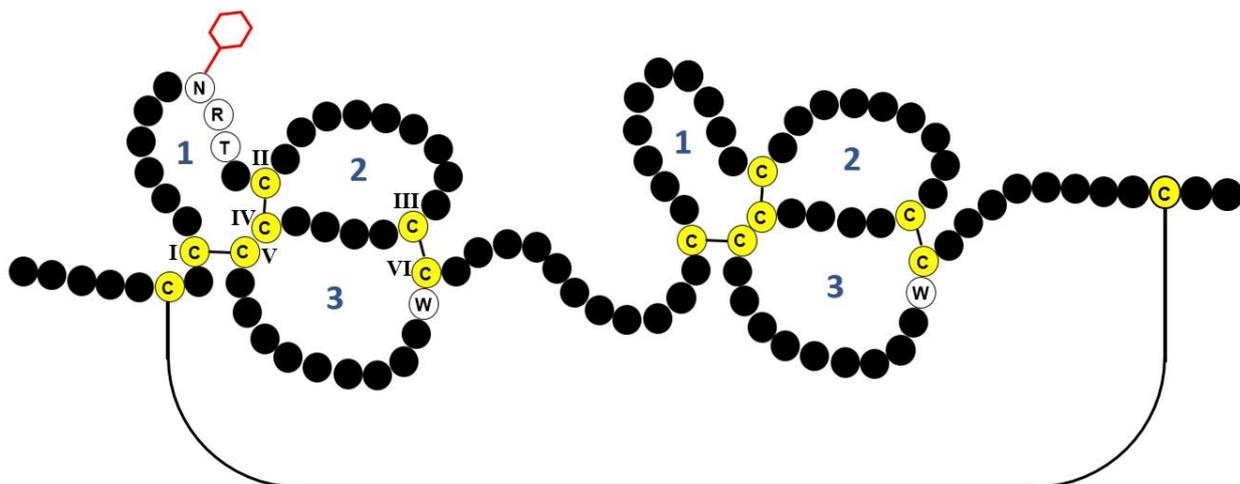


Abb. 1. Sekundärstruktur von TFF2 (nach Hoffmann 2015). Die Loops sind in blau nummeriert, die Cysteinreste in gelb dargestellt. Die N-Glykosylierungsstelle (NRT) in Loop 1 ist gekennzeichnet, die Glykosylierung an Asn-15 ist durch das rote Sechseck symbolisiert. Im jeweils dritten Loop des TFF-Motivs befindet sich vor dem letzten Cysteinrest ein konservierter Tryptophanrest (W). Außerdem ist die Disulfidbrücke zwischen Cys-6 und Cys-104 eingezeichnet, die den C- und N-Terminus verbindet.

Der überwiegende Teil des menschlichen TFF2 ist N-glykosyliert, während nicht glykosyliertes TFF2 nur einen geringen Anteil ausmacht (May *et al.* 2000). Die drei TFF-Peptide sind beim Menschen auf Chromosom 21 in der Anordnung Telomer-TFF1-TFF2-TFF3-Centromer codiert; die Transkription verläuft in Richtung des Centromers (Gött *et al.* 1996, Seib *et al.* 1997).

1.1.2. Vorkommen und Lokalisation von TFF2

TFF2 wird beim Menschen vor allem im Magen und Duodenum zusammen mit dem Muzin MUC6 exokrin sezerniert (Tomasetto *et al.* 1990; Hanby *et al.* 1993; Poulsom 1996). Im Fundus des Magens sind die Nebenzellen (*Mucous Neck Cells*, MNC), im Antrum die Antrumdrüsenzellen und im Duodenum die Brunner'schen Drüsenzellen für die Synthese verantwortlich (Tomasetto *et al.* 1990; Hanby *et al.* 1993; Ota *et al.* 2006).

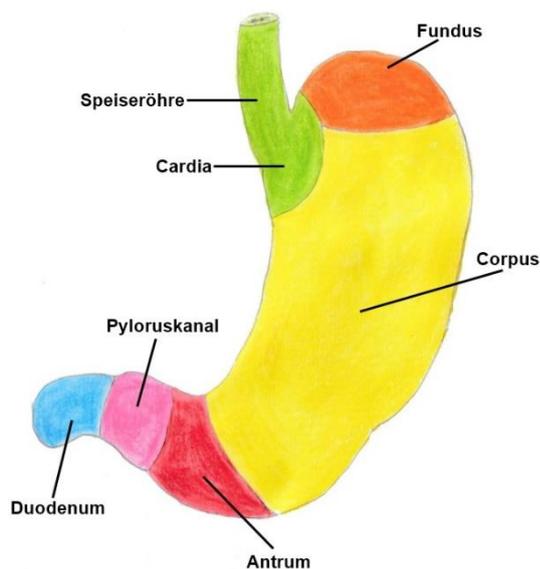


Abb. 2. Anatomie des Magens (nach Schünke *et al.* 2009, verändert). Direkt hinter der Speiseröhre befindet sich die Cardia des Magens; der darüber liegende Bereich wird als Fundus bezeichnet. Den weitaus größten Teil macht der Corpus aus. Das Antrum befindet sich vor dem Pyloruskanal, der schließlich in den Zwölffingerdarm (Duodenum) mündet.

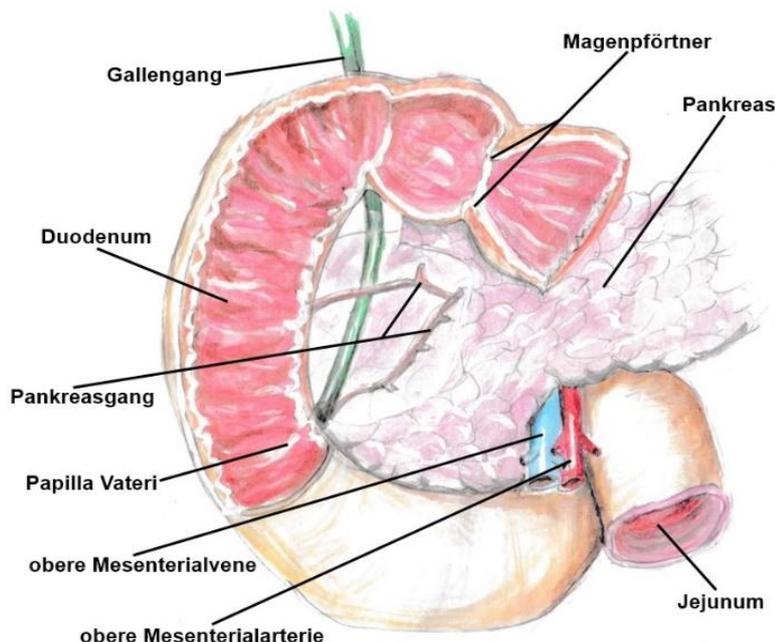


Abb. 3. Anatomie des Duodenums (nach Schünke *et al.* 2009, verändert). Hinter dem Magenpförtner beginnt der obere Teil des Duodenums, der in den absteigenden Teil übergeht. In diesem befindet sich auch die Vatersche Papille (Papilla Vateri), in die sowohl der Gallengang als auch der Pankreasgang münden. Das Duodenum geht nach einer Krümmung in das Jejunum über.

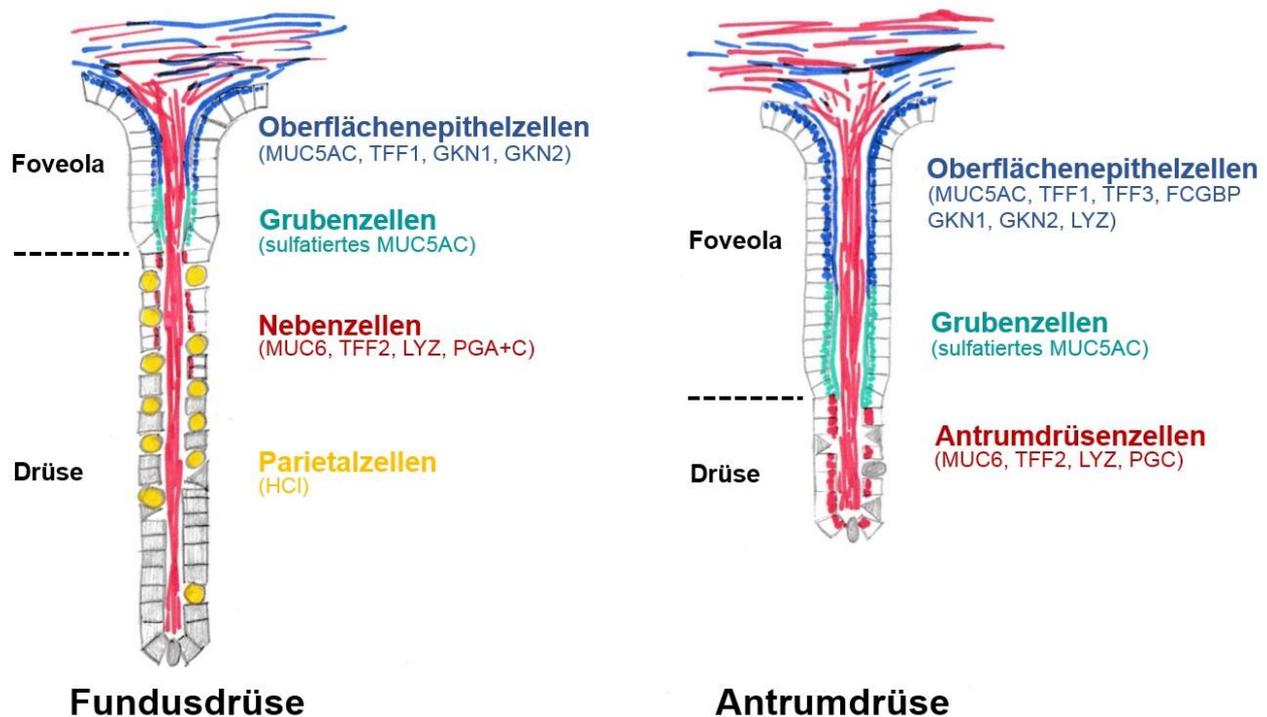


Abb. 4. Schematischer Aufbau der Fundus- und Antrumdrüse (nach Hoffmann 2015, verändert); die Drüse ist im Verhältnis zur Foveola tatsächlich viel länger. Die laminar aufgebaute Schleimschicht des Magens wird hauptsächlich aus den Muzinen MUC5AC (blau) und MUC6 (rot) gebildet. In beiden Drüsen synthetisieren die Oberflächenepithelzellen MUC5AC, während die Zellen in der Foveola dieses zusätzlich sulfatieren. Weitere Exkretionsprodukte der Oberflächenepithelzellen sind TFF1, TFF3, Gastrokin 1+2, FCGBP und Lysozym, wobei sich die Oberflächenepithelzellen von Antrum und Fundus teilweise unterscheiden. MUC6 und TFF2 werden im Fundus von den Nebenzellen und im Antrum von den Antrumdrüsenzellen sezerniert. Die HCl-produzierenden Parietalzellen sind nur in der Fundusdrüse zu finden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind weitere Zelltypen in den Drüsen nicht explizit dargestellt.

Bemerkenswert ist, dass die mRNA für TFF2 nur in den Vorläuferstufen der Nebenzellen nachweisbar ist, während das TFF2-Peptid beim Menschen (Kouznetsova *et al.* 2011), der Maus (Quante *et al.* 2010) und der Ratte (Jeffrey *et al.* 1994) nur in reifen Nebenzellen nachweisbar ist. Innerhalb des Gastrointestinaltraktes ist TFF2 mit den Muzinen assoziiert (Ota *et al.* 2006; Kouznetsova *et al.* 2007) und stellt einen charakteristischen Bestandteil der laminar aufgebauten Schleimschicht an der Oberfläche des Magens dar, wo es zusammen mit MUC6 vorkommt (Ota *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2006). TFF2 ist jedoch nicht nur Bestandteil der Mukusschicht, sondern lässt sich auch im Magensaft nachweisen, wo es in einer Konzentration von $\sim 1,9 \mu\text{g/mL}$ vorkommt (Kubota *et al.* 2011). Während der pH-Wert, der Gesamtproteingehalt und die Pepsinkonzentration des Magensaftes im Verlauf eines Tages nicht signifikant variieren, unterliegt die TFF2-Konzentration im Magensaft dramatischen Schwankungen: am niedrigsten ist sie am frühen Abend mit etwa $0,29 \mu\text{g/mL}$ und ihr Maximum erreicht sie zwischen 5:00 und 7:00 Uhr mit $7,9 \mu\text{g/mL}$ (Semple *et al.*

2001). Auch das Verhältnis von glykosyliertem zu nicht-glykosyliertem TFF2 unterliegt zirkadianen Schwankungen: zwischen 9:00 und 23:00 Uhr ist nicht-glykosyliertes TFF2 nahezu nicht nachweisbar und erst mit der Steigerung der gesamten TFF2-Produktion während der Nacht nimmt auch der Anteil an nicht-glykosyliertem TFF2 zu. Seine maximale Konzentration erreicht nicht-glykosyliertes TFF2 um etwa 7:00 Uhr; zu diesem Zeitpunkt schwankte das Verhältnis zwischen glykosyliertem zu nicht-glykosyliertem TFF2 zwischen 2,7:1 und 7:1 (Semple *et al.* 2001). Der nächtliche Anstieg der TFF2-Konzentration im Magensaft wird durch eine Infektion mit *H. pylori* abgeschwächt; dieser Effekt konnte auch durch Schlafentzug der Probanden erreicht werden und war ebenfalls bei fortgeschrittenem Alter der Testpersonen zu beobachten (Johns *et al.* 2005). Abgesehen vom Gastrointestinaltrakt wird TFF2 auch in den Speicheldrüsen synthetisiert (Jeffrey *et al.* 1994; Kouznetsova *et al.* 2010).

Neben der exokrinen Sekretion wird TFF2 auch endokrin sezerniert. So spielt es zum Beispiel eine Rolle im Immunsystem, wo es bei der Ratte in den Makrophagen des Peritoneums und außerdem im Gewebe des lymphatischen Systems wie der Milz, dem Thymus, den Lymphknoten und dem Knochenmark exprimiert wird (Cook *et al.* 1999; Kurt-Jones *et al.* 2007). Weiterhin konnte bei der Ratte gezeigt werden, dass die TFF2-Expression in der Milz durch intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden aus *E. coli* um ein Vielfaches gesteigert wird und die Migration von Monocyten stimulieren kann, so dass eine mögliche Rolle für TFF2, aber auch für TFF3, bei der Immunantwort bei Entzündungen des Gewebes vorgeschlagen wurde (Cook *et al.* 1999). Im zentralen Nervensystem konnte TFF2 im Hypophysenvorderlappen und im sich entwickelnden Gehirn nachgewiesen werden (Hinz *et al.* 2004), im menschlichen Blutserum liegt das Referenzintervall für TFF2 zwischen 37-190 pmol/L (Vestergaard *et al.* 2004).

1.1.3. TFF2-Homologe in *Xenopus laevis*

Die funktionellen Orthologen von TFF2 in *X. laevis* sind die beiden Peptide xP4.1 und xP4.2, die jeweils über vier TFF-Domänen verfügen (Jagla *et al.* 1998; Hoffmann 2015). Sie werden von zwei verschiedenen Genen codiert und nur xP4.1 weist eine N-Glykosylierungsstelle auf (Hauser und Hoffmann 1991; Botzler *et al.* 1999). Im Gegensatz zum menschlichen TFF2, welches eine Disulfidbrücke zwischen Cys-6 und Cys-104 ausbildet und damit C- und N-Terminus des TFF2-Peptids verbindet, fehlen bei den homologen Peptiden aus *X. laevis* die entsprechenden Cysteinreste, so dass hier keine Zyklisierung möglich ist (Jagla *et al.* 1998). Auch das Expressionsmuster der beiden Peptide unterscheidet sich; so wird das

glykosylierte Peptid xP4.1 in allen Bereichen des Magens exprimiert, während das nicht glykosylierte xP4.2 auf den Fundus und Corpus begrenzt ist (Jagla *et al.* 1998; Hoffmann und Jagla 2002). Bei der RT-PCR Analyse konnten die Transkripte von xP4.1 nur im Magen und nicht in der Speiseröhre detektiert werden, während die Transkripte von xP4.2 sowohl in der Speiseröhre als auch im Magen nachweisbar waren, wobei ein absteigender Gradient vom Fundus zum Antrum beobachtet wurde (Hoffmann und Jagla 2002).

1.1.4. Ektopische TFF2-Expression im Rahmen pathologischer Prozesse

1.1.4.1. Innerhalb des Gastrointestinaltraktes

TFF2 wird beim Barret-Ösophagus exprimiert (Hanby *et al.* 1994); es handelt sich dabei um eine intestinale Metaplasie, die als Folge der Refluxkrankheit auftritt: aufgrund des ständigen Rückflusses des sauren Mageninhalts wandelt sich das im unteren Teil der Speiseröhre vorhandene Plattenepithel in ein spezialisiertes Zylinderepithel, ähnlich wie das im Dünndarm, um (Spechler 1994). Bei etwa 0,3% der Patienten mit Barret-Ösophagus entwickelt sich daraus ein Adenokarzinom der Speiseröhre (Hvid-Jensen *et al.* 2011; Bhat *et al.* 2011).

Weiterhin induzieren Geschwüre im Gastrointestinaltrakt, die zum Beispiel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie *Morbus Crohn* oder *Colitis ulcerosa* typisch sind, die Ausbildung einer neuen Zelllinie in der umgebenden Mukosa, welche als *ulcer-associated cell lineage* (UACL) bezeichnet wird (Wright *et al.* 1990). Die UACL beginnt zunächst als Knospe an der Basis der intestinalen Krypten in der Nähe des Geschwürs, verzweigt sich in der *Lamina propria* und bildet schließlich eine neue Drüse, durch deren Gang Sekretionsprodukte zur Oberfläche der Mukosa gelangen (Ahnen *et al.* 1994). Die UACL sezerniert neben TFF2 auch die Muzine MUC5AC, MUC6, Lysozym und den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), so dass eine Rolle dieser Zelllinie *in vivo* für die Heilung des angrenzenden Geschwürs durch Stimulation von Proliferation und Regeneration postuliert wurde (Wright *et al.* 1990; Longman *et al.* 2000).

Bei der Ratte konnte gezeigt werden, dass die mRNA für das TFF2-Analogon *rat spasmolytic peptide* (rSP) nach einer durch Kälte induzierten Schädigung der Magenschleimhaut schnell anstieg und ihr Maximum am 3. Tag erreichte, während die mRNAs für EGF und *transforming growth factor α* (TGF α) ihr Maximum erst am 6. Tag zeigten (Alison *et al.* 1995).

Eine weitere TFF2-exprimierende Metaplasie des Gastrointestinaltraktes stellt die *spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia* (SPEM) dar. Bei ihr handelt es sich um eine

Muzin-sezernierende, metaplastische Zelllinie, deren Phänotyp den tiefen Antrumdrüsenzellen ähnelt, was die namensgebende Expression von TFF2, das früher als *spasmolytic polypeptide* bezeichnet wurde, beinhaltet (Goldenring *et al.* 2010). Während die intestinale Metaplasie eher inselförmig oder multifokal auftritt, erscheint die SPEM bei Patienten, die später Magenkrebs entwickeln, typischerweise diffus über den Corpus verteilt (Goldenring *et al.* 2010; El-Zimaity *et al.* 2002). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung der SPEM-Zelllinie und einer Infektion mit *H. pylori*: bei 68% der Patienten, die eine durch dieses Bakterium verursachte Gastritis im Bereich des Fundus hatten, war eine SPEM in den Biopsien nachweisbar (Schmidt *et al.* 1999). Was die Korrelation von SPEM und die Ausbildung eines gastrischen Adenokarzinoms betrifft, ist diese noch ausgeprägter: bei der Untersuchung von 22 Resektionsproben mit dieser Diagnose konnte die SPEM in 91% der Fälle nachgewiesen werden, wobei sie typischerweise in der Mukosa neben dem Adenokarzinom oder in Bereichen mit Dysplasien lokalisiert war; somit ist die SPEM eher noch stärker mit der Entwicklung eines Adenokarzinoms im Magen assoziiert als die intestinale Metaplasie (Goldenring *et al.* 2010, Schmidt *et al.* 1999).

1.1.4.2. Außerhalb des Gastrointestinaltraktes

Alle drei TFF-Peptide sind in der Bronchiallavage nachweisbar, wobei die Konzentrationen dieser Peptide bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) relativ zur gesunden Kontrollgruppe zwei- bis dreimal so hoch waren (Viby *et al.* 2015). Bei Patienten mit bösartigen Lungenerkrankungen waren die Konzentrationen von TFF1 und TFF2 dreimal so hoch wie in der gesunden Referenzgruppe (Viby *et al.* 2015). Auch bei der Nephrolithiasis ist die Konzentration von TFF2 im Urin signifikant erhöht; dies ist darum besonders bemerkenswert, da TFF2 unter physiologischen Bedingungen im Harntrakt von allen TFF-Peptiden am geringsten exprimiert wird und dort nur in Spuren vorkommt (Rinnert *et al.* 2010). Während TFF1 in der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 ursprünglich aufgrund seiner Regulation durch Östrogen entdeckt wurde (Masiakowski *et al.* 1982) und auch TFF3 dort hormonabhängig induziert wird (Poulsom *et al.* 1997), wird TFF2 interessanterweise dort nicht exprimiert (Tomasetto *et al.* 1990).

1.1.5. Mögliche Funktionen des TFF2-Peptids

1.1.5.1. Wechselwirkungen von TFF2 mit der Mukusschicht des Magens

TFF2 wird zusammen mit MUC6 sezerniert und bereits 2007 konnten Kouznetsova *et al.* zeigen, daß TFF2 trotz seines geringen Molgewichts bei der Größenausschluss-

Chromatographie ausschließlich im hochmolekularen Muzinpeak lokalisiert war. In histologischen Untersuchungen wurde TFF2 zusammen mit MUC6 in der laminar aufgebauten Schleimschicht des Magens nachgewiesen (Ota *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2006), so dass TFF2 die Eigenschaften dieser Schleimschicht mitbestimmen könnte.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von TFF2 sowohl die Viskosität als auch die Elastizität einer 8%igen kommerziellen Muzinlösung aus dem Schweinemagen um den Faktor 10 erhöht und diese dabei in einen gelartigen Zustand übergeht, wobei serpentinartige Komplexe zwischen TFF2 und dem Muzin bestehen (Thim *et al.* 2002). Es besteht weiterhin ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Viskositätszunahme und dem pH-Wert; wobei die höchste Viskosität bei niedrigen pH-Werten erreicht wird (Thim *et al.* 2002). Im Tiermodell bei der Ratte und der Maus wurde beobachtet, dass intravenös verabreichtes humanes TFF2 in die Mukusschicht des Magens integriert wird und dort eine signifikante Zunahme der Viskosität bewirkt (Kjellev *et al.* 2006). Auch wurde radioaktiv markiertes TFF2 nach intraperitonealer Applikation von Nebenzellen, Parietalzellen und Antrumdrüsenzellen aufgenommen; das heißt von TFF2-sezernierenden Zellen (Poulsen *et al.* 1998). Dies könnte für eine rezeptor-abhängige Transzytose von TFF2 sprechen (Poulsen *et al.* 1998).

1.1.5.2. Rolle von TFF2 im Rahmen einer Infektion mit *H. pylori*

Aus medizinischer Sicht sind Wechselwirkungen zwischen *H. pylori* und TFF2 von besonderem Interesse, da dieser Keim bei fast der Hälfte aller Menschen nachweisbar ist und somit eine der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit darstellt (Pounder und Ng 1995). Er wird insbesondere mit chronischen Geschwüren des Gastrointestinaltrakts in Verbindung gebracht und gilt nicht nur als Risikofaktor für daraus entstehende Karzinome, sondern auch für Schleimhaut assoziierte (***Mucosa Associated Lymphoid Tissue***, MALT) Lymphome (Kusters *et al.* 2006), weshalb *H. pylori* im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation als Karzinogen der Gruppe 1 eingestuft wurde.

Im Falle einer Besiedelung des Magens mit *H. pylori* befindet sich der Großteil der Bakterien in der apikalen Mukusschicht, wo sie an MUC5AC gebunden sind (Van den Brink *et al.* 2000), während ungefähr 20% direkt an die Zellen des Magenepithels binden (Colomb *et al.* 2014). Die Expression sowohl von MUC6 als auch von TFF2 wird durch die Infektion mit *H. pylori* zunächst verstärkt (Xia *et al.* 2004). TFF2 könnte durch die in Kapitel 1.1.5.3 beschriebenen motogenen und cytoprotektiven Effekte einerseits die Reparatur des Epithels unterstützen und andererseits die akute Entzündung durch Inhibierung der

Stickstoffmonoxid-Synthase in Monocyten abmildern (Giraud *et al.* 2004). TFF2 könnte damit eine Schlüsselstellung bei der Kommunikation zwischen dem Epithel und dem Immunsystem einnehmen (Kurt-Jones *et al.* 2007). Die Steigerung der MUC6-Expression während der Infektion mit *H. pylori* ist für den Menschen physiologisch sinnvoll, da seine O-Glykane mit der Struktur GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow R eine antibiotische Wirkung gegen den Keim entfalten, indem sie die Biosynthese von Cholesteryl-alpha-D-glucopyranosid inhibieren, das einen wichtigen Zellwandbestandteil von *H. pylori* darstellt (Kawakubo *et al.* 2004). Interessanterweise kommt es im weiteren Verlauf einer *H. pylori*-Infektion zu einer Hypermethylierung des TFF2-Promotors, wodurch die TFF2-Expression abnimmt und es in der Folge bei der Maus und dem Menschen zur Entwicklung von Tumoren kommt (Peterson *et al.* 2010).

1.1.5.3. Motogene und andere Effekte, mögliche TFF2-Rezeptoren

TFF2 ist in der Lage, in geringem Ausmaß motogene Effekte auszulösen, die über ERK1/2 vermittelt werden (Playford *et al.* 1995; Graness *et al.* 2002; Chwieralski *et al.* 2004). *Tff2*-defiziente (*Tff2*^{-/-}) Mäuse zeigen schwere Störungen bei der Restitution der Oberflächenschleimhaut des Magens nach Laser-induzierter Schädigung, die interessanterweise durch Zugabe von *Tff3* aus der Ratte abgemildert werden können (Xue *et al.* 2010). Da die Expression von TFF2 nach Verletzungen der Magenschleimhaut erhöht wird, wurde es auch als „early response“ Schutzpeptid angesehen, welches für die Reparatur des Epithels mitverantwortlich sein könnte (Wong *et al.* 2000). TFF2 kann in Monocyten die durch Lipopolysaccharide induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid hemmen und ist in der Lage, die Rekrutierung von Leukozyten zum Ort einer Verletzung zu begrenzen (Baus-Loncar *et al.* 2005).

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass luminal verabreichtes TFF2 eine durch Dextransulfat (DSS) induzierte Colitis positiv beeinflusste, während die parenterale Gabe des Peptids den gegenteiligen Effekt auslöste (Poulsen *et al.* 2005). Auch die Gabe von gentechnisch verändertem *Lactococcus lactis*, der das murine *Tff2* exprimiert, konnte in der Maus den positiven Effekt des Peptids auf eine DSS-induzierte Colitis bestätigen (Vandenbroucke *et al.* 2004). *Tff2*^{-/-} Mäuse, die mit *H. pylori* infiziert wurden, gingen im Bereich des Antrums schneller vom Stadium der Gastritis in eine Dysplasie über (Fox *et al.* 2007), was ebenfalls die Bedeutung von TFF2 unterstreicht.

Es gibt außerdem Berichte, dass TFF2 die Apoptose sowohl fördern als auch inhibieren kann und in der Brustkarzinom-Zelllinie MCF-7 die Ausbildung von verzweigten,

drüsenartigen Strukturen induziert (Lalani *et al.* 1999; Tu *et al.* 2009; Paunel-Görgülü *et al.* 2011).

Trotz der vielfältigen durch TFF2 vermittelten Effekte wurde bisher kein typischer Transmembran-Rezeptor für TFF2 identifiziert (Otto *et al.* 1996). TFF2 wird als ein Ligand für den Chemokin-Rezeptor CXCR4 betrachtet (Dubeykovskaya *et al.* 2009; Hoffmann 2009) und bindet an CRP-ductin/DMBT1 sowie an Integrin $\beta 1$ aus dem Schweinemagen (Thim und Mørtz 2000).

1.2. Die gastrale Mukusschicht und Muzine des Magens

Da es zu Beginn der Dissertation schon klare biochemische und histologische Hinweise gab, dass TFF2 im Magen mit dem Mukus bzw. der Mukusschicht assoziiert ist (Kouznetsova *et al.* 2007; Ota *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2006) und dass TFF2 gemeinsam mit dem Muzin MUC6 exokrin sezerniert wird (Tomasetto *et al.* 1990; Hanby *et al.* 1993; Poulsom 1996), soll an dieser Stelle ein Überblick über diese und die darin enthaltenen Muzine gegeben werden.

Die Mukusschicht des Gastrointestinaltrakts erfüllt viele physiologische Funktionen: sie erleichtert die Passage der Nahrung, schützt das Epithel vor mechanischem Schaden und der Einwirkung von Pepsin, sie ist essenziell für die Aufrechterhaltung des pH-Gradienten zum Magensaft und sie verhindert oder begrenzt die Besiedlung mit schädlichen Mikroorganismen wie *H. pylori* (Allen 1989). Ein wesentlicher Bestandteil der Mukusschicht sind die Muzine, wobei es sich um sehr große (M_r 10^6 - 10^7 Dalton), viskose Glykoproteine handelt (Bansil *et al.* 1995; McGuckin *et al.* 2011). Die wichtigsten Muzine im Magen sind MUC5AC, das von den Oberflächenepithelzellen sezerniert wird und MUC6, das typischerweise von den Nebenzellen in den Fundusdrüsen und den Antrumdrüsenzellen, sowie den duodenalen Brunnerschen Drüsen exprimiert wird (Nordman *et al.* 2002). Neben den Muzinen sind Wasser, Immunglobuline (McGuckin *et al.* 2011), Ionen (u.a. H^+ , Cl^- , HCO_3^- , Ca^{2+}) und andere Proteine in der Mukusschicht enthalten, z.B. TFF-Peptide (Hoffmann 2013), FCGBP (Kouznetsova *et al.* 2011), Galektine (Nio-Kobayashi *et al.* 2009) und Lysozym (Kouznetsova *et al.* 2011).

Sezernierte Muzine bestehen typischerweise aus einer linearen Proteinkette, die als ApoMuzin bezeichnet wird (Strous *et al.* 1992) und am amino- und carboxyterminalen Ende oft globuläre Bereiche aufweist, die reich an Cysteinresten sind und eine inter- oder intramolekulare Vernetzung über Disulfidbrücken ermöglichen (Bansil *et al.* 1995). Den größten Teil des ApoMuzins machen repetetive Domänen aus, die reich an Prolin, Threonin

und Serin sind (PTS-Domänen). Die Threonin- und Serinreste können bis zu einem Drittel der Aminosäuren in diesem Bereich ausmachen und sind über O-glykosidische Bindungen mit linearen oder verzweigten Oligosacchariden verbunden, die aus bis zu 12 Monosacchariden bestehen können und radial vom Kern des ApoMuzins abstehen, so dass das Muzin eine starre, stabähnliche Konfiguration annimmt.

Insgesamt macht der Kohlenhydratanteil ungefähr 75% der Masse des Muzins aus, während die restlichen 25% auf das ApoMuzin entfallen (Bansil *et al.* 1995).

MUC6 besitzt die ungewöhnliche Kohlenhydratgruppe GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β \rightarrow R an seinen nicht-reduzierenden Enden, wobei es sich um ein evolutionär sehr altes Prinzip handelt, das vom Frosch bis zum Menschen erhalten blieb (Hoffmann 2020). Diese Zuckerstruktur wird einerseits vom monoklonalen Antikörper HIK1083 (Ishihara *et al.* 1996), als auch vom Lektin GSA-II von *Griffonia simplicifolia* erkannt (Oinuma *et al.* 1994).

Knockout-Mäuse, die das für die Synthese dieser terminalen α GlcNAc-Gruppe notwendige Enzym (α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, α 4GnT) nicht besitzen, entwickeln spontan Adenokarzinome im Antrum (Karasawa *et al.* 2012). Des Weiteren wirkt das terminale α 1,4-GlcNAc-Glykan von MUC6 als Antibiotikum gegen *H. pylori*, da es die Cholesterol α -glucosyltransferase des Bakteriums inhibiert und so die Synthese eines essenziellen Zellwandbestandteils hemmt (Kawakubo *et al.* 2004; Lee *et al.* 2008). Aus diesem Grund besiedelt *H. pylori* vorwiegend die MUC5AC-Schichten des Mukus (van den Brink *et al.* 2000).

1.3. Ziele der Dissertation

Das primäre Ziel der Arbeit bestand darin, durch Verwendung verschiedener chromatographischer Trennverfahren und unterschiedlicher Säulenmaterialien ein geeignetes Reinigungsprotokoll für TFF2 aus dem menschlichen Magen und Duodenum zu etablieren.

Wenn TFF2 in genügend großer Menge und Reinheit für massenspektrometrische Untersuchungen isoliert werden kann, sollte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Hanisch (Universität Köln) die Glykanstruktur von TFF2 identifiziert werden. Es war bekannt, dass TFF2 eine Glykosylierungsstelle an N-15 besitzt und überwiegend glykosyliert vorliegt (May *et al.* 2000); allerdings gab es noch keine Informationen über die Art der angehängten Zuckerstruktur.

Da Vorversuche darauf hindeuten, dass TFF2 mit der hochmolekularen Mukusfraktion assoziiert ist (Kouznetsova *et al.* 2007), sollten diese Ergebnisse an verschiedenen Proben überprüft werden. Sollten sich diese Resultate reproduzieren lassen, könnten sowohl der bzw. die Bindungspartner von TFF2 in der Mukusfraktion identifiziert werden, als auch die Art der Bindung.

Zuletzt könnten Untersuchungen folgen, ob sich die Glykosylierung von TFF2 in Abhängigkeit von bestimmten äußeren Faktoren (Entzündungen oder anderen pathologischen Prozessen) ändert und ob sich diese in verschiedenen Regionen des Magens und im proximalen Duodenum unterscheidet.

2. Material und Methoden

Dieser Teil ist nach Standardprotokollen des **Instituts für Mikrobiologie und Medizinische Chemie** der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg verfasst und entsprechend individueller Änderungen modifiziert.

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Die Chemikalien, die für die Ansetzung von Puffern und sonstigen Lösungen für Protein-Standardmethoden verwendet wurden, hatten analysenreine Qualität (p.a.) und wurden von den Firmen **Sigma-Aldrich** (Deisenhofen, Deutschland), **Merck** (Darmstadt, Deutschland), **Riedel-de-Haën** (Seelze, Deutschland), **Roth** (Karlsruhe, Deutschland) und **Fisher Scientific GmbH** (Schwerte, Deutschland) geliefert. Für wässrige Lösungen wurde generell deionisiertes Wasser aus dem **Ultra Clear TWF Reinstwassersystem** (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Deutschland) verwendet.

Das von dieser Anlage bereitgestellte Wasser wies folgende Spezifikationen auf:

Tab. 2: Systemdaten des Ultra Clear TWF Reinstwassersystems

Produktwasserleistung	1,8	[L/min]
Leitfähigkeit bei 25°C	0,055	[µS/cm]
Widerstand bei 25°C	18,2	[MΩ * cm]
Totaler organischer Kohlenstoff	< 1	[ppb]
Bakterien	< 1	[KbE/mL]
Endotoxine	< 0,001	[EU/mL]
Partikel > 0,1 µm	< 1	[Stk./mL]

2.1.2. Gewebe

Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Erklärung von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg genehmigt. Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben entstammen vornehmlich Bereichen des Magens (Fundus, Corpus, Antrum) und des proximalen Duodenums. Für die Aufklärung der Patienten und deren Einverständniserklärung für die Gewebeentnahme war Herr Prof. Dr. med. Frank Meyer (Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie) zuständig und das entnommene Gewebe wurde nur dann verwendet, wenn die histopathologische Untersuchung durch Herrn Prof.

Dr. med. Thomas Kalinski (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Magdeburg) keine neoplastischen Veränderungen aufwies. Die Gewebeproben wurden bis zu ihrer jeweiligen Verwendung bei -80°C eingelagert und bei Bedarf Aliquots im gefrorenen Zustand mit einem Skalpell abgetrennt, um wiederholte Auftauzyklen zu vermeiden.

Tab. 3: Verwendete Gewebeproben

Interne Bezeichnung	Histologischer Befund und Diagnosen
323M _A	Normales Antrumgewebe
333M _A	Mittelgradige chronische Gastritis mit fokaler intestinaler Metaplasie
337M _A	Normales Antrumgewebe
343M _C	Chronische und floride Gastritis (vermutl. <i>H.pylori</i> induziert)
358M _A	Übergangsschleimhaut mit mäßiger, chronischer, leicht florider Gastritis (vermutl. <i>H.pylori</i>), sonst normal
369D _{Pr}	Normale Dünndarmmukosa und Brunnersche Drüsen
382M _C	Normales Corpusgewebe
400M _A	Leichte chronische Gastritis, <i>H.pylori</i> positiv
450M _F	Normales Fundusgewebe, Adipositas

2.1.3. Antikörper zum Nachweis von TFF2

Der immunlogische Nachweis des TFF2-Peptids wurde standardmäßig mittels des affinitätsgereinigten polyklonalen Antiserums **anti-hTFF2-1** (Jagla *et al.* 2000) durchgeführt, welches gegen die an *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) gekoppelte Sequenz FFPNSVEDCHY am C-Terminus des menschlichen TFF2 gerichtet ist. Vereinzelt kam auch **anti-hTFF2-3** zum Einsatz; hierbei handelt es sich ebenfalls um ein polyklonales Kaninchen-Antiserum, bei dem die Antikörper jedoch gegen das synthetische Peptid FFPKSVEDCHY (May *et al.* 2000) gerichtet sind, das ebenfalls an KLH gekoppelt ist. Beide Primärantikörper wurden in einer 1:1000 fachen Verdünnung bei der Immundetektion eingesetzt.

Als Sekundärantikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG (H+L) (PI-1000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:4000 zur Detektion der gebundenen anti-hTFF2-1 bzw. anti-hTFF2-3 Primärantikörper verwendet.

2.1.4. Lektine zum Nachweis spezifischer Zuckerstrukturen

Da TFF2 überwiegend in N-glykosylierter Form vorliegt (May *et al.* 2000), konnte die Verwendung spezifischer Lektine einen Hinweis über die Art der Glykosylierung liefern. In

dieser Arbeit wurden die folgenden biotinylierten Lektine verwendet: **LCA** aus *Lens culinaris*, **PSA** aus *Pisum sativum*, **SNA** aus *Sambucus nigra*, **WFA** aus *Wisteria floribunda* (jeweils Vector Laboratories, Burlingame, USA) und **RCA-II** aus *Ricinus communis* (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland). Die gebundenen Lektine werden im nächsten Schritt mittels eines Konjugates aus Streptavidin und der Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht; Streptavidin bindet dabei zunächst an Biotin und die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase kann anschließend mittels verstärkter Chemolumineszenz (*Enhanced Chemiluminescence*, ECL) detektiert werden (siehe 2.2.9 und 2.2.10).

Tab. 4: Spezifität der verwendeten Lektine

LCA	verzweigte α -Mannose mit einem Fucose-Kern
PSA	verzweigte α -Mannose mit einem Fucose-Kern
SNA	Sialinsäure
WFA	terminales GalNAc, bevorzugt β 4-verknüpfte GalNAc, wie sie in der LacdiNAc-Gruppe vorkommt (Ikehara <i>et al.</i> 2006)
RCA-II	terminale β -Galaktose, β -GalNAc, Laktose

2.1.5. Datenbanken

Wissenschaftliche Literatur und Informationen zu Proteinsequenzen wurden über folgende Internet-Datenbanken gesucht:

NCBI (**N**ational **C**enter for **B**io**t**echnology **I**nformation; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

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

UniProt (**U**niversal **P**rotein **R**esource; <http://www.uniprot.org>)

ExpASy (**E**xpert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem; <http://www.expasy.ch>)

2.2. Biochemische Methoden

2.2.1. Gewinnung von Protein-Rohextrakten aus Gewebeproben

Um die Gewebeproben qualitativ und semi-quantitativ auf ihren TFF2-Gehalt zu untersuchen, wurden von den bei -80°C gelagerten Proben mittels eines Skalpells kleine Stücke abgetrennt, deren Gewicht jeweils 0,3 Gramm nicht überschreiten sollte und in ein spezielles verschraubbares Reaktionsgefäß für den Precellys®24 Homogenisator (PepLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gegeben, das zuvor etwa 3-4 mm hoch mit Zirconiumoxid-Kügelchen (\varnothing 1,4mm, Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux,

Frankreich) gefüllt worden war. Anschließend wurden die Gewebsstücke mit der vierfachen Menge (w/v) Extraktionspuffer versetzt und in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Die Reaktionsgefäße wurden dann im Precellys®24-Homogenisator bei 6800 rpm in 3-4 Zyklen aufgeschlossen, wobei zwischen den Zyklen eine Pause von 30 Sekunden eingestellt wurde. Die Zahl der verwendeten Zyklen richtete sich nach dem Erscheinungsbild der aufgeschlossenen Probe, die zwar durch die erzeugten Scherkräfte der Keramik-Kugeln aufgeschlossen, aber nicht überhitzt werden sollte. Im Idealfall wies die Probe nach dem Aufschluß eine trübe, kräftig rötliche Färbung auf; während eine graue Färbung der Probe darauf hindeutete, dass einige der enthaltenen Proteine durch eine zu hohe Temperatur denaturiert wurden. Im letzteren Fall wurde dann entweder die Zyklenzahl oder die Dauer der Zyklen reduziert. Die Suspension wurde nach dem Aufschluß für 10 Minuten bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit derselben Menge Chloroform versetzt und die Phasen durch Schütteln kurz vermischt (Abtrennung der Lipide); anschließend wurde erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert und der Überstand („Rohextrakt“) dann für die weiteren Analysen verwendet.

Tab. 5: Zusammensetzung des Extraktionspuffers (500 mL)

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 8,0	10,0 [mL]	20 mM
4 M NaCl	3,75 [mL]	30 mM
Benzamidin*		0,5 mM
Pefabloc SC*		0,1 mM
Leupeptin*		1 µg/ml
Deion. Wasser	Ad 500 mL	

*Die Endkonzentration der Proteaseinhibitoren wird durch Verdünnung der jeweiligen Stammlösungen erreicht.

2.2.2. Proteinreinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie (*Size Exclusion Chromatography, SEC*)

In der Anfangsphase der Arbeit wurden die Bestandteile des unter 2.2.1 hergestellten Protein-Rohextraktes zunächst mittels einer Sephadex G-200 (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) Glas-Säule (270x15 mm, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Trennprinzip besteht dabei darin, dass die

zu trennenden Moleküle ja nach der Größe ihres hydrodynamische Radius („Stokesradius“) in die Poren des Sephadexgels diffundieren können und sich während dieses Aufenthalts in der stationären Phase nicht mit der mobilen Phase weiterbewegen und so retardiert werden. Moleküle, die größer als die Poren der stationären Phase sind, bewegen sich also ungehindert mit der Auftragsfront fort, während die kleinsten Moleküle sich statistisch gesehen am häufigsten innerhalb der Poren des Sephadexgels aufhalten und so zuletzt im Elutionsprofil erscheinen. Da die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen von der Temperatur abhängt, nimmt die Trennschärfe der Säule mit steigender Temperatur zu, allerdings bewirkt eine Erhöhung der Temperatur auch eine Vergrößerung der Bandenbreite. Die G-200-Säule wurde aus diesem Grund immer bei einer Temperatur von 4°C betrieben. Als Elutionspuffer/Laufmittel wurde der bereits in Kapitel 2.2.1 in Tabelle 5 beschriebene Extraktionspuffer verwendet. Die Säule wurde mittels der peristaltischen Schlauchpumpe Ismatec REGLO Digital MS-2/6 (IDEX Health and Science GmbH, Wertheim, Deutschland) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,15 mL/min betrieben. Die Fraktionen wurden mit dem Fraktionssammler Modell 2110 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aufgefangen, wobei dieser auf 9 Min/Fraktion eingestellt wurde. Das Elutionsprofil wurde bei 280 nm mithilfe des EM-1 Econo UV-Monitors (Sensibilität 0,2; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und des Schreibers Rec 111 (0,2 mm/min, GE Healthcare, München, Deutschland) aufgezeichnet. Sollten größere Mengen eines Rohextraktes mittels Größenausschluss-Chromatographie präparativ aufgetrennt werden, so wurde eine Säule mit einem größeren Durchmesser verwendet (260x40 mm, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), die Fließgeschwindigkeit der Pumpe auf 0,75 mL/min und die Sensibilität des UV-Monitors auf 0,5 erhöht; alle anderen Werte konnten beibehalten werden. Die Fraktionen hatten im ersten Fall ein Volumen von 1,35 mL, unter präparativen Bedingungen resultierten 6,8 mL pro Fraktion. Sie wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung entweder im Kühlraum oder bei -80°C gelagert.

2.2.3. Proteinreinigung durch Größenausschluss-Chromatographie mit dem FPLC-System

Um eine bessere Auftrennung der sehr großen Muzin-Proteine zu erreichen, wurde im Verlauf der Arbeit auf andere Säulen(-materialien) zurückgegriffen, die in diesem Bereich über eine größere Trennschärfe verfügten. Die Säulen wurden über das Äkta™-FPLC System (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) bei Raumtemperatur mit dem

bereits in Tabelle 5 beschriebenen Extraktionspuffer als Laufmittel betrieben und das Elutionsprofil durch Messung der Absorption bei 280 nm erstellt.

Tab. 6: Mit dem Äkta-FPLC System verwendete SEC-Säulen

Hi-Prep 16/60 Sephacryl S-500 High Resolution	Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min; 1,8 mL/Fraktion
Hi-Prep 16/60 Sephacryl S-300 High Resolution	Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min; 1,8 mL/Fraktion
Superose 6	Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min; 1,8 mL/Fraktion

Alle Säulen von GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden

2.2.4. Proteinreinigung durch Ionenaustausch-Chromatographie

Standardmäßig wurde der Protein-Rohextrakt erst über eine Größenausschluss-Chromatographie getrennt und die einzelnen Fraktionen dann auf ihren TFF2-Gehalt hin untersucht. Bei allen durchgeführten Größenausschluss-Chromatographien war TFF2 nur in Form eines Peaks innerhalb der Muzin-Fraktion nachweisbar, so dass die TFF2-positiven Fraktionen vereinigt werden konnten. Für die weitere Auftrennung wurde dann die Resource Q6 Säule (16x30 mm, Anionentauscher, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) in Verbindung mit dem Äkta™-FPLC System eingesetzt.

Das Trennprinzip beim Anionentauscher besteht darin, dass zunächst alle unter den gegebenen Bedingungen negativ geladenen Moleküle von der positiv geladenen Matrix des Anionentauschers gebunden werden. Wird nun ein steigender Salz-Gradient (in diesem Fall NaCl) angelegt, so werden die im Überschuss vorliegenden Chlorid-Ionen die negativ geladenen Probenmoleküle sukzessive von der Matrix verdrängen, wobei die Reihenfolge der abgewaschenen Moleküle von der Stärke ihrer jeweiligen Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial abhängt. Beim Anionentauscher kann durch die Veränderung bestimmter Parameter die Wechselwirkung des aufzureinigenden Proteins mit der Säulenmatrix beeinflusst werden und somit dessen Binde- und Elutionsverhalten. Dazu zählen der pH-Wert des Laufmittels, die Steigung des Salz-Gradienten sowie dessen Konzentration, die Fließgeschwindigkeit des Eluenten und die Ladungsdichte im Säulenmaterial (Rossomando 1990, Choudhary und Horvath 1996).

Das Standardprotokoll sah als „Puffer A“ eine sterilfiltrierte und entgaste 20 mM Tris/HCl pH 8,0 Lösung vor und als „Puffer B“ dieselbe Lösung, die zusätzlich NaCl in einer Konzentration von 1 mol/L enthielt. Nach dem Einspritzen der Probe auf die Säule wurde diese zunächst mit einem Säulenvolumen Puffer A gewaschen und anschließend auf eine

Konzentration von 5% Puffer B erhöht, wobei die Länge dieses Gradienten 1,5 Säulenvolumina (SV) betrug. Anschließend wurde die Zielkonzentration auf 100% Puffer B gesteigert, die Länge des Gradienten wurde hier auf 3,5 Säulenvolumina gesetzt. Die Fließgeschwindigkeit der bei Raumtemperatur betriebenen Säule wurde auf 4,0 ml/min festgelegt und das Elutionsprofil durch Messung der Absorption bei 280 nm von der Software des Äkta™-Systems automatisch erstellt. Die aufgefangenen Fraktionen, die jeweils ein Volumen von 1 mL hatten, wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) umgefüllt und je nach weiterem Vorgehen entweder bei 4°C gelagert oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der SDS-PAGE besteht darin, das zu untersuchende Proteingemisch zunächst mit einem Probenpuffer aufzukochen, dem unter anderem das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) im Überschuß zugesetzt ist (Tab. 7). Durch die thermische Denaturierung werden die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst und SDS kann sich mit seiner hydrophoben Gruppe an die Proteine anlagern, wodurch diese in eine „gestrecktere“ Form überführt und gehalten werden. Des Weiteren sorgt die negative Sulfatgruppe des SDS dafür, dass alle vom Detergens ummantelten Proteine in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wandern und ein konstantes Verhältnis von negativer Ladung pro Masseneinheit aufweisen (1,4 g SDS/g Protein). Zusätzlich zu SDS können dem Probenpuffer noch reduzierende Substanzen wie Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol zugesetzt werden, um Disulfidbindungen aufzuspalten, wodurch allerdings Informationen über die Quartärstruktur verloren gehen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

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

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 [mL]	125 mM
Glycerin	2,0 [mL]	20% (v/v)
10 % SDS (w/v)	4,0 [mL]	4% (v/v)
0,1% Bromphenolblau (w/v)	0,5 [mL]	0,005% (w/v)
HO-(CH ₂) ₂ -SH (β -Mercaptoethanol)	0,5 [mL]	5% (v/v)
deion. Wasser	0,5 [mL]	

Für den nicht reduzierenden SDS-Probenpuffer wird auf die Zugabe von β -Mercaptoethanol verzichtet und stattdessen insgesamt 1,0 mL deion. Wasser zugesetzt.

Im nächsten Schritt wird das so vorbehandelte Proteingemisch in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, welches aus einem vorgeschalteten, niederprozentigen Sammel- und einem höherprozentigen Trenngel besteht; diese beiden Gele unterscheiden sich außerdem in ihrem pH-Wert (Tab. 8, Tab. 9). Die treibende Kraft, die für die Wanderung der Proteine durch das Gel verantwortlich ist, ist ein von außen angelegtes elektrisches Feld. Da die mit SDS-ummantelten Proteine wie eingangs beschrieben alle in eine relativ ähnliche, gestreckte Sekundärstruktur überführt wurden und ein konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse aufweisen, hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix im Idealfall nur noch von ihrem Stokesradius ab, der wiederum zur Molekülmasse proportional ist .

Tab. 8: Zusammensetzung des Sammelgels (6%, 2 Gele)

deion. Wasser	9,0	[mL]
4 x Sammelgelpuffer*	3,125	[mL]
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)	3,125	[mL]
20 % SDS (w/v)	0,5	[mL]
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	12,5	[μ L]
20% Ammoniumperoxodisulfat (APS) (w/v)	125	[μ L]

*4x Sammelgelpuffer (500 mL): Tris (1M), mit HCl auf pH 6,8 eingestellt. TEMED/APS wurde erst unmittelbar vor dem Gießen hinzugefügt.

Tab. 9: Zusammensetzung des Trenngels (15%, 2 Gele)

deion. Wasser	6,2	[mL]
4 x Trenngelpuffer*	3,8	[mL]
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)	10,0	[mL]
TEMED	8,0	[μ L]
20 % APS (w/v)	80	[μ L]

*4x Trenngelpuffer (500 mL): Tris (1,5 M), mit HCl auf pH 8,8 eingestellt. Anschließend Zugabe von 10 mL 10% SDS, deion. Wasser ad 500 mL. TEMED/APS wurde erst unmittelbar vor dem Gießen zugesetzt.

Ein wichtiger funktioneller Bestandteile des „Lämmli“-Elektrophoresepuffers (Tab. 10; Laemmli 1970) ist Glycin, dessen Funktion am bestem im Zusammenhang mit den unterschiedlichen pH-Werten des Sammel- und Trenngels erläutert werden kann: Im Sammelgel herrscht ein pH-Wert von 6,8, welcher bewirkt, dass Glycin überwiegend als Zwitterion vorliegt und somit im elektrischen Feld weniger schnell zur Anode wandert als die ebenfalls vorhandenen Chloridionen oder die mit SDS ummantelten Proteine. Sobald die Glycinmoleküle das Trenngel erreichen, in dem ein pH-Wert von 8,8 herrscht, nehmen sie überwiegend den deprotonierten Zustand an, sind also negativer als im Sammelgel und ihre Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix wird größer als die der Proteine, die nun von ihnen überholt werden. Dieser Überholvorgang der Glycinmoleküle bewirkt einen sogenannten „Stapelungseffekt“ bei den Proteinen, der zu schärferen Proteinbanden führt.

Tab. 10: „Lämmli“-Elektrophoresepuffer

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
Tris/HCl, pH 8,5	3,03 [g]	25 mM
Glycin	14,25 [g]	190 mM
20% SDS (w/v)	5,0 [mL]	0,1% (w/v)
deion. Wasser	Ad 1000 [mL]	

Für die Herstellung der Gele wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei eingespannte und unten abgedichtete Glasplatten etwa 4,5 cm hoch eingefüllt und anschließend mit 200 µL Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol vollständig entfernt, das Sammelgel zwischen die Glasplatten gefüllt und der entsprechende Kamm eingesetzt, der später die Taschen für den Probenauftrag erzeugt. Zur Vorbereitung der Proben vor dem Gellauf wurden 37,5 µL der jeweiligen Probe (evtl. mit Extraktionspuffer verdünnt) mit 12,5 µL reduzierendem bzw. nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 Minuten im Wasserbad erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt und vor dem Auftragen auf das Gel abzentrifugiert, um den kondensierten Wasserdampf wieder mit der Probe zu vermischen. Für die eigentliche Elektrophorese wurde das vertikale Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und ein Netzgerät der Heinzinger Economy Line LNG 35006 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde nach der Befüllung der Taschen eine Spannung

von 85 Volt gewählt und diese nach dem Einwandern der Proben in das Trenngel auf 150 Volt erhöht. Der Gellauf wurde beendet, sobald das Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte. Standardmäßig wurde als Molekulargewichtsmarker der peqGOLD Protein-Marker I verwendet (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

Tab. 11: peqGOLD Protein-Marker I

β -Galaktosidase aus <i>E.coli</i>	116,0	[kDa]
Serumalbumin aus Rinderblut	66,2	[kDa]
Ovalbumin aus Hühnereiern	45,0	[kDa]
Laktat-Dehydrogenase aus Schweinemuskeln	35,0	[kDa]
<i>Bsp 98l</i> aus <i>E. coli</i>	25,0	[kDa]
β -Laktoglobulin aus Kuhmilch	18,4	[kDa]
Lysozym aus Hühnereiern	14,4	[kDa]

2.2.6. Native SDS-Agarose-Gelelektrophorese (SDS-AgGE)

Sollten sehr große Proteine (> 500 kDa) unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt werden, wurde eine SDS-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Thornton *et al.* 1994). Im Vergleich zur SDS-PAGE ist die Agarose-Gelmatrix deutlich großporiger, so dass Proteine, die aufgrund ihrer Größe bei der SDS-PAGE nicht in das Sammelgel einwandern, bei dieser Methode aufgetrennt und anschließend geblottet werden können. Die Verwendung von SDS in geringer Konzentration im Gel und im Laufpuffer (Tab. 12) soll dabei die Bildung von Schlieren vermindern, die insbesondere bei der Elektrophorese von Glykoproteinen entstehen können (Lottspeich und Zorbas 1998; Thornton *et al.* 1994). Zuerst wurde das 1%ige Agarosegel hergestellt, indem 2,5 g Agarose in 250 ml Laufpuffer gegeben und vorsichtig in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg) für wenige Sekunden aufgeköcht wurde, wobei die Lösung nicht überkochen durfte. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die gesamte Agarose in Lösung gegangen war und keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Anschließend wurde die Lösung auf einem Taumelschüttler (Heidolph Polymax 1040, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei RT kurz abgekühlt und in die horizontale Gelkammer gegossen, wo sie ein Gel bildete. Das Probenvolumen bei der SDS-AgGE betrug 30 μ L pro Bahn, wobei 22,5 μ L Probe mit 7,5 μ L Probenpuffer [Laufpuffer (Tab. 12) mit 30% Glycerin und

etwas Bromphenolblau] vermischt wurde. Vor der eigentlichen Elektrophorese wurde das Gel im horizontalen Gelsystem Agagel Maxi® (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) eingelegt und die beiden Elektrophoresekammern so hoch mit Laufpuffer befüllt, dass er auch das Gel etwa 0,5 cm hoch bedeckte. Nach dem Beladen des Gels wurde die Elektrophorese bei 40 V für 6,5 Stunden durchgeführt; als Spannungsquelle diente das Netzgerät Heinzinger Economy Line LNG 35006 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Da die verfügbaren Molekulargewichtsmarker die relevanten Größenbereiche nicht abdeckten, wurde überwiegend auf ihre Verwendung verzichtet und bei der SDS-AgGE vornehmlich Proben in Relation zueinander bewertet.

Tab. 12: Laufpuffer für die SDS-AgGE (2000 mL)

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
Tris	9,7 [g]	40 mM
EDTA	0,74 [g]	1,266 mM
20% SDS (w/v)	10,0 [mL]	0,1% (w/v)
deion. Wasser	Ad 2000 [mL]	

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

2.2.7. Western Blotting

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und dort fixiert; dieser Vorgang wird in Anspielung auf das 1975 von Edwin M. Southern entwickelte Verfahren zum Transfer von DNA auf eine entsprechende Membran als „Western-Blotting“ bezeichnet (Towbin *et al.* 1979; Renart *et al.* 1979). Je nach Art des Gels kamen dabei zwei verschiedene Methoden zum Einsatz; bei Polyacrylamidgelen wurde der „Elektroblot“, bei Agarosegelen der „Kapillarblot“ durchgeführt. Für die schnelle Analyse einer großen Anzahl von Proben (z.B. Screenen von HPLC-Fraktionen) wurde ein Dot-Blot angefertigt.

2.2.7.1. Elektroblot

Bei der verwendeten „semi-dry-Methode“ wird das zu blottende Gel, das mit einer zugeschnittenen Nitrocellulose-Membran (Protran BA 79, Whatman®, Dassel, Deutschland) bedeckt ist, zwischen je 3 Lagen mit Transferpuffer (Tab. 13) getränktem Filterpapier (Gel-Blotting Papier BF2, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland), in die entsprechenden Blotting-

Apparatur (20x20 cm Semi-Dry-Blotter, biostep® GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) gelegt (Abb. 5).

Da die Proteine nach der Elektrophorese immer noch von den negativen SDS-Molekülen ummantelt sind, wandern sie im elektrischen Feld in Richtung Anode, weshalb die Nitrocellulose-Membran näher an der Anode liegen muss als das Gel. Die Proteine werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld von der Nitrocellulose-Membran aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen gebunden; der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei 0,8 mA/cm².

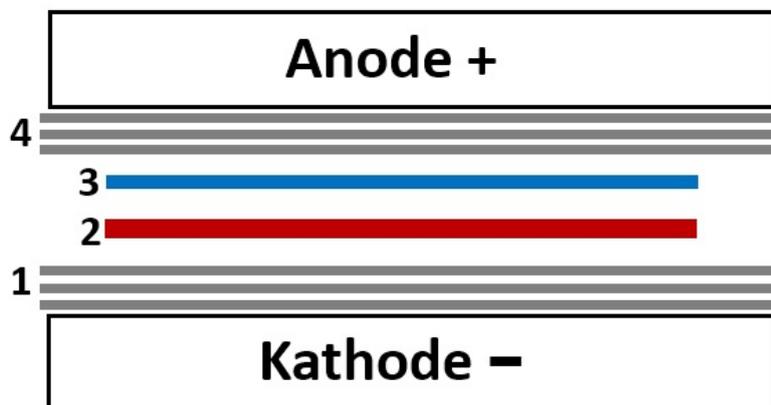


Abb. 5. Schematischer Aufbau des „semi-dry“-Elektroblots. (1) und (4): mit Transferpuffer getränktes Filterpapier (2): SDS-Gel (3): Nitrocellulosemembran

Tab. 13: Transferpuffer für den Elektroblot (2000 mL)

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
Tris/HCl, pH 8,8	11,62 [g]	48 mM
Glycin	5,86 [g]	39 mM
20% SDS (w/v)	3,7 [mL]	0,037% (w/v)
abs. Methanol	400 [mL]	20% (v/v)
deion. Wasser	Ad 2000 [mL]	

2.2.7.2. Kapillarblot

Zunächst wurde ein ca. 80 cm langer Filterpapierstreifen (Gel-Blotting Papier BF2, s.o.) so zugeschnitten, dass er etwas breiter als das zu blottende Agarosegel war. Dann wurde er zentral auf eine Glasscheibe gelegt und tauchte mit seinen Enden in zwei Plastikschalen, die mit Transferpuffer (Tab. 14) befüllt waren. Auf dieses Filterpapier wurde nun das Agarosegel gelegt, welches mit einer passend zugeschnittenen Nitrocellulosemembran (Protran BA 79, Whatman®, Dassel, Deutschland) bedeckt wurde. Auf die Nitrocellulosemembran wurden dann weitere Lagen Filterpapier gegeben und dieses abschließend mit einem Gewicht (etwa 2 kg) beschwert (Abb. 6). Das Prinzip der Proteinübertragung aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran ist in diesem Fall lediglich die Kapillarkraft der über der Membran befindlichen trockenen Filterpapiere, die sich langsam mit Transferpuffer vollsaugen, wobei auch die im Gel befindlichen Proteine mitwandern und dann von der Nitrocellulosemembran gebunden werden.

Der Kapillarblot wurde mindestens für 6 Stunden oder über Nacht bei RT durchgeführt.

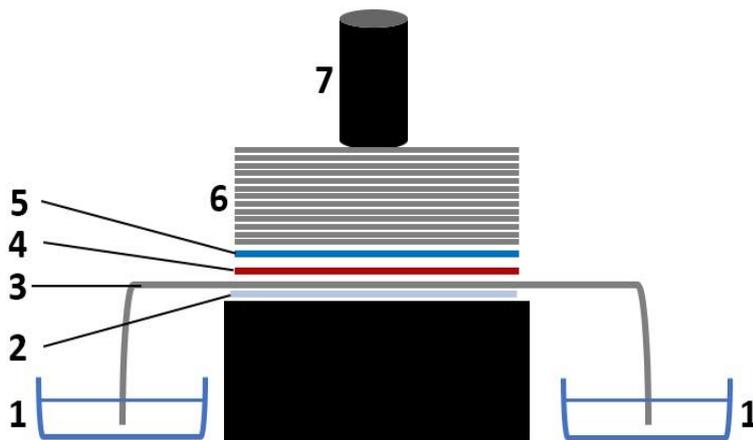


Abb. 6. Schematischer Aufbau des Kapillarblots. (1): mit Transferpuffer gefüllte Wanne (2): Glasplatte (3): Filterpapierstreifen (4): Agarose-Gel (5): Nitrocellulosemembran (6): Filterpapierstapel (7): Gewicht

Tab. 14: Transferpuffer für den Kapillarblot (2000 mL)

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
NaCl	70,13 [g]	600 mM
tri-Natriumcitrat Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	35,29 [g]	60 mM
deion. Wasser	Ad 2000 [mL]	

2.2.7.3. Dot-Blot

Der Dot-Blot kam zum Einsatz, wenn viele Fraktionen eines FPLC-Laufes schnell und zeitsparend auf ihre TFF2-Immunreaktivität hin untersucht werden sollten. Zunächst wurde die Nitrocellulosemembran auf eine geeignete Größe zugeschnitten und anschließend mit Bleistift die Stellen für den Probenauftrag markiert. Standardmäßig wurden pro Membran 28 (7 x 4) oder 35 (7 x 5) Proben im Abstand von 1 cm aufgetragen und diese dann bei RT trocknen gelassen. Das Probenvolumen pro Dot betrug 5 µL und um Vergleichbarkeit in der Intensität fortlaufender Membranen zu gewährleisten, wurde nach Möglichkeit auf jeder Membran eine Kontrolle mitgeführt, die als Standard für eine semiquantitative Auswertung diente.

2.2.8. Ponceau-Färbung von Proteinen

Nach Beendigung des jeweiligen Blotvorganges wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit Ponceau S-Lösung (Tab.15) inkubiert, wobei es sich um einen wasserlöslichen Azofarbstoff handelt, der reversibel an positive Aminogruppen bindet. Die dann erscheinenden Banden auf der Nitrocellulosemembran lieferten einen ersten Hinweis auf den erfolgreichen Proteintransfer; zudem konnten nur bei diesem Schritt die Banden der Größenstandards sichtbar gemacht und mit Bleistift markiert werden. Bei Dot-Blots konnte die Ponceau-Färbung aufgrund des fehlenden Größenmarkers übersprungen werden.

Tab. 15: Zusammensetzung der Ponceau S-Lösung (500 mL)

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
Ponceau S	1,0 [g]	2% (w/v)
Cl ₃ C-CO ₂ H	15 [mL]	30% (v/v)
deion. Wasser	Ad 500 [mL]	

2.2.9. Nachweis der geblotteten Proteine mittels Antikörper / *Enhanced Chemiluminescence (ECL)*

Die bisher nur über hydrophobe Wechselwirkungen gebundenen Proteine wurden im nächsten Schritt auf der Nitrocellulosemembran fixiert, indem diese für 30 Minuten in einer 1x „Phosphate-Buffered Saline“ (PBS, siehe Tab. 16) Lösung inkubiert wurden, der Glutaraldehyd in einer Endkonzentration von 0,2% (v/v) zugesetzt worden war. Die beiden

Aldehydgruppen des Glutaraldehyds vernetzen dabei die Proteine kovalent mit der Membran, indem sie einerseits mit freien Aminogruppen der zu bindenden Proteine und andererseits mit der OH-Gruppe des Celluloseacetats der Membran reagieren (Low *et al.* 2013). Diesem Fixierungsschritt folgten 3 jeweils 5-minütige Wasch-Schritte mit PBS-T (Tab. 16) und eine 5-minütige Inkubation mit 1x „Tris-Buffered Saline-Tween“ (TBS-T, siehe Tab. 17). Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran durch eine 60-minütige Inkubation mit 1x TBS-T, dem zusätzlich Rinderserumalbumin (BSA) und Trockenmilch in einer Endkonzentration von jeweils 1% (w/v) zugesetzt worden war. Nach Beendigung der Blockierung wurde die Lösung abgegossen und die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in einer 1:1000-fachen Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers (siehe 2.1.3) in 1x TBS-T inkubiert. Darauf folgten drei 5-minütige Wasch-Schritte der Membran mit 1x TBS-T und die 60-minütige Inkubation der Membran mit dem ebenfalls unter 2.1.3 beschriebenen Sekundärantikörper, der in einer 1:4000-fachen Verdünnung in 1x TBS-T eingesetzt wurde. Nach Abwaschen des Sekundärantikörpers durch zwei jeweils 10-minütige Wasch-Schritte mit 1x TBS-T war die Membran bereit für die ECL-Analyse, die in Kap. 2.2.11 beschrieben wird.

Tab. 16: 1x PBS-Lösung und 1x PBS-T (2000 mL)

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
Na ₂ HPO ₄	2,3 [g]	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	0,5 [g]	1,8 mM
NaCl	18 [g]	154 mM
deion. Wasser	ad 2000 [mL]	

KH₂PO₄ zuletzt lösen, pH-Wert vor dem Auffüllen mit NaOH auf 7,4 einstellen.

PBS-T : zusätzlich Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zusetzen.

Tab. 17: 1x TBS-T-Lösung (2000 mL)

Reagenz	Volumen / Menge	Endkonzentration
Tris/HCl, pH 7,2	4,84 [g]	20 mM
NaCl	17,52 [g]	150 mM
Tween 20	2 [mL]	0,1% (v/v)
deion. Wasser	ad 2000 [mL]	

pH Wert vor dem Auffüllen mit HCl auf 7,2 einstellen, Tween 20 zuletzt zugeben.

2.2.10. Nachweis spezifischer Glykostrukturen mittels biotinylierter Lektine

Sollten die Zuckerstrukturen von Glykoproteinen näher untersucht werden, bot sich der Einsatz spezifischer Lektine an (2.1.4). Dabei wurde die Nitrocellulosemembran nach der Ponceau-Färbung nicht mit Glutaraldehyd fixiert, sondern es wurde nach dem in Tab. 18 dargestellten Protokoll vorgegangen.

Tab. 18: Protokoll für die Lektinfärbung

Arbeitsschritt	Zusammensetzung der Lösung	Dauer
Blockierung	1xTBS-T mit 2% (w/v) Gelatine	1 Stunde
Bindung	biotinyliertes Lektin (1:500-1:1000 verdünnt) in 1xTBS-T mit 1% (w/v) Gelatine	30 min
Waschen	1xTBS-T	2 x 10 min
Waschen	1xTBS-T mit 1% (w/v) Gelatine	2 x 10 min
Bindung des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats	Streptavidin-Peroxidase (1:2500 verdünnt) in 1xTBS-T mit 1% (w/v) Gelatine	30 min
Waschen	1xTBS-T	4 x 10 min

2.2.11. Enhanced Chemiluminescence (ECL) Färbung

Das Prinzip der ECL-Färbung besteht darin, dass die an den Sekundärantikörper bzw. an Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase unter alkalischen Bedingungen die Umsetzung des Luminol-Dianions mit Wasserstoffperoxid katalysiert. Das Luminol Dianion geht dabei unter Abspaltung von Stickstoff in das 3-Aminophthalat-Dianion über, welches sich im angeregten Triplett-Zustand befindet. Dieser Zustand wird durch einen

strahlungslosen Spin-Flip in einen angeregten Singulett-Zustand überführt, der zuletzt unter Emission eines Lichtquanten mit einer Wellenlänge von ~ 428 nm in den Singulett-Grundzustand übergeht (Abb. 7).

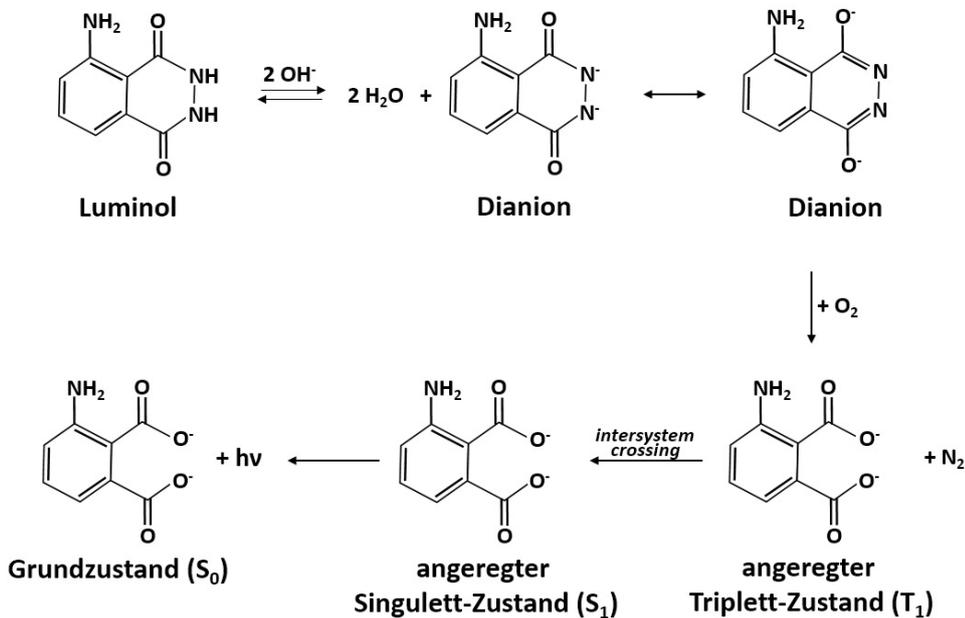


Abb. 7. Reaktion des Luminols mit Sauerstoff (nach https://www.researchgate.net/figure/Enhanced-chemiluminescence-Luminol-is-a-widely-used-chemiluminescent-reagent-Oxidation_fig1_255821800)

Die emittierten Lichtquanten können mit einer Kamera detektiert werden und ergeben die später sichtbaren Banden, da die Lichtreaktion nur an den Stellen auf der Nitrocellulosemembran erfolgt, an denen sich das vom Primärantikörper gebundene Protein bzw. die vom Lektin erkannte Zuckerstruktur befindet. Praktisch wurden je 2,5 mL ECL-Lösung 1 und 2 (siehe Tab. 19 und 20) vermischt und auf die Membran aufgetragen. Nach einer Inkubationsdauer von 2 Minuten wurde die Membran in das Geldokumentationsgerät GeneGnome (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) überführt und die Lichtemission in 2 Minuten-Abständen über eine Gesamtdauer von 10 Min additiv bestimmt.

Tab. 19: ECL-Lösung 1 (10 mL)

250 mM Luminol (44,29 g/L)	100	[μL]
90 mM p-Cumarsäure (14,77 g/L)	44	[μL]
1 M Tris/HCl pH 8,5	1000	[μL]
deion. Wasser	8856	[μL]

Tab. 20: ECL-Lösung 2 (10 mL)

30 % (w/v) H ₂ O ₂	6,1	[μ L]
1 M Tris/HCl pH 8,5	1000	[μ L]
deion. Wasser	8994	[μ L]

2.2.12. Semiquantitative Westernblot-Analyse

Die Intensitäten der bei der ECL erhaltenen Banden konnten mittels der GeneTools Analyse-Software (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, England) semi-quantitativ zueinander in Beziehung gesetzt werden. In der Praxis wurden dabei alle auszuwertenden Banden eines Blots umrandet und die Intensität einer Bande, zumeist die TFF2 Positivkontrolle aus dem Magen, als Referenz gesetzt. Waren in einer Spur mehrere TFF2-positive Banden vorhanden, so wurden sie auch alle umrandet; es wurde also die gesamte TFF2-Immunreaktivität einer Spur ermittelt, ohne zwischen verschiedenen TFF2-Formen zu unterscheiden. Das Programm gab dann die Intensitäten aller markierten Banden als prozentuale Intensität in Bezug auf die Referenz an. Die so gewonnenen Daten konnten in das Programm Excel™ (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) übertragen und in graphischer Form dargestellt werden.

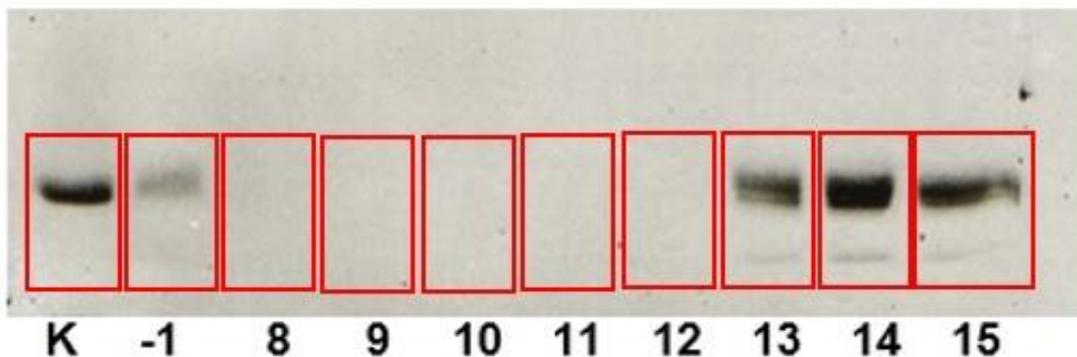


Abb. 8. Beispielhafte semi-quantitative Analyse der Immunreaktivität eines Westernblots. Die roten Rechtecke stellen jeweils den ausgewerteten Bereich jeder Spur dar und umfassen die gesamte Immunreaktivität. Teilweise mussten die Abmessungen des Rechtecks angepasst werden, um die gesamte Immunreaktivität einzuschließen (Fraktion 15, äußerste rechte Spur). K = Positivkontrolle (Magenextrakt, dessen gemessene Immunreaktivität als Referenz des Blots benutzt wird), -1 = Aliquot der zu trennenden Probe. Die anderen Zahlen geben die Nummer der Fraktion des Laufes an (FPLC oder SEC).

2.2.13. Silberfärbung von Proteinen

Um die Reinheit bestimmter Fraktionen abschätzen zu können, wurden Aliquots derselben zunächst wie unter 2.2.5 beschrieben über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Lauf eine Silberfärbung des Gels nach dem Protokoll von Blum *et al.* (1987) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine zunächst mit einer Mischung aus Essigsäure und Ethanol (s.u.) im Gel fixiert, mit einer Natriumthiosulfatlösung ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) sensibilisiert und dann mit einer Silbernitratlösung behandelt. Die Silberionen bilden dabei Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten der Proteine; durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd werden die Silberionen dann zu elementarem Silber reduziert, wodurch sich diese Bereiche im Gel braun färben. Während der Entwicklung muss darauf geachtet werden, dass einerseits die entstehenden Banden gut sichtbar sind, aber andererseits der Hintergrund nicht zu stark angefärbt wird, was den Gesamtkontrast auf dem Gel verschlechtern würde. Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei der Silberfärbung bei 0,1 - 1 ng/Bande.

Tab. 21: Protokoll für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Arbeitsschritt	Zusammensetzung der Lösung	Dauer
Fixierung	40% Ethanol, 10% Eisessig, 50% deion. Wasser	> 1 Stunde
Waschen	30% Ethanol, 70% deion. Wasser	2 x 20 min
Waschen	deion. Wasser	1 x 20 min
Sensibilisierung	0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in deion. Wasser	1 min
Waschen	deion. Wasser	3 x 20 sec
Färben	0,2 % (w/v) AgNO_3 , 0,02 % (v/v) Formaldehyd 37%	20 min
Waschen	deion. Wasser	3 x 20 sec
Entwicklung	3% (w/v) Na_2CO_3 , 0,05 % (v/v) Formaldehyd 37%, 0,0005 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	3 – 5 min (nach Bedarf)
Abstoppen	siehe Fixierlösung	5 min
Waschen	deion. Wasser	3 x 10 min

Lösungen zur Sensibilisierung, Färbung und Entwicklung müssen immer frisch angesetzt werden; jeweils 50 mL Lösung pro Gel.

2.2.14. Coomassie-Brillantblau-Färbung von Proteinen

Wenn in Vorversuchen die ausreichende Reinheit einer Proteinfraction sichergestellt wurde und diese dann mit massenspektrometrischen Methoden weiter untersucht werden sollte, wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel anschließend zur Anfärbung der Proteinbanden in Coomassie-Brillantblau inkubiert. Dabei handelt es sich um einen Triphenylmethan-Farbstoff, der unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten bindet. Insbesondere die Wechselwirkungen mit Arginin-Resten spielen dabei eine wichtige Rolle; vermutlich kommt es durch die Anlagerung zu einer Stabilisierung des Farbstoffes in seiner anionischen Sulfonat-Form. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich dabei im Säuren von 465 zu 595 nm (Lottspeich und Zorbas 1998). Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei der Verwendung von Coomassie-Brillantblau G-250 bei etwa 0,5 µg und ist damit weniger empfindlicher als die Silberfärbung; jedoch können mit Silber gefärbte Banden nicht massenspektrometrisch untersucht werden, so dass zur Visualisierung nur die Coomassie-Brillantblau-Färbung in Frage kam. Die reduzierte Empfindlichkeit des Farbstoffs bot sogar den Vorteil, dass nur solche Proteinbanden angefärbt wurden, in denen das Protein in für massenspektrometrische Analysen genügend hoher Konzentration vorlag.

Praktisch wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese in der vorgemischten Bio-Safe Coomassie G250 Färbelösung (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) inkubiert und anschließend sukzessive durch Wasch-Schritte mit deion. Wasser entfärbt. Wenn das Gel und vor allem der Hintergrund sehr stark gefärbt war, konnte zusätzlich ein Zellstoffpapier in die Schale gegeben werden, welches den Entfärbeprozess beschleunigte.

2.2.15. Protokoll der massenspektrometrischen Untersuchungen

Die Aufreinigung des TFF2-Proteins und proteinbiochemische Analysen wurden am Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie (IMMC) in Magdeburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hoffmann durchgeführt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen und die Auswertung der dabei erhaltenen Ergebnisse wurden nicht von mir, sondern durch Herrn Prof. Dr. Hanisch und seiner Arbeitsgruppe am Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln in der Abteilung „Zentrale Bioanalytik“ geleistet. Die im Rahmen der Proteinanalytik durchgeführten Arbeitsschritte während der Massenspektrometrie sind bereits ausführlich in der Publikation von Albert *et al.* (2010) beschrieben, so dass an dieser Stelle nur kurz auf die Vorgehensweise für die N-Glykan-Analytik eingegangen wird.

Zunächst erfolgte ein in-Gel-Verdau der aufgereinigten Proteine mittels Pronase E. Dazu wurde die mit Coomassie angefärbte (siehe 2.2.14) TFF2-Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten, einmal für eine Stunde mit 1 mL Wasser und zweimal für eine Stunde mit 1 mL 50% Acetonitril/Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gelstück in der Vakuumzentrifuge getrocknet, eine Stunde in Pronase-Puffer (50 mM NH_4HCO_3 + 1mM CaCl_2) inkubiert und wieder in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Verdau mit Pronase E (10 mg in 1 mL Puffer) wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die (Glyko-)peptide wurden dann zweimal mit je 200 mL Wasser und einmal mit 200 mL 50% Acetonitril/Wasser jeweils für eine Stunde eluiert, auf 90°C erhitzt (mindestens 10 min) und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Glykanketten wurden durch Addition von 0,5 μL Peptide:N-glycosidase F (PNGase F, 250 U, New England BioLabs GmbH, Frankfurt/M., Deutschland) in 50 μL 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0 von den Glykoproteinen abgespalten. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde der Reaktionsansatz in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 μL Wasser aufgenommen, um ihn anschließend auf die aktivierte C18 BondElut Säulen aufzutragen. Der Durchfluß, welcher die N-Glykane enthielt, wurde gesammelt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet, bis zu einer Stunde über P_2O_5 entwässert und anschließend entsprechend Ciucanu und Kerek (1984) permethyliert. Die Glykan-Analyse erfolgte durch MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie mittels des UltrafleXtreme™-Gerätes (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Dazu wurden die in Methanol gelösten, permethylierten Glykane auf den Edelstahl-Probenträger („target“) aufgetragen, indem dort 0,5 μL der Probe mit 1,0 μL Matrix (gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxy-Benzoessäure in Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure, 1:2) vermischt wurden. Alternativ wurden 0,75 μL der in Methanol gelösten Probe mit dem gleichen Volumen α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (gesättigte Lösung in 50% Acetonitril/ wässriger Trifluoressigsäure) versetzt. Die Analysen wurden durch Nachweis der positiven Ionen im Reflektron-Modus durchgeführt. Die Ionisierung der co-kristallisierten Analysesubstanzen wurde durch einen gepulsten Smart-beam Laser induziert (Akkumulation von ~5.000 Schüssen), die Ionen in einem Feld von 20 kV beschleunigt und bei 23 kV reflektiert. Die MALDI-MS/MS wurde durch Analyse der „post-source-decay“(PSD) Fragmente im „Laser-induced Dissociation“ (LID) Modus durchgeführt. Die Zuordnung der Fragmente wurde durch die Anwendung der GlycoWorkbench-Software (Ceroni *et al.* 2008) unterstützt.

2.2.16. Verdau von glykosyliertem TFF2 mit *Peptide:N-glycosidase F* (PNGase-F)

TFF2, welches vorher durch chromatographische Methoden aufgereinigt und konzentriert worden war, wurde zunächst durch eine 3-minütige Inkubation in kochendem 0,09% β -Mercaptoethanol denaturiert und auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte der Verdau durch 16-stündige Inkubation bei 37°C mit 20 Einheiten PNGase-F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in Anwesenheit von 50 mM Na_2HPO_4 /pH 7,0 entsprechend der Herstellervorschrift. Das Enzym spaltet zwischen dem Asparaginrest des Proteins und dem N-glykosidisch daran gebundenen N-Acetylglucosaminrest von „high mannose“, hybriden und komplexen Oligosacchariden (Tarentino *et al.* 1989). Die Endprodukte der Spaltung sind das freie Glykan inklusive der vom Asparagin stammenden Aminogruppe und das Peptid, dessen Asparaginrest zu einem Aspartat umgewandelt wurde (Tarentino und Plummer 1994). Das Protein wurde durch Addition des 4-fachen Volumens Aceton (-20°C) gefällt und das Pellet zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Immunodetektion bzw. Lektinfärbung eingesetzt, wobei es mit der unverdauten Referenzprobe verglichen wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines TFF2-Reinigungsprotokolls für menschliche Gewebeproben aus dem Magen und proximalen Duodenum

Um ein Reinigungsprotokoll für TFF2 aus Gewebeproben des Magens und des Duodenums zu erstellen, wurde zunächst stichprobenartig der TFF2-Gehalt von je 7 Gewebeproben aus dem Corpus- und Fundusbereich, dem Antrum und dem proximalen Duodenum untersucht. Dazu wurden die Rohextrakte der jeweiligen Probe mittels reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und die Westernblots mit dem Antiserum anti-hTFF2-1 (Jagla *et al.* 2000) behandelt, welches gegen die Sequenz FFPNSVEDCHY am C-Terminus des menschlichen TFF2 gerichtet ist (Kap. 2.1.3).

Die Gesamt-TFF2-Immunreaktivität ist in Abbildung 9 dargestellt und verteilt sich bei den Proben auf eine starke Bande bei etwa 18,4 kDa, welche das glykosylierte TFF2-Peptid darstellt, und eine schwächere Nebenbanden bei 14,4 kDa, die vom nicht-glykosylierten TFF2-Peptid hervorgerufen wird (May *et al.* 2000, siehe auch Abb. 31). Bei den Banden, die unterhalb des 14,4 kDa Markers auftreten, dürfte es sich um Abbauprodukte von TFF2 handeln.

Bezogen auf die Gesamt-TFF2-Immunreaktivität zeigten alle Proben aus den verschiedenen Bereichen des Magens eine für eine quantitative TFF2-Aufreinigung hinreichend hohe TFF2-Konzentration (Abb. 9A und 9B), während die Proben aus dem proximalen Duodenum hinsichtlich der nachweisbaren TFF2-Immunreaktivität deutlich heterogener ausfielen und diese teilweise relativ schwach ausgeprägt war (Abb. 9C, Spuren 1, 3 und 4).

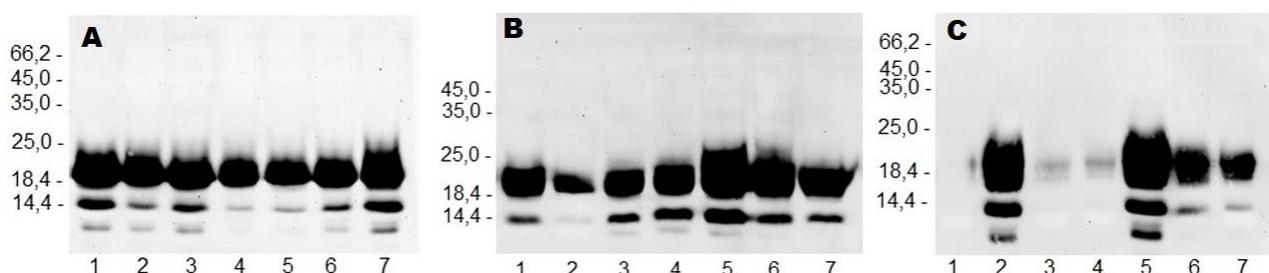


Abb. 9. Rohextrakte aus (A) dem Bereich des Corpus/Fundus, (B) des Antrums und (C) des proximalen Duodenums wurden unter reduzierenden Bedingungen über eine 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die TFF2-Immunreaktivität bestimmt. Jeweils links angegeben ist die Position der Markerbanden (Gewicht in kDa).

Für die Reinigung von TFF2 wurde zunächst nach einem etablierten Protokoll vorgegangen, welches für die Reinigung von TFF3 verwendet wurde (Albert *et al.* 2010). Hierbei wurden die Proteine der aufgeschlossenen Gewebeproben zuerst mittels einer klassischen Größenausschluss-Chromatographie (SEC) mit einer Sephadex G-200 Säule nach ihrer Größe getrennt (Kap. 2.2.2). Die Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität wurden dann vereinigt und über den Resource Q-Anionentauscher nach ihrer Ladung aufgetrennt, wobei die gebundenen, negativ geladenen Proteine über einen ansteigenden NaCl-Gradienten vom Säulenmaterial eluiert wurden.

Nach diesem Protokoll erfolgte die Aufreinigung einer Duodenumprobe, dreier Antrumproben und einer Probe aus dem Corpus (Kap. 3.1.1.1 - 3.1.1.4); bei letzterer wurde zusätzlich der Verlauf des NaCl-Gradienten für die TFF2-Reinigung optimiert.

Bei einem weiteren Experiment wurde das Reinigungsprotokoll umgekehrt: die Proteine des Rohextrakts wurden dabei zunächst über den Resource Q-Anionentauscher nach ihrer Ladung getrennt und die erhaltenen Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität anschließend über eine FPLC-kompatible Superose 6 10/300 GL-Säule nach der Größe aufgetrennt (Kap. 3.1.2).

Zuletzt wurden die beiden Sephacryl-Säulen S-300 und S-500 mit dem FPLC-System für die SEC eingesetzt und ihre Eignung für die Reinigung von TFF2 untersucht (Kap. 3.1.3).

Tab. 22: Bei der SEC verwendete Säulenmaterialien

Säulenmaterial	Spezifikation	Trennbereich [kDa]
Sephadex G-200	klassische Säule mit peristaltischer Schlauchpumpe, bei 4° Celsius betrieben	5 – 600
Superose 6 10/300 GL	Äkta FPLC-System, Raumtemperatur	5 – 5.000
Sephacryl S-300 HR	Äkta FPLC-System, Raumtemperatur	10 – 1.500
Sephacryl S-500 HR	Äkta FPLC-System, Raumtemperatur	40 – 20.000

3.1.1. Reinigung von TFF2 mittels Sephadex G-200 Größenausschluss-Chromatographie und Anionentauscher

3.1.1.1. Reinigung von TFF2 aus der Duodenumprobe 369D_{Pr}

Der Rohextrakt einer Gewebeprobe aus dem proximalen Duodenum (369D_{Pr}) wurde zunächst über eine Sephadex G-200 Säule nach der Größe der Proteine aufgetrennt, wobei die Proteine in Form dreier Peaks, gemessen über die Absorption bei 280 nm, von der Säule eluierten. Die gesamte TFF2 Immunreaktivität entfiel dabei auf die Fraktionen, die den ersten Absorptionspeak ausmachten (siehe Abb. 10).

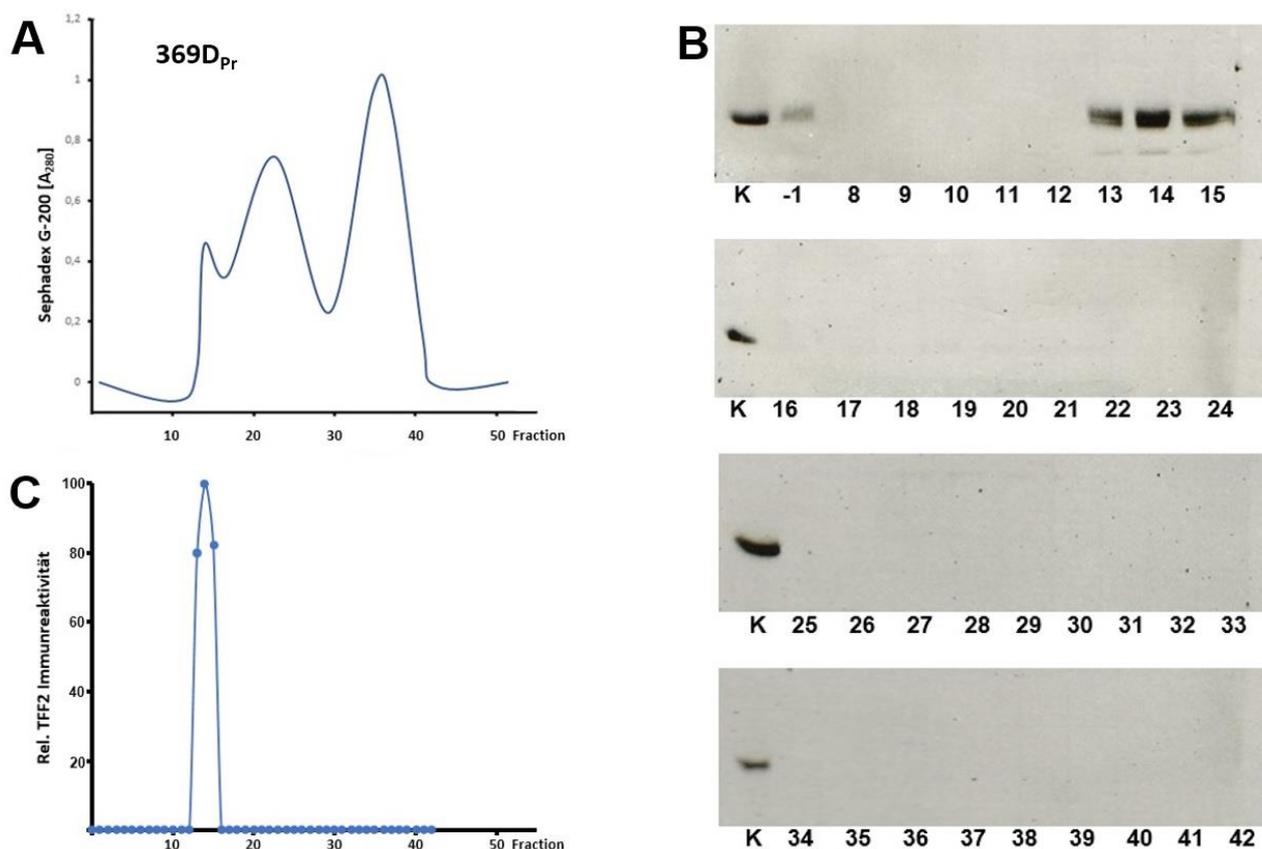


Abb. 10. Größenausschluss-Chromatographie des Duodenum-Rohextraktes 369D_{Pr}. **(A)** Absorptionsprofil der Sephadex G-200 Säule, gemessen bei 280 nm. **(B)** Westernblot der Fraktionen 8 - 42. K = Positivkontrolle; -1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. Die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(C)** Semiquantitative Auswertung der in (B) gemessenen TFF2 Immunreaktivität.

Für die semiquantitative Auswertung wurde auf jedem Westernblot dieselbe Menge eines Magenextraktes aufgetragen und dessen Intensität als Referenz für alle anderen Banden des jeweiligen Blots verwendet. Bei der Auswertung der TFF2-Immunreaktivität der einzelnen Fraktionen wurde immer die Summe aller dort auftretenden Banden gebildet; das heißt, es wurde nicht zwischen den verschiedenen TFF2-Glykoformen unterschieden (siehe Kap. 2.2.12).

Nach der Größenausschluss-Chromatographie wurden die Fraktionen 13 - 15 vereinigt und auf den Resource Q-Anionentauscher aufgetragen. Bei der anschließenden Elution mittels eines ansteigenden NaCl-Gradienten (siehe Kap. 2.2.4) konnte in keiner der untersuchten Fraktionen eine TFF2-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 11).

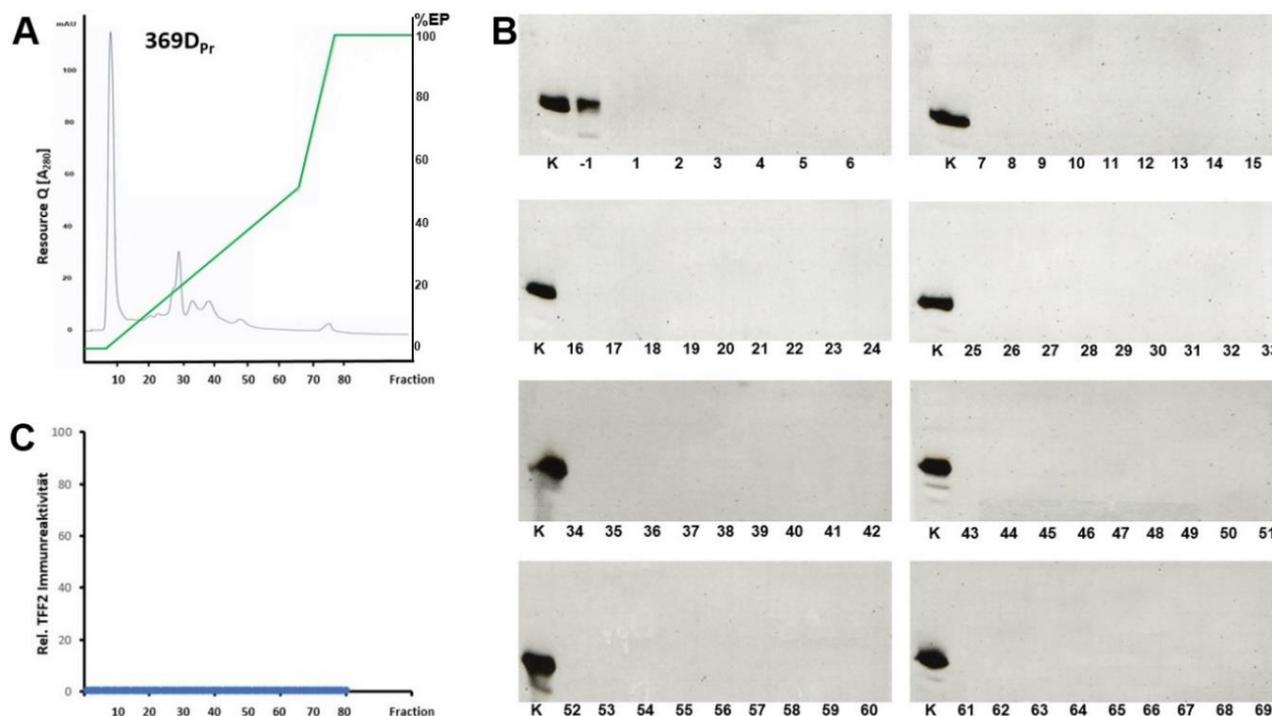


Abb. 11. Weitere Auftrennung der vereinigten Fraktionen 13 - 15 des Sephadex G-200 Laufs (Abb. 10) mittels des Resource Q-Anionentauschers. **(A)** Absorptionsprofil, gemessen bei 280 nm. Die grüne Linie stellt den Verlauf des NaCl-Gradienten dar, der über den zugemischten Elutionspuffer (EP) gesteuert wurde. **(B)** Westernblots der Fraktionen 1 - 69 bezüglich TFF2, die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. K = Positivkontrolle, -1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. **(C)** Semiquantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität.

3.1.1.2. Reinigung von TFF2 aus der Antrumprobe 323M_A

Um mehr Ausgangsmaterial für Experimente mit dem Anionentauscher zu generieren und die dort ablaufenden Prozesse besser zu verstehen, wurde die gesamte Gewebeprobe 323M_A (ca. 1,3 Gramm) extrahiert (siehe Kap. 2.2.1). Dabei wurden 8 mL Rohextrakt erhalten. Dieser wurde auf eine präparative Sephadex G-200 Säule gegeben, die aufgrund ihres größeren Volumens entsprechend angepasste Parameter aufwies (siehe Kap. 2.2.2). Aufgrund eines Gerätedefektes ist in diesem Fall kein Absorptionsprofil aufgezeichnet worden, so dass hier nur die Westernblots und die semi-quantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität gezeigt werden können (Abb. 12).

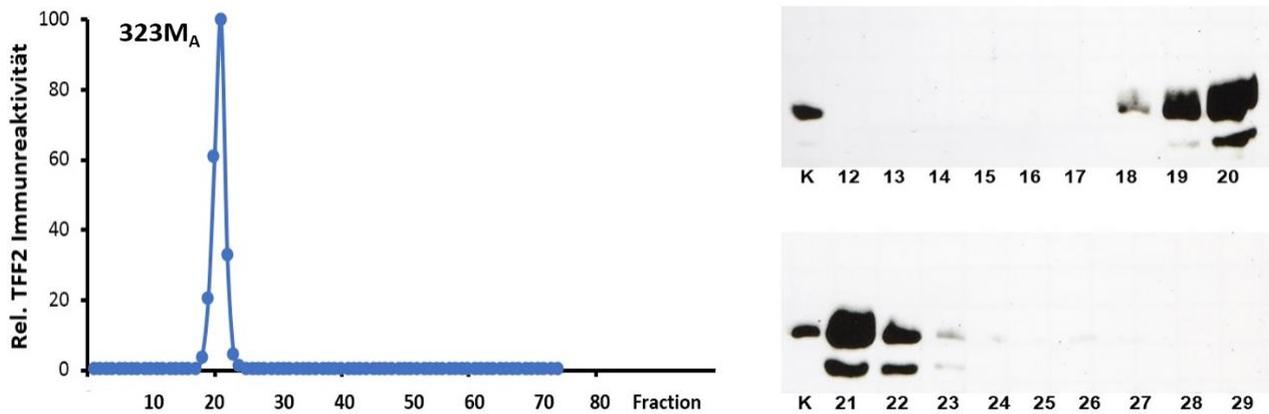


Abb. 12. Präparative SEC des Antrum-Rohextraktes (323M_A) mittels Sephadex G-200. Links ist der Verlauf der relativen TFF2-Immunreaktivität grafisch dargestellt. Rechts in der Abbildung die Westernblots mit positiver TFF2 Immunreaktivität, die dieser Auswertung zugrunde liegen. Die 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Nach Vereinigung der Fraktionen 19 - 22 wurde ein 2 mL Aliquot auf den Resource Q-Anionentauscher aufgetragen und mittels eines steigenden NaCl-Gradienten vom Säulenmaterial eluiert (Abb. 13). Das Absorptionsprofil zeigte, dass die meisten Proteine dieser Probe nicht mit der Matrix des Anionentauschers interagierten und schon in den ersten Fraktionen eluierten. Die TFF2-Immunreaktivität war in den Fraktionen 3 – 5 lokalisiert.

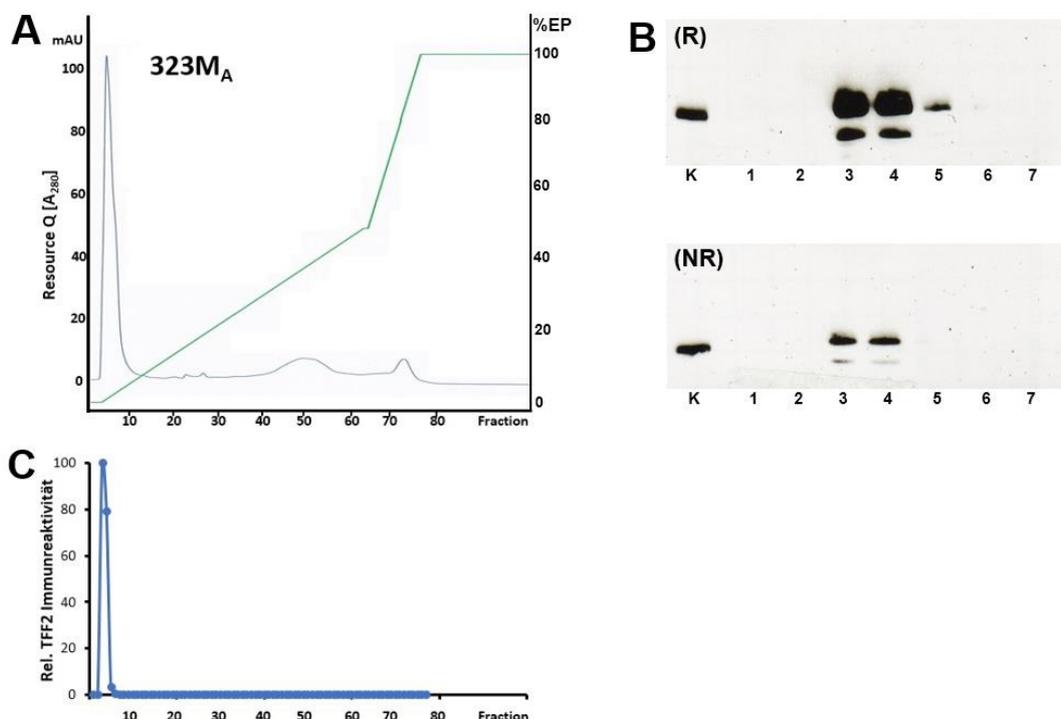


Abb. 13. Resource Q-Lauf des vorgereinigten Rohextraktes 323M_A. Ein 2 mL Aliquot der vereinigten Sephadex G-200 Fraktionen 19 - 22 (Abb. 12) wurde über den Anionentauscher weiter aufgetrennt, wobei das in (A) dargestellte Elutionsprofil resultierte. Die grüne Linie zeigt den Verlauf des 1M NaCl Elutionspuffers. (B) Westernblots der Fraktionen 1 - 7, K = Positivkontrolle, (R) = reduzierende, (NR) = nicht reduzierende Bedingungen der 15%igen SDS-PAGE. (C) Semi-quantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität.

Überladungsphänomene, die für das frühe Erscheinen der TFF2-Peptide verantwortlich sein könnten, sind in diesem Fall ausgeschlossen, da sich das Maximum der 280 nm Absorption bei etwa 100 mAU befindet, bei dem noch keine Überladung vorliegt. Alle anderen Peaks bewegen sich lediglich im Bereich bis etwa 20 mAU.

Ein Konzentrat der vereinigten Resource Q-Fraktionen 3 und 4 wurde unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen über eine 15%ige SDS aufgetrennt (Abb. 14). Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich eine starke Bande bei etwa 18,4 kDa, und eine schwächere etwas oberhalb von 14,4 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen war die TFF2-Immunreaktivität insgesamt deutlich schwächer ausgeprägt und es war nur eine Bande etwas unterhalb des 25 kDa Größenstandards zu erkennen.

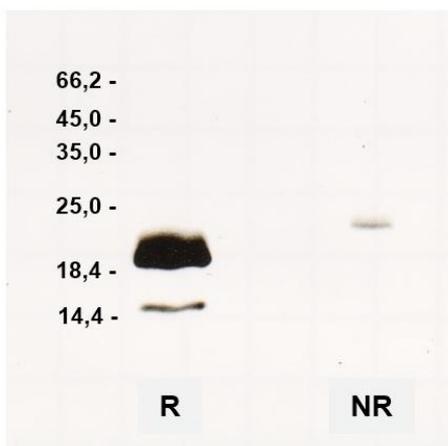


Abb. 14. 15%ige SDS-PAGE eines Konzentrats der Fraktionen 3 und 4 des Resource Q- Anionentauschers der Probe 323M_A (Abb. 13). R = reduzierende, NR = nicht reduzierende Bedingungen. Auf der linken Seite sind die Positionen der Größenstandards in kDa angegeben.

Eine weitere unter reduzierenden Bedingungen durchgeführte 15% SDS-PAGE des Konzentrats wurde mit Coomassie gefärbt und anschließend wurden 9 Banden ausgeschnitten, die massenspektrometrisch von Herrn Prof. Hanisch im Institut für Biochemie der Universität Köln untersucht wurden. Die Positionen der einzelnen Banden auf dem Coomassie-gefärbten Gel sind in Abb. 15 dargestellt, die Ergebnisse der Massenspektrometrie in Tabelle 23 aufgelistet.

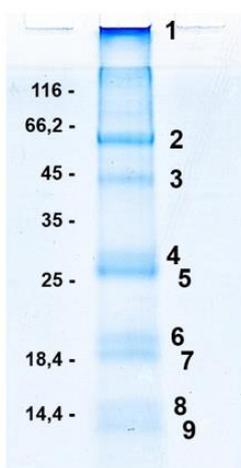


Abb. 15. 15%ige SDS-PAGE eines Konzentrats der Fraktionen 3 und 4 des Resource Q- Anionentauschers der Probe 323M_A (Abb. 13), unter reduzierenden Bedingungen. Das Gel wurde mit Coomassie angefärbt. Links die Position der Größenstandards in kDa, rechts die Position der 9 massenspektrometrisch analysierten Banden.

Tab. 23: Durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine

Bande Nr.	Identifizierte Proteine (Auswahl)	MW [kDa]	Score	Sequenz- abdeckung [%]	Identifizierte Peptide
1	MUC5AC	526,3	4161,6	19,9	84
	MUC6	252,0	831,1	8,5	17
	FCGBP	571,6	286,9	1,1	5
2	MUC5AC	526,3	720	4,9	17
	Haptoglobin	45,2	456,9	25,1	11
	FCGBP	571,6	315,5	1,4	6
3	Haptoglobin	45,2	1158,8	40,4	24
	MUC5AC	526,3	370,0	1,9	8
	FCGBP	571,6	135,6	0,7	3
4	Keratin, type II cytoskel.	66,0	506,6	20,2	10
	Ig lambda-2 chain	11,3	313,1	63,2	5
	Hemoglobin subunit beta	16,0	200,2	21,8	3
5	Ig kappa chain	11,6	371,2	88,7	7
	Immunoglobulin J chain	18,1	311,7	28,3	5
	Peroxiredoxin-4	30,5	107,8	13,3	3
6	Haptoglobin	45,2	326,1	13,1	7
	TFF 2	14,3	229,7	28,7	6
	Gastrokine-2	20,5	55,8	14,1	2
7	TFF 2	14,3	239,1	28,7	6
	Galectin-3	26,1	216,5	14,8	4
	Transgelin	22,6	186,6	18,4	4
8	TFF 2	14,3	196,9	28,7	6
	Lysozyme C	16,5	134,4	27,0	4
	Galectin-1	14,7	117	20,7	3
9	Thioredoxin	11,7	256,8	49,5	5
	TFF 1	9,1	52,2	10,7	1
	Galectin-1	14,7	51,3	13,3	2

Bei allen Banden konnten in der massenspektrometrischen Analyse Keratine, verschiedene Hämoglobin-Untereinheiten und Ketten von Immunglobulinen nachgewiesen werden. Da es sich bei ihnen um typische Verunreinigungen handelt, werden sie hier nicht weiter besprochen. In den Banden 6, 7 und 8 konnte TFF2 mit einem Score zwischen 196 und 239 nachgewiesen werden; in Bande 7 und 8 waren zudem die Galectine 1 und 3 nachweisbar, die an beta-Galaktoside binden können. In den Banden 1 - 3 war das *IgG Fc-binding protein* (FCGBP) nachweisbar. Während MUC6 nur in Bande 1 identifiziert werden konnte, waren Fragmente von MUC5AC auch in den Banden 1 - 3 zu finden. Eine vollständige Auflistung aller in den jeweiligen Banden nachgewiesenen Proteine ist im Anhang (Kap. 7.1) zu finden.

3.1.1.3. Reinigung von TFF2 aus den Antrumproben 333M_A und 337M_A

Nach dem unerwarteten Ergebnis, dass die Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität der Antrumprobe 323M_A sofort im Durchfluss des Resource Q Anionentauschers erschienen, wurde untersucht, ob dieses Verhalten für TFF2 aus dem Antrum charakteristisch sein könnte. Aus diesem Grund wurden 2 weitere Antrumproben, 333M_A und 337M_A, nach demselben Reinigungsprotokoll behandelt; das heißt, sie wurden zuerst einer SEC mittels der Sephadex G-200 Säule unterworfen, die Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität jeweils vereinigt, auf den Resource Q Anionentauscher aufgetragen und mit demselben Gradientenverlauf wie bei der Probe 323M_A von der Säule eluiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die beiden Reinigungen dargestellt.

333M_A

Bei der SEC zeigte sich die TFF2-Immunreaktivität wie bei den zuvor durchgeführten Experimenten im ersten, hochmolekularen Peak; bei der semiquantitativen Auswertung der Westernblots wurde die maximale Aktivität in der Fraktion 15 festgestellt (siehe Abb. 16).

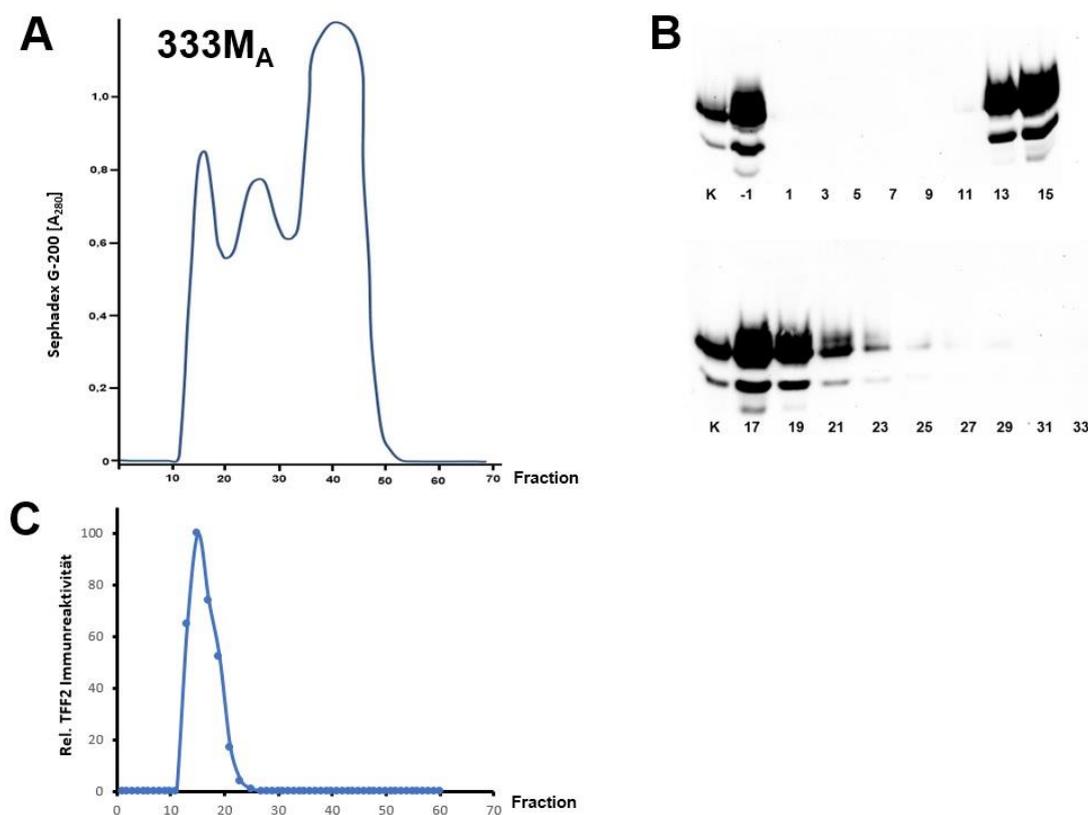


Abb. 16. SEC des Antrum-Rohextraktes 333M_A. **(A)** Absorptionsprofil der Sephadex G-200 Säule, gemessen bei 280 nm. **(B)** Westernblot der Fraktionen 1 - 33. K = Positivkontrolle (Magenextrakt); -1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. Die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(C)** Semiquantitative Auswertung der in (B) gemessenen TFF2-Immunreaktivität.

Nachdem die Fraktionen 13 - 19 der SEC vereinigt wurden, wurde ein 2 mL-Aliquot auf den Resource Q-Anionentauscher gegeben, wobei sich eine positive TFF2-Immunreaktivität in Fraktion 5 und im Bereich der Fraktionen 17 - 35 ergab (siehe Abb.17).

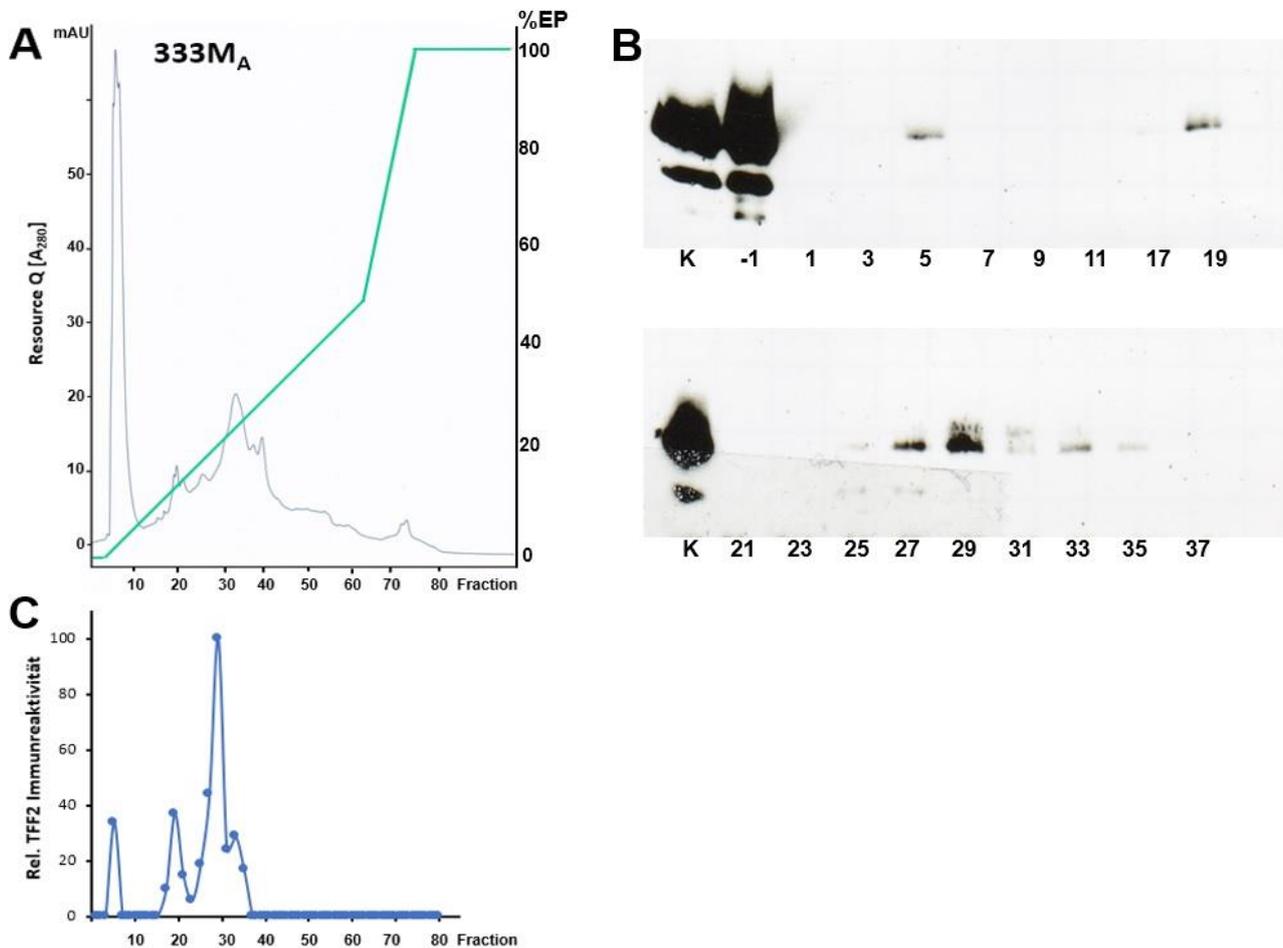


Abb. 17. Resource Q des vorgereinigten Rohextraktes 333M_A. Ein 2 mL Aliquot der vereinigten Sephadex G-200 Fraktionen 13 - 19 (Abb. 16) wurde über den Anionentauscher weiter nach der Ladung aufgetrennt. **(A)** Elutionsprofil, gemessen bei 280 nm. Die grüne Linie zeigt den Verlauf des NaCl-Gradienten **(B)** Westernblots der Fraktionen 1 - 37, K = Positivkontrolle (Magenextrakt), -1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. **(C)** Semiquantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität.

337M_A

Auch dieser Rohextrakt zeigte die TFF2-Immunreaktivität im Bereich des hochmolekularen Peaks bei der SEC; die semiquantitative Auswertung lokalisierte das Maximum in Fraktion 16 (Abb. 18).

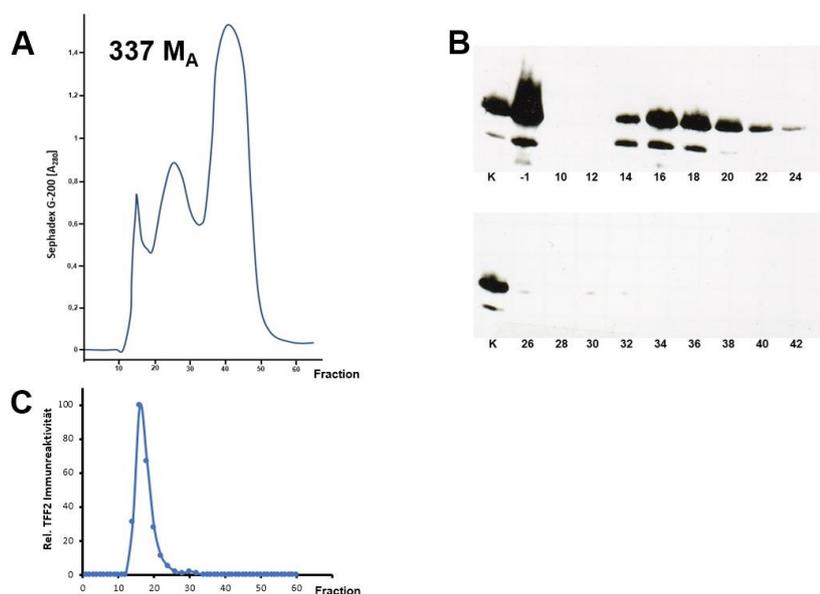


Abb. 18. SEC des Antrum-Rohextraktes 337M_A. **(A)** Absorptionsprofil der Sephadex G-200 Säule, ermittelt bei 280 nm. **(B)** Westernblot der Fraktionen 10 - 42. K = Positivkontrolle; -1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. Die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(C)** Semiquantitative Auswertung der in (B) gemessenen TFF2 Immunreaktivität.

Für den nächsten Reinigungsschritt auf dem Anionentauscher wurden die Fraktionen 14 - 20 vereinigt und ein 2 mL-Aliquot auf dem Resource Q-Anionentauscher aufgetragen.

Zur Elution der gebundenen Proteine wurde derselbe Verlauf des NaCl-Gradienten wie bei den Proben 323M_A und 333M_A eingestellt. Die TFF2-Immunreaktivität war dieses Mal auf die Fraktionen 19 – 43 beschränkt; eine TFF2-Immunreaktivität in den frühen Fraktionen war nicht zu detektieren (Abb. 19).

Im Vergleich der drei Antrumproben 323M_A, 333M_A und 337M_A konnte somit kein einheitliches Muster bei der Auftrennung durch den Anionentauscher erkannt werden: in der Probe 323M_A war die gesamte Immunreaktivität auf die Fraktionen 3 - 5 verteilt (Abb. 13), die Probe 333M_A zeigte eine schwach ausgeprägte TFF2-Immunreaktivität in Fraktion 5, während der Hauptteil der TFF2-Immunreaktivität im Bereich der Fraktionen 19 - 35 lokalisiert war, mit dem Maximum in Fraktion 29 (Abb. 17). Die Probe 337M_A zeigte keinerlei TFF2-Immunreaktivität im Bereich der ersten 17 Fraktionen, sondern nur auf die Fraktionen 19 - 43 (Abb. 19) verteilt.

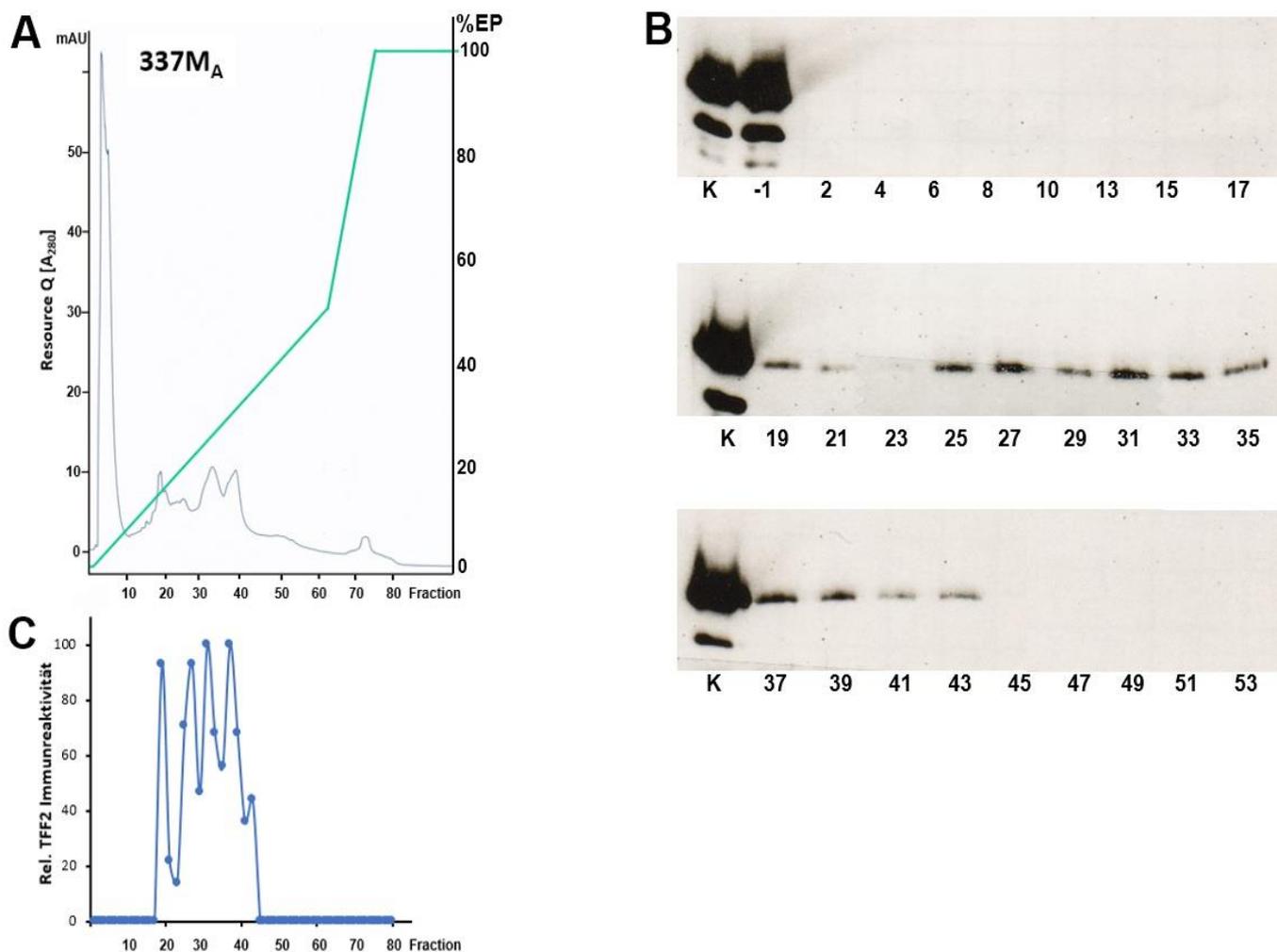


Abb. 19. Resource Q des vorgereinigten Rohextraktes 337M_A. Ein 2 mL-Aliquot der vereinigten Sephadex G-200 Fraktionen 14 - 20 (Abb. 18) wurde über den Anionentauscher aufgetrennt. **(A)** Elutionsprofil, gemessen bei 280 nm. Die grüne Linie zeigt den Verlauf des NaCl-Gradienten. **(B)** Westernblots der Fraktionen 2 - 53, K = Positivkontrolle (Magenextrakt), -1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. **(C)** Semiquantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität.

3.1.1.4. Optimierung des Gradientenverlaufs des Resource Q-Anionentauschers

Ein Rohextrakt der Gewebeprobe 343M_C aus dem Corpus wurde zunächst mittels der Sephadex G-200 Säule nach der Größe der Proteine aufgetrennt. Wie in allen Experimenten zuvor, wurde auch hier die TFF2-Immunreaktivität im ersten, hochmolekularen Peak nachgewiesen. Das Maximum befand sich in der Fraktion 15 (siehe Abb. 20A). Nach Vereinigung der Fraktionen 14 - 20 wurde ein 2 mL-Aliquot mittels des Resource Q-Anionentauschers weiter aufgetrennt. Genau wie bei der ersten Aufreinigung (3.1.1.1) war in keiner der Fraktionen eine TFF2-Immunreaktivität nachzuweisen (Abb. 20B).

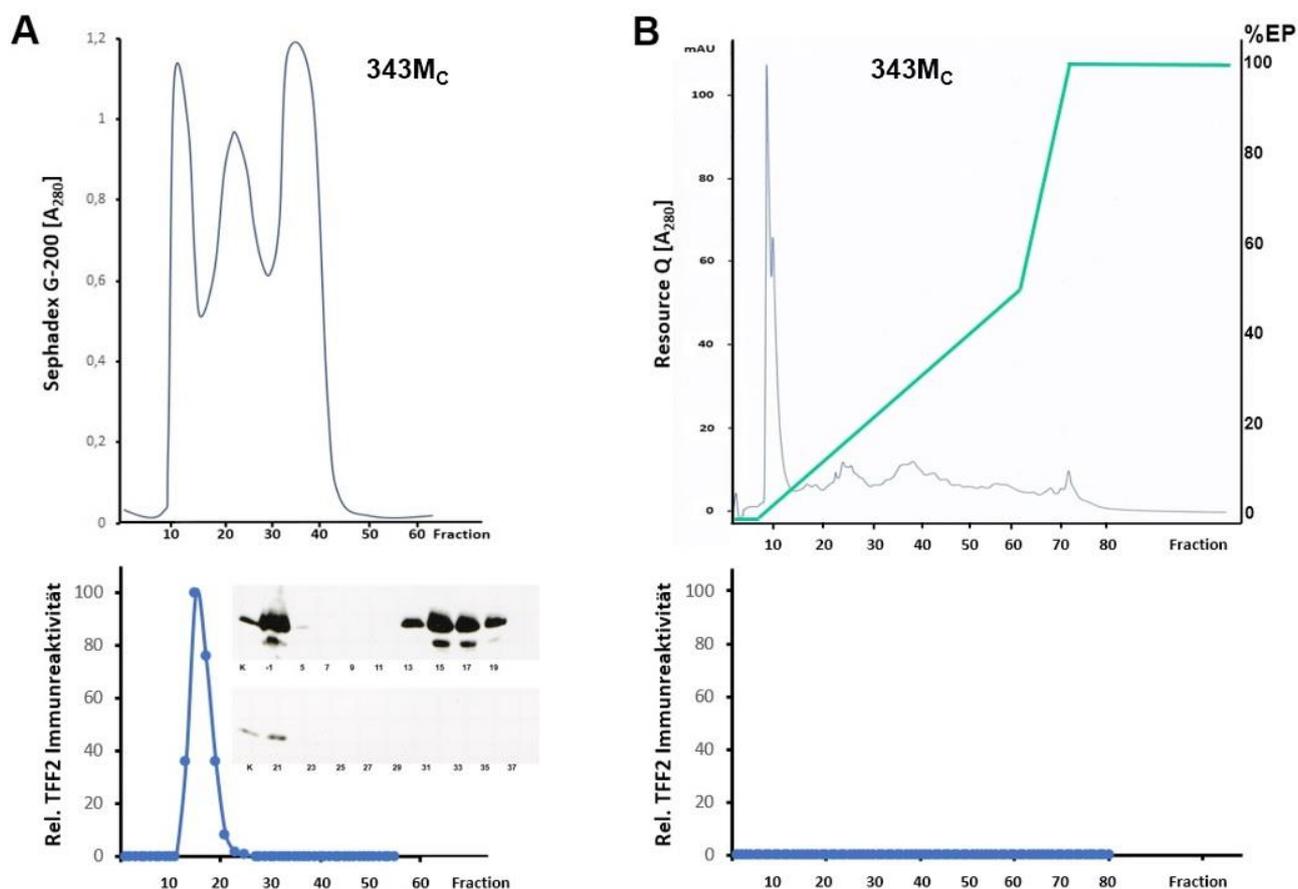


Abb. 20. TFF2-Reinigung der Gewebeprobe 343Mc. **(A)** Profil der bei 280 nm gemessenen Absorption und Darstellung der semiquantitativen Auswertung. Die Westernblots (reduzierend durchgeführte 15%ige SDS-PAGE) mit TFF2-Immunreaktivität sind ebenfalls gezeigt. **(B)** Absorptionsprofil des Resource Q-Anionentauschers; aufgetragen wurde ein Aliquot der vereinigten Fraktionen 13 - 19 der SEC; die grüne Linie zeigt den Verlauf des NaCl-Gradienten. Darunter die semiquantitative Auswertung der gemessenen TFF2-Immunreaktivität.

Um zu überprüfen ob der zum Eluieren des Anionentauschers verwendete „Puffer B“ (20mM Tris/HCl pH 8,0 + 1 M NaCl) überhaupt in der Lage ist, die an das Säulenmaterial gebundenen TFF2-Peptidkomplexe vom Anionentauscher zu verdrängen, wurde der Verlauf des Gradienten verändert. Nach einer sehr schwach ansteigenden Anfangsphase wurde die Konzentration des Puffers B abrupt in Form einer Stufe auf 100% angehoben. Auf diese Weise konnte die aufgetragene Probe in zwei Fraktionen aufgeteilt werden: Proteine, die nicht an den Anionentauscher binden und sofort im Durchfluss erscheinen, sowie Proteine, die durch den 100% Puffer B eluiert werden können. Bei diesem Verlauf des Gradienten war eine TFF2-Immunreaktivität nachweisbar und zeigte sich in den Fraktionen, die unmittelbar nach Anlegen der 100%-Stufe von der Säule ausgewaschen wurde (Abb. 21).

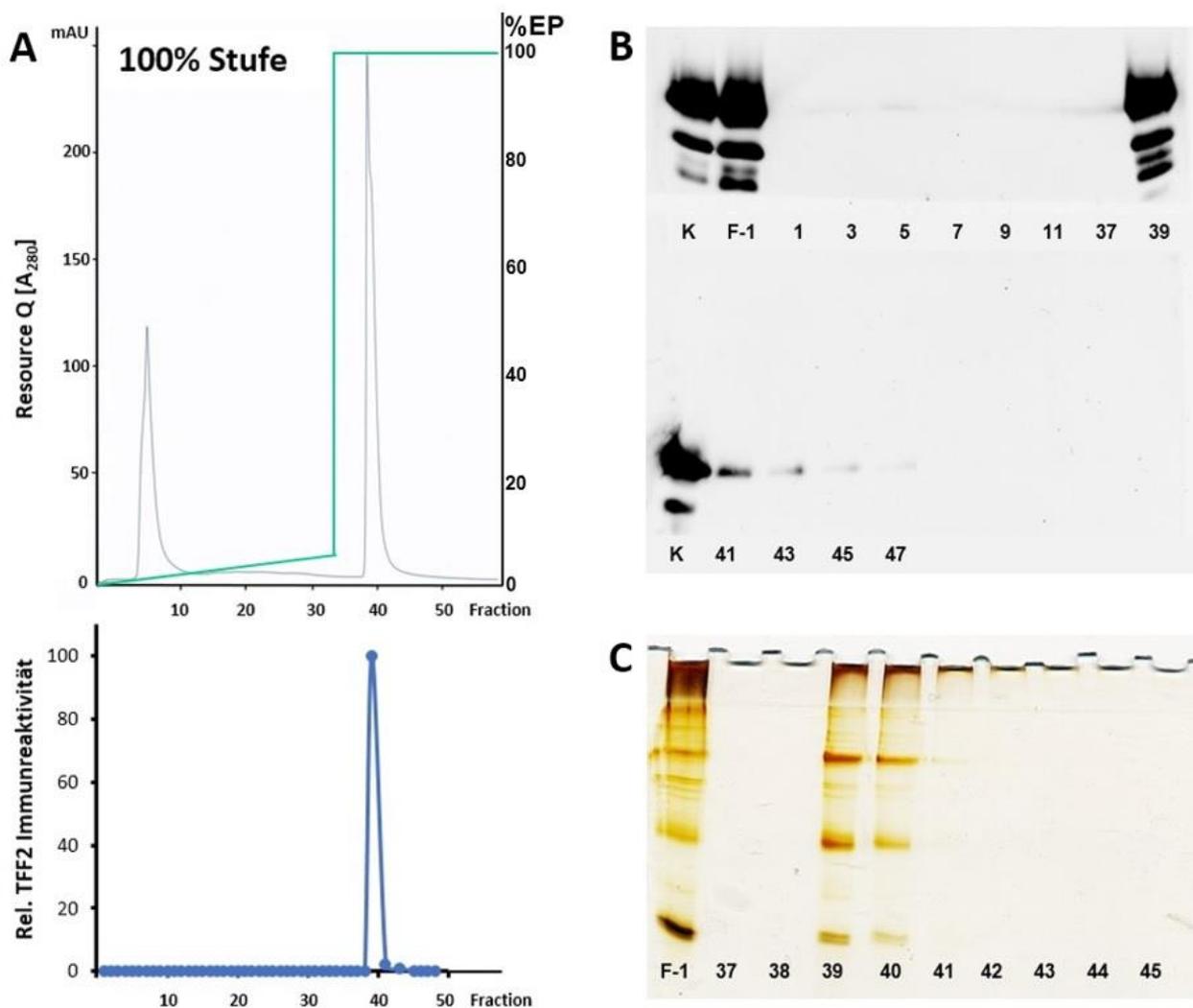


Abb. 21. Weitere Auftrennung des über G-200 vorgereinigten Corpusextraktes 343M_c (Abb. 20) mittels des Resource Q Anionentauschers. **(A)** Der obere Graph zeigt den Verlauf der Absorption bei 280 nm, der Verlauf des NaCl-Gradienten ist als grüne Linie dargestellt. Darunter die Verteilung der relativen TFF2-Immunreaktivität, die durch semi-quantitative Bestimmung der Bandenintensitäten des Westernblots ermittelt wurde. Die zugrunde liegenden SDS-PAGEs der Fraktionen wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(B)** Westernblot der Fraktionen 1 - 11 und 37 - 47 bezüglich TFF2. K = TFF2-Positivkontrolle (Magenextrakt), F-1 = Aliquot der aufgetragenen Probe. **(C)** Silbergel der Fraktionen 37 - 45; die Proben wurden in reduziertem Zustand aufgetragen.

Als Konsequenz dieses Ergebnisses wurde der Verlauf des NaCl-Elutionsgradienten für die folgenden Experimente steiler gestaltet, so dass das TFF2-immunreaktive Material konzentrierter von der Säule eluierte und besser nachgewiesen werden konnte. Ein Vergleich der Elutionsprofile bei unterschiedlichem Verlauf des NaCl-Gradienten ist in Abb. 22 dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass TFF2 nun als gut detektierbarer Peak eluierte, im Gegensatz zum flacheren Gradienten.

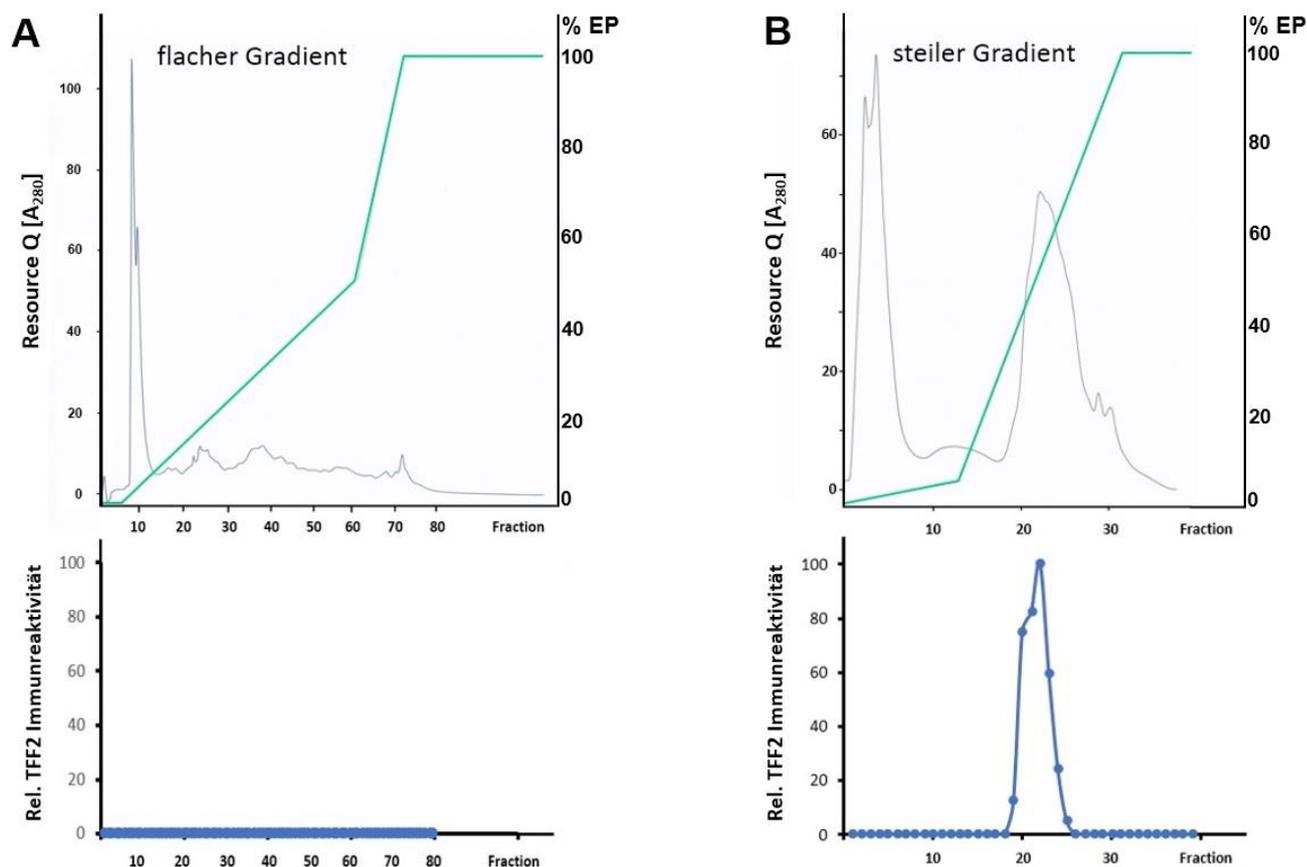


Abb. 22. Gegenüberstellung der Resource Q Elutionsprofile und der Verteilung der relativen TFF2-Immunreaktivität des über G-200 vorgereinigten Corpusextraktes 343M_C (Abb. 20) bei Verwendung verschiedener NaCl-Gradientenverläufe, die jeweils durch die grüne Linie dargestellt sind. (A) Flacher Verlauf des Elutionsgradienten. (B) Steiler ansteigender Elutionsgradient.

3.1.2. Reinigung von TFF2 aus einer Antrum-Gewebeprobe mittels Resource Q-Anionentauscher und Superose 6 10/300 SEC

Um eine bessere Trennschärfe im hochmolekularen Bereich zu erzielen, wurde bei diesem Experiment die Eignung einer Superose 6 10/300 GL-Säule für die Reinigung von TFF2 untersucht. Die Superose-Säule kann Moleküle bis zu einem maximalen Gewicht von 5.000 kDa auftrennen, während die Porengröße des Sephadex G-200 Materials nur eine Trennung im Bereich zwischen 5 und 600 kDa erlaubt (Tab. 22, S. 43). Da die Superose-Säule eine geringere Beladungskapazität aufweist, musste das bisherige Reinigungsprotokoll umgekehrt werden: der Rohextrakt der Antrum-Gewebeprobe 358M_A wurde zunächst auf dem Resource Q-Anionentauscher vorgereinigt und die Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität sollten anschließend auf der Superose-Säule nach ihrer Größe getrennt werden. Bei der Auftrennung des Rohextraktes mittels des Anionentauschers ergab sich das in Abb. 23 gezeigte Elutionsprofil und die TFF2-Immunreaktivität verteilte sich auf die Fraktionen 2 und 3 sowie die Fraktionen 16 - 23, wobei die Fraktion 19 das lokale Maximum darstellte.

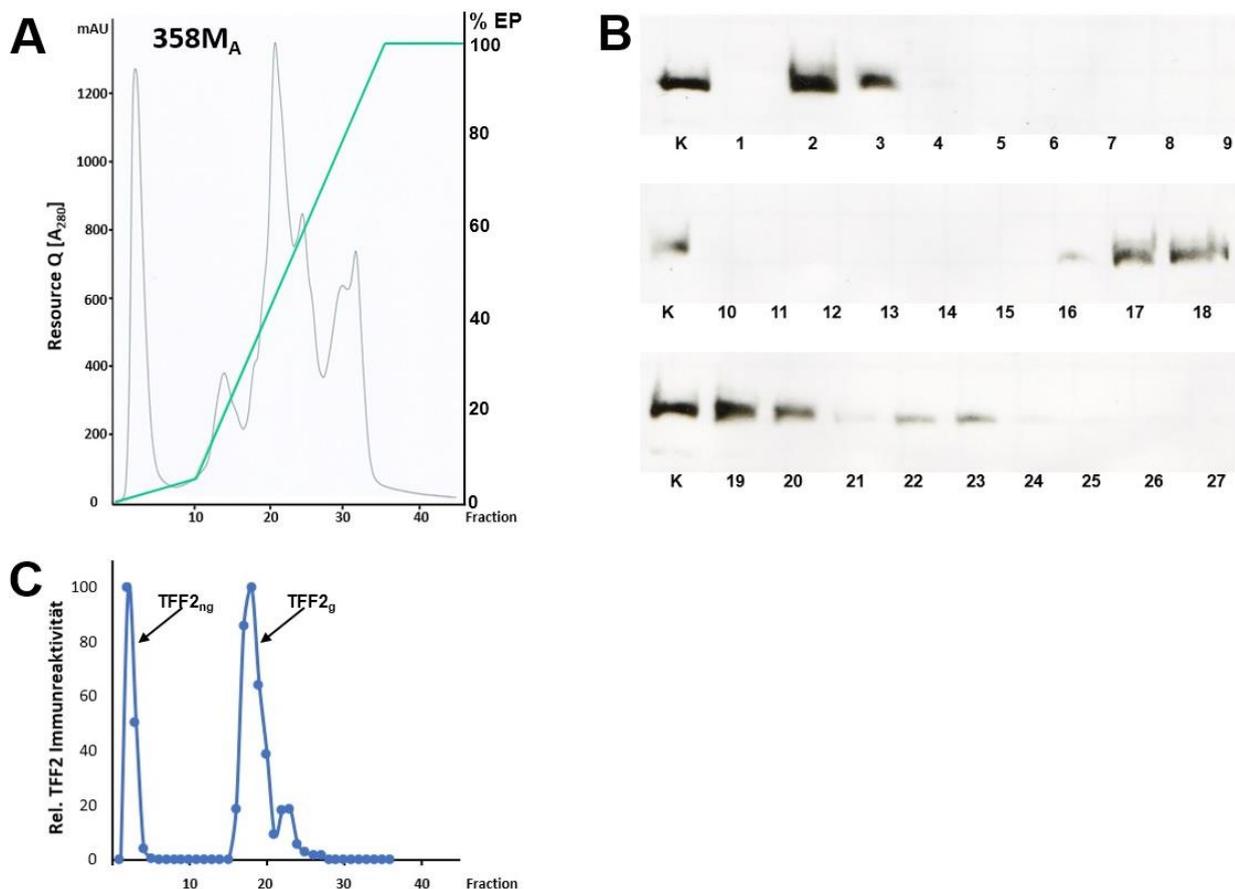


Abb. 23. TFF2-Reinigung des Rohextraktes 358M_A. **(A)** Elutionsprofil des Resource Q-Anionentauschers, die grüne Linie stellt den Verlauf des NaCl-Gradienten dar. **(B)** Westernblots der Fraktionen 1 - 27, die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(C)** Grafische Darstellung der relativen TFF2-Immunreaktivität, die durch semiquantitative Auswertung der Bandenintensitäten der Westernblots ermittelt wurde. TFF2_{ng} = nicht gebundenes TFF2, TFF2_g = gebundenes TFF2.

Da die TFF2-Komplexe der Fraktionen 2 und 3 nicht an die positiv geladene Matrix des Anionentauschers banden, wurden sie als „nicht gebundenes TFF2“ (TFF2_{ng}) bezeichnet. Diejenigen TFF2-Komplexe, die vom Anionentauscher gebunden wurden und erst durch den NaCl-Gradienten in den Fraktionen 16 – 23 von diesem eluiert werden konnten, stellten das „gebundene TFF2“ (TFF2_g) dar. Sowohl TFF2_{ng} als auch TFF2_g wurden im nächsten Reinigungsschritt separat auf der Superose 6 10/300 GL-Säule nach ihrer Größe aufgetrennt. Die TFF2-Immunreaktivität des nicht gebundenen TFF2 war bei der SEC auf die Fraktionen 6 - 8 und 15 - 19 verteilt; es waren also sowohl hochmolekulare als auch niedermolekulare TFF2-Komplexe, die das nicht gebundene TFF2 darstellten. Bei der semiquantitativen Auswertung zeigte sich, dass das Maximum im hochmolekularen Bereich etwa 3 Mal intensiver war (siehe Abb. 24C). Im Gegensatz dazu eluierte das gebundene TFF2 bei der SEC ausschließlich im Bereich der Fraktionen 6 – 8 (Abb. 25), liegt also nur in einer hochmolekularen Form vor.

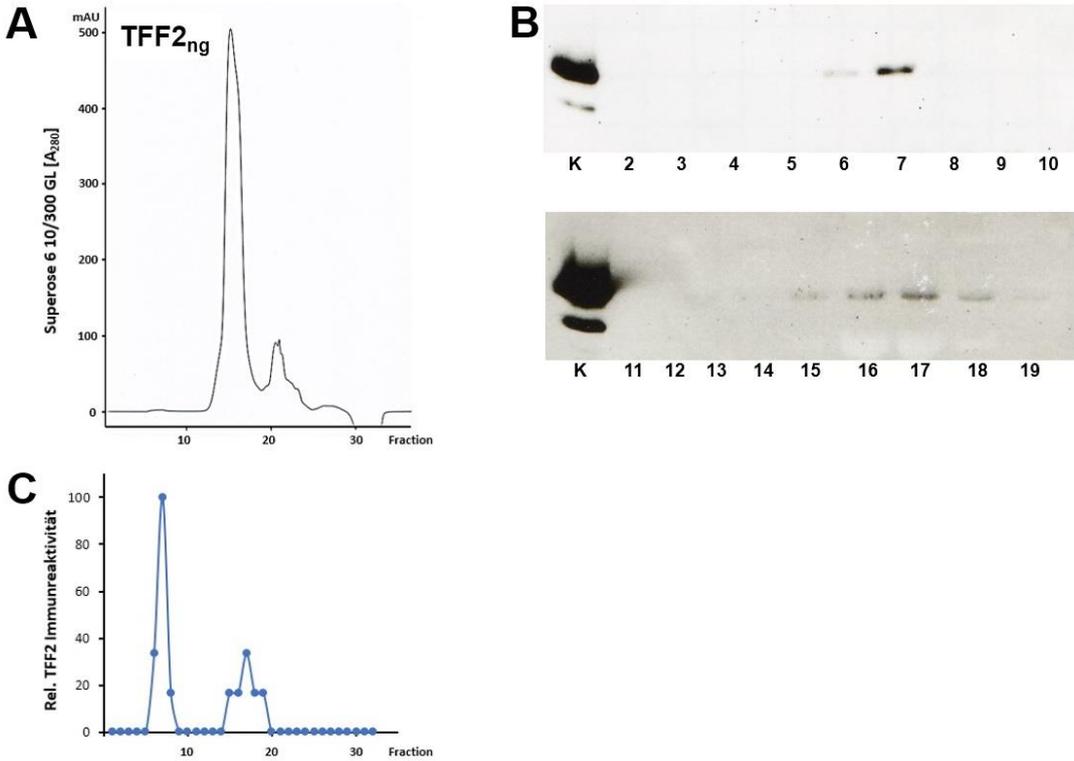


Abb. 24. SEC (Superose 6 10/300 GL) der Fraktionen 2 + 3 nach Anionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 23). **(A)** Absorptionsprofil, gemessen bei 280. **(B)** Westernblots der Fraktionen 1 - 19 bezüglich TFF2, die 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(C)** Semiquantitative Auswertung der Westernblots.

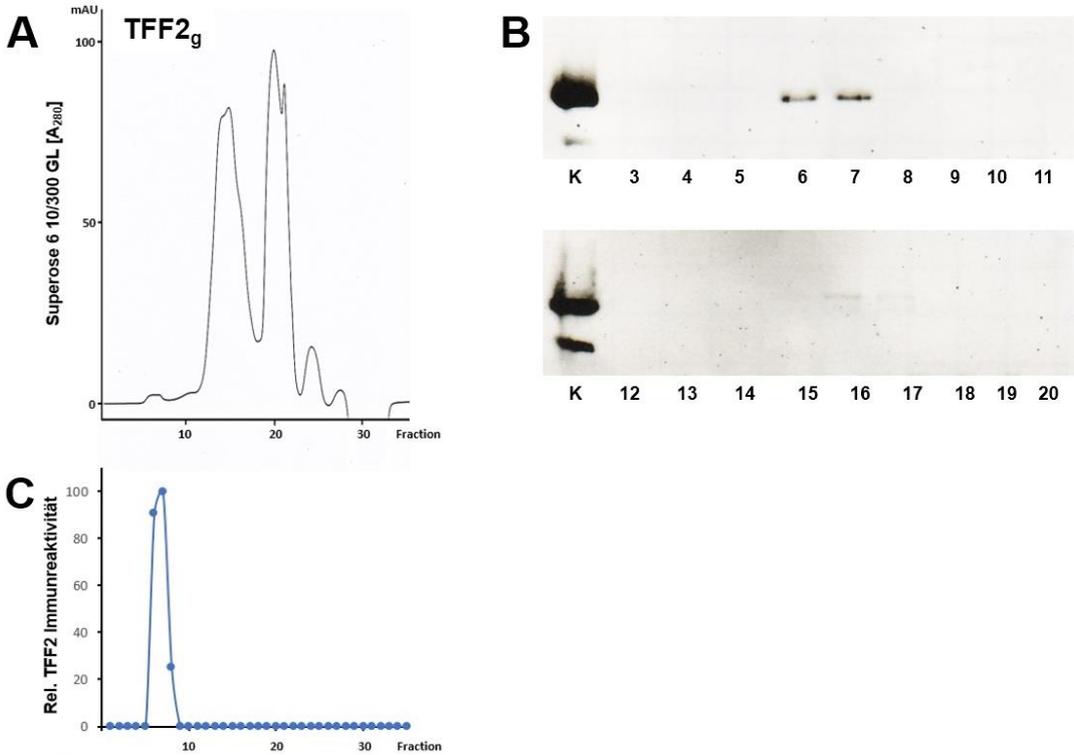


Abb. 25. SEC (Superose 6 10/300 GL) der Fraktionen 17 - 20 nach Anionenaustauschchromatographie (siehe Abb. 23). **(A)** Absorptionsprofil, gemessen bei 280. **(B)** Westernblots der Fraktionen 3 - 20 bezüglich TFF2, die 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(C)** Semiquantitative Auswertung der Westernblots.

3.1.3. Reinigungseffizienz von Sephacryl-Säulen bei der TFF2- Reinigung

Durch die Verwendung von Sephacryl-Säulen konnte ebenfalls eine verbesserte Auflösung im hochmolekularen Bereich, verglichen mit klassischen SEC-Säulen wie der Sephadex G-200, erzielt werden (Tab. 22, S. 43). Die Sephacryl-Säulen wurden genau wie die Superose 6 10/300 GL-Säule mit der Äkta-FPLC-Anlage betrieben, haben jedoch eine höhere Beladungskapazität, so dass sie direkt für die Trennung von Rohextrakten verwendet werden konnten und die bisherige logische Abfolge der Reinigungsschritte nicht verändert werden musste.

3.1.3.1. Sephacryl S-500 HR

Auf der Sephacryl S-500 Säule wurde ein Rohextrakt der Corpus-Gewebeprobe 382Mc aufgetrennt, wobei die TFF2-Immunreaktivität sich über die Fraktionen 25 - 63 erstreckte und die Fraktion 54 das stärkste Signal zeigte (Abb. 26).

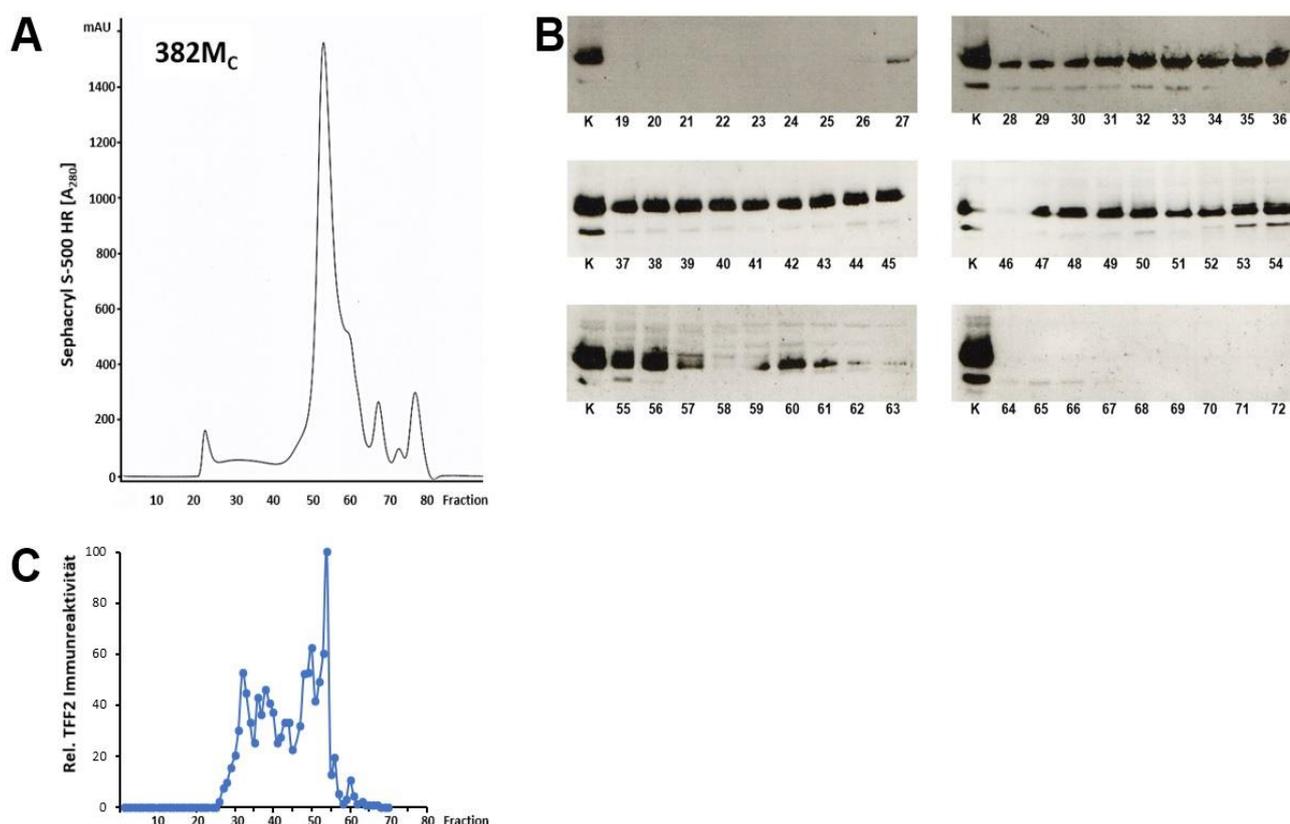


Abb. 26. SEC des Corpus-Rohextraktes 382Mc (Sephacryl S-500 HR) **(A)** Elutionsprofil, bestimmt über die Absorption bei 280 nm. **(B)** Westernblots mit positiver Immunreaktivität bezüglich TFF2 (Fraktionen 19 – 72), die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. K = Positivkontrolle (Magenextrakt). **(C)** Semiquantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität.

3.1.3.2. Sephacryl S-300 HR

Die Sephacryl S-300 Säule wurde für die TFF2-Reinigung der Gewebeprobe 400M_A verwendet. Der Hauptteil der TFF2-Immunreaktivität verteilte sich hier auf die Fraktionen 21-23, wobei die Fraktion 21 bei der semiquantitativen Auswertung der TFF2-Immunreaktivität das Maximum darstellte (Abb. 27). Die TFF2-Immunreaktivität nahm danach abrupt ab und in Fraktion 25 waren nur noch rund 11% der TFF2-Immunreaktivität, verglichen mit Fraktion 21, messbar. Setzt man die Fraktionen 21 -23 in Relation zum Absorptionsprofil, so sind sie Teil des ersten, hochmolekularen Peaks. Bei Verwendung der S-300 Säule war auch eine geringe TFF2-Immunreaktivität bis zur Fraktion 47 nachweisbar (1 - 5% bezogen auf die maximal gemessene Intensität).

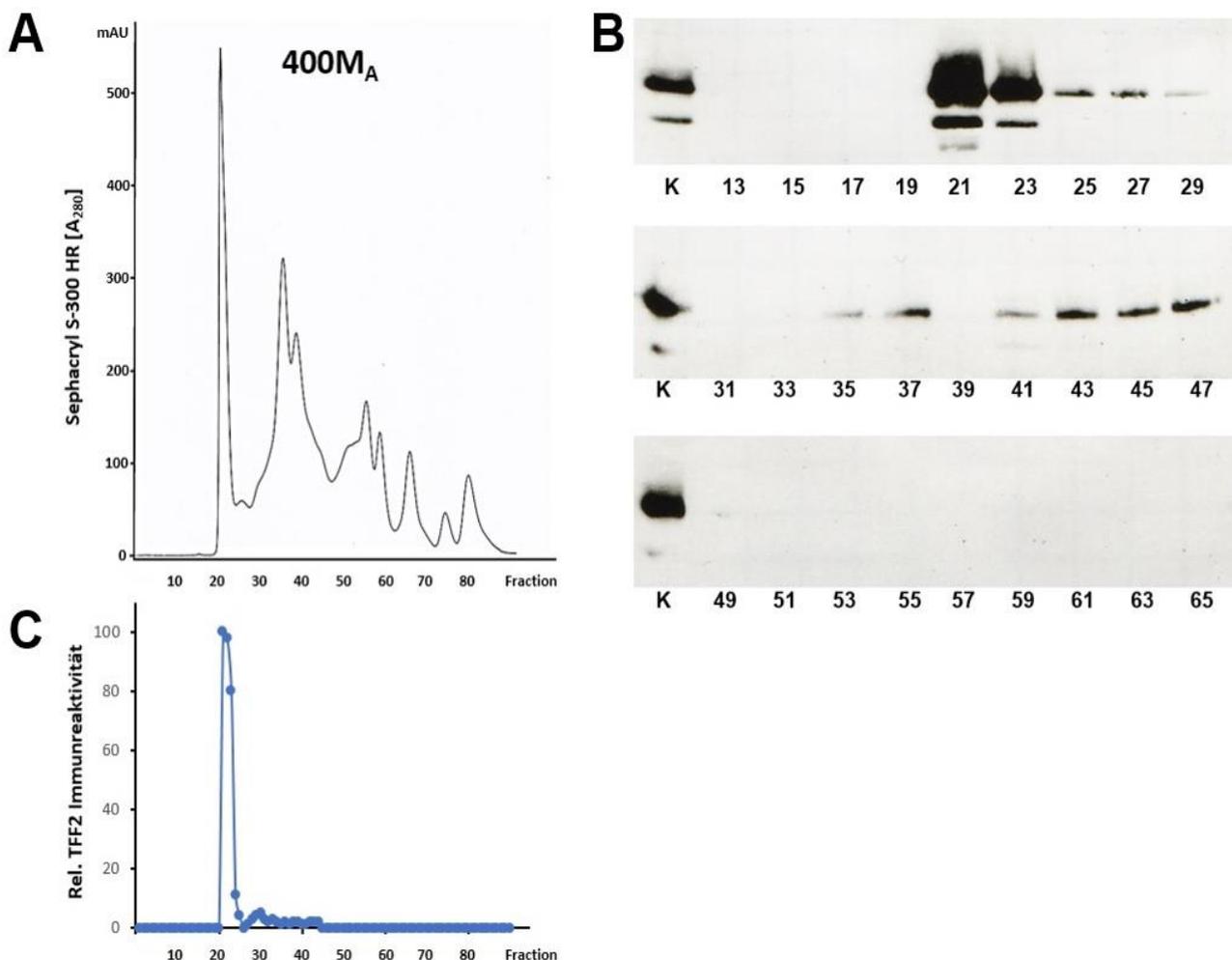


Abb. 27. SEC des Corpus-Rohextraktes 400M_A (Sephacryl S-300 HR). **(A)** Elutionsprofil, bestimmt über die Absorption bei 280 nm. **(B)** Westernblots mit positiver TFF2-Immunreaktivität (Fraktionen 13 – 65). Die zugrunde liegenden 15%igen SDS-PAGEs wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. K = Positivkontrolle (Magenextrakt). **(C)** Semiquantitative Auswertung der TFF2-Immunreaktivität.

Insgesamt betrachtet wies die Sephacryl-S 300 Säule in Bezug auf die Reinigung von TFF2 das geeignetere Profil auf, weil der Hauptteil der TFF2-Immunreaktivität in lediglich drei Fraktionen von der Säule eluierte und ein Großteil der anderen enthaltenen Proteine abgetrennt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde bei Verwendung der S-500 Säule die TFF2-Immunreaktivität über mehr als 30 Fraktionen gestreut und überlappte teilweise mit dem Bereich, bei dem die meisten Proteine des Extraktes eluierten (Abb. 26A, Fraktionen 50-60).

3.2. Bestimmung der N-Glykosylierung von TFF2 mittels Lektinen

Die massenspektrometrischen Glykanuntersuchungen wurden an den gereinigten Gewebeproben 323M_A und 382M_C von Herrn Prof. Hanisch (Universität Köln) durchgeführt. Die Probe 323M_A wurde wie bereits beschrieben über eine SEC mit der G-200 Säule und dem ResourceQ-Anionentauscher gereinigt (Abb. 12, Abb. 13), während bei der Probe 382M_C der entsprechende Rohextrakt nur über eine Sephacryl S-500-Säule aufgetrennt und ein Konzentrat der Fraktion 32 (Abb. 26) verwendet wurde. Die analysierten Banden sind in Abb. 28 dargestellt. Bei beiden Proben deuteten die Ergebnisse auf die seltene, bi-antennäre, fucosylierte LacdiNAc-Zuckerstruktur als N-Glykosylierung des TFF2-Peptids hin (Hanisch *et al.* 2013), die in Abb. 29 schematisch dargestellt ist.

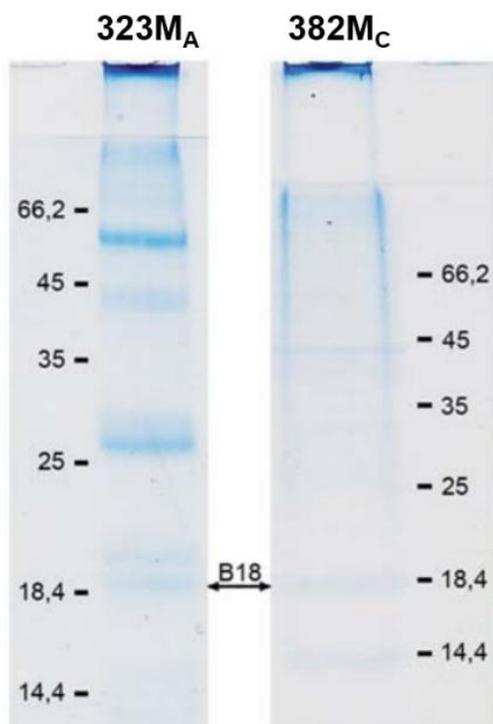


Abb. 28. Coomassie-gefärbte 15% SDS-PAGE-Gele der gereinigten Magenextrakte 323M_A bzw. 382M_C (reduzierende Bedingungen). Es wurde jeweils die als „B18“ eingezeichnete Bande massenspektrometrisch bezüglich der enthaltenen Glykane untersucht. Rechts und links angegeben sind die Positionen der Markerbanden (kDa). Diese Abbildung wurde teilweise als Fig.1 in Hanisch *et al.* (2013) publiziert.

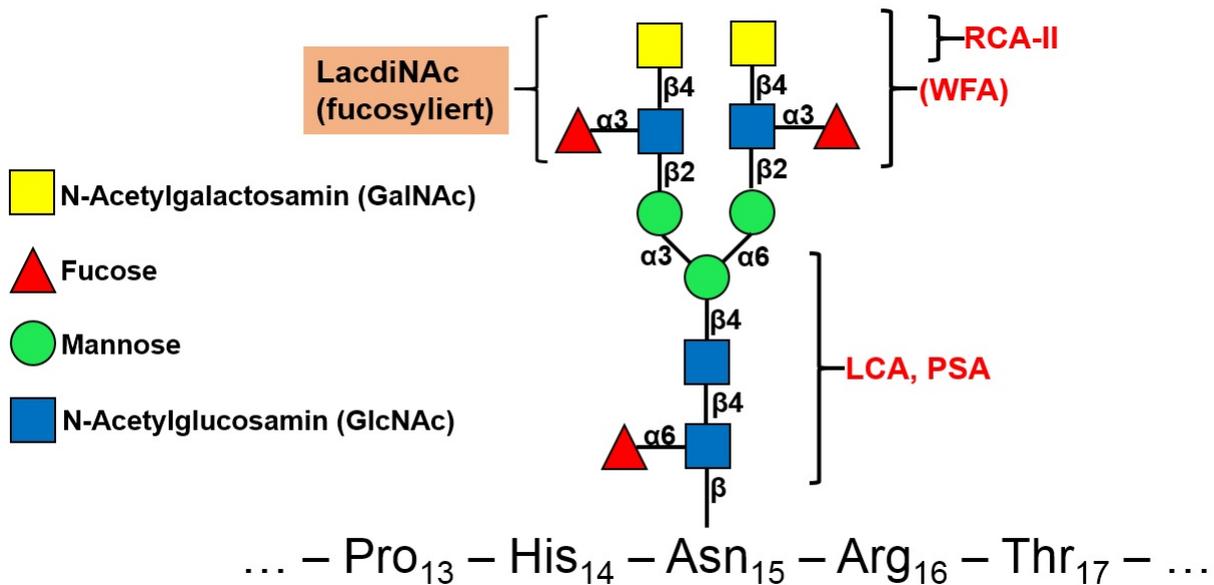


Abb. 29. Massenspektrometrisch bestimmte N-Glykosylierung von TFF2 aus dem Antrum/Corpus (Hanisch *et al.* 2013). Die Glykanstruktur an Asn-15 besitzt zwei endständige LacdiNAc-Gruppen (GalNAc β 1-4GlcNAc), die zusätzlich am GlcNAc fucosyliert sind. Die LacdiNAc-Struktur sollte von den beiden Lektinen WFA und RCA-II erkannt werden; da die LacdiNAc-Struktur in diesem Fall durch die Fucosylierung noch weiter modifiziert ist, kann WFA im Gegensatz zu RCA-II nicht mehr binden (Sakiyama *et al.* 1998, Ikehara *et al.* 2006), weshalb es in Klammern gesetzt ist. Die Lektine LCA und PSA erkennen die fucosylierte Kernstruktur (Tateno *et al.* 2009), können aber auch an fucosyliertes GlcNAc von LacdiNAc binden. Ist LacdiNAc am GalNAc zusätzlich sialyliert, wird die Sialinsäure vom Lektin SNA (nicht eingezeichnet) erkannt.

Um dieses Ergebnis auch mit biochemischen Methoden zu bestätigen und eventuelle Unterschiede in der Glykosylierung zwischen dem Fundus und Antrum zu entdecken, wurden je drei durch SEC gereinigte Rohextrakte aus diesen Bereichen mittels spezifischer Lektine (RCA-II, WFA, LCA, PSA und SNA; siehe Kap 2.1.4) untersucht (Abb. 29).

3.2.1. Reinigung geeigneter Gewebeproben für Lektinanalysen

Die Rohextrakte wurden jeweils einer SEC unterworfen, wobei entweder die Superose 6 10/300 GL oder die Sephacryl S-300 Säule zum Einsatz kam. Auf einen zusätzlichen Reinigungsschritt durch den Resource Q-Anionentauscher wurde verzichtet, um die Proben nicht weiter zu verdünnen und das Reinigungsprotokoll möglichst einfach zu halten. Die TFF2-Immunreaktivität war bei jeder SEC stets im hochmolekularen Peak lokalisiert; aus Gründen der Übersichtlichkeit ist daher in Abb. 30 exemplarisch nur jeweils ein typisches Chromatogramm für eine Superose- bzw. Sephacryl-Säule gezeigt, sowie die Verteilung der TFF2-Immunreaktivität im Bezug auf das Elutionsprofil. Die für die Lektinanalysen verwendeten Gewebeproben sind systematisch in Tabelle 25 aufgelistet.

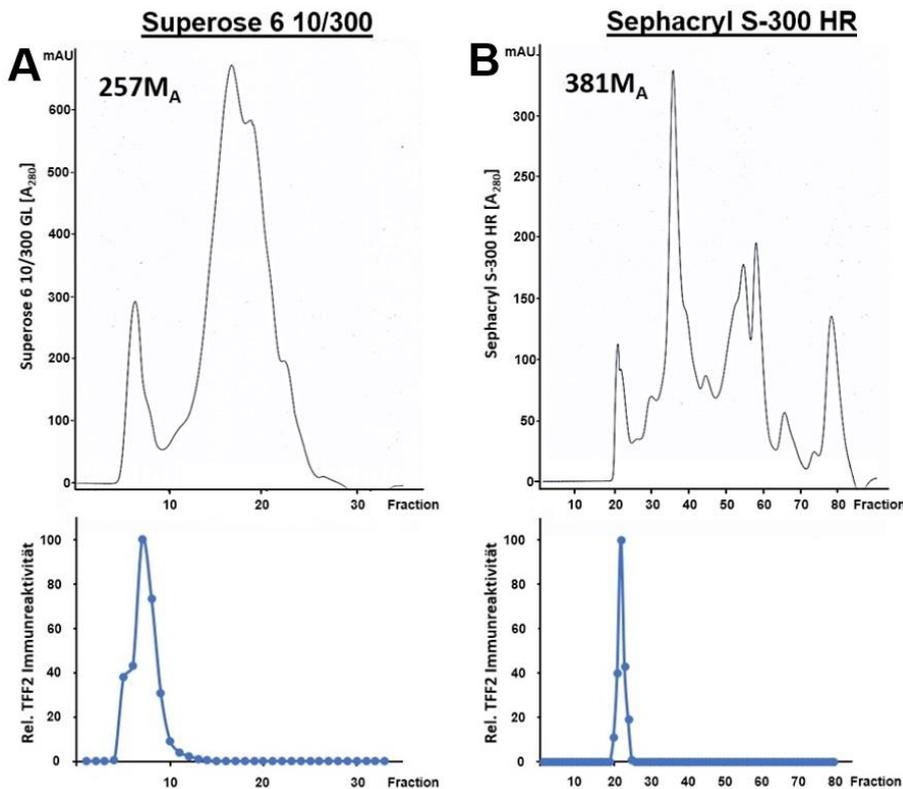


Abb. 30. Darstellung des Elutionsprofils und der relativen TFF2-Immunreaktivität nach semiquantitativer Auswertung der Westernblots unter reduzierenden Bedingungen für die Proben 257M_A und 381M_A. **(A)** Auftrennung des Rohextrakts mittels der Superose 6 10/300 GL. **(B)** Auftrennung des Rohextrakts über Sephacryl S-300 HR.

Tab. 24: SEC der Magenproben für die Lektinanalyse

Probe	Entnahmeort	SEC durchgeführt mit	Verwendete Fraktionen
461M _F	Fundus	Superose 6 10/300 GL	6+7
462M _F	Fundus	Superose 6 10/300 GL	7+8
463M _F	Fundus	Superose 6 10/300 GL	7+8
257M _A	Antrum	Superose 6 10/300 GL	7+8
354M _A	Antrum	Sephacryl S-300	21
381M _A	Antrum	Sephacryl S-300	22

3.2.2. Verdau des gereinigten TFF2 mit *Peptide:N-glycosidase F* (PNGase-F)

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Banden der Lektintests wirklich um das glykosylierte TFF2-Peptid handelt, wurde ein Aliquot der gereinigten Probe 461M_F mit PNGase-F verdaut (siehe Kap. 2.2.16). Das Enzym spaltet zwischen dem Asparaginrest des Proteins und dem N-glykosidisch daran gebundenen N-Acetylglucosaminrest von „high mannose“, hybriden und komplexen Oligosacchariden (Tarentino *et al.* 1989). Als Endprodukte dieser Spaltung resultieren das freie Glykan inklusive der vom Asparagin

stammenden Aminogruppe und das Peptid, dessen Asparaginrest zu einem Aspartat umgewandelt wird (Tarentino und Plummer 1994).

Das verdaute Peptid wurde zusammen mit der unverdauten Kontrolle unter reduzierenden Bedingungen durch eine 15% SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließende Westernblot wurde dann entweder mit dem Antikörper anti-hTFF2-1 bzw. dem Lektin PSA oder RCA-II behandelt und mittels ECL ausgewertet (Abb. 31).

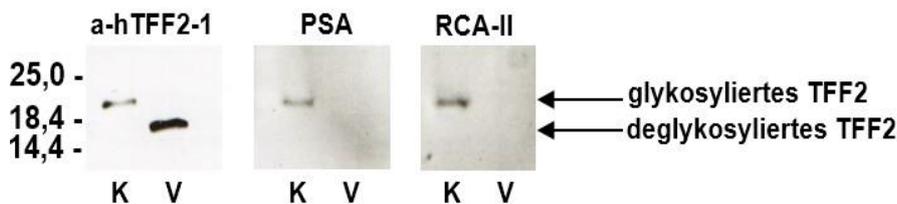


Abb. 31. PNGase-F-Verdau der gereinigten Probe 461MF. Nach 15% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wurden die Westernblots mit dem Antikörper anti-hTFF2-1 bzw. den Lektinen PSA und RCA-II behandelt. Links die Position der Größenstandards (kDa); K = unverdaute Kontrolle (gereinigte Probe 461MF), V = mit PNGase-F verdaut. Die Abbildung wurde teilweise als Fig.5 in Hanisch et al. (2013) publiziert.

Der Westernblot zeigte im Fall des Antikörpers eine Bande etwas oberhalb des 18,4 kDa Größenstandards, die verdaute Probe eine Bande zwischen 14,4 und 18,4 kDa. Dieses Ergebnis beweist einerseits, dass der Antikörper spezifisch TFF2 erkennt und andererseits, dass der Verdau erfolgreich war und quantitativ erfolgte.

Wurden die Blots mit Hilfe der Lektine behandelt, so zeigte nur die unverdaute Kontrolle eine Bande, während in der Spur mit der verdauten Probe erwartungsgemäß kein Signal mehr detektiert werden konnte, da die Glykanstruktur abgespalten wurde und keine Wechselwirkung mit dem Lektin mehr möglich war.

3.2.3. Untersuchungen der gereinigten Extrakte mit Hilfe von Antikörpern bzw. Lektinen

Im Folgenden wurden die gereinigten Proben auf ihre Interaktion mit den Antiseren anti-hTFF2-1 und anti-hTFF2-3 über eine Westernblot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen untersucht (Abb. 32). Bei beiden Antiseren handelt es sich um affinitätsgereinigte polyklonale Antiseren aus dem Kaninchen, bei denen die zur Immunisierung verwendeten Peptide zuvor an das *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) gekoppelt waren. Antiserum anti-hTFF2-1 (Jagla *et al.* 2000) ist gegen die Sequenz FFPNSVEDCHY am C-Terminus des humanen TFF2 gerichtet, während das Antiserum anti-hTFF2-3 die Sequenz FFPKSVEDCHY (May *et al.* 2000) erkennt. Die beiden TFF2-Sequenzen wurden von den zitierten Arbeitsgruppen bestimmt und unterscheiden sich nur

an einer Position. Bei der massenspektrometrischen Analyse der gereinigten Extrakte der Proben 323M_A und 343M_C konnten jeweils Peptide mit der Sequenz **K**SVEDCHY nachgewiesen werden (siehe Anhang Kap. 7.1.6 – 7.1.8; Kap. 7.2.2).

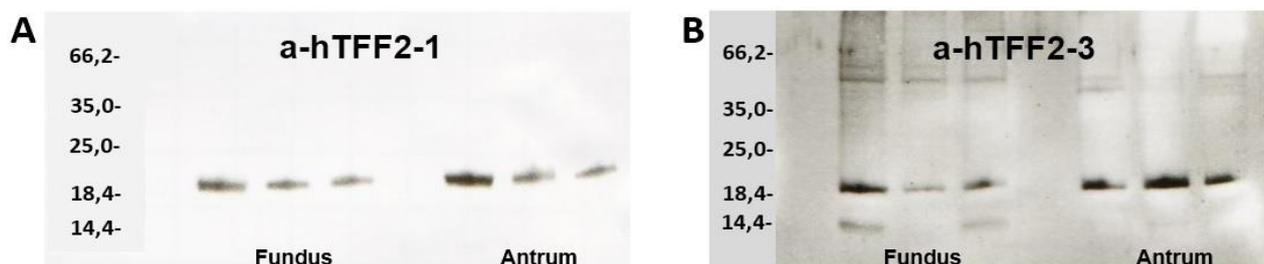


Abb. 32. Westernblot je dreier über SEC gereinigter Proben aus dem Fundus (461M_F, 462M_F, 463M_F) und dem Antrum (257M_A, 354M_A, 381M_A) und Bindung mittels der Antikörper anti-hTFF2-1 bzw. anti-hTFF2-3. Jeweils links die Position der Größenstandards (kDa).

Beide Antiseren erkennen das glykosylierte TFF2-Peptid etwas oberhalb des 18,4 kDa Größenstandards. Das Antiserum anti-hTFF2-3 lieferte bei den Fundusproben 461 und 463 noch eine Bande im Bereich von 14,4 kDa, bei der es sich um das nicht glykosylierte TFF2 handeln könnte. Da der Antikörper anti-hTFF2-1 im Laborbetrieb routinemäßig beim Screenen von FPLC-Fractionen verwendet wird und dort auch zuverlässig das nicht glykosylierte TFF2 detektiert, kann das Bandenmuster der Abb. 32 zum Beispiel dadurch erklärt werden, dass anti-hTFF2-3 etwas empfindlicher für nicht glykosyliertes TFF2 ist als anti-hTFF2-1. Das Antiserum anti-hTFF2-3 erkennt auch noch Banden im Bereich von 50 - 60 kDa, sodass die mit diesem Antikörper durchgeführten Blots etwas unspezifischer erscheinen.

Um die massenspektrometrischen Ergebnisse der Glykananalyse durch Herrn Prof. Hanisch zu verifizieren wurden, so wie in Abb. 29 dargestellt, nun die Lektine RCA-II, WFA, LCA, PSA und SNA eingesetzt (Abb. 33).

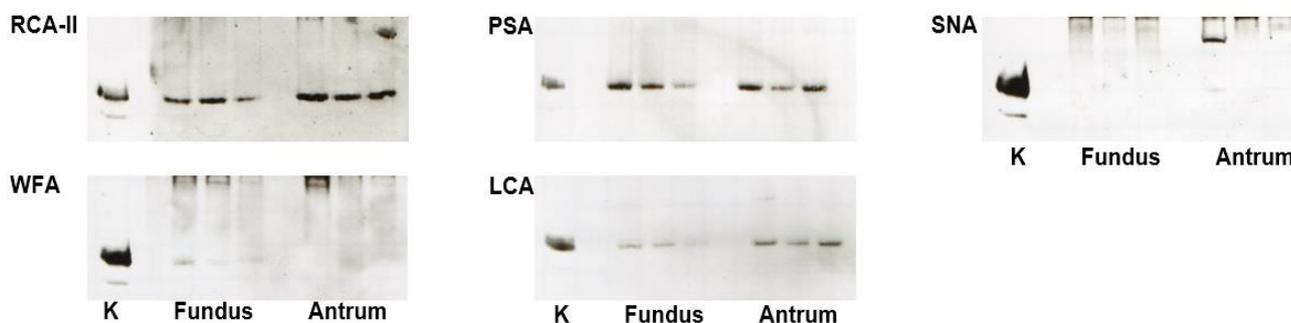


Abb. 33. Westernblot je dreier über SEC gereinigter Proben aus dem Fundus (461M_F, 462M_F, 463M_F) und Antrum (257M_A, 354M_A, 381M_A). Die Proben wurden über eine 15%ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und der anschließende Westernblot mit dem jeweils angegebenen Lektin analysiert. K = Positivkontrolle (Magenextrakt, Nachweis des TFF2-Peptids mit dem Antiserum anti-hTFF2-1).

Die stärksten Signale zeigte dabei das Lektin RCA-II, welches das terminale β -GalNAc der LacdiNAc-Gruppe erkennt. Das Lektin WFA, welches ebenfalls spezifisch das terminale β -GalNAc erkennen sollte (Ikehara *et al.* 2006), zeigte bei den Proben aus dem Fundus nur ein sehr schwaches Signal, während die Proben aus dem Antrum kein Signal lieferten.

Bei Einsatz des Lektins PSA, welches die fucosylierte Kernstruktur der Glykangruppe erkennt, sind keine Unterschiede zwischen den Proben aus dem Fundus und dem Antrum zu erkennen. Das Lektin LCA, welches ebenfalls fucosyliertes GlcNAc erkennt, zeigt bei den Antrumproben intensivere Banden als bei den Fundusproben.

Eine eventuelle Sialylierung der Glykanstruktur von TFF2 konnte zumindest durch Verwendung des Lektins SNA, welches an Sialinsäure bindet, nicht bestätigt werden, da keine der Proben im Bereich des glykosylierten TFF2 eine Bande zeigte.

3.3. Agarose-Gelelektrophorese gereinigter TFF2-Komplexe

Es fiel immer wieder auf, dass die TFF2-Immunreaktivität bei nicht reduzierend durchgeführter 15%iger SDS-PAGE deutlich vermindert gegenüber einer unter reduzierenden Bedingungen durchgeführten PAGE war (Abb. 34).

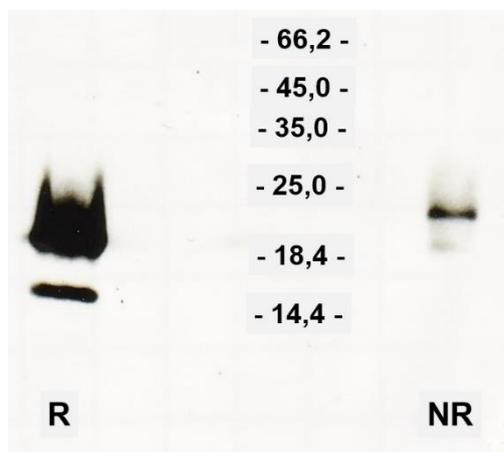


Abb. 34. Westernblot eines Konzentrats des gereinigten Extraktes 343Mc (Fraktionen 20 - 23 des Anionentauschers, Abb. 22B). 15%ige SDS-Page, R = reduzierende Bedingungen, NR = nicht reduzierende Bedingungen. In der Mitte die Position der Markerbanden in kDa.

Eine mögliche Erklärung für den Verlust der TFF2-Immunreaktivität könnte sein, dass bei den vertikal durchgeführten nicht-reduzierenden SDS-PAGEs eventuell hochmolekulare TFF2-Komplexe nicht in das Sammelgel einwandern, sondern oben in der Geltasche verbleiben und auch beim Blotten nicht auf die Membran transferiert werden. Aus diesem Grund wurde das in Abb. 34 gezeigte Konzentrat einer aufgereinigten Corpusprobe zusätzlich mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 35). Diese Methode eignet sich dazu, sehr große Proteine (größer als 500 kDa) unter nahezu nativen Bedingungen aufzutrennen. Dieses wird dadurch erreicht, dass die Matrix des Agarosegels

weniger dicht ist als im Polyacrylamid-Gel, keine reduzierenden Agenzien zugesetzt werden und SDS nur in einer Endkonzentration von 0,1% (w/v) zugegeben wird, um die Bildung von Schlieren bei der Elektrophorese von Glykoproteinen zu verhindern (Lottspeich *et al.* 1998; Thornton *et al.* 1994). Die Proben werden auch vor dem Auftragen nicht mit Probenpuffer aufgekocht, sondern nur bei Raumtemperatur mit diesem vermischt (Kap. 2.2.6).

Um auch die Auswirkung verschiedener denaturierender Methoden auf die TFF2-Proteinkomplexe zu untersuchen, wurden folgende Bedingungen gewählt (Abb. 35): in Spur 1 wurde die Probe wie eben beschrieben möglichst nativ belassen (Kap. 2.2.6), in Spur 2 wurde die Probe 5 Minuten mit dem nicht-reduzierenden Probenpuffer für SDS-Gele aufgekocht (1% SDS Endkonzentration) und in Spur 3 wurde die Probe für 5 Minuten mit reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekocht (Kap. 2.2.5).

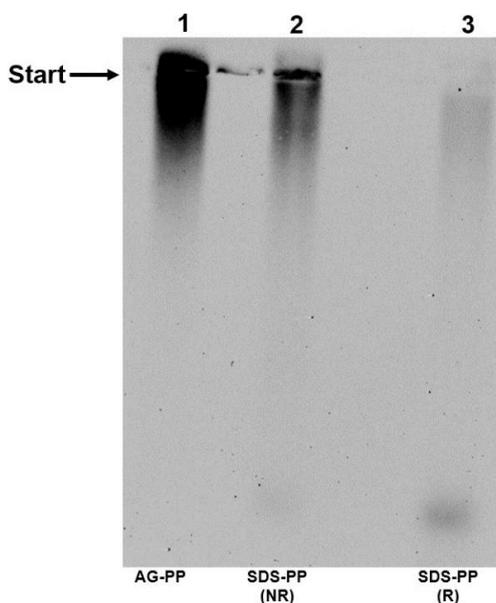
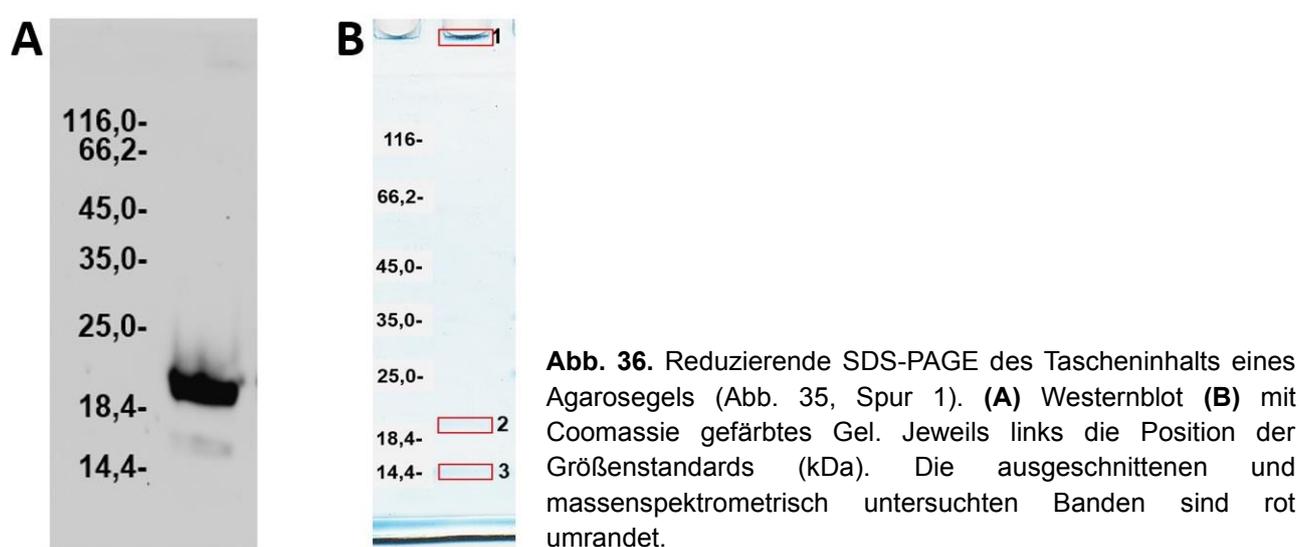


Abb. 35. Westernblot eines 1%igen Agarosegels; aufgetragen wurde ein Konzentrat der über G-200 und Resource Q aufgereinigten Probe 343Mc (Abb. 22B). **(1)** Agarose-Probenpuffer, nicht gekocht, nativ. **(2)** nicht-reduzierender SDS-Probenpuffer, 5 min gekocht **(3)** reduzierender SDS-Probenpuffer, 5 min gekocht

Wie in Abb. 35 zu erkennen, ist die TFF2-Immunreaktivität in Spur 1 am stärksten ausgeprägt und verteilt sich auf den Bereich der Tasche und knapp darunter; in Spur 1 ist auch eine TFF2-Immunreaktivität oberhalb der Tasche zu erkennen. Spur 2 zeigt die stärkste TFF2-Immunreaktivität im Bereich der Tasche und eine sehr schwach ausgeprägte diffuse Bande im niedermolekularen Bereich. Die Behandlung der Probe mit reduzierendem SDS-Probenpuffer in Spur 3 lässt die positive TFF2-Immunreaktivität im Bereich der Tasche verschwinden und verschiebt sie vor allem in den niedermolekularen Bereich; dabei ist die Bande etwas unterhalb derjenigen in der zweiten Spur positioniert. Ebenfalls zeigt sich in Spur 3 ein deutlicher Verlust der TFF2-Immunreaktivität.

Um sicherzugehen, dass es sich bei der TFF2-Immunreaktivität im Bereich der Tasche nicht um ein Artefakt handelt, wurde erneut eine Agarosegel-Elektrophorese derselben Probe

durchgeführt und nach Beendigung des Laufes Aliquots des Tascheninhalts entnommen, mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und eine 15%ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abb. 36). Beim anschließenden Westernblot konnte eine TFF2-Immunreaktivität etwas oberhalb des 18,4 kDa-Markers detektiert werden (Abb. 36A). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde nochmals ein 15%iges SDS-Gel des Agarosegel-Tascheninhalts unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, dieses im Anschluß mit Coomassieblau gefärbt, die drei in Abbildung 30B markierten Banden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse zu Herrn Professor Hanisch (Institut für Biochemie, Universität Köln) geschickt.



Die massenspektrometrische Analyse (Tab. 25) konnte die Existenz von TFF2 im Bereich der Bande 2 bestätigen. Bande 3 bei etwa 14,4 kDa lieferte keinen Treffer bezüglich TFF2. In Bande 1 konnten die Muzine MUC5AC, MUC6 und MUC1 identifiziert werden. Die vollständigen Ergebnisse sind im Anhang (Kap. 7.2) zu finden.

Tab. 25: Durch LC-ESI-MS/MS-Analyse identifizierte Proteine

Bande Nr.	Identifizierte Proteine (Auswahl)	MW [kDa]	Score	Sequenzabdeckung [%]	Identifizierte Peptide
1	MUC5AC	526,3	481,9	2,8	12
	MUC6	252,0	427,2	4,8	10
	MUC1	122,0	122,9	1,8	2
2	Trefoil factor 2	14,3	166,6	27,9	6
	Trypsin-3	32,5	65,9	3,3	1
	MUC19	597,8	52,9	0,3	2
3	Dermcidin	11,3	86,1	12,7	2
	Protein S100-A7	11,5	68,5	10,9	1
	Lysozyme C	16,5	58,7	12,8	2

3.4. Untersuchungen zur Wechselwirkung von TFF2 und Muzinen

Um zu quantifizieren, in welchem Ausmaß TFF2 durch Aufkochen in Anwesenheit von SDS aus seinen Muzin-Komplexen herausgelöst werden kann, wurden drei Rohextrakte der Probe 450M_F hergestellt und nach unterschiedlicher Vorbehandlung über eine Sephacryl S-300 Säule aufgetrennt (Abb. 37).

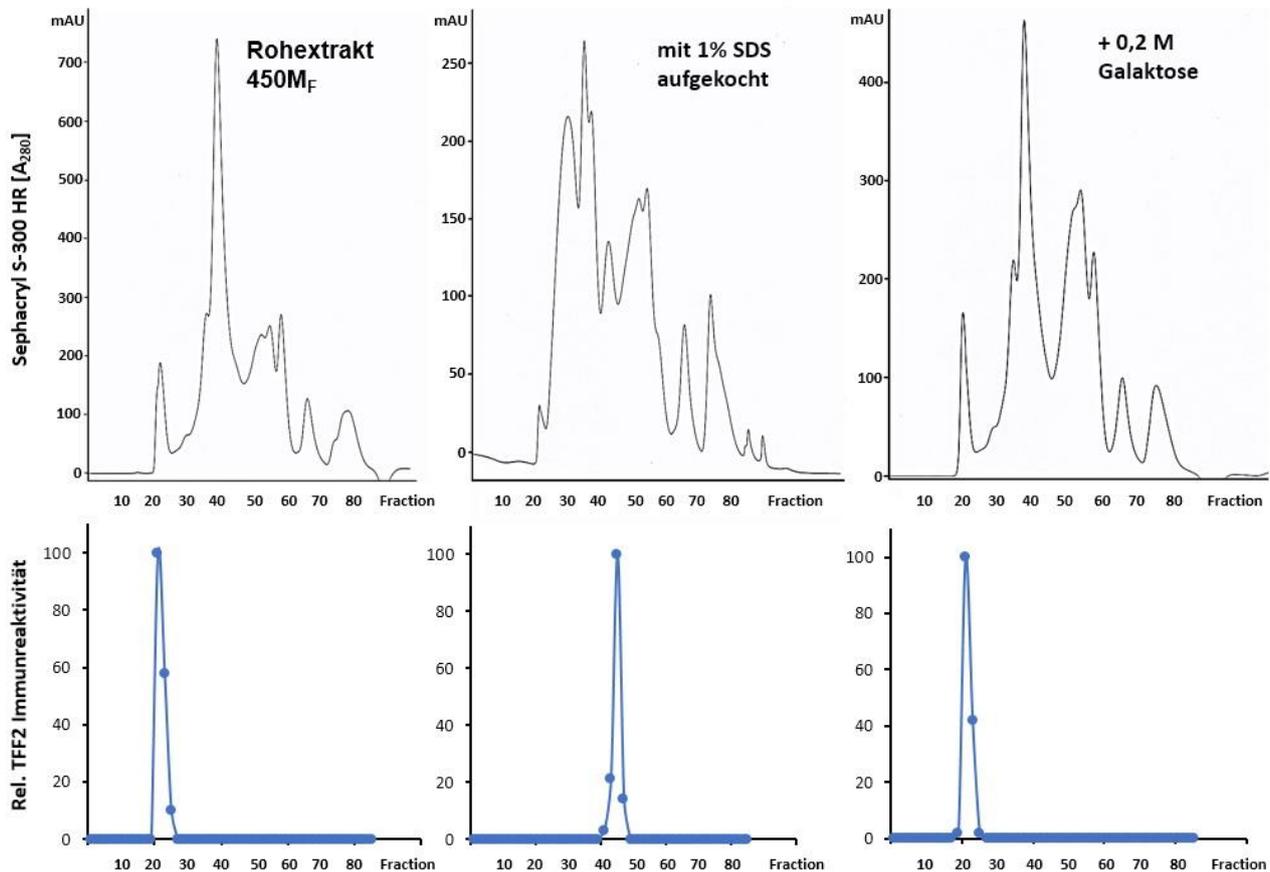


Abb. 37. SEC der Magenprobe 450M_F mittels der Sephacryl S-300 Säule unter verschiedenen Bedingungen. **(A)** SEC des Rohextraktes ohne jegliche weitere Vorbehandlung **(B)** Aufkochen des Extraktes direkt vor der SEC für 5 Min mit 1% SDS (Endkonzentration) **(C)** SEC des Rohextraktes in Gegenwart von 0,2 M Galaktose. Unter den jeweiligen Elutionsprofilen (Absorption bei 280 nm) ist die Verteilung der relativen TFF2-Immunreaktivität dargestellt, die durch semiquantitative Auswertung der entsprechenden reduzierenden Westernblots ermittelt wurde.

Die Auftrennung des ersten Extraktes zeigte die TFF2-Immunreaktivität wie üblich im hochmolekularen Peak des Absorptionsprofils; der Bereich der TFF2-Immunreaktivität erstreckte sich dabei von den Fraktionen 20 - 25, wobei das Maximum in Fraktion 20 zu finden war (Abb. 37A).

Die SEC des durch Kochen in 1% SDS denaturierten Rohextraktes zeigte, dass das gesamte TFF2 aus seinen hochmolekularen Komplexen herausgelöst wurde (Abb. 37B). Die TFF2-Immunreaktivität war nun im Bereich der Fraktionen 40 - 48 lokalisiert, mit dem

Maximum in Fraktion 45, während sich im hochmolekularen Bereich keine TFF2-Immunreaktivität mehr zeigte.

Der Zusatz von Galaktose in einer Endkonzentration von 0,2 M zum Laufmittel bewirkte keine detektierbare Verschiebung der TFF2-Immunreaktivität, die sich ähnlich wie im ersten Experiment über die Fraktionen 19 - 25 erstreckte, wobei das Maximum sich exakt an derselben Position, in Fraktion 20, befand (Abb. 37C).

4. Diskussion

4.1. Erstellung eines Reinigungsprotokolls für TFF2

4.1.1. Größenausschluss-Chromatographie

Bereits 2007 konnten Kouznetsova *et al.* zeigen, dass bei der SEC (Sephadex G-200) eines Proteinextraktes aus dem Antrum die TFF2-Immunreaktivität ausschließlich in einem Peak im hochmolekularen Bereich lokalisiert war. Neben der TFF2-Immunreaktivität war dort auch die Muzinfraktion nachzuweisen, die mit Hilfe der PAS-Färbung sichtbar gemacht werden konnte (Kouznetsova *et al.* 2007). Die Lokalisation der TFF2-Immunreaktivität im hochmolekularen Muzinbereich konnte in dieser Arbeit auch für andere Proben aus dem Corpus (343M_C), dem Antrum (333M_A, 337M_A), und dem Duodenum (369D_{Pr}) bestätigt werden. In keiner dieser Proben war bei Verwendung des Sephadex G-200 Säulenmaterials (Trennbereich zwischen 5 und 600 kDa) eine TFF2-Immunreaktivität im niedermolekularen Bereich nachzuweisen (Abb. 10, 12, 16, 18).

Im späteren Verlauf der Arbeit wurde von der „klassischen“ SEC (Sephadex G-200) auf das FPLC-System gewechselt, weil die dort verwendeten Säulen eine bessere Auftrennung im hochmolekularen Bereich gewährleisteten. Bei Verwendung der **Sephacryl S-300 High Resolution** (obere Trenngrenze 1.500 kDa) oder der **Superose 6 10/300 GL** (obere Trenngrenze 5.000 kDa), war die TFF2-Immunreaktivität ebenfalls im ersten Peak, der von der Säule eluierte, lokalisiert. Während also durch die oben zitierten Experimente von Kouznetsova *et al.* (2007) lediglich klar war, dass die TFF2 enthaltenden Proteinkomplexe größer als 600 kDa sind, konnte insbesondere durch die Verwendung der Superose-Säule gezeigt werden, dass sie sogar eine Größe von 5.000 kDa überschreiten (Abb. 24, 25).

Die Verwendung einer Säule mit einer noch größeren Auflösung im hochmolekularen Bereich, wie zum Beispiel der **Sephacryl S-500 High Resolution** (bis 20.000 kDa), erwies sich für die Reinigung von TFF2 als nicht zweckmäßig, da die TFF2-Immunreaktivität hier über mehr als 30 Fraktionen verteilt eluierte (Abb. 26).

Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse der SECs dafür, dass die TFF2-Komplexe heterogene Molekulargewichte besitzen, die aber alle größer als 5.000 kDa (obere Grenze des Superose-Säule) sind, weshalb sie nur von der Sephacryl S-500-Säule weiter aufgetrennt werden konnten.

Neuere Resultate, die durch Trennung von Gewebeextrakte aus dem humanen Magen mittels der **Superdex 75 HL**-Säule (Trennbereich 3 - 70 kDa) gewonnen wurden, konnten

auch eine TFF2-Immunreaktivität im niedermolekularen Bereich identifizieren, deren Anteil individuell verschieden ist und 5 bis 35% der gesamten TFF2-Immunreaktivität ausmacht (Heuer *et al.* 2019).

Vermutlich führte die Verwendung von Säulenmaterialien mit sehr großen Poren dazu, dass die kleineren Moleküle zu sehr verdünnt wurden und so beim Screening der Fraktionen nicht erkannt wurden. Überraschend ist im Nachhinein, dass auch bei der Verwendung des Sephadex G-200-Säulenmaterials keine TFF2-Immunreaktivität im niedermolekularen Bereich nachzuweisen war (Kouznetsova *et al.* 2007; sowie eigene Ergebnisse der Reinigungen von 343M_C, 333M_A, 337M_A, 369D_{Pr}).

4.1.2. Anionenaustauschchromatographie

Um die mittels der Sephadex G-200 nach der Größe aufgetrennten Proteine auch anhand ihrer Ladung zu trennen, wurden die Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität auf den Resource Q-Anionentauscher des FPLC-Systems aufgetragen und die gebundenen Proteine mittels eines ansteigenden NaCl-Gradienten von der Säule eluiert. Für den Verlauf des NaCl-Gradienten wurde zunächst das von Albert *et al.* bei der Aufreinigung des TFF3-FCGBP-Heterodimers verwendete Protokoll (siehe Kap. 2.2.4 bzw. Abb. 11A) übernommen (Albert *et al.* 2010). Bei den Proben 369D_{Pr} und 343M_C zeigte keine der von der Säule eluierten Fraktionen eine TFF2-Immunreaktivität (Abb. 11, Abb. 20).

Um zu überprüfen, ob der als Gradient angelegte 1M NaCl-Puffer überhaupt in der Lage war, die TFF2 enthaltenden Proteinkomplexe von der Matrix des Anionentauschers zu verdrängen, wurde ein weiteres Aliquot der mittels SEC vorgereinigten Gewebeprobe 343M_C auf den Anionentauscher geladen. Die Elution wurde aber dahingehend verändert, den NaCl-Gradienten nach einer zunächst nur schwach ansteigenden Anfangsphase abrupt in Form einer Stufe auf 100% zu steigern (Abb. 21). Dieser veränderte Gradientenverlauf führte dazu, dass die vorher nicht nachweisbare TFF2-Immunreaktivität direkt, und damit konzentriert, in den dieser Stufe folgenden Fraktionen eluiert wurde.

Nachdem durch dieses Experiment ein zu flacher Gradientenverlauf als die wahrscheinlichste Ursache für das scheinbare Verschwinden der TFF2-Immunreaktivität identifiziert wurde, wurde ein weiteres Aliquot der Gewebeprobe 343M_C auf den Anionentauscher geladen und der Gradient des 1M NaCl-Elutionspuffers im Vergleich zu den Anfangsexperimenten (Abb. 11) steiler gestaltet (Abb. 22). Dadurch eluierte die TFF2-Immunreaktivität zwar, verglichen mit dem stufenförmigen Gradienten, in mehreren

Fraktionen von der Säule, war aber im Vergleich zum anfänglich gewählten flacheren Gradientenverlauf eindeutig nachzuweisen.

Ein weiteres Ergebnis, welches bei der Verwendung des Anionentauschers gewonnen wurde, ist das Auftreten einer sogenannten „nicht gebundenen TFF2-Fraktion“. Diese wurde erstmals bei der Probe 323M_A beobachtet (Abb. 13). In diesem Fall, und im Unterschied zu den eingangs beschriebenen Proben 369D_{Pr} und 343M_C, binden die TFF2 enthaltenden Proteinkomplexe nicht an die Matrix des Anionentauschers und erscheinen deshalb sofort in den ersten Fraktionen, bei denen noch gar kein NaCl-Gradient angelegt war. Es muss sich also um Proteinkomplexe handeln, die positiv geladen oder zumindest neutral sind, so dass sie von den quartären Ammoniumionen der Säulenmatrix nicht gebunden werden können. Dies könnte auch das Phänomen erklären, dass bei Agarosegelen gereinigter Extrakte die entsprechenden Westernblots oftmals eine TFF2-Immunreaktivität oberhalb der Tasche zeigen (Abb. 35): die positiven TFF2-Komplexe würden im elektrischen Feld in die entgegengesetzte Richtung wandern. Eventuell könnte dieses Verhalten der TFF2-Muzinkomplexe auf die MUC6-Sequenz zurückzuführen sein, welche erst kürzlich aufgeklärt werden konnte (Svensson *et al.* 2018). Nach diesen neuesten Erkenntnissen weist MUC6 unter anderem Histidin-reiche Cluster auf und der theoretische isoelektrische Punkt befindet sich bei pH 8,85; außerdem gibt es individuelle Unterschiede in den zentralen Exons von MUC6 (Svensson *et al.* 2018).

Ob die Ausprägung dieser „nicht gebundenen TFF2-Fraktion“ vom Gewebetyp abhängig ist, konnte bisher nicht bestätigt werden. So wurden neben der Gewebeprobe 323M_A noch zwei weitere Proben aus dem Antrum, 333M_A und 337M_A, zuerst mittels G-200 einer SEC unterworfen und anschließend über den Anionentauscher getrennt, wobei der Verlauf des NaCl-Gradienten dem der zuerst untersuchten Probe 323M_A entsprach.

Die Probe 337M_A zeigte hierbei nur eine „gebundene TFF2-Fraktion“ (Abb. 19) und die Probe 333M_A (Abb. 17) beide Fraktionen. Es konnte aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Proben nicht abschließend geklärt werden, ob sich die TFF2-Proteinkomplexe aus dem Antrum und dem Fundus in ihrer Ladung unterscheiden.

Da die Beladungskapazität der Resource Q-Säule auch die Trennung von Rohextrakten erlaubt, wurde bei der Probe 358M_A das Reinigungsprotokoll umgekehrt und in diesem Fall der Rohextrakt direkt mittels des Anionentauschers getrennt (Abb. 23). Die Fraktionen mit positiver TFF2-Immunreaktivität wurden anschließend einer SEC unterworfen, wobei die **Superose 6 10/300 GL** Säule verwendet wurde (Abb. 24, Abb. 25).

Interessanterweise zeigte sich bei diesem Protokoll bei der Trennung durch den Anionentauscher sowohl eine „nicht gebundene“, als auch eine „gebundene“ TFF2-Fraktion (Abb. 23). Während beide Fraktionen bei der anschließenden SEC eine TFF2-Immunreaktivität im hochmolekularen Bereich aufwiesen (Fraktionen 6 - 8), war nur bei der nicht gebundenen TFF2-Fraktion erstmals auch eine TFF2-Immunreaktivität im niedermolekularen Bereich (Fraktionen 15 - 19) festzustellen (Abb. 24, Abb. 25). Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse darauf hin deuten, dass es sich bei den „nicht gebundenen“ TFF2-Komplexen teilweise um nicht kovalent gebundenes TFF2 handeln könnte. Die Reinigungsergebnisse der Probe 358MA sind zur besseren Übersichtlichkeit in Abb. 38 noch einmal schematisch dargestellt.

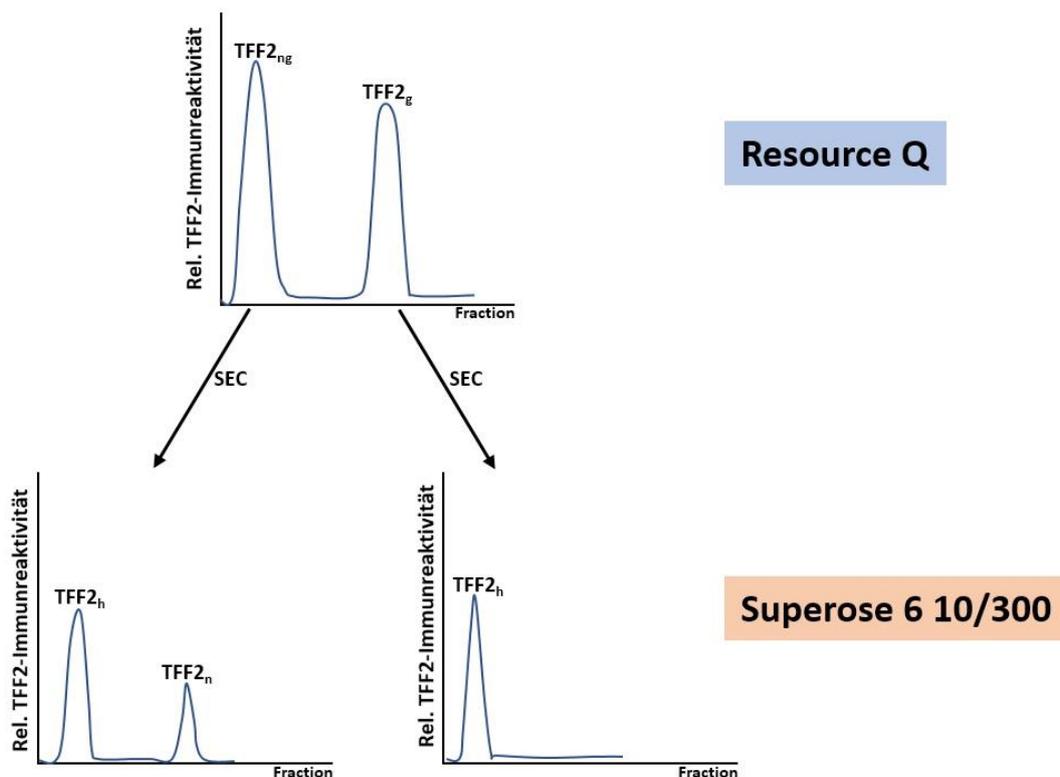


Abb.38. Schematische Darstellung der Reinigungsergebnisse der Probe 358MA. **TFF2_{ng}**: nicht an den Anionentauscher gebundenes TFF2; **TFF2_g**: an den Anionentauscher gebundenes TFF2. **TFF2_h**: TFF2 im hochmolekularen Bereich, **TFF2_n**: TFF2 im niedermolekularen Bereich.

Insgesamt weist die Existenz einer „nicht gebundenen“ und einer „gebundenen“ TFF2 enthaltenden Fraktion im Anionentauscher darauf hin, dass TFF2 an verschiedene Partner aus der Muzinfraktion gebunden sein dürfte, die sich in ihrer Ladung unterscheiden. Es bleibt zu klären, ob es sich um verschiedene Proteine handelt, oder ob Unterschiede in der Glykosylierung des Partnerproteins die unterschiedlichen Ladungen der TFF2-Komplexe hervorrufen.

4.1.3. Verminderung der TFF2-Immunreaktivität unter nicht-reduzierenden Bedingungen

Eine immer wiederkehrende Auffälligkeit beim Nachweis der TFF2-Immunreaktivität bestand darin, dass diese stark vermindert war, wenn die entsprechenden SDS-PAGE-Gele unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurden (Abb. 14). Da der Antikörper anti-hTFF2-1 gegen die Sequenz FFPNSVEDCHY am C-Terminus des humanen TFF2 gerichtet ist (Jagla *et al.* 2000), das TFF2-Peptid jedoch durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys-6 und Cys-104 zyklisiert ist (Abb. 1), könnte dieser Bereich unter nicht-reduzierenden Bedingungen maskiert und somit für den Antikörper nicht zugänglich sein.

Um die Sensitivität des TFF2-Nachweises bei nicht-reduzierenden Gelen zu erhöhen, wurde später als neue Methode die sogenannte „post-in-gel“ (PIG)-Reduktion entwickelt (Stürmer *et al.* 2014). Bei diesem Verfahren wird das unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführte Gel vor dem Blotting für 5 Min bei 50°C in einer 1%igen β -Mercaptoethanol-Lösung nachträglich reduziert, wodurch auch die Disulfidbrücke zwischen Cys-6 und Cys-104 gelöst und somit auch die Zyklisierung des Peptids aufgehoben wird (Stürmer *et al.* 2014). Dieses Verfahren bewirkte eine drastische Zunahme der auf Westernblots beobachteten TFF2-Immunreaktivität bei nicht-reduzierend durchgeführten Gelen.

4.2. Glykosylierung des TFF2 mit LacdiNAc

4.2.1. Vorkommen und Bildung der LacdiNAc-Struktur

Die massenspektrometrische Analyse der N-gebundenen Glykanstruktur von TFF2 erfolgte durch Herrn Prof. Hanisch (Universität Köln) und wurde an je einer aufgereinigten Probe aus dem Antrum (323MA) und dem Corpus (382MC) durchgeführt (Kap. 3.2; Abb. 28). Die Ergebnisse der Massenspektrometrie belegten in beiden Fällen die ungewöhnliche LacdiNAc-Struktur, die zusätzlich fucosyliert ist (Hanisch *et al.* 2013).

Die über einen Asparagin-Rest N-glykosidisch verknüpfte LacdiNAc-Gruppe wurde in einer Vielzahl von Glykoproteinen in Säugetieren identifiziert, zum Beispiel bei den im Hypophysenvorderlappen produzierten luteinisierenden Hormon (Green *et al.* 1985), Thyreotropin (Green und Baenziger 1988) und Pro-opiomelanocortin (Skelton *et al.* 1992). Andere Proteine mit der LacdiNAc-Gruppe sind das in der Placenta produzierte Glycodelin, welches immunsuppressiv und empfängnisverhütend wirkt (Dell *et al.* 1995), sowie die Carboanhydrase VI (Hooper *et al.* 1995). Abgesehen davon kann LacdiNAc auch O-glykosidisch verknüpft vorliegen, zum Beispiel bei MUC5AC (Kenny *et al.* 2012), dem

menschlichen *zona pellucida glycoprotein 3* (ZP3) und einigen Proteinen der extrazellulären Matrix wie *nidogen-1*, *α -dystroglycan* und *neurofascin* (Breloy *et al.* 2012).

Die Bildung der über Asparagin N-glykosidisch verknüpften LacdiNAc-Struktur benötigt die Aktivität der β -GalNAc-Transferase. Die Synthese der LacdiNAc-Struktur sowie Modifikationen derselben (Fucosylierung, Sulfatierung und Sialylierung) ist schematisch in Abb. 39 dargestellt.

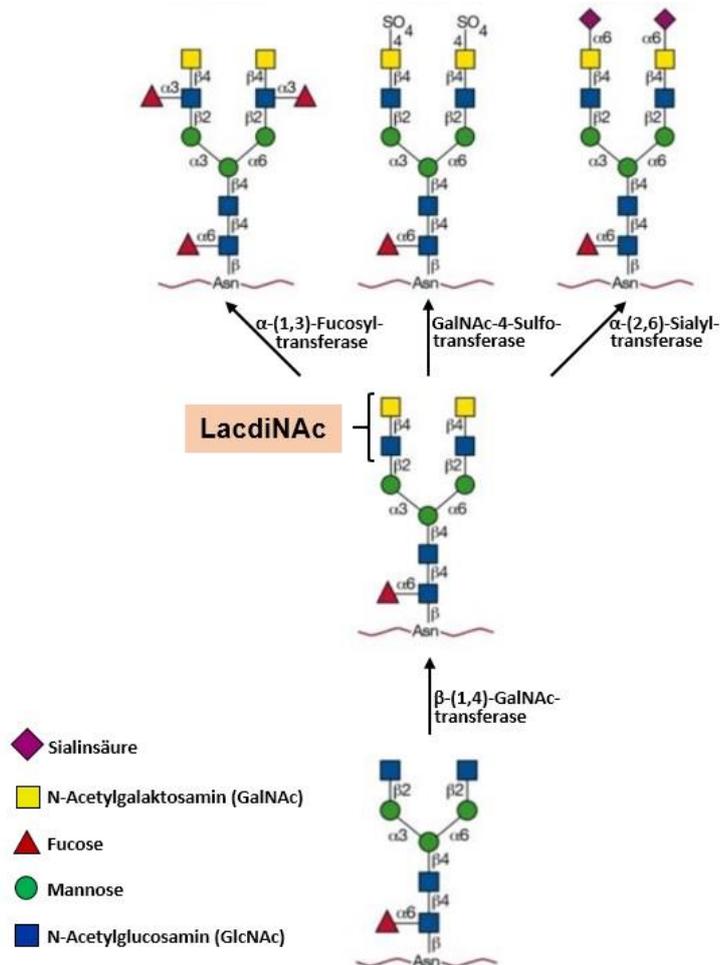


Abb. 39. Synthese der LacdiNAc-Struktur. Die beiden endständigen N-Acetylglucosaminreste des an Asparagin gebundenen Oligosaccharids werden durch die β -(1,4)-GalNAc-transferase (β 4GNT) mit jeweils einem N-Acetylgalaktosamin verknüpft. Die LacdiNAc-Struktur kann durch Anhängen von Fucose, Sulfat oder Sialinsäure weiter modifiziert werden (nach Varki, 2008; verändert). Eine Phosphorylierung (hier nicht gezeigt) wurde erstmals 2012 von Breloy *et al.* beschrieben.

Bisher sind zwei Isoenzyme der β -GalNAc-Transferase charakterisiert: die β 4GalNAc-T3 (β GT3) und β 4GalNAc-T4 (β GT4). Beide Enzyme gehören zur β 4-Galaktosyltransferase Familie und weisen eine große Ähnlichkeit mit der Chondroitinsulfat-Synthase auf (Sato *et al.* 2003). Diese Enzyme transferieren N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) von UDP-GalNAc auf terminales N-Acetylglucosamin (GlcNAc) am nicht-reduzierenden Ende von N- und O-Glykanen in einer β -1,4-Verknüpfung. Obwohl beide β 4GNTs *in vitro* dieselbe

Substratspezifität zeigen, ist ihre Verteilung gewebespezifisch: das β GT3-Gen wird im menschlichen Magen, Dickdarm und den Hoden exprimiert, während das β GT4-Gen in den Ovarien und dem Gehirn exprimiert wird (Gotoh *et al.* 2004).

Immunhistochemische Analysen zeigen, dass die Expression von β GT3 und der LacdiNAc-Gruppe in der menschlichen Magenmukosa vor allem in den Oberflächenepithelzellen der Pylorus- und Fundusdrüsen nachzuweisen ist (Ikehara *et al.* 2006). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass sowohl β GT3 als auch β GT4 N-Acetylgalaktosamin übertragen und das Signal für die Aktivität des Enzyms durch eine spezifische Sequenz des Zielpeptids ausgelöst wird (Fiete *et al.* 2012). Im Falle der β -N-Acetylgalaktosaminierung durch β GT3 oder β GT4 konnte bei der bovinen Carboanhydrase-VI eine Determinante aus 19 Aminosäureresten mit der Sequenz LRRFIEQKITKRKKEYWP (Miller *et al.* 2008) identifiziert werden. Diese Determinante, die für die LacdiNAc-Modifikation der N-gebundenen Glykanstruktur verantwortlich ist, befindet sich am C-Terminus der Carboanhydrase-VI, weist eine α -helikale Struktur auf und besitzt einen hohen Anteil basischer Aminosäuren (Hanisch und Breloy 2009).

Die N-Glykosylierungsstelle von TFF2 befindet sich im ersten Loop (Abb. 1) und wird von Prolinresten flankiert (basierend auf der dreidimensionalen Struktur von TFF2 aus dem Schwein; Carr *et al.* 1994, De *et al.* 1994). Somit dürfte diese N-Glykosylierungsstelle besonders exponiert sein und deshalb von β GT3 oder β GT4 erkannt werden (Hanisch *et al.* 2013). In ihrer Primärstruktur weist die Determinante von TFF2 allerdings keine Ähnlichkeit zu der oben beschriebenen Erkennungssequenz aus der Carboanhydrase VI auf; es wird daher auch für TFF2 postuliert, dass für die Aktivität der Enzyme eine sterisch exponierte Sekundärstruktur ausreicht (Bonar und Hanisch 2014).

Bezüglich der N-Glykosylierung von TFF2 ist auffällig, dass sie sich bei verschiedenen Spezies unterscheidet: bei der Maus und dem Schwein fehlt die N-Glykosylierungsstelle; *X. laevis* hingegen besitzt zwei Orthologe von TFF2: die beiden Peptide xP4.1 und xP4.2. Sie verfügen jeweils über vier TFF-Domänen (Jagla *et al.* 1998) und werden von zwei verschiedenen Genen codiert, wobei nur xP4.1 eine N-Glykosylierungsstelle aufweist (Hauser und Hoffmann 1991; Botzler *et al.* 1999). Nach bisherigem Kenntnisstand zeigt die Glykanstruktur von xP4.1 kein LacdiNAc-Motiv (Stürmer *et al.* 2019).

4.2.2. Ergebnisse der Lektinanalyse

Da die N-Glykanstruktur von TFF2 massenspektrometrisch an nur je einer Probe aus dem Antrum und dem Corpus ermittelt wurde (Kap. 3.2; Abb. 28), wurden für die Lektinanalyse

je drei Proben aus dem Fundus und dem Antrum untersucht. Auf diese Weise konnte einerseits überprüft werden, ob die Ergebnisse der Massenspektrometrie im Antrum sich auch mit Lektinen bestätigen lassen und ob eventuelle Unterschiede in der Glykosylierung des TFF2 aus dem Antrum und Fundus bestehen.

Die stärkste Reaktivität ist mit RCA-II zu verzeichnen, welches an das terminale β -GalNAc der LacdiNAc-Gruppe bindet (Abb. 29, Abb. 33). Auch das Lektin WFA erkennt die LacdiNAc-Struktur, jedoch nicht, wenn sie durch Sulfatierung, Fucosylierung oder Sialylierung modifiziert ist (Sakiyama *et al.* 1998; Ikehara *et al.* 2006). Insofern konnte das Ergebnis der Massenspektrometrie bei allen drei untersuchten Antrumproben bestätigt werden: da die LacdiNAc-Gruppe fucosyliert ist, wird sie von WFA nicht erkannt und es sind keine Banden sichtbar (Abb. 33). Die drei Proben aus dem Fundus zeigen hingegen schwache Signale (Abb. 33), was als ein Hinweis gedeutet werden könnte, dass die LacdiNAc-Gruppe dort teilweise in nicht-fucosylierter Form vorliegt.

Die beiden Lektine LCA und PSA bestätigen die Fucosylierung der Kernstruktur (Abb. 29; Tateno *et al.* 2009), wobei LCA etwas stärkere Signale bei den Proben aus dem Antrum zeigt (Abb. 33). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass LCA auch an fucosyliertes GlcNAc der LacdiNAc-Struktur bindet. Auf diese Weise würden sich die Ergebnisse der Lektine WFA und LCA ergänzen und darauf hindeuten, dass die LacdiNAc-Gruppe von TFF2 aus dem Bereich des Fundus teilweise nicht fucosyliert vorliegt.

Das Lektin SNA, welches für Sialinsäure spezifisch ist, liefert bei keiner der Proben Signale und bestätigt somit bei den Proben aus dem Antrum die massenspektrometrische Analyse, bei der ebenfalls keine Sialinsäure in der Glykanstruktur von TFF2 gefunden wurde.

Zusammengenommen bestätigen die Lektine WFA, LCS und SNA einerseits für die drei untersuchten Antrum-Proben die Ergebnisse der Massenspektrometrie, also eine fucosylierte LacdiNAc-Struktur, während sie andererseits Hinweise darauf liefern, dass die LacdiNAc-Gruppe im Fundus teilweise auch nicht fucosyliert vorliegen könnte.

Dieser Unterschied könnte sich dadurch erklären lassen, dass TFF2 im Fundus von den Nebenzellen produziert wird, während die Synthese im Antrum in den Antrumdrüsenzellen erfolgt. Obwohl beide Zelltypen große Ähnlichkeiten aufweisen und TFF2 und MUC6 sezernieren, unterscheiden sie sich teilweise signifikant, zum Beispiel im Bezug auf die Synthese von Pepsinogen A, das bei Antrumdrüsenzellen fehlt (Kouznetsova *et al.* 2011). Es ist also möglich, dass die Nebenzellen nicht die entsprechenden Fucosyl-Transferasen aufweisen, die für die weitere Modifikation der LacdiNAc-Struktur benötigt werden, während diese in den Antrumdrüsenzellen vorhanden sind.

4.2.3. Physiologische Funktionen der LacdiNAc-Struktur

Die N-Glykosylierung von TFF2 könnte die Halbwertszeit und/oder die Aktivität des Peptids beeinflussen. So zeigte subkutan verabreichtes glykosyliertes TFF2 bei der Ratte eine etwas stärkere Wirkung als das nicht-glykosylierte TFF2, wenn es darum ging, Indomethacin-induzierte Schädigungen des Magens zu reduzieren (Playford *et al.* 1995); allerdings handelte es sich in diesem Fall um rekombinant in Hefe hergestelltes TFF2, welches vermutlich keine LacdiNAc-Glykosylierung aufweist (Thim *et al.* 1993).

Das Verhältnis von glykosyliertem zu nicht-glykosyliertem TFF2 unterliegt außerdem zirkadianen Schwankungen: tagsüber ist nicht-glykosyliertes TFF2 fast nicht nachweisbar und erst mit der Steigerung der gesamten TFF2-Produktion während der Nacht nimmt auch der Anteil an nicht-glykosyliertem TFF2 zu (Semple *et al.* 2001). Es wird allerdings angenommen, dass diese Zunahme von nicht-glykosyliertem TFF2 primär auf eine Überladung des Glykosylierungsapparates im endoplasmatischen Retikulum zurückzuführen ist: da in der Nacht insgesamt mehr TFF2 synthetisiert wird, könnten die Kapazitäten für dessen Glykosylierung erschöpft sein (Semple *et al.* 2001).

Die fucosylierte LacdiNAc-Struktur hat auf die Wechselwirkungen von TFF2 mit MUC6 offenbar keinen Einfluss: weder das TFF2-Ortholog aus dem Schwein, noch aus der Maus, weisen eine N-Glykosylierungsstelle auf. Während die Wechselwirkungen zwischen TFF2 aus dem Schwein und MUC6 bedeutend stärker sind als im Menschen und sich sogar gegenüber dem Aufkochen in SDS resistent zeigen (Stürmer *et al.* 2014; 2018; Heuer *et al.* 2019), verhält sich das murine TFF2 wie das menschliche (Hoffmann 2020).

Das Adhesin LabA von *H. pylori* bindet ebenfalls an das LacdiNAc-Motiv (Rossez *et al.* 2014); da auch MUC5AC teilweise diese Glykanstruktur besitzt (Kenny *et al.* 2012), dürfte dies einer von mehreren Gründen dafür sein, dass *H. pylori* hauptsächlich diese Muzinschicht besiedelt (Rossez *et al.* 2014). Eventuell könnte die Fucosylierung der LacdiNAc-Struktur dazu beitragen, die Bindung des LabA Adhesins von *H. pylori* an TFF2 zu verhindern oder zu erschweren.

Das LacdiNAc-Motiv spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der zirkulatorischen Halbwertszeit von Hormonen (Manzella *et al.* 1996), bei der Zellerkennung (Lowe und Marth 2003) und in der Selbst-Erneuerung von embryonalen Stammzellen der Maus (Sasaki *et al.* 2011). Die sulfatierte LacdiNAc Struktur wird spezifisch durch den hepatischen reticuloendothelialen Rezeptor (Fiete *et al.* 1991) und den eng verwandten Macrophagen-Mannoserezeptor der Lunge erkannt (Fiete *et al.* 1997). Im letzteren ist eine cysteinreiche Domäne für die spezifische Bindung verantwortlich (Fiete *et al.* 1998). Weiterhin wurde

gezeigt, dass fucosylierte LacdiNAc-Antennen durch Selectin verursachte Adhäsionen in einer Ca^{2+} -abhängigen Art und Weise blockieren können (Grinnell *et al.* 1994). Dies wird auch als Grund für die empfängnisverhütende Wirkung von Glycodelin diskutiert (Dell *et al.* 1995).

4.2.4. Expression von LacdiNAc im Rahmen von Krebserkrankungen

Im menschlichen Colonkarzinom ist βGT3 im Vergleich zu den normalen Kontrollen hochreguliert (Huang *et al.* 2007). In der humanen Colonkarzinomzelllinie HCT116 führte eine Überexpression des Enzyms zu einer Erhöhung der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, zu einer gesteigerten Migration und Koloniebildung (Huang *et al.* 2007). Die vorgenannten Effekte werden wahrscheinlich durch Integrine hervorgerufen; bei ihnen handelt es sich um Oberflächenrezeptoren, deren Signale durch *focal adhesion kinase* (FAK) und Paxillin für das maligne Verhalten von Krebszellen verantwortlich sein sollen (Guo und Giancotti 2004). Außerdem erhöhte die Überexpression von βGT3 das Tumorwachstum und die Metastasenbildung von HCT116 in Nacktmäusen (Huang *et al.* 2007).

Im Falle des Prostatakarzinoms wurde die Expression von βGT4 , jedoch nicht von βGT3 beschrieben. Dies wurde auch in der Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP beobachtet (Fukushima *et al.* 2010). Diese Resultate sind konsistent mit der gesteigerten Expression der LacdiNAc-Gruppe auf den N-Glykanen des prostataspezifischen Antigens (PSA) (Fukushima *et al.* 2010).

Interessanterweise verhält es sich bei Neuroblastomen genau umgekehrt. So ist die Aktivität der βGT3 in den differenzierten Neuroblastomen höher als in den undifferenzierten und kann die bösartigen Eigenschaften wie Zellproliferation, Migration und Invasion unterdrücken (Hsu *et al.* 2011). Patienten, deren Neuroblastome eine gesteigerte βGT3 -Aktivität zeigten, hatten außerdem eine höhere Überlebensrate (Hsu *et al.* 2011).

4.3. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen TFF2 und der hochmolekularen Muzinfraktion

4.3.1. Eigene Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit durchgeführten SECs konnten das Resultat von Kouznetsova *et al.* (2007) bestätigen, wonach die TFF2-Immunreaktivität immer im ersten, hochmolekularen Muzinpeak von der Säule eluiert. Da TFF2 aufgrund seiner geringen Größe von 14,3 kDa bei der SEC nicht im hochmolekularen Bereich auftreten sollte, war dieses Ergebnis ein starker Hinweis, dass TFF2 im nativen Zustand mit einem Muzin, konkret mit MUC5AC oder

MUC6, assoziiert sein könnte. Es gelang in der Folge erstmalig bei der Probe 323M_A, nach Reinigung über SEC mittels Sephadex G-200 (Abb. 12) und anschließender Ionenaustauschchromatographie (Abb. 13), sowohl TFF2, als auch die Muzine MUC5AC und MUC6 massenspektrometrisch nachzuweisen (Abb. 15; Tab. 23). Die Frage nach dem Bindungspartner von TFF2 konnte in meiner Arbeit aber nicht abschließend geklärt werden; erst Heuer *et al.* konnten 2019 durch den Einsatz einer Sephacryl S-500 Säule die beiden Muzine MUC5AC und MUC6 hinreichend auftrennen und durch Bindungsstudien mit ¹²⁵I-markiertem TFF2 nachweisen, dass sowohl TFF2 aus dem Menschen wie auch aus dem Schwein an menschliches MUC6 bindet (Heuer *et al.* 2019). Dadurch ist der Bindungspartner von TFF2 in der Muzinfraktion eindeutig identifiziert.

Um die Art der Wechselwirkung bzw. Bindung von TFF2 zu seinem Partner zu bestimmen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese eines gereinigten Corpusextraktes durchgeführt, bei der die Probe auf drei unterschiedliche Arten behandelt wurde (Abb. 35): a) nativ, b) in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekocht und c) in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgekocht. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass das Aufkochen der Probe in SDS in der Lage ist, die Wechselwirkungen zu lösen und die TFF2-Immunreaktivität aus der Geltasche zu verschieben, so daß es sich nicht um kovalente Bindungen handeln konnte. Durch Zusatz von Mercaptoethanol wurde dieser Effekt noch verstärkt.

Um die Wechselwirkung zwischen TFF2 und der Muzinfraktion zu quantifizieren, wurde ein Proteinextrakt der Gewebeprobe 450M_F einmal unter Standardbedingungen (siehe Kap. 2.2.1) einer SEC mittels S-300 unterworfen wurde, während er im anderen Fall direkt vor dem Auftrag für 5 Min mit einer 1%igen SDS-Endkonzentration aufgekocht wurde (Abb. 37). Die letztgenannte Behandlung bewirkte eine vollständige Verschiebung der TFF2-Immunreaktivität vom hochmolekularen (Maximum in Fraktion 20) in den niedermolekularen Bereich (Maximum in Fraktion 45). Dieses Ergebnis zeigte erstmalig, dass das gesamte TFF2 vollständig über nicht-kovalente Wechselwirkungen an das entsprechende Partnerprotein der Muzinfraktion gebunden ist. Diese Wechselwirkungen konnten durch den Zusatz von Galaktose in einer 0,2 molaren Konzentration nicht inhibiert werden (Abb. 37C); dies bedeutet, dass Galaktose nicht in der Lage ist, TFF2 kompetitiv zu verdrängen.

4.3.2. Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung und Ausblick

Nachdem meine Vorarbeiten zu der Hypothese führten, dass TFF2 vollständig nicht-kovalent an MUC5AC oder MUC6 gebunden ist, konnte kurze darauf geklärt werden, dass es sich bei TFF2 um ein Lektin handelt, welches über die terminale, O-glykosidische

Zuckerstruktur GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow R an seinen Partner in der Mukusfraktion gebunden ist (Hanisch *et al.* 2014, Hoffmann 2015).

Im Anschluss gelang es, MUC6 als Partnerprotein von TFF2 zu identifizieren (Heuer *et al.* 2019) und zu charakterisieren, dass die Bindung zwischen TFF2 und MUC6 pH- und Calcium-abhängig ist, da die Bindung ohne Ca²⁺ vermindert ist und in Gegenwart von EDTA fast gar nicht erfolgt (Stürmer *et al.* 2018; Heuer *et al.* 2019). Auch Methyl- β -D-galaktopyranosid in einer Konzentration von 1mM, nicht jedoch das α -Anomer, wirkt als kompetitiver Inhibitor der Bindung zwischen TFF2 und MUC6 (Heuer *et al.* 2019). Im Nachhinein betrachtet ging die Idee, TFF2 mithilfe eines Zuckerüberschusses aus der Bindung mit seinem Partner zu verdrängen, also in die richtige Richtung; allerdings handelte es sich bei der verwendeten Galaktose nicht um den dafür geeigneten Zucker.

Die Lektin-Verbindung zwischen TFF2 und MUC6 ergibt auch physiologisch Sinn, da TFF2 und MUC6 von denselben Zellen synthetisiert werden: im Bereich des Fundus handelt es sich dabei um die Nebenzellen, im Antrum um die Antrumdrüsenzellen (Tomasetto *et al.* 1990, Hanby *et al.* 1993, Ota *et al.* 2006).

Die O-glykosidisch an MUC6 gebundene α 1,4GlcNAc-Zuckerstruktur wird sowohl vom monoklonalen Antikörper HIK1083 (Ishihara *et al.* 1996) als auch vom Lektin GSA-II von *Griffonia simplicifolia* (Oinuma *et al.* 1994) erkannt. Es handelt sich bei ihr um ein in der Evolution konserviertes Prinzip, das vom Frosch bis zum Menschen erhalten blieb (Hoffmann, 2020); so bindet porcines TFF2 an das MUC6-Ortholog von *X. laevis* (Stürmer *et al.* 2018).

Auch das Muzin MUC6 wurde bereits früh im Stammbaum der Vertebraten exprimiert und ging erst später bei den echten Knochenfischen verloren (Lang *et al.* 2016). Es gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei der α 1,4GlcNAc-Gruppe um einen Tumorsuppressor des Magens handeln könnte: KO-Mäuse, die das für die Synthese dieser Zuckerstruktur notwendige Enzym (α 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase (α 4GnT)) nicht exprimieren, entwickeln Adenokarzinome des Antrums (Karasawa *et al.* 2012).

Die konservierte O-Glykosylierung von MUC6 hemmt außerdem die Besiedelung des Magenmukus mit *H. pylori*, da sie die Cholesterol- α -glucosyltransferase des Bakteriums inhibiert (Kawakubo *et al.* 2004, Lee *et al.* 2008). Dieses ist wahrscheinlich ein entscheidender Grund, weshalb *H. pylori* im menschlichen Magen mit MUC5AC kolokalisiert ist (van den Brink *et al.* 2000).

Insgesamt gesehen kommt TFF2 somit die Rolle eines vernetzenden und stabilisierenden Lektins insbesondere der inneren, fest aufliegenden Mukusschicht des Magens zu, wobei

es an die konservierte Zuckerstruktur von MUC6 bindet (Hoffmann 2020). Erstmals wurde dieser stabilisierende Effekt *in vitro* demonstriert, als Thim *et al.* 2002 zeigen konnten, dass die Viskosität einer kommerziellen Muzinlösung aus dem Schweinemagen sich durch Zugabe von TFF2 um das zehnfache erhöhte. Einen weiteren Hinweis für die stabilisierenden Eigenschaften von TFF2 bzw. seines entsprechenden Orthologs xP4 findet man bei *X. laevis*: dort verhindert die Wechselwirkung zwischen xP4 und dem Muzin eine Schrumpfung der Sekretgranula in den Becherzellen des Ösophagus, wie sie während der Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie auftritt (Schwarz und Hoffmann 2020). In der Zukunft könnte man mit den nun etablierten Reinigungs- und Nachweisprotokollen relativ schnell überprüfen, ob es sich bei der N-Glykosylierung von TFF2 im Duodenum ebenfalls um eine (fucosylierte) LacdiNAc-Struktur handelt. Des Weiteren ist noch nicht geklärt, wie die „nicht gebundene“ und die „gebundene“ TFF2-Fraktion bei der Auftrennung von Rohextrakten durch den Anionentauscher genau zustande kommt. Aus medizinischer Sicht wäre es sicherlich auch interessant, die Glykosylierung von TFF2 bei Patienten mit SPEM zu bestimmen. Da die Ursache der SPEM eine dysregulierte Trans-Differenzierung der TFF2-produzierenden Nebenzellen ist (Hoffmann 2015; Goldenring *et al.* 2010), könnte sich die Glykosylierung des von ihnen produzierten TFF2 vom physiologischen Zustand unterscheiden, was als ein weiterer diagnostischer Marker für die Ausprägung einer SPEM dienen könnte.

Ebenfalls könnte es in der Zukunft sehr interessant sein, die Wechselwirkungen von endokrin sezerniertem TFF2 zum Beispiel im lymphatischen System (Baus-Loncar *et al.* 2005) genauer zu untersuchen und dort die entsprechenden Partner beziehungsweise Wechselwirkungen zu charakterisieren.

5. Zusammenfassung

TFF2 ist ein Polypeptid der *Trefoil Factor Family* mit einer Länge von 106 Aminosäuren und wird beim Menschen in größeren Mengen im Magen, sowie im proximalen Duodenum sezerniert. TFF2 ist an Asn-15 glykosyliert, wobei die Glykanstruktur zu Beginn der Arbeit (2010) noch nicht erforscht war, und ist im nativen Zustand mit der Muzinschicht assoziiert.

In dieser Arbeit wurden Gewebe-Extrakte aus dem Magen zunächst mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) aufgetrennt und dabei die Eignung verschiedener Säulenmaterialien für die Reinigung von TFF2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Superose 6-10/300 GL und die Sephacryl-S-300-Säulen die TFF2-Muzinkomplexe so effektiv anreichern konnten, dass sie in der Folge massenspektrometrischen Analysen zugänglich waren. Wurde die Reinigung zusätzlich mit einem Anionentauscher (ResourceQ) durchgeführt, zeigten sich teilweise zwei verschiedene TFF2-Entitäten: eine „nicht-gebundene“ Form, die sofort von der Säule gewaschen wurde, und eine „gebundene“, die erst durch den angelegten NaCl-Gradienten eluiert wurde. Bis jetzt ist nicht bekannt, welche Faktoren die Ausbildung dieser beiden unterschiedlich geladenen TFF2-Fractionen beeinflussen.

Die massenspektrometrische Glykananalyse von gereinigtem TFF2 aus dem Corpus und Antrum, welche von Herrn Prof. Dr. Hanisch an der Universität Köln durchgeführt wurde, konnte eine seltene, fucosylierte LacdiNAc-Struktur identifizieren. Zusätzlich durchgeführte Lektinanalysen haben Hinweise erbracht, dass die LacdiNAc-Struktur bei TFF2 aus dem Fundus des Magens teilweise nicht fucosyliert vorliegen könnte.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der gereinigten TFF2-Muzin-Komplexe konnten sowohl MUC5AC als auch MUC6 nachgewiesen werden. Bezüglich der Wechselwirkungen zwischen TFF2 und dem Mukus wurde gezeigt, daß das Aufkochen eines Gewebeextraktes mit SDS (1% Endkonzentration) unter nicht-reduzierenden Bedingungen die TFF2-Immunreaktivität bei einer anschließenden SEC vollständig in Richtung niedrigerer Molekülmassen verschieben konnte. Dies ist ein starker Anhaltspunkt dafür, dass die Wechselwirkungen, die TFF2 mit seinem Partner in der Muzinfraktion verknüpfen, vollständig nicht-kovalenter Natur sind. Der Zusatz von Galaktose (0,2 M Endkonzentration) konnte diese Wechselwirkungen nicht inhibieren.

In der Folge ist erforscht worden, dass es sich bei TFF2 um ein Lektin handelt, welches an die O-glykosidische Zuckerstruktur $\text{GlcNAc}\alpha 1\rightarrow 4\text{Gal}\beta 1\rightarrow \text{R}$ seines Partnerproteins MUC6 bindet.

5.1 Abstract

TFF2 is a polypeptide belonging to the Trefoil factor family (TFF) with a length of 106 amino acids and is secreted in the human stomach and proximal duodenum. It was known that TFF2 is associated with the mucus layer and is glycosylated at Asn-15, but no information about its glycosylation structure was available at the beginning of this work (2010).

In this work we first established a protocol for the purification of TFF2 from human stomach. When performing a size exclusion chromatography (SEC) of tissue-samples, the Sephacryl-S-300 and Superose 6-10/300 columns have proven to be most effective. Using either column, TFF2 was separated from the majority of all other proteins and SEC fractions could be used for mass-spectrometry.

If tissue-samples were additionally separated via an anion-exchanger (ResourceQ), we occasionally observed two different TFF2 entities: an “unbound” form, which showed no interaction with the positively charged matrix of the column and a “bound” form, which only appeared after the application of a NaCl-gradient. It is unknown, which factors might contribute to the formation of these differently charged TFF2 entities.

Mass spectrometric analysis of purified TFF2 from the corpus and antrum of the stomach, which has been carried out by Prof. Dr. Hanisch (University of Cologne), could identify a rare fucosylated lacdiNAc-glycosylation at Asn-15. Through further analysis with specific lectins we have gathered first hints that lacdiNAc from the fundus of the stomach may be partially non-fucosylated.

Data gathered by mass spectrometry of purified TFF2 identified MUC5AC and MUC6 as potential binding partners. Regarding the interaction between TFF2 and the mucus, it was shown that boiling of homogenized tissue samples with SDS (1% final concentration) under non-reducing conditions resulted in a complete shift of TFF2 immunoreactivity towards lower molecular masses, appearing as a single peak during SEC. This was strongly suggesting that the interactions between TFF2 and its partner(s) in the mucus layer are non-covalent. Addition of galactose (0,2 M) did not interfere with the binding of TFF2 to the mucus.

Later research revealed that TFF2 is indeed a lectin, which binds to the O-glycosidic linked GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow R motif of its partner in the mucus layer, MUC6.

6. Literaturverzeichnis

Ahnen DJ, Poulsom R, Stamp GW, Elia G, Pike C, Jeffery R, Longcroft J, Rio MC, Chambon P, Wright NA (1994). The ulceration-associated cell lineage (UACL) reiterates the Brunner's gland differentiation programme but acquires the proliferative organization of the gastric gland. *J Pathol* 173:317-326

Albert TK. Biosynthese von TFF3 im humanen Gastrointestinaltrakt. Dissertationsschrift. Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (2012)

Albert TK, Laubinger W, Müller S, Hanisch FG, 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

Alison MR, Chinery R, Poulsom R, Ashwood P, Longcroft JM, Wright NA (1995). Experimental ulceration leads to sequential expression of spasmolytic polypeptide, intestinal trefoil factor, epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mRNAs in rat stomach. *J Pathol* 175:405-414

Allen A (1989). Gastrointestinal mucus. Section 6: The gastrointestinal system. Handbook of physiology. III. Schultz SG. *Am Physiol Soc*. Bethesda, MD: pp. 359–382

Bansil R, Stanley E, LaMont JT. Mucin biophysics (1995). *Annu Rev Physiol* 57:635-657

Baus-Loncar M, Kayademir T, Takaishi S, Wang T (2005). Trefoil factor family 2 deficiency and immune response. *Cell Mol Life Sci* 62:2947-2955

Baus-Loncar M, Schmid J, Lalani el-N, Rosewell I, Goodlad RA, Stamp GW, Blin N, Kayademir T (2005). Trefoil factor 2 (TFF2) deficiency in murine digestive tract influences the immune system. *Cell Physiol Biochem* 16:31-42

Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, McManus DT, Gavin AT, Murray LJ (2011). Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst* 103:1049-1057

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99

Bonar D, Hanisch FG (2014). Trefoil factor family domains represent highly efficient conformational determinants for N-linked N,N'-di-N-acetyllactosamine (LacdiNAc) synthesis. *J Biol Chem* 289:29677-29690

- Botzler C, Oertel M, Hinz M, Hoffmann W (1999). Structure of the *Xenopus laevis* TFF-gene xP4.1, differentially expressed to its duplicated homolog xP4.2. *Biochim Biophys Acta* 1489:345-353
- Breloy I, Pacharra S, Ottis P, Bonar D, Grahn A, Hanisch FG (2012). O-linked N,N'-diacetyllactosamine (LacdiNAc)-modified glycans in extracellular matrix glycoproteins are specifically phosphorylated at subterminal N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 287:18275-18286
- Carr MD, Bauer CJ, Gradwell MJ, Feeney J (1994). Solution structure of a trefoil-motif-containing cell growth factor, porcine spasmodic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2206-2210
- Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM (2008). GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res* 7:1650-1659
- Choudhary G, Horváth C (1996). Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* 270:47-82
- Chwieralski CE, Schnurra I, Thim L and Hoffmann W (2004). Epidermal growth factor and trefoil factor family 2 synergistically trigger chemotaxis on BEAS-2B cells via different signaling cascades. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:528–537
- Ciucanu I, Kerek F (1984). Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J Chromatography* 284: 179-185
- Colomb F, Robbe-Masselot C, Groux-Degroote S, Boukaert J, Delannoy P, Michalski JC (2014). Epithelial mucins and bacterial adhesion. *Carbohydr. Chem* 40: 596–623
- Cook GA, Familiar M, Thim L, Giraud AS (1999). The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett* 456:155–159
- De A, Brown DG, Gorman MA, Carr M, Sanderson MR, Freemont PS (1994). Crystal structure of a disulfide-linked "trefoil" motif found in a large family of putative growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1084-1088
- Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehniger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Clark GF (1995). Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodefin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J Biol Chem* 270:24116-24126

- Dubeykovskaya Z, Dubeykovskiy A, Solal-Cohen J, Wang TC (2009). Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J Biol Chem* 284:3650-3662
- Ebert MP, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P (1999). Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 45:105-111
- El-Zimaity HM, Ota H, Graham DY, Akamatsu T, Katsuyama T (2002). Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer* 94:1428-1436
- Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU (1991). A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell* 67:1103-1110
- Fiete D, Beranek MC, Baenziger JU (1997). The macrophage/endothelial cell mannose receptor cDNA encodes a protein that binds oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAcbeta1,4GlcNAcbeta or Man at independent sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11256-11261
- Fiete DJ, Beranek MC, Baenziger JU (1998). A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO₄ binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2089-2093
- Fiete D, Beranek M, Baenziger JU (2012). Peptide-specific transfer of N-acetylgalactosamine to O-linked glycans by the glycosyltransferases β 1,4-N-acetylgalactosaminyl transferase 3 (β 4GalNAc-T3) and β 4GalNAc-T4. *J Biol Chem* 287:29204-29212
- Fox JG, Rogers AB, Whary MT, Ge Z, Ohtani M, Jones EK, Wang TC (2007). Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2 ^{-/-} C57BL6 x Sv129 Helicobacter pylori-infected mice. *Am J Pathol* 171:1520-1528
- Fukushima K, Satoh T, Baba S, Yamashita K (2010). alpha1,2-Fucosylated and beta-N-acetylgalactosaminylated prostate-specific antigen as an efficient marker of prostatic cancer. *Glycobiology* 20:452-460
- 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
- Gilbert HF (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63:69-172
- Giraud AS, Pereira PM, Thim L, Parker LM, Judd LM (2004). TFF-2 inhibits iNOS/NO in monocytes, and nitrated protein in healing colon after colitis. *Peptides* 25:803-809

- 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
- Goldenring JR, Nam KT, Wang TC, Mills JC, Wright NA (2010). Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia and intestinal metaplasia: time for reevaluation of metaplasias and the origins of gastric cancer. *Gastroenterology* 138:2207-2210
- Gotoh M, Sato T, Kiyohara K, Kameyama A, Kikuchi N, Kwon YD, Ishizuka Y, Iwai T, Nakanishi H, Narimatsu H (2004). Molecular cloning and characterization of beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferases IV synthesizing N,N'-diacetyllactosediamine. *FEBS Lett* 562:134-140
- Graness A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W (2002). Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J Biol Chem* 277:18440-18446
- Green ED, van Halbeek H, Boime I, Baenziger JU (1985). Structural elucidation of the disulfated oligosaccharide from bovine lutropin. *J Biol Chem* 260:15623-15630
- Green ED, Baenziger JU (1988). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 263:36-44
- Grinnell BW, Hermann RB, Yan SB (1994). Human protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiology* 4:221-225
- Guo W, Giancotti FG (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:816-826
- Hanby AM, Poulson R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA (1993). Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology* 105:1110-1116
- Hanby AM, Poulson R, Elia G, Singh S, Longcroft JM, Wright NA (1993). The expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in 'gastric metaplasia' of the proximal duodenum: implications for the nature of 'gastric metaplasia'. *J Pathol* 169:355-360
- Hanby AM, Jankowski JA, Elia G, Poulson R, Wright NA (1994). Expression of the trefoil peptides pS2 and human spasmolytic polypeptide (hSP) in Barrett's metaplasia and the native oesophageal epithelium: delineation of epithelial phenotype. *J Pathol* 173:213-219
- Hanisch FG, Breloy I (2009). Protein-specific glycosylation: signal patches and cis-controlling peptidic elements. *Biol Chem* 390:619-626

- Hanisch FG, Ragge H, Kalinski T, Meyer F, Kalbacher H, Hoffmann W (2013). Human gastric TFF2 peptide contains an N-linked fucosylated N,N'-diacetyllactosediamine (LacdiNAc) oligosaccharide. *Glycobiology* 23:2-11
- Hanisch FG, Bonar D, Schloerer N, Schroten H (2014). Human Trefoil Factor 2 Is a Lectin That Binds α -GlcNAc-capped Muzin Glycans with Antibiotic Activity against *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 289: 27363–27375
- Hauser F, Hoffmann W (1991). xP1 and xP4. P-domain peptides expressed in *Xenopus laevis* stomach mucosa. *J Biol Chem* 266: 21306-21309
- Hauser F, Poulsom R, Chinery R, Rogers LA, Hanby AM, Wright NA, Hoffmann W (1993). hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6961-6965
- Heuer 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
- Hinz M, Schwegler H, Chwieralski CE, Laube G, Linke R, Pohle W, Hoffmann W (2004). Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides* 25:827-832
- Hoffmann W (2015). Current Status on Stem Cells and Cancers of the Gastric Epithelium. *Int J Mol Sci* 16:19153-19169
- Hoffmann W (2009). Trefoil factor family (TFF) peptides and chemokine receptors: a promising relationship. *J Med Chem* 52:6505-6510
- Hoffmann W, Hauser F (1993). The P-domain or trefoil motif: a role in renewal and pathology of mucous epithelia? *Trends Biochem Sci* 18:239-243
- Hoffmann W, Jagla W (2002). Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol* 213:147-181
- Hoffmann W, Jagla W, Wiede A (2001). Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 16:319-334
- Hoffmann W. (2013). TFF peptides. In *Handbook of biologically active peptides* (pp. 1338-1345). Academic Press.
- Hoffmann W (2015). TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int J Oncol* 47:806-816

- Hoffmann W (2020). Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Diverse Molecular Functions in Mucus Barrier Protection and More: Changing the Paradigm. *Int J Mol Sci* 21:4535
- Hoffmann W (2021). Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and their Different Roles in the Mucosal Innate Immune Defense and More: An Update. *Curr Med Chem* 28:7387-7399
- Hooper LV, Beranek MC, Manzella SM, Baenziger JU (1995). Differential expression of GalNAc-4-sulfotransferase and GalNAc-transferase results in distinct glycoforms of carbonic anhydrase VI in parotid and submaxillary glands. *J Biol Chem* 270:5985-5993
- Hsu WM, Che MI, Liao YF, Chang HH, Chen CH, Huang YM, Jeng YM, Huang J, Quon MJ, Lee H, Huang HC, Huang MC (2011). B4GALNT3 expression predicts a favorable prognosis and suppresses cell migration and invasion via β_1 integrin signaling in neuroblastoma. *Am J Pathol* 179:1394-1404
- Huang J, Liang JT, Huang HC, Shen TL, Chen HY, Lin NY, Che MI, Lin WC, Huang MC (2007). Beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase III enhances malignant phenotypes of colon cancer cells. *Mol Cancer Res* 5:543-552
- Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sørensen HT, Funch-Jensen P (2011). Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 365:1375-83
- 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
- Ikehara Y, Sato T, Niwa T, Nakamura S, Gotoh M, Ikehara SK, Kiyohara K, Aoki C, Iwai T, Nakanishi H, Hirabayashi J, Tatematsu M, Narimatsu H (2006). Apical Golgi localization of N,N'-diacetyllactosamine synthase, beta4GalNAc-T3, is responsible for LacdiNAc expression on gastric mucosa. *Glycobiology* 16:777-785
- 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 Muzin derived from mammalian gastric gland mucous cells: epitope recognized by a newly characterized monoclonal antibody. *Biochem J* 318:409-416
- 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
- 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

- Jeffrey GP, Oates PS, Wang TC, Babyatsky MW, Brand SJ (1994). Spasmolytic polypeptide: a trefoil peptide secreted by rat gastric mucous cells. *Gastroenterology* 106: 336-345
- Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 352-361
- Johns CE, Newton JL, Westley BR, May FE (2005). The diurnal rhythm of the cytoprotective human trefoil protein TFF2 is reduced by factors associated with gastric mucosal damage: ageing, *Helicobacter pylori* infection, and sleep deprivation. *Am J Gastroenterol* 100:1491-1497
- 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* 3:207-219
- Jørgensen KD, Diamant B, Jørgensen KH, Thim L (1982). Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): III. Pharmacology of a new porcine pancreatic polypeptide with spasmolytic and gastric acid secretion inhibitory effects. *Regul Pept* 3:231-243
- Kang W, Rathinavelu S, Samuelson LC, Merchant JL (2005). Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy. *Lab Invest* 85:702-715
- Karasawa F, Shiota A, Goso Y, Kobayashi M, Sato Y, Masumoto J, Fujiwara M, Yokosawa S, Muraki T, Miyagawa S, Ueda M, Fukuda MN, Fukuda M, Ishihara K, Nakayama J (2012). Essential role of gastric gland mucin in preventing gastric cancer in mice. *J Clin Invest* 122:923-934
- Kato M (2003). Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int J Mol Med* 12:3-9
- 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
- Kenny DT, Skoog EC, Lindén SK, Struwe WB, Rudd PM, Karlsson NG (2012). Presence of terminal N-acetylgalactosamine- β 1-4N-acetylglucosamine residues on O-linked oligosaccharides from gastric MUC5AC: involvement in *Helicobacter pylori* colonization? *Glycobiology* 22:1077-1085
- Kjellerv S (2009). The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 66:1350-1369
- Kjellerv S, Nexø E, Thim L, Poulsen SS (2006). Systemically administered trefoil factors are secreted into the gastric lumen and increase the viscosity of gastric contents. *Br J Pharmacol* 149:92-99

- Kouznetsova I, Laubinger W, Kalbacher H, Kalinski T, Meyer F, Roessner A, Hoffmann W (2007). Biosynthesis of gastrokine-2 in the human gastric mucosa: restricted spatial expression along the antral gland axis and differential interaction with TFF1, TFF2 and mucins. *Cell Physiol Biochem* 20:899-908
- Kouznetsova I, Gerlach KL, Zahl C and Hoffmann W (2010). Expression analysis of human salivary glands by laser microdissection: Differences between submandibular and labial glands. *Cell Physiol Biochem* 26:375–382
- 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
- Kubota S, Yamauchi K, Sugano M, Kawasaki K, Sugiyama A, Matsuzawa K, Akamatsu T, Ohmoto Y, Ota H (2011). Pathophysiological investigation of the gastric surface mucous gel layer of patients with *Helicobacter pylori* infection by using immunoassays for trefoil factor family 2 and gastric gland mucous cell-type mucin in gastric juice. *Dig Dis Sci* 56:3498-3506
- Kurt-Jones EA, Cao L, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR, Cerny A, Bowen G, Yan J, Takaishi S, Chi AL, Reed G, Houghton J, Fox JG, Wang TC (2007). Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. *Infect Immun* 75:471-480
- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19:449-490
- 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, Koumarianou 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 ME, Hansson GC, Samuelsson T (2016). Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components-Mucins and FCGBP. *Mol Biol Evol* 33:1921-1936
- Lee H, Wang P, Hoshino H, Ito Y, Kobayashi M, Nakayama J, Seeberger PH, Fukuda M (2008). Alpha1,4GlcNAc-capped mucin-type O-glycan inhibits cholesterol alpha-glucosyltransferase from *Helicobacter pylori* and suppresses *H. pylori* growth. *Glycobiology* 18:549-558
- Leitner VM, Walker GF, Bernkop-Schnürch A (2003). Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *Eur J Pharm Biopharm* 56:207-214

- Lottspeich F, Zorbas H. Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*. **1998**; 1. Auflage.
- Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom 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
- Low SC, Shaimi R, Thandaithabany Y, Lim JK, Ahmad AL, Ismail A (2013). Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Biointerface analysis and protein adhesion properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 110:248-253
- Lowe JB, Marth JD (2003). A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 72:643-691
- Marczynski M , Käsdorf BT , Altaner B , Wenzler A , Gerland U , Lieleg O (2018). Transient binding promotes molecule penetration into mucin hydrogels by enhancing molecular partitioning. *Biomater Sci* 6:3373-3387
- Manzella SM, Hooper LV, Baenziger JU (1996). Oligosaccharides containing beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine, a paradigm for protein-specific glycosylation. *J Biol Chem* 271:12117-12120
- Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P (1982). Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10:7895-7903
- May FE, Semple JI, Newton JL, Westley BR (2000). The human two domain trefoil protein, TFF2, is glycosylated in vivo in the stomach. *Gut* 46:454-459
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9:265-278
- Mengeling BJ, Manzella SM, Baenziger JU (1995). A cluster of basic amino acids within an alpha-helix is essential for alpha-subunit recognition by the glycoprotein hormone N-acetylgalactosaminyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:502-506
- Miller E, Fiete D, Blake NM, Beranek M, Oates EL, Mi Y, Roseman DS, Baenziger JU (2008). A necessary and sufficient determinant for protein-selective glycosylation in vivo. *J Biol Chem* 283:1985-1991
- Nakayama J (2014). Dual roles of gastric gland mucin-specific O-glycans in prevention of gastric cancer. *Acta Histochem. Cytochem* 47:1-9
- Nikolaidis NM, Zimmermann N, King NE, Mishra A, Pope SM, Finkelman FD, Rothenberg ME (2003). Trefoil factor-2 is an allergen-induced gene regulated by Th2 cytokines and STAT6 in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:458-464

- Nio-Kobayashi J, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T (2009). Immunohistochemical localization of six galectin subtypes in the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem* 57:41-50
- Nordman H, Davies JR, Carlstedt I (1998). Mucus glycoproteins from pig gastric mucosa: Different mucins are produced by the surface epithelium and the glands. *Biochem J* 331:687-694
- Nordman H, Davies JR, Lindell G, de Bolós C, 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
- Oinuma T, Ide S, Kawano J, Suganuma T (1994). Purification and immunohistochemistry of *Griffonia simplicifolia* agglutinin-II-binding mucus glycoprotein in rat stomach. *Glycobiology* 4:469-475
- Ota H, Katsuyama T (1992). Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Histochem. J* 24: 86–92
- Ota H, Hayama M, Momose M, El-Zimaity HM, Matsuda K, Sano K, Maruta F, Okumura N, Katsuyama T (2006). Co-localization of TFF2 with gland mucous cell mucin in gastric mucous cells and in extracellular mucous gel adherent to normal and damaged gastric mucosa. *Histochem Cell Biol* 126:617-625
- Otto WR, Rao J, Cox HM, Kotzian E, Lee CY, Goodlad RA, Lane A, Gorman M, Freemont PA, Hansen HF (1996). Effects of pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP) on epithelial cell function. *Eur. J. Biochem* 235:64–72
- Paunel-Görgülü AN, Franke AG, Paulsen FP, Dünker N (2011). Trefoil factor family peptide 2 acts pro-proliferative and pro-apoptotic in the murine retina. *Histochem Cell Biol* 135:461-473
- 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
- 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
- Poole LB (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biol. Med* 80:148-157

- Poulsen SS, Thulesen J, Nexø E, Thim L (1998). Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytic polypeptide in the rat. *Gut* 43:240-247
- Poulsen SS, Kissow H, Hare K, Hartmann B and 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
- Poulsom R, Wright NA (1993). Trefoil peptides: a newly recognized family of epithelial mucin-associated molecules. *Am J Physiol* 265:205-213
- Poulsom R (1996). Trefoil peptides. *Baillieres Clin Gastroenterol* 10:113-134
- Poulsom R, Hanby AM, Lalani EN, Hauser F, Hoffmann W, Stamp GW (1997). Intestinal trefoil factor (TFF 3) and pS2 (TFF 1), but not spasmolytic polypeptide (TFF 2) mRNAs are co-expressed in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol* 183:30-38
- Pounder RE, Ng D (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 9:33-39
- Quante M, Marrache F, Goldenring JR, Wang TC (2010). TFF2 mRNA transcript expression marks a gland progenitor cell of the gastric oxyntic mucosa. *Gastroenterology* 139:2018-2027
- Regalo G, Wright NA, Machado JC (2005). Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 62:2910-2915
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3116-3120
- Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC (1998). The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1378:61-77
- Rinnert M, Hinz M, Buhtz P, Reiher F, Lessel W, Hoffmann W (2010). Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine. *Cell Tissue Res* 339:639-647
- Rio MC, Chenard MP, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, Bellocq JP, Chambon P (1991). Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* 100:375-379

- Rose K, Savoy LA, Thim L, Christensen M, Jørgensen KH (1989). Revised amino acid sequence of pancreatic spasmolytic polypeptide exhibits greater similarity with an inducible pS2 peptide found in a human breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 998:297-300
- Rossez Y, Gosset P, Boneca IG, Magalhães A, Ecobichon C, Reis CA, Cieniewski-Bernard C, Joncquel Chevalier Curt M, Léonard R, Maes E, Sperandio B, Slomianny C, Sansonetti PJ, Michalski JC, Robbe-Masselot C (2014). The lacdiNAc-specific adhesin LabA mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Infect Dis* 210:1286-1295
- Rossez Y, Maes E, Lefebvre Darroman T, Gosset P, Ecobichon C, Joncquel Chevalier Curt M, Boneca IG, Michalski JC, Robbe-Masselot C (2012). Almost all human gastric mucin O-glycans harbor blood group A, B or H antigens and are potential binding sites for *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* 22:1193-1206
- Rossomando EF (1990). Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* 182:309-317
- Sakiyama T, Kabayama M, Tomita M, Nakamura J, Mukai H, Tomita Y, Furukawa K (1998). Distribution of glycoproteins with beta-N-acetylgalactosaminylated N-linked sugar chains among bovine tissues. *Biochim Biophys Acta* 1380:268-274
- Sasaki N, Shinomi M, Hirano K, Ui-Tei K, Nishihara S (2011). LacdiNAc (GalNAc β 1-4GlcNAc) contributes to self-renewal of mouse embryonic stem cells by regulating leukemia inhibitory factor/STAT3 signaling. *Stem Cells* 29:641-650
- Sato T, Gotoh M, Kiyohara K, Kameyama A, Kubota T, Kikuchi N, Ishizuka Y, Iwasaki H, Togayachi A, Kudo T, Ohkura T, Nakanishi H, Narimatsu H (2003). Molecular cloning and characterization of a novel human beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase, beta 4GalNAc-T3, responsible for the synthesis of N,N'-diacetyllactosidamine, galNAc beta 1-4GlcNAc. *J Biol Chem* 278:47534-47544
- Schmidt PH, Lee JR, Joshi V, Playford RJ, Poulsom R, Wright NA, Goldenring JR (1999). Identification of a metaplastic cell lineage associated with human gastric adenocarcinoma. *Lab Invest* 79:639-646
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2009). Hrsg. *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag.
- Schwarz H, Hoffmann W (2020). Subcellular Localization of the TFF Peptides xP1 and xP4 in the *Xenopus laevis* Gastric/Esophageal Mucosa: Different Secretion Modes Reflecting Diverse Protective Functions. *Int J Mol Sci* 21:761
- 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

- Semple JI, Newton JL, Westley BR, May FE (2001). Dramatic diurnal variation in the concentration of the human trefoil peptide TFF2 in gastric juice. *Gut* 48:648-655
- Skelton TP, Kumar S, Smith PL, Beranek MC, Baenziger JU (1992). Pro-opiomelanocortin synthesized by corticotrophs bears asparagine-linked oligosaccharides terminating with SO₄-4GalNAc-beta-1,4GlcNAc-beta-1,2Man-alpha. *J Biol Chem* 267:12998-13006
- Spechler SJ (1994). Barrett's esophagus. *Semin Oncol* 21:431-437
- Strous GJ, Dekker J (1992). Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:57-92
- 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
- Stürmer R, Müller S, Hanisch FG, Hoffmann W (2014). Porcine gastric TFF2 is a mucus constituent and differs from pancreatic TFF2. *Cell Physiol Biochem* 33:895-904
- Stürmer R, Harder S, Schlüter H, Hoffmann W (2018). Commercial Porcine Gastric Mucin Preparations, also Used as Artificial Saliva, are a Rich Source for the Lectin TFF2: In Vitro Binding Studies. *Chembiochem* 19:2598-2608
- 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* 20:6052
- Suzuki K, Hayama M, Nakamura M, Yamauchi K, Maruta F, Miyagawa S, Ota H (2006). Trefoil factor 2 in gland mucous cell mucin in the mucous gel covering normal or damaged gastric mucosa using the Mongolian gerbil model. *Scand J Gastroenterol* 41:1390-1397
- Svensson F, Lang T, Johansson MEV, Hansson GC (2018). The central exons of the human MUC2 and MUC6 mucins are highly repetitive and variable in sequence between individuals. *Sci Rep* 8:17503
- Tarentino AL, Trimble RB, Plummer TH Jr (1989). Enzymatic approaches for studying the structure, synthesis, and processing of glycoproteins. *Methods Cell Biol* 32:111-139
- Tarentino AL, Plummer TH Jr (1994). Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol* 230:44-57
- Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J (2009). Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 19:527-536

- Thim L, Norris K, Norris F, Nielsen PF, Bjorn SE, Christensen M, Petersen J (1993). Purification and characterization of the trefoil peptide human spasmolytic polypeptide (hSP) produced in yeast. *FEBS Lett* 318:345–352
- Thim L, Madsen F, Poulsen SS (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 32:519-527
- Thim L (1997). Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci* 53:888-903
- 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, Madsen F, Poulsen SS (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 32:519-527
- Thim L, Mørtz E (2000). Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 90:61-68
- Thornton DJ, Carlstedt I, Sheehan JK (1994). Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels. *Methods Mol Biol* 32:119-128
- Thornton DJ, Devine PL, Hanski C, Howard M, Sheehan JK (1994). Identification of two major populations of mucins in respiratory secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 150:823-832
- Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Hareuveni M, Chambon P, Lathe R (1990). hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J* 9:407-414
- 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
- Tu SP, Chi AL, Ai W, Takaishi S, Dubeykovskaya Z, Quante M, Fox JG, Wang TC (2009). p53 inhibition of AP1-dependent TFF2 expression induces apoptosis and inhibits cell migration in gastric cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:385-396
- Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J (2000). *H pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* 46:601-607
- Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L (2004). Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 127:502–513

- Vestergaard EM, Brynskov J, Ejksjaer K, Clausen JT, Thim L, Nexø E, Poulsen SS (2004). Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Clin Lab Invest* 64:146-156
- Varki A (2008). *Essentials of Glycobiology*, May 15th 2008, PowerPoint-Presentation Lecture 15 Chapter 28. R-type Lectins, Figure 13.15.
- Viby NE, Nexø E, Kissow H, Andreassen H, Clementsen P, Thim L, Poulsen SS (2015). Trefoil factors (TFFs) are increased in bronchioalveolar lavage fluid from patients with chronic obstructive lung disease (COPD). *Peptides* 63:90-59
- Wong WM, Playford RJ, Wright NA (2000). Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: ordered sequence or redundancy? *Gut* 46:286-292
- Wright NA, Pike C, Elia G (1990). Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature* 343:82-85
- 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
- Wright NA (1998). Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:925-933
- Xia HH, Yang Y, Lam SK, Wong WM, Leung SY, Yuen ST, Elia G, Wright NA, Wong BC (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
- Xue L, Aihara E, Podolsky DK, Wang TC, Montrose MH (2010). In vivo action of trefoil factor 2 (TFF2) to speed gastric repair is independent of cyclooxygenase. *Gut* 59:1184-1191
- Yu G, Jiang P, Xiang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhang C, Lee S, Lee W, Zhang Y (2015). Increased expression of protease-activated receptor 4 and Trefoil factor 2 in human colorectal cancer. *PLoS One*, 10:e0122678.
- Zhang Y, Yu G, Wang Y, Xiang Y, Gao Q, Jiang P, Zhang J, Lee W, Zhang Y (2011). Activation of protease-activated receptor (PAR) 1 by frog trefoil factor (TFF) 2 and PAR4 by human TFF2. *Cell Mol Life Sci* 68:3771-3780

7. Anhang

7.1. Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen der gereinigten Probe 323M_A

7.1.1. Bande 1

Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 08:58:53 GMT
Protein hits : [MUC5A_HUMAN](#) Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3
[A2MG_HUMAN](#) Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=2
[MUC6_HUMAN](#) Mucin-6 OS=Homo sapiens GN=MUC6 PE=1 SV=2
[IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
[IGHA2_HUMAN](#) Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3
[IGHM_HUMAN](#) Ig mu chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHM PE=1 SV=3
[IGKC_HUMAN](#) Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1
[HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[FCGBP_HUMAN](#) IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3
[HPT_HUMAN](#) Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
[ACTB_HUMAN](#) Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
[LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
[ACTA_HUMAN](#) Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1
[FIBG_HUMAN](#) Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens GN=FGG PE=1 SV=3
[HBA_HUMAN](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
[IGHG1_HUMAN](#) Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[IGHG2_HUMAN](#) Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2
[SHRM3_HUMAN](#) Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2
[HV201_HUMAN](#) Ig heavy chain V-II region OU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1

Protein 1: Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3

Accession: MUC5A_HUMAN **Score:** 4161.6
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 526.3
Database Date: 2009-03-05 **pl:** 6.6
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 19.9
No. of unique Peptides: 84

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
200	1	366.9000	62.47	3	9.9	33.0	0	38-47	K.HHPALSPIAR.G	
247	1	391.7000	-75.55	2	11.1	30.8	0	48-55	R.GPSGVPLR.G	
444	1	474.3000	65.19	2	16.4	30.4	0	56-64	R.GATVFPSLR.T	
379	1	686.3000	-16.25	2	14.7	49.3	0	80-90	R.VCSTWGSFHYK.T	Carbamidomethyl: 2
426	1	478.8000	151.97	2	15.9	53.9	0	91-98	K.TFDGDVFR.F	
644	2	1003.5000	377.25	3	22.3	63.5	0	99-123	R.FPGLCNYVFSEHCAGAYEDFNIQLR.R	Carbamidomethyl: 5, 13
178	1	434.9000	7.20	3	9.4	27.1	1	124-135	R.RSQESAAPTLRSR.V	
220	1	573.8000	15.49	2	10.4	49.6	0	125-135	R.SQESAAPTLRSR.V	
439	1	536.4000	141.60	2	16.3	74.5	0	140-149	K.VDGVVQLTK.G	
594	1	1015.2000	315.17	3	21.1	35.5	0	150-178	K.GSVLVNGHPVLLPFSQSGVLIQSSSYTK.V	
474	1	639.4000	107.06	2	17.3	63.8	0	230-240	K.LTPMEFGNLQK.M	
385	1	647.3000	-44.82	2	14.9	33.3	0	230-240	K.LTPMEFGNLQK.M	Oxidation: 4
332	1	1006.4000	467.01	2	13.4	54.7	0	241-257	K.MDDPTEQCQDPVPEPPR.N	Carbamidomethyl: 8
244	1	474.7000	-33.34	2	11.0	52.0	0	330-337	R.GPDFCPQK.C	Carbamidomethyl: 5
168	1	754.8000	6.60	2	9.2	34.1	0	338-348	K.CPNNMQYHECR.S	Carbamidomethyl: 1, 10
304	1	642.3000	25.00	2	12.6	85.5	0	478-488	R.CGLTDSSETCLK.S	Carbamidomethyl: 1, 9
463	1	810.7000	401.86	3	16.9	60.2	1	563-583	K.LRGQTCGLCGNFNSIQADDFR.T	Carbamidomethyl: 6, 9
495	1	1080.9000	402.33	2	18.0	83.7	0	565-583	R.GQTCLGCGNFNSIQADDFR.T	Carbamidomethyl: 4, 7
740	1	625.7000	594.89	3	24.5	58.2	0	584-601	R.TLSGVVEATAAAFFNTFK.T	
184	1	515.8000	80.35	2	9.5	35.2	0	602-610	K.TQAACPNI.R	Carbamidomethyl: 5
388	1	877.9000	22.19	2	15.0	82.7	0	611-625	R.NSFDPCSLSVENEK.Y	Carbamidomethyl: 7
466	1	1055.0000	32.43	2	17.0	51.8	0	626-643	K.YAQHWCSQLTDADGPFGR.C	Carbamidomethyl: 6
395	1	436.8000	136.25	2	15.1	40.6	0	686-693	K.GVQLGGWR.D	
207	2	747.8000	-54.96	2	10.1	31.1	1	694-706	R.DGVCTKPMTTCPK.S	Carbamidomethyl: 4, 11
267	1	676.6000	-32.82	3	11.6	40.4	0	707-722	K.SMTYHYHVSTCQPTCR.S	Carbamidomethyl: 11, 15
228	1	681.9000	-78.95	3	10.6	42.2	0	707-722	K.SMTYHYHVSTCQPTCR.S	Carbamidomethyl: 11, 15; Oxidation: 2
585	1	1256.5000	332.91	2	20.6	46.0	0	723-745	R.SLSEGDITCSVGFIPVDGICCPK.G	Carbamidomethyl: 9, 19, 21
333	1	477.2000	-67.82	2	13.3	37.0	0	746-754	K.GFTLDDTGK.C	

166	1	776.3000	-20.76	2	9.1	73.4	0	755-766	K.CVQASNCPCYHR.G	Carbamidomethyl: 1, 7, 9
643	1	842.4000	405.77	3	22.2	41.9	0	790-812	K.LSCIGGQAPAPVCAAPMVFFDCR.N	Carbamidomethyl: 3, 13, 22
190	1	478.2000	-19.70	2	9.6	29.3	0	938-945	K.DSTQDSFR.V	
253	1	906.0000	89.27	2	11.3	67.2	0	946-962	R.VVTENVPCGTTGTTCCKA	Carbamidomethyl: 8, 15
597	1	512.4000	200.45	2	21.0	53.7	0	966-974	K.IFLGGFELK.L	
607	1	698.9000	745.21	2	21.4	88.2	0	1018-1029	K.TSIFINLSPEFK.G	
574	1	1073.0000	484.47	2	20.3	72.0	0	1032-1050	R.VCGLCGNFDDIAVNDFATR.S	Carbamidomethyl: 2, 5
678	1	769.0000	145.30	2	23.1	102.8	0	1053-1066	R.SVVDVLEFGNSWK.L	
315	1	628.3000	-33.72	2	12.9	60.9	0	1067-1078	K.LSPSCPDALAPK.D	Carbamidomethyl: 5
282	1	603.3000	16.21	2	11.9	21.8	1	1079-1088	K.DPCTANPFRK.S	Carbamidomethyl: 3
319	1	787.0000	-56.25	3	13.0	27.1	0	1094-1114	K.QCSILHGPTFAACHAVEPAR.Y	Carbamidomethyl: 2, 13
248	1	462.2000	-39.38	2	11.3	32.4	0	1202-1209	R.GLEGCPYK.C	Carbamidomethyl: 5
415	1	709.4000	114.42	2	15.6	40.1	0	1210-1221	K.CPPEAFIPEDEK.M	Carbamidomethyl: 1
507	1	1042.1000	270.30	3	18.3	31.2	1	1210-1236	K.CPPEAFIPEDEKMQCVATCPTPLPPR.C	Carbamidomethyl: 1, 15, 19
237	1	638.3000	-59.88	2	10.9	42.2	1	1243-1254	K.SYRPGAVVPSDK.N	
187	1	664.3000	55.67	2	9.6	83.3	0	1255-1264	K.NCQSCLCTER.G	Carbamidomethyl: 2, 5, 7
226	1	715.3000	694.78	2	10.5	88.0	0	1272-1283	K.AEACVCTYNGQR.F	Carbamidomethyl: 4, 6
362	1	754.4000	64.10	3	14.4	26.9	0	1284-1304	R.FHPGDVIYHTDGTGGCISAR.C	Carbamidomethyl: 17
637	1	718.9000	102.79	2	22.0	51.0	0	1387-1397	K.CLWSPWMDVSR.P	Carbamidomethyl: 1
480	1	770.4000	65.27	2	17.6	64.0	0	1401-1414	R.GTDSGDFDTLENLR.A	
303	1	512.8000	49.28	2	12.6	43.5	0	1431-1440	R.AEDAPGVPLR.A	
301	1	696.3000	-34.38	2	12.5	64.4	0	1446-1457	R.VQCSPDVGLTCR.N	Carbamidomethyl: 3, 11
349	1	936.5000	59.28	2	13.8	47.7	1	1458-1472	R.NREQASGLCYNYQIR.V	Carbamidomethyl: 9
401	1	801.4000	34.35	2	15.3	103.3	0	1460-1472	R.EQASGLCYNYQIR.V	Carbamidomethyl: 7
341	1	680.8000	33.28	2	13.6	69.7	0	1610-	R.DEGYTFCESPR.S	Carbamidomethyl: 7

								1620		
488	1	560.6000	-21.14	3	17.7	63.5	0	1655-1667	K.NQLPPICYNEYR.I	Carbamidomethyl: 7
270	1	719.8000	-21.42	2	11.7	74.2	0	1668-1678	R.IQCETVNVCR.D	Carbamidomethyl: 3, 4, 10
541	1	921.5000	428.81	3	19.3	31.7	1	1752-1775	K.WFDVDFPSPGPHGGDKETYNNIIR.S	
320	1	511.7000	-130.73	2	13.0	20.2	0	1768-1775	K.ETYNNIIR.S	
116	1	450.7000	-107.63	2	7.9	47.5	1	1783-1789	R.RPEEITR.V	
405	1	1031.5000	-10.05	2	15.4	56.7	0	1796-1813	K.SHPEVSIIEHLGQVQCSR.E	Carbamidomethyl: 16
201	2	531.3000	86.28	2	10.1	37.9	0	1821-1829	R.NDQQGPFK.M	
366	1	542.8000	93.33	2	14.4	64.3	0	1830-1837	K.MCLNYEVR.V	Carbamidomethyl: 2
298	1	550.8000	96.59	2	12.4	50.6	0	1830-1837	K.MCLNYEVR.V	Carbamidomethyl: 2; Oxidation: 1
416	1	1131.5000	-44.38	2	15.7	55.4	0	2697-2716	R.AESHPEVSIIEHLGQVQCSR.E	Carbamidomethyl: 18
414	1	1145.5000	388.05	2	15.6	61.7	0	4054-4073	R.AESHPEVNIIEHLGQVQCSR.E	Carbamidomethyl: 18
348	1	570.8000	-10.57	2	14.0	35.9	0	4166-4175	R.LYPAGSTIYR.H	
428	1	1158.5000	428.56	2	15.9	70.9	0	4178-4196	R.DLAGHCYYALCSQDCQVVR.G	Carbamidomethyl: 6, 11, 15
238	1	767.4000	12.86	2	10.9	43.1	1	4267-4280	R.VEKPTCANGYPAVK.V	Carbamidomethyl: 6
532	1	1036.5000	34.51	2	18.9	75.5	0	4336-4353	R.VLVDNYFCGAEDGLSCPR.S	Carbamidomethyl: 8, 16
334	1	637.3000	-47.70	2	13.4	57.8	0	4354-4363	R.SIILEYHQDR.V	
360	1	614.7000	603.17	3	14.3	67.6	1	4369-4384	R.KPVHGVMTNEIIFNNK.V	
274	1	381.2000	-49.48	2	11.8	30.3	0	4385-4391	K.VVSPGFR.K	
157	1	436.8000	70.40	2	8.8	27.3	1	4392-4399	R.KNGIVVSR.I	
268	1	373.3000	1551.37	2	11.6	37.9	0	4393-4399	K.NGIVVSR.I	
234	1	769.3000	-19.83	2	10.8	28.8	0	4584-4596	R.TGHMCPFTCPADK.V	Carbamidomethyl: 5, 9; Oxidation: 4
291	1	761.3000	-23.38	2	12.2	30.3	0	4584-4596	R.TGHMCPFTCPADK.V	Carbamidomethyl: 5, 9
172	1	547.3000	42.79	2	9.3	50.5	0	4654-4663	R.CLGPHGEPVK.V	Carbamidomethyl: 1

209	1	635.7000	-136.82	2	10.1	51.9	0	4727-4738	R.CPAPVGCPEGAR.A	Carbamidomethyl: 1, 7
285	1	598.8000	-58.98	2	12.0	81.8	0	4861-4871	K.HQDGLVVVTTK.K	
307	1	535.3000	80.19	3	12.6	36.4	1	4872-4885	K.KACPLSLCSLDEAR.M	Carbamidomethyl: 3, 8
359	1	738.4000	88.71	2	14.2	49.3	0	4873-4885	K.ACPLSLCSLDEAR.M	Carbamidomethyl: 2, 7
345	1	894.9000	-54.84	2	13.7	94.5	0	4914-4929	R.SLIQQQGCSSSEPVR.L	Carbamidomethyl: 9
337	1	734.0000	37.46	3	13.5	20.9	0	4935-4954	R.GNCGDSSSMYSLEGNTVEHR.C	Carbamidomethyl: 3
165	1	577.2000	-53.69	2	9.1	40.9	0	4955-4962	R.QCQCQELR.T	Carbamidomethyl: 1, 3, 4
435	1	898.4000	46.92	2	16.2	67.7	0	4979-4993	R.AFSYTEVEECGMGR.R	Carbamidomethyl: 10, 12

Protein 3: Mucin-6 OS=Homo sapiens GN=MUC6 PE=1 SV=2

Accession:	MUC6_HUMAN	Score:	831.1
Database:	SwissProt(SwissProt_57.3.fasta)	MW [kDa]:	252.0
Database Date:	2009-06-03	pI:	7.1
Modification(s):	Carbamidomethyl, Oxidation	Sequence Coverage [%]:	8.5
		No. of unique Peptides:	17

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
118	1	400.6000	132.16	3	8.0	25.6	1	32-42	R.LKDSPQTAPDK.G	
714	1	855.2000	479.34	3	24.0	45.5	0	117-140	K.DIGVISLPYTSNGLQITPFGQSVR.L	
383	1	622.9000	484.69	3	14.8	39.0	1	167-182	R.KYMGQMCGLCGNFDGK.V	Carbamidomethyl: 7, 10
458	1	869.4000	61.85	2	16.7	69.0	0	168-182	K.YMGQMCGLCGNFDGK.V	Carbamidomethyl: 6, 9
294	1	619.8000	2.26	2	12.3	84.8	0	183-193	K.VTNEFVSEEGK.F	
462	1	734.1000	114.23	3	16.9	53.8	0	206-224	K.LDDPGEICTFQDIPSTHVR.Q	Carbamidomethyl: 8
397	1	919.7000	324.82	3	15.2	72.0	0	292-316	R.SPGLCSVGQCPANQVYQECGSACVK.T	Carbamidomethyl: 5, 10, 19, 23
343	1	858.4000	-51.43	2	13.6	96.4	0	462-477	K.IVISQDEVVTNNGEAK.W	
288	1	705.3000	-7.67	2	12.1	65.8	0	573-584	R.ETDPCMSQLNK.V	Carbamidomethyl: 5
179	1	713.3000	-4.02	2	9.4	63.7	0	573-584	R.ETDPCMSQLNK.V	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 7
259	1	405.2000	-27.73	2	11.4	32.6	0	597-603	R.TGTVFER.C	
642	1	493.8000	36.13	2	22.2	52.8	0	646-653	R.GVLLWGW.R.S	
299	1	476.3000	143.12	2	12.4	33.7	0	679-686	R.TCLSLSDRA	Carbamidomethyl: 2
292	1	944.4000	348.73	3	12.2	42.4	0	687-711	R.ATECHHSVAVPVDGCNCPDGYLNQK.G	Carbamidomethyl: 4, 14, 16
330	1	490.0000	866.34	3	13.2	27.2	1	717-728	R.KAQCPCILEGYK.F	Carbamidomethyl: 4, 6
396	1	669.8000	-18.92	2	15.1	48.1	0	718-728	K.AQCPCILEGYK.F	Carbamidomethyl: 3, 5
325	1	576.3000	30.22	2	13.2	43.4	0	2306-2314	R.EQQEITFK.G	

Protein 9: IgGFC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3

Accession:	FCGBP_HUMAN	Score:	286.9
Database:	SwissProt(SwissProt_56.9.fasta)	MW [kDa]:	571.6
Database Date:	2009-03-05	pI:	5.0
Modification(s):	Carbamidomethyl	Sequence Coverage [%]:	1.1
		No. of unique Peptides:	5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
217	1	640.8000	16.03	2	10.3	88.8	0	462-473	K.AGCVAESTAVCR.A	Carbamidomethyl: 3, 11
515	1	781.4000	640.91	2	18.5	59.8	0	1291-1304	R.FAVLQENVAWGNR.V	
452	1	590.4000	60.90	2	16.9	54.5	0	1338-1348	K.LPVVLANGQIR.A	
618	1	831.9000	667.11	2	21.5	36.3	0	1846-1858	R.APGWDPLCWDECR.G	Carbamidomethyl: 8, 12
350	1	479.3000	58.79	2	13.9	54.2	0	5333-5341	R.TPDGSLLR.Q	

7.1.2. Bande 2

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987108.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 08:59:19 GMT
Protein hits : [IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
[MUC5A_HUMAN](#) Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3
[IGHA2_HUMAN](#) Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3
[HPT_HUMAN](#) Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
[A1AT_HUMAN](#) Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
[FCGBP_HUMAN](#) IgGfc-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3
[HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[FIBB_HUMAN](#) Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2
[IGHG1_HUMAN](#) Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[IGHG2_HUMAN](#) Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[HV303_HUMAN](#) Ig heavy chain V-III region VH26 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[HV319_HUMAN](#) Ig heavy chain V-III region JON OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[HBA_HUMAN](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
[HV101_HUMAN](#) Ig heavy chain V-I region EU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[A2MG_HUMAN](#) Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens GN=A2M PE=1 SV=2
[HV305_HUMAN](#) Ig heavy chain V-III region BRO OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[ALBU_HUMAN](#) Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2
[LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
[HV103_HUMAN](#) Ig heavy chain V-I region V35 OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[QRIC2_HUMAN](#) Glutamine-rich protein 2 OS=Homo sapiens GN=QRICH2 PE=1 SV=1
[ACTB_HUMAN](#) Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
[HV201_HUMAN](#) Ig heavy chain V-II region OU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[HV307_HUMAN](#) Ig heavy chain V-III region CAM OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[NALP5_HUMAN](#) NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=NLRP5 PE=2 SV=2
[CP51A_HUMAN](#) Lanosterol 14-alpha demethylase OS=Homo sapiens GN=CYP51A1 PE=1 SV=3
[YM018_HUMAN](#) Uncharacterized protein FLJ40176 OS=Homo sapiens PE=2 SV=2

Protein 2: Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3

Accession: MUC5A_HUMAN **Score:** 720.8
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 526.3
Database Date: 2009-03-05 **pl:** 6.6
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 4.9
No. of unique Peptides: 17

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
191	1	573.8000	15.49	2	10.4	40.4	0	125-135	R.SQESAAPTLRS.V	
746	1	625.4000	115.14	3	24.5	50.0	0	584-601	R.TLSGVVEATAAAFFNTFK.T	
394	1	877.8000	-91.73	2	15.2	35.0	0	611-625	R.NSFEDPCSLSVENEK.Y	Carbamidomethyl: 7
549	1	705.4000	600.84	3	19.3	24.5	0	667-685	R.SEDCLCAALSSVHACAAK.G	Carbamidomethyl: 4, 6, 16
594	1	1072.5000	18.26	2	20.7	60.3	0	1032-1050	R.VCGLCGNFDDIADVDFATR.S	Carbamidomethyl: 2, 5
696	1	769.0000	145.30	2	23.2	90.3	0	1053-1066	R.SVVGDVLEFGNSWK.L	
499	1	840.4000	-16.82	2	17.9	47.0	0	1655-1667	K.NQLPPICYNYEIR.I	Carbamidomethyl: 7
243	1	720.3000	673.20	2	11.5	41.9	0	1668-1678	R.IQCCETVNVCR.D	Carbamidomethyl: 3, 4, 10
84	1	450.8000	114.22	2	7.9	45.7	1	1783-1789	R.RPEEITR.V	
413	1	688.1000	131.78	3	15.6	25.1	0	1796-1813	K.SHPEVSIHGLQVVQCSRE	Carbamidomethyl: 16
185	1	531.3000	86.28	2	10.3	29.6	0	1821-1829	R.NQDQQGPFK.M	
178	1	517.8000	112.95	2	10.1	38.5	0	1838-1845	R.VLCCETPR.G	Carbamidomethyl: 3, 4
427	1	772.3000	-49.52	3	15.9	23.9	0	4178-4196	R.DLAGHCYYALCSQDCQVVR.G	Carbamidomethyl: 6, 11, 15
416	1	767.9000	85.64	4	15.7	26.4	1	4664-4689	K.VGHTVMGDCQECTCEAATWTLTCRPK.L	Carbamidomethyl: 9, 12, 14, 23
182	1	636.2000	649.61	2	10.2	45.6	0	4727-4738	R.CPAPVGCPEGAR.A	Carbamidomethyl: 1, 7
261	1	598.9000	108.01	2	12.0	75.9	0	4861-4871	K.HQDGLVVVTTK.K	
442	1	898.9000	603.49	2	16.4	38.0	0	4979-4993	R.AFSYTEVEECGMGR.R	Carbamidomethyl: 10, 12

Protein 4: Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1

Accession: HPT_HUMAN **Score:** 456.9
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 45.2
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 6.1
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 25.1
No. of unique Peptides: 11

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
201	1	462.8000	1148.50	2	10.9	22.0	0	162-170	R.ILGGHLDAG	
447	1	460.8000	141.35	2	16.6	21.6	0	171-178	K.GSFPWQAK.M	
295	1	429.8000	115.90	2	12.8	36.6	0	229-235	K.QLVEIEK.V	
96	1	352.2000	27.53	2	8.1	28.1	0	256-261	K.VSVNER.V	
177	1	405.2000	17.17	2	10.1	27.1	0	271-277	K.DYAEVGR.V	
381	1	490.8000	99.73	2	15.0	54.1	0	278-286	R.VGYVSGWGR.N	
492	1	854.4000	-15.55	2	17.7	59.6	0	298-311	K.YVMLPVADQDQCIR.H	Carbamidomethyl: 12
482	1	725.1000	564.76	3	17.4	52.9	0	326-345	K.SPVGVQPILNEHTFCAGMSK.Y	Carbamidomethyl: 15
445	1	730.0000	-30.63	3	16.5	20.5	0	326-345	K.SPVGVQPILNEHTFCAGMSK.Y	Carbamidomethyl: 15; Oxidation: 18
404	1	673.4000	109.20	2	15.5	88.3	0	380-391	K.SCAVAEYGVYVK.V	Carbamidomethyl: 2
448	1	602.8000	793.52	2	16.6	66.5	0	392-401	K.VTSIQDWVQK.T	

Protein 6: IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3

Accession: FCGBP_HUMAN **Score:** 315.5
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 571.6
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 5.0
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 1.4
No. of unique Peptides: 6

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
253	1	481.8000	90.62	2	11.8	59.8	0	1725-1733	R.GNPAVSYYR.V	
548	1	784.5000	71.70	2	19.3	61.0	0	1756-1771	R.VNGVLTALPVSVADGR.I	
106	1	589.7000	-54.06	2	8.4	39.0	0	1859-1868	R.GSCPTCPEDR.L	Carbamidomethyl: 3, 6
698	1	717.4000	53.69	3	23.3	53.8	0	1922-1941	K.ALASYVAACQAAGVVIEDWR.A	Carbamidomethyl: 9
142	1	484.8000	116.70	2	9.2	62.6	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
132	1	430.7000	-105.50	2	9.0	49.8	0	4174-4182	R.ISVAQGASK.A	

7.1.3. Bande 3

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987109.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 08:59:44 GMT
Protein hits : [HPT_HUMAN](#) Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
[ACTB_HUMAN](#) Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
[IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
[MUC5A_HUMAN](#) Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3
[IGHA2_HUMAN](#) Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3
[GELS_HUMAN](#) Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1
[IGKC_HUMAN](#) Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[FCGBP_HUMAN](#) IgGfC-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[K1C18_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=1 SV=2
[A1AT_HUMAN](#) Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[TXND5_HUMAN](#) Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXND5 PE=1 SV=2
[LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
[FLNB_HUMAN](#) Filamin-B OS=Homo sapiens GN=FLNB PE=1 SV=2
[CLUS_HUMAN](#) Clusterin OS=Homo sapiens GN=CLU PE=1 SV=1
[LMNA_HUMAN](#) Lamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1
[FIBB_HUMAN](#) Fibrinogen beta chain OS=Homo sapiens GN=FGB PE=1 SV=2
[HRG_HUMAN](#) Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens GN=HRG PE=1 SV=1
[SHRM3_HUMAN](#) Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2
[NFAC3_HUMAN](#) Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3 OS=Homo sapiens GN=NFATC3 PE=1 SV=1
[MYH9_HUMAN](#) Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4
[ARMX4_HUMAN](#) Armadillo repeat-containing X-linked protein 4 OS=Homo sapiens GN=ARMCX4 PE=2 SV=2
[PCD15_HUMAN](#) Protocadherin-15 OS=Homo sapiens GN=PCDH15 PE=1 SV=2

Protein 1: Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1

Accession: HPT_HUMAN **Score:** 1158.8
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 45.2
Database Date: 2009-03-05 **pl:** 6.1
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 40.4
No. of unique Peptides: 24

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
190	1	462.3000	66.88	2	10.9	61.7	0	162-170	R.ILGGHLDAAK.G	
389	1	460.8000	141.35	2	16.5	38.3	0	171-178	K.GSFPWQAK.M	
507	1	645.9000	48.26	2	19.7	67.4	0	216-227	K.DIAPTLTYVGK.K	
433	1	709.9000	-22.97	2	17.6	55.3	1	216-228	K.DIAPTLTYVGKK.Q	
201	1	493.8000	4.71	2	11.2	45.0	1	228-235	K.KQLVEIEK.V	
257	1	429.8000	115.90	2	12.9	29.8	0	229-235	K.QLVEIEK.V	
453	1	599.1000	152.59	3	18.2	61.9	0	236-251	K.VVLHPNYSQVDIGLIK.L	
65	1	480.3000	68.56	2	7.7	35.8	1	254-261	K.QKQSVNER.V	
79	1	352.2000	27.53	2	8.1	31.3	0	256-261	K.VSVNER.V	
316	1	530.8000	37.47	2	14.3	42.0	0	262-270	R.VMPICLPSK.D	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 2
413	1	918.5000	584.84	2	17.1	58.0	1	262-277	R.VMPICLPSKDYAEVGR.V	Carbamidomethyl: 5
364	1	926.5000	582.53	2	15.8	53.7	1	262-277	R.VMPICLPSKDYAEVGR.V	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 2
165	1	405.3000	263.97	2	10.2	40.4	0	271-277	K.DYAEVGR.V	
343	1	490.7000	-104.04	2	15.1	71.1	0	278-286	R.VGYVSGWGR.N	
283	2	667.8000	-69.21	2	13.5	56.6	1	287-297	R.NANFKFTDHLK.Y	
135	1	381.2000	1305.36	2	9.5	32.5	0	292-297	K.FTDHLK.Y	
434	2	854.4000	-15.55	2	17.7	68.6	0	298-311	K.YVMLPVADQDQCIR.H	Carbamidomethyl: 12
378	2	862.4000	-12.45	2	16.2	82.5	0	298-311	K.YVMLPVADQDQCIR.H	Carbamidomethyl: 12; Oxidation: 3
94	1	573.8000	43.70	2	8.4	41.6	0	312-321	R.HYEGSTVPEK.K	
48	1	637.8000	-35.13	2	7.2	55.5	1	312-322	R.HYEGSTVPEK.T	
429	1	1087.0000	430.32	2	17.5	88.4	0	326-345	K.SPVGVPILNEHTFCAGMSK.Y	Carbamidomethyl: 15
388	1	1094.5000	-27.32	2	16.5	61.1	0	326-345	K.SPVGVPILNEHTFCAGMSK.Y	Carbamidomethyl: 15; Oxidation: 18
352	2	673.4000	109.20	2	15.4	91.4	0	380-391	K.SCAVAEYGVYK.V	Carbamidomethyl: 2
390	2	602.3000	-36.60	2	16.5	72.4	0	392-401	K.VTSIQDWWQK.T	

Protein 4: Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3

Accession: MUC5A_HUMAN **Score:** 370.0
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 526.3
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 6.6
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 1.9
No. of unique Peptides: 8

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
176	1	573.8000	15.49	2	10.7	34.7	0	125-135	R.SQESAAPTLR.V	
73	1	450.8000	114.22	2	8.0	37.8	1	1783-1789	R.RPEEITR.V	
154	1	635.8000	20.46	2	10.1	41.5	0	4727-4738	R.CPAPVGCPEGAR.A	Carbamidomethyl: 1, 7
241	1	598.8000	-58.98	2	12.2	66.0	0	4861-4871	K.HQDGLVVVTK.K	
322	1	738.4000	88.71	2	14.5	27.1	0	4873-4885	K.ACPPLSCSLDEAR.M	Carbamidomethyl: 2, 7
311	1	894.9000	-54.84	2	14.0	93.0	0	4914-4929	R.SLIQQQGCSSSEPV.R.L	Carbamidomethyl: 9
240	1	739.7000	535.44	3	12.2	28.1	0	4935-4954	R.GNCGDSSSMYSLEGNTVEHR.C	Carbamidomethyl: 3; Oxidation: 9
123	1	577.3000	119.55	2	9.2	44.8	0	4955-4962	R.CQCCQELR.T	Carbamidomethyl: 1, 3, 4

Protein 10: IgGfc-binding protein OS=Homo sapiens GN=FCGBP PE=1 SV=3

Accession: FCGBP_HUMAN **Score:** 135.6
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 571.6
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 5.0
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 0.7
No. of unique Peptides: 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
644	1	717.4000	53.69	3	23.4	67.6	0	1922-1941	K.ALASYVAACQAAGVVIEDWR.A	Carbamidomethyl: 9
133	1	484.8000	116.70	2	9.4	41.6	0	2122-2130	R.GSQAVSYTR.S	
118	1	430.8000	126.66	2	9.1	30.1	0	4174-4182	R.ISVAQGASK.A	

7.1.4. Bande 4

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987110.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 09:00:04 GMT
Protein hits : [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
[ACTB_HUMAN](#) Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
[LAC1_HUMAN](#) Ig lambda-1 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC1 PE=1 SV=1
[IGKC_HUMAN](#) Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1
[HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
[K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
[IGJ_HUMAN](#) Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4
[IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
[LV302_HUMAN](#) Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[LV301_HUMAN](#) Ig lambda chain V-III region SH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[LAC7_HUMAN](#) Ig lambda-7 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGLC7 PE=1 SV=2
[1433Z_HUMAN](#) 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1
[KV402_HUMAN](#) Ig kappa chain V-IV region Len OS=Homo sapiens PE=1 SV=2
[PRDX4_HUMAN](#) Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1
[LV102_HUMAN](#) Ig lambda chain V-I region HA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[KV106_HUMAN](#) Ig kappa chain V-I region EU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[KV201_HUMAN](#) Ig kappa chain V-II region Cum OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[MUC5A_HUMAN](#) Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3
[HPT_HUMAN](#) Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
[LV109_HUMAN](#) Ig lambda chain V-I region EPS OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[LV403_HUMAN](#) Ig lambda chain V-IV region Hil OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[DHX9_HUMAN](#) ATP-dependent RNA helicase A OS=Homo sapiens GN=DHX9 PE=1 SV=4
[LV401_HUMAN](#) Ig lambda chain V-IV region Bau OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[SHRM3_HUMAN](#) Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2
[CLPB_HUMAN](#) Caseinolytic peptidase B protein homolog OS=Homo sapiens GN=CLPB PE=1 SV=1

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

Accession: K2C1_HUMAN **Score:** 506.6
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 66.0
Database Date: 2009-06-03 **pl:** 8.8
Sequence Coverage [%]: 20.2
No. of unique Peptides: 10

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
271	1	437.8000	106.76	2	14.0	34.2	0	66-74	R.SLVNLGGSK.S	
512	1	547.0000	76.55	3	20.5	24.1	1	186-199	K.SLNNQFASFIDKVR.F	
289	1	738.4000	5.05	2	14.5	58.4	0	200-211	R.FLEQQNQVLQTK.W	
192	1	500.3000	147.48	2	12.0	41.5	0	290-298	K.DVDGAYMTK.V	
618	1	651.9000	59.52	2	23.1	96.4	0	344-355	R.SLDLDSIIAEVK.A	
392	1	763.1000	507.23	3	17.2	24.1	1	367-386	K.AEAESLYQSKYEELQITAGR.H	
309	1	590.4000	162.88	2	15.1	77.3	0	377-386	K.YEELQITAGR.H	
206	1	517.3000	74.13	2	12.4	50.0	0	484-492	R.TLLEGEESR.M	
157	1	795.4000	97.91	3	11.0	62.8	0	519-549	R.GGGGGGYGSGSSYSGGGSYSGGGGGGGR.G	
37	1	546.8000	82.20	2	7.7	42.1	0	603-616	R.GSGGGSSGGSIGGR.G	

Protein 3: Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1

Accession: LAC2_HUMAN **Score:** 313.1
Database: SwissProt(SwissProt_2010x.fasta) **MW [kDa]:** 11.3
Database Date: 2010-09-02 **pl:** 7.7
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 63.2
No. of unique Peptides: 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
434	2	993.5000	-12.64	2	18.4	50.7	0	5-23	K.AAPSVTLFPPSSEELQANK.A	
55	1	495.8000	83.21	2	8.5	74.7	0	51-60	K.AGVETTTPSK.Q	
497	1	872.5000	76.74	2	20.2	56.4	0	66-80	K.YAASSYLSLTPEQWK.S	
129	1	856.4000	19.58	2	10.3	87.9	0	84-98	R.SYSCQVTHEGSTVEK.T	Carbamidomethyl: 4
100	1	432.7000	18.45	2	9.6	43.5	0	99-106	K.TVAPTECS.-	Carbamidomethyl: 7

Protein 7: Hemoglobin subunit beta - Homo sapiens (Human)

Accession: HBB_HUMAN **Score:** 200.2
Database: SwissProt(SwissProt_55.3.fasta) **MW [kDa]:** 16.0
Database Date: 2008-09-07 **pl:** 6.9
Sequence Coverage [%]: 21.8
No. of unique Peptides: 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
404	1	466.9000	292.15	2	17.5	45.0	0	10-18	K.SAVTALWGK.V	
313	1	657.9000	97.22	2	15.1	90.6	0	19-31	K.VNVDEVGGEALGR.L	
527	1	637.9000	52.64	2	20.8	64.6	0	32-41	R.LLVVYPWTQR.F	

7.1.5. Bande 5

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987111.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 09:00:31 GMT
Protein hits :

- [IGKC_HUMAN](#) Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1
- [IGJ_HUMAN](#) Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4
- [LAC1_HUMAN](#) Ig lambda-1 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC1 PE=1 SV=1
- [LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
- [KV118_HUMAN](#) Ig kappa chain V-I region WEA OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [KV302_HUMAN](#) Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
- [LV302_HUMAN](#) Ig lambda chain V-III region LOI OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [KV102_HUMAN](#) Ig kappa chain V-I region AU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [PRDX4_HUMAN](#) Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1
- [IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
- [K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
- [TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
- [KV201_HUMAN](#) Ig kappa chain V-II region Cum OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [KV106_HUMAN](#) Ig kappa chain V-I region EU OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [ACTB_HUMAN](#) Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1
- [GSTP1_HUMAN](#) Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2
- [KV309_HUMAN](#) Ig kappa chain V-III region VG (Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [KV401_HUMAN](#) Ig kappa chain V-IV region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGKV4-1 PE=4 SV=1
- [KV113_HUMAN](#) Ig kappa chain V-I region Lay OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
- [TRIPB_HUMAN](#) Thyroid receptor-interacting protein 11 OS=Homo sapiens GN=TRIP11 PE=1 SV=3
- [RTEL1_HUMAN](#) Regulator of telomere elongation helicase 1 OS=Homo sapiens GN=RTEL1 PE=1 SV=2
- [MANE1_HUMAN](#) Glycoprotein endo-alpha-1,2-mannosidase-like protein OS=Homo sapiens GN=MANEAL PE=2 SV=1
- [SHRM3_HUMAN](#) Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2
- [LV301_HUMAN](#) Ig lambda chain V-III region SH OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
- [PCD15_HUMAN](#) Protocadherin-15 OS=Homo sapiens GN=PCDH15 PE=1 SV=2
- [ATD3B_HUMAN](#) ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens GN=ATAD3B PE=1 SV=1

Protein 1: Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=1 SV=1

Accession: IGKC_HUMAN **Score:** 371.2
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 11.6
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 5.5
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 88.7
No. of unique Peptides: 7

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
592	2	649.3000	-72.64	3	21.4	48.5	0	1-18	-TVAAPSVFIFPPSDEQLK.S	
678	1	899.5000	54.20	2	23.5	51.9	0	19-34	K.SGTASVVCLLNNFYPR.E	Carbamidomethyl: 8
203	1	1068.4000	-82.36	2	11.8	77.4	0	42-61	K.VDNALQSGNSQESVTEQDSK.D	
467	1	751.9000	22.80	2	18.3	55.5	0	62-75	K.DSTYLSLSSTLTLSK.A	
214	1	714.3000	-91.15	3	12.2	27.9	1	81-99	K.HKVYACEVTHQGLSSPVTK.S	Carbamidomethyl: 6
277	1	938.5000	35.06	2	13.6	82.0	0	83-99	K.VYACEVTHQGLSSPVTK.S	Carbamidomethyl: 4
87	1	435.2000	41.01	2	8.9	28.0	1	100-106	K.SFNRGEC.-	Carbamidomethyl: 7

Protein 2: Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4

Accession: IGJ_HUMAN **Score:** 311.7
Database: SwissProt(SwissProt_2010x.fasta) **MW [kDa]:** 18.1
Database Date: 2010-09-02 **pI:** 5.0
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 28.3
No. of unique Peptides: 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
239	1	400.8000	131.12	2	12.7	60.1	0	28-34	R.IVLVDNK.C	
217	1	695.3000	-14.47	2	12.2	82.2	0	47-58	R.SSEDPNEDIVER.N	
382	1	641.3000	-28.77	2	16.2	63.4	0	83-92	R.FVYHLSDLCK.K	Carbamidomethyl: 9
336	1	705.4000	48.30	2	14.9	39.5	1	83-93	R.FVYHLSDLCKK.C	Carbamidomethyl: 9
477	1	829.4000	580.61	2	18.6	68.8	0	131-145	K.CYTAVVPLVYGGETK.M	Carbamidomethyl: 1

Protein 10: Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1

Accession: PRDX4_HUMAN **Score:** 107.8
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 30.5
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 5.8
Sequence Coverage [%]: 13.3
No. of unique Peptides: 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
542	1	489.0000	97.75	3	20.2	21.0	0	174-186	R.IPLLSDLTHQISK.D	
552	1	454.0000	136.57	3	20.5	32.4	1	201-212	R.GLFIIDDKGILR.Q	
456	1	613.4000	83.81	2	18.1	54.4	0	213-223	R.QITLNDLPVGR.S	

7.1.6. Bande 6

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987112.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 09:00:55 GMT
Protein hits : [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
[K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
[HPT_HUMAN](#) Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
[IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
[TFF2_HUMAN](#) Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
[KV302_HUMAN](#) Ig kappa chain V-III region SIE OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
[HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[GKN2_HUMAN](#) Gastrokeine-2 OS=Homo sapiens GN=GKN2 PE=1 SV=2
[LEG3_HUMAN](#) Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5
[PSMD1_HUMAN](#) 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 PE=1 SV=2
[HBA_HUMAN](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
[PRDX1_HUMAN](#) Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1
[IGJ_HUMAN](#) Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens GN=IGJ PE=1 SV=4
[PCD15_HUMAN](#) Protocadherin-15 OS=Homo sapiens GN=PCDH15 PE=1 SV=2

Protein 5: Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1

Accession: HPT_HUMAN **Score:** 326.1
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 45.2
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 6.1
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 13.1
No. of unique Peptides: 7

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
253	1	656.3000	-10.34	2	13.1	77.8	0	60-71	R.TEGDGVYTLNDK.K	
194	1	480.6000	58.39	3	11.4	33.2	1	60-72	R.TEGDGVYTLNDK.K	
111	1	408.8000	146.88	2	9.5	22.2	1	72-77	K.KQWINK.A	
239	1	570.3000	20.69	3	12.7	33.4	1	117-131	K.LRTEGDGVYTLNNEK.Q	
244	1	720.3000	-50.08	2	12.8	87.4	0	119-131	R.TEGDGVYTLNNEK.Q	
161	1	694.3000	-56.25	2	10.5	47.8	1	142-153	K.LPECEAVCGKPK.N	Carbamidomethyl: 4, 8
100	1	448.3000	131.94	2	9.1	27.7	0	154-161	K.NPANPVQR.I	

Protein 7: Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2

Accession: TFF2_HUMAN **Score:** 229.7
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 14.3
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 5.4
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 28.7
No. of unique Peptides: 6

10	20	30	40	50	60	70	80
MGRRDAQLLA	ALLVLGLCAL	AGSEKPSPCQ	CSRLSPHNRT	NCGFPGITSD	QCFDNGCCFD	SSVTGVPWCF	HPLPKQESDQ
90	100	110	120	130			
CVMEVSDRRN	CGYPGISPEE	CASRKCCFSN	FIFEVPWCF	PKSVEDCHY			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
165	1	799.8000	-30.87	2	10.7	73.5	0	76-88	K.QESDQCVMEVSDR.R	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
208	1	580.2000	-93.56	3	11.8	38.6	1	76-89	K.QESDQCVMEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6
141	1	585.6000	24.04	3	10.2	22.9	1	76-89	K.QESDQCVMEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
263	1	849.3000	522.67	2	13.4	42.6	0	90-104	R.NCGYPGISPEECASR.K	Carbamidomethyl: 2, 12
220	1	912.9000	-4.17	2	12.2	36.0	1	90-105	R.NCGYPGISPEECASR.C	Carbamidomethyl: 2, 12
144	1	455.2000	57.14	2	10.2	39.0	0	123-129	K.SVEDCHY.-	Carbamidomethyl: 5

Protein 12: Gastroke-2 OS=Homo sapiens GN=GKN2 PE=1 SV=2

Accession: GKN2_HUMAN **Score:** 55.8
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 20.5
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 7.8
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 14.1
No. of unique Peptides: 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
526	1	538.9000	180.11	2	20.4	28.1	0	120-128	K.YNPLESLIK.D	
117	1	567.3000	646.19	3	9.4	27.7	0	151-167	K.GEVVENTHNVGAGGCAK.A	Carbamidomethyl: 15

7.1.7. Bande 7

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987113.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 09:01:18 GMT
Protein hits :

- [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
- [K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
- [TFF2_HUMAN](#) Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
- [LEG3_HUMAN](#) Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5
- [IGHA1_HUMAN](#) Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2
- [TAGL_HUMAN](#) Transgelin OS=Homo sapiens GN=TAGLN PE=1 SV=4
- [HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
- [K2C6B_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5
- [K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
- [TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
- [AGR2_HUMAN](#) Anterior gradient protein 2 homolog OS=Homo sapiens GN=AGR2 PE=1 SV=1
- [PDIA3_HUMAN](#) Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4
- [F194B_HUMAN](#) Protein FAM194B OS=Homo sapiens GN=FAM194B PE=2 SV=1
- [PSMD1_HUMAN](#) 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 PE=1 SV=2
- [GCP4_HUMAN](#) Gamma-tubulin complex component 4 OS=Homo sapiens GN=TUBGCP4 PE=1 SV=1
- [ZN292_HUMAN](#) Zinc finger protein 292 OS=Homo sapiens GN=ZNF292 PE=1 SV=3

Protein 3: Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2

Accession: TFF2_HUMAN **Score:** 239.1
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 14.3
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 5.4
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 28.7
No. of unique Peptides: 6

10	20	30	40	50	60	70	80
MGRRDAQLLA	ALLVLGLCAL	AGSEKPSPCQ	CSRLSPHNRT	NCGFPGITSD	QCFDNGCCFD	SSVTGVPWCF	HPLPKQESDQ
90	100	110	120	130			
CVMEVSDRRN	CGYPGISPEE	CASRKCFSN	FIFEVPWCF	PKSVEDCHY			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
230	1	791.8000	-34.40	2	12.7	72.2	0	76-88	K.QESDQCVMVEVSDR.R	Carbamidomethyl: 6
161	1	799.8000	-30.87	2	10.6	74.4	0	76-88	K.QESDQCVMVEVSDR.R	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
201	1	580.2000	-93.56	3	11.7	39.2	1	76-89	K.QESDQCVMVEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6
254	1	848.8000	-66.36	2	13.4	61.6	0	90-104	R.NCGYPGISPEECASR.K	Carbamidomethyl: 2, 12
215	1	912.9000	-4.17	2	12.2	37.4	1	90-105	R.NCGYPGISPEECASR.K	Carbamidomethyl: 2, 12
130	1	455.2000	57.14	2	10.0	27.6	0	123-129	K.SVEDCHY.-	Carbamidomethyl: 5

Protein 4: Galectin-3 OS=Homo sapiens GN=LGALS3 PE=1 SV=5

Accession: LEG3_HUMAN **Score:** 216.5
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 26.1
Database Date: 2009-03-05 **pl:** 9.1
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 14.8
No. of unique Peptides: 4

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
423	1	547.7000	81.45	3	17.8	67.3	1	130-144	R.MLITILGTVKPNANR.I	
410	1	829.0000	27.86	2	17.5	31.5	1	130-144	R.MLITILGTVKPNANR.I	Oxidation: 1
312	1	637.4000	145.52	2	14.9	65.6	0	152-162	R.GNDVAFHFNPR.F	
349	1	662.9000	50.36	2	15.9	83.7	0	200-210	K.IQVLVEPDHFK.V	

Protein 6: Transgelin OS=Homo sapiens GN=TAGLN PE=1 SV=4

Accession: TAGL_HUMAN **Score:** 186.6
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 22.6
Database Date: 2009-06-03 **pl:** 9.4
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 18.4
No. of unique Peptides: 4

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
467	1	703.8000	139.49	3	19.3	73.5	1	30-47	R.LVEWIIQCGPDVGRPDR.G	Carbamidomethyl: 9
178	1	365.8000	200.91	2	11.0	42.5	0	58-64	K.NGVILSKL	
449	1	602.9000	79.42	2	18.7	51.0	0	129-140	R.TLMALGSLAVTK.N	
400	1	610.9000	82.54	2	17.3	70.6	0	129-140	R.TLMALGSLAVTK.N	Oxidation: 3

7.1.8. Bande 8

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987114.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 09:01:40 GMT
Protein hits : [HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[HPT_HUMAN](#) Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1
[HBD_HUMAN](#) Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2
[TFF2_HUMAN](#) Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
[LYSC_HUMAN](#) Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1
[LEG1_HUMAN](#) Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[ACTA_HUMAN](#) Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1
[HBA_HUMAN](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
[K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
[TAGL_HUMAN](#) Transgelin OS=Homo sapiens GN=TAGLN PE=1 SV=4
[PROF1_HUMAN](#) Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2
[GCP4_HUMAN](#) Gamma-tubulin complex component 4 OS=Homo sapiens GN=TUBGCP4 PE=1 SV=1
[TRY1_HUMAN](#) Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1
[AFF4_HUMAN](#) AF4/FMR2 family member 4 OS=Homo sapiens GN=AFF4 PE=1 SV=1
[LAC2_HUMAN](#) Ig lambda-2 chain C regions OS=Homo sapiens GN=IGLC2 PE=1 SV=1
[CBAA1_HUMAN](#) Calcium-binding atopy-related autoantigen 1 OS=Homo sapiens GN=CBARA1 PE=1 SV=1
[NUP54_HUMAN](#) Nucleoporin p54 OS=Homo sapiens GN=NUP54 PE=1 SV=2
[SHRM3_HUMAN](#) Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2
[TXND5_HUMAN](#) Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXND5 PE=1 SV=2
[ZN292_HUMAN](#) Zinc finger protein 292 OS=Homo sapiens GN=ZNF292 PE=1 SV=3
[PCD15_HUMAN](#) Protocadherin-15 OS=Homo sapiens GN=PCDH15 PE=1 SV=2
[NUCB1_HUMAN](#) Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4

Protein 4: Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2

Accession: TFF2_HUMAN **Score:** 196.9
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 14.3
Database Date: 2009-06-03 **pl:** 5.4
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 28.7
No. of unique Peptides: 6

10	20	30	40	50	60	70	80
MGRRDAQLLA	ALLVLGLCAL	AGSEKPSPCQ	CSRLSPHNRT	NCGFPGITSD	QCFDNGCCFD	SSVTGVPWCF	HPLPKQESDQ
90	100	110	120	130			
CVMEVSDRRN	CGYPGISPEE	CASRKCFSN	FIFEVPWCF	PKSVEDCHY			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
140	1	799.8000	-30.87	2	10.5	51.0	0	76-88	K.QESDQCVMVEVSDR.R	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
178	1	580.5000	423.46	3	11.6	26.6	1	76-89	K.QESDQCVMVEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6
119	1	585.6000	24.04	3	10.0	36.2	1	76-89	K.QESDQCVMVEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
240	1	848.8000	-66.36	2	13.3	56.4	0	90-104	R.NCGYPGISPEECASR.K	Carbamidomethyl: 2, 12
200	1	912.9000	-4.17	2	12.2	29.0	1	90-105	R.NCGYPGISPEECASR.C	Carbamidomethyl: 2, 12
122	1	455.2000	57.14	2	10.1	25.4	0	123-129	K.SVEDCHY.-	Carbamidomethyl: 5

Protein 5: Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1

Accession: LYSC_HUMAN **Score:** 134.4
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 16.5
Database Date: 2009-03-05 **pl:** 10.6
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 27.0
No. of unique Peptides: 4

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
97	1	414.2000	25.48	2	9.5	35.0	0	33-39	R.LGMDGYR.G	Oxidation: 3
588	1	682.4000	78.14	2	22.7	23.0	0	40-51	R.GISLANWMCLAK.W	Carbamidomethyl: 9
47	1	491.2000	-46.54	2	8.1	22.3	0	60-68	R.ATNYNAGDR.S	
427	1	701.4000	793.51	2	18.4	54.0	0	69-80	R.STDYGFQINSR.Y	

Protein 6: Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2

Accession: LEG1_HUMAN **Score:** 117.0
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 14.7
Database Date: 2009-03-05 **pl:** 5.2
Sequence Coverage [%]: 20.7
No. of unique Peptides: 3

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
41	1	521.3000	23.01	2	7.9	27.9	1	20-29	R.VRGEVAPDAK.S	
401	1	439.3000	89.40	2	17.7	47.5	0	30-37	K.SFVLNLGK.D	
162	1	538.7000	-76.88	2	11.1	41.6	0	65-74	K.DGGAWGTEQRE	

7.1.9. Bande 9

Search title : HCT_SP_Hum_Tryp
MS data file : 5066549580987115.mgf
Database : SwissProt 2010x (519348 sequences; 183273162 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20359 sequences)
Timestamp : 26 Oct 2010 at 09:02:00 GMT
Protein hits : [K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[HBA_HUMAN](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
[K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
[K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
[THIO_HUMAN](#) Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3
[HBD_HUMAN](#) Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens GN=HBD PE=1 SV=2
[KRT81_HUMAN](#) Keratin, type II cuticular Hb1 OS=Homo sapiens GN=KRT81 PE=1 SV=2
[LRC15_HUMAN](#) Leucine-rich repeat-containing protein 15 OS=Homo sapiens GN=LRR15 PE=1 SV=1
[K2C5_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3
[K1C14_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[K1H1_HUMAN](#) Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Homo sapiens GN=KRT31 PE=1 SV=3
[FIBA_HUMAN](#) Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
[TFF1_HUMAN](#) Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1
[LEG1_HUMAN](#) Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2
[DCD_HUMAN](#) Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2
[PKP1_HUMAN](#) Plakophilin-1 OS=Homo sapiens GN=PKP1 PE=1 SV=2
[PSMD1_HUMAN](#) 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 OS=Homo sapiens GN=PSMD1 PE=1 SV=2
[TFF2_HUMAN](#) Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
[ACTA_HUMAN](#) Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1
[SHRM3_HUMAN](#) Protein Shroom3 OS=Homo sapiens GN=SHROOM3 PE=1 SV=2
[NUP54_HUMAN](#) Nucleoporin p54 OS=Homo sapiens GN=NUP54 PE=1 SV=2
[RTEL1_HUMAN](#) Regulator of telomere elongation helicase 1 OS=Homo sapiens GN=RTEL1 PE=1 SV=2
[NUCB1_HUMAN](#) Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4

Protein 7: Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TXN PE=1 SV=3

Accession: THIO_HUMAN **Score:** 256.8
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 11.7
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 4.7
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 49.5
No. of unique Peptides: 5

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
382	1	668.8000	-33.80	2	17.0	107.8	0	9-21	K.TAFQEALDAAGDK.L	
335	1	488.6000	9.49	3	15.7	22.5	1	37-48	K.MIKPFFHSLSEK.Y	
462	1	611.3000	40.58	2	19.4	36.4	0	73-81	K.CMPTFQFFK.K	Carbamidomethyl: 1; Oxidation: 2
110	1	454.7000	-59.92	2	10.0	43.0	0	86-94	K.VGEFSGANK.E	
492	1	501.4000	240.75	2	20.2	48.2	0	97-105	K.LEATINELV.-	

Protein 16: Trefoil factor 1 OS=Homo sapiens GN=TFF1 PE=1 SV=1

Accession: TFF1_HUMAN **Score:** 52.2
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 9.1
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 4.1
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 10.7
No. of unique Peptides: 1

10	20	30	40	50	60	70	80
MATMENKVIC	ALVLVSM LAL	GTLAEAQ TET	CTVAPRERQ N	CGFPGVTPSQ	CANKGCCFDD	TVRGVPWCFY	PNTIDVPPEE
90							
ECEF							

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
203	1	565.2000	-41.91	2	12.3	52.2	0	55-63	K.GCCFDDTVR.G	Carbamidomethyl: 2, 3

Protein 17: Galectin-1 OS=Homo sapiens GN=LGALS1 PE=1 SV=2

Accession: LEG1_HUMAN **Score:** 51.3
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 14.7
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 5.2
Sequence Coverage [%]: 13.3
No. of unique Peptides: 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
48	1	521.3000	23.01	2	8.0	20.9	1	20-29	R.VRGEVAPDAK.S	
413	1	439.3000	89.40	2	17.8	30.4	0	30-37	K.SFVLNLGK.D	

7.2. Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen der gereinigten Probe 343M_c (Tascheninhalt des Agarosegels)

7.2.1. Bande 1

Search title : HCT_SP_Hum_semiTryp
MS data file : 5066549580994418.mgf
Database : SwissProt 2011 (525207 sequences; 185522689 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20326 sequences)
Timestamp : 16 Mar 2011 at 09:43:11 GMT
Protein hits : [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[K22E_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2
[MUC5A_HUMAN](#) Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3
[MUC6_HUMAN](#) Mucin-6 OS=Homo sapiens GN=MUC6 PE=1 SV=2
[K1C16_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4
[K2C6B_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5
[K2C5_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3
[MUC1_HUMAN](#) Mucin-1 OS=Homo sapiens GN=MUC1 PE=1 SV=3
[NIBL2_HUMAN](#) Niban-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=FAM129C PE=1 SV=2

Protein 5: Mucin-5AC (Fragments) OS=Homo sapiens GN=MUC5AC PE=1 SV=3

Accession: MUC5A_HUMAN **Score:** 481.9
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 526.3
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 6.6
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 2.8
No. of unique Peptides: 12

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
526	1	639.3000	-49.36	2	16.5	29.8	0	230-240	K.LTPMEFGNLQK.M	
685	1	512.3000	5.25	2	20.3	48.9	0	966-974	K.IFLGGFELK.L	
534	1	770.3000	-64.54	2	16.7	90.5	0	1401-1414	R.GTDSGDFDTLENLR.A	
543	1	840.4000	-16.82	2	16.9	49.2	0	1655-1667	K.NQLPPICNYEIR.I	Carbamidomethyl: 7
609	1	586.6000	-3.62	3	18.4	24.9	0	1752-1767	K.WFDVDFPSPGPHGGDK.E	
443	1	688.3000	422.47	3	14.6	35.9	0	1796-1813	K.SHPEVSIEHLGQVVQCSR.E	Carbamidomethyl: 16
208	1	531.2000	-101.95	2	9.5	49.9	0	1821-1829	R.NDQQGPFK.M	
394	1	542.7000	-90.92	2	13.6	67.1	0	1830-1837	K.MCLNVEVR.V	Carbamidomethyl: 2
283	1	550.7000	-84.98	2	11.1	77.6	0	1830-1837	K.MCLNVEVR.V	Carbamidomethyl: 2; Oxidation: 1
187	1	503.7000	-76.32	2	9.2	50.4	0	2211-2218	R.VLCCETPK.G	Carbamidomethyl: 3, 4
456	1	755.0000	394.10	3	14.9	47.1	0	2697-2716	R.AESHPEVSIEHLGQVVQCSR.E	Carbamidomethyl: 18
414	1	906.5000	159.65	2	13.9	22.4	0	4979-4993	R.AFSYTEVEECGMGR.R	Carbamidomethyl: 10, 12; Oxidation: 13

Protein 6: Mucin-6 OS=Homo sapiens GN=MUC6 PE=1 SV=2

Accession: MUC6_HUMAN **Score:** 427.2
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 252.0
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 7.1
Modification(s): Carbamidomethyl **Sequence Coverage [%]:** 4.8
No. of unique Peptides: 10

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
511	1	734.0000	-22.01	3	16.2	22.3	0	206-224	K.LDDPGEICTFQDIPSTHVR.Q	Carbamidomethyl: 8
726	1	493.8000	36.13	2	21.3	26.7	0	646-653	R.GVLLWGWR.S	
266	1	511.2000	-118.14	2	10.8	34.0	0	759-767	M.FLASCQAPK.T	Carbamidomethyl: 5
427	1	940.4000	-57.07	2	14.3	68.8	0	909-925	K.ILTENVICGNSGVTCSSRA	Carbamidomethyl: 8, 15
641	1	812.8000	-140.85	2	19.3	71.5	0	1018-1031	R.YVASSELELVNSWK.E	
602	1	731.3000	-113.25	2	18.2	61.3	0	1019-1031	Y.VASSELELVNSWK.E	
650	1	864.3000	-123.22	2	19.5	78.0	0	1038-1052	G.DVSFVTDCSLNAFR.R	Carbamidomethyl: 9
280	1	580.5000	-171.39	3	11.1	23.5	0	1060-1074	K.CSVINSQTFATCHSK.V	Carbamidomethyl: 1, 12
462	1	523.9000	-42.25	3	15.1	37.5	0	1075-1086	K.VYHLPYYEACVR.D	Carbamidomethyl: 10
387	1	446.2000	-24.01	2	13.4	28.4	0	1115-1121	K.GVCVDWR.T	Carbamidomethyl: 3

Protein 10: Mucin-1 OS=Homo sapiens GN=MUC1 PE=1 SV=3

Accession: MUC1_HUMAN **Score:** 122.9
Database: SwissProt(SwissProt_2010x.fasta) **MW [kDa]:** 122.0
Database Date: 2010-09-02 **pI:** 7.0
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 1.8
No. of unique Peptides: 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
665	1	701.8000	-70.92	2	19.9	71.4	0	1072-1082	R.DISEMFLQIYK.Q	Oxidation: 5
580	1	567.3000	-34.03	2	17.9	52.7	0	1083-1093	K.QGGFLGLSNIK.F	

7.2.2. Bande 2

Search title : HCT_SP_Hum_semiTryp
MS data file : 5066549580994419.mgf
Database : SwissProt 2011 (525207 sequences; 185522689 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20326 sequences)
Timestamp : 16 Mar 2011 at 09:44:04 GMT
Protein hits : [K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[TFF2_HUMAN](#) Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[MUC19_HUMAN](#) Mucin-19 OS=Homo sapiens GN=MUC19 PE=1 SV=2
[K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6

Protein 2: Trefoil factor 2 OS=Homo sapiens GN=TFF2 PE=1 SV=2

Accession: TFF2_HUMAN **Score:** 166.6
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 14.3
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 5.4
Modification(s): Carbamidomethyl, Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 27.9
No. of unique Peptides: 6

10	20	30	40	50	60	70	80
MGRRDAQLLA	ALLVLGLCAL	AGSEKPSPCQ	CSRLSPHNRT	NCGFPGITSD	QCFDNGCCFD	SSVTGVPWCF	HPLPKQESDQ
90	100	110	120	130			
CVMEVSDRRN	CGYPGISPEE	CASRKCCFSN	FIFEVPWCF	PKSVEDCHY			

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
215	1	791.7000	-160.69	2	11.6	87.8	0	76-88	K.QESDQCVMVEVSDR.R	Carbamidomethyl: 6
144	1	800.2000	469.23	2	9.7	74.9	0	76-88	K.QESDQCVMVEVSDR.R	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
188	1	580.2000	-93.56	3	11.0	29.8	1	76-89	K.QESDQCVMVEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6
112	1	585.5000	-146.73	3	9.1	31.6	1	76-89	K.QESDQCVMVEVSDRR.N	Carbamidomethyl: 6; Oxidation: 8
301	1	849.3000	522.67	2	13.4	23.8	0	90-104	R.NCGYPGISPEECASR.K	Carbamidomethyl: 2, 12
130	1	455.2000	57.14	2	9.4	27.1	0	123-129	K.SVEDCHY.-	Carbamidomethyl: 5

Protein 4: Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2

Accession: TRY3_HUMAN **Score:** 65.9
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 32.5
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 8.8
Sequence Coverage [%]: 3.3
No. of unique Peptides: 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
485	1	588.3000	-35.11	2	17.6	67.0	0	160-169	D.TLNDIMLIK.L	

Protein 5: Mucin-19 OS=Homo sapiens GN=MUC19 PE=1 SV=2

Accession: MUC19_HUMAN **Score:** 52.9
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 597.8
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 4.8
Sequence Coverage [%]: 0.3
No. of unique Peptides: 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
233	1	467.3000	94.93	2	12.0	21.2	0	750-757	K.IIVAFQDQ.N	
408	1	523.2000	-198.08	2	15.9	40.7	0	5273-5283	V.TGITGLSAGLR.G	

7.2.3. Bande 3

Search title : HCT_SP_Hum_semiTryp
MS data file : 5066549580994420.mgf
Database : SwissProt 2011 (525207 sequences; 185522689 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (20326 sequences)
Timestamp : 16 Mar 2011 at 09:48:18 GMT
Protein hits : [HBB_HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2
[K2C1_HUMAN](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6
[K1C9_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3
[HBA_HUMAN](#) Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2
[DCD_HUMAN](#) Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2
[K1C10_HUMAN](#) Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6
[S10A7_HUMAN](#) Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4
[LYSC_HUMAN](#) Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1
[TRY3_HUMAN](#) Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2
[S10A9_HUMAN](#) Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1
[DBPA_HUMAN](#) DNA-binding protein A OS=Homo sapiens GN=CSDA PE=1 SV=4
[S10A8_HUMAN](#) Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1
[RL40_HUMAN](#) Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 OS=Homo sapiens GN=UBA52 PE=1 SV=2

Protein 5: Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2

Accession: DCD_HUMAN **Score:** 86.1
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 11.3
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 6.1
Sequence Coverage [%]: 12.7
No. of unique Peptides: 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
337	1	730.3000	-117.16	2	15.2	33.9	1	83-96	K.LGKDAVEDLESVGK.G	
346	1	581.3000	25.25	2	15.4	52.2	0	86-96	K.DAVEDLESVGK.G	

Protein 7: Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4

Accession: S10A7_HUMAN **Score:** 68.5
Database: SwissProt(SwissProt_57.3.fasta) **MW [kDa]:** 11.5
Database Date: 2009-06-03 **pI:** 6.4
Sequence Coverage [%]: 10.9
No. of unique Peptides: 1

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
496	1	628.8000	-18.30	2	18.9	69.7	0	51-61	K.GTNYLADVFEK.K	

Protein 8: Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1

Accession: LYSC_HUMAN **Score:** 58.7
Database: SwissProt(SwissProt_56.9.fasta) **MW [kDa]:** 16.5
Database Date: 2009-03-05 **pI:** 10.6
Modification(s): Oxidation **Sequence Coverage [%]:** 12.8
No. of unique Peptides: 2

Cmpd.	No. of Cmpds.	m/z meas.	Δ m/z [ppm]	z	Rt [min]	Score	P	Range	Sequence	Modification
94	1	414.2000	25.48	2	8.9	21.7	0	33-39	R.LGMDGYR.G	Oxidation: 3
438	1	701.4000	793.51	2	17.5	39.4	0	69-80	R.STDYGIFQINSR.Y	

8. Ehrenerklärung

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

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

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

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

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

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



Magdeburg, den 18.01.2022

Hubert Ragge