

Charakterisierung verschiedener Formen von
TFF3 im humanen Kolon, der Lunge und im
Speichel: Bildung eines Komplexes mit IgG Fc
Binding Protein (FCGBP) und seine mögliche
Rolle bei der angeborenen mukosalen
Immunabwehr

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 M.Sc. Till Houben

geb. am 04.11.1988 in Neuruppin

Gutachter: Prof. Dr. Werner Hoffmann
Prof. Dr. Markus Muttenthaler

eingereicht am: 18.03.2024

verteidigt am: 23.04.2025

Gender-Disclaimer

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich - sofern nicht anders kenntlich gemacht - auf alle Geschlechter.

Charakterisierung verschiedener Formen von TFF3 im humanen Kolon, der Lunge und im Speichel: Bildung eines Komplexes mit IgG Fc Binding Protein (FCGBP) und seine mögliche Rolle bei der angeborenen mukosalen Immunabwehr
Till Houben

Zusammenfassung

TFF3 ist ein 59 Aminosäuren langes, sezerniertes Polypeptid und gehört zur Trefoil-Factor-Familie (TFF). Ungewöhnlich ist die Anzahl von 7 Cysteinresten, von denen 6 intramolekulare Disulfidbrücken die namensgebende TFF-Domäne bilden. Durch das C-terminale, 7. Cystein ist TFF3 in der Lage Homodimere und Heteromere zu bilden. TFF3 spielt eine Rolle bei mukosalen Schutz- und Reparaturmechanismen.

Ziel dieser Arbeit war es, die TFF3-Formen im humanen Kolon, Lunge, und Speichel zu analysieren und zu vergleichen. Dazu wurden Proteinextrakte von humanem Kolongewebe, Bronchialgewebe, bronchoalveolaere Lavage, Bronchialsekret und Speichel durch Größenausschlusschromatographie, verschiedene Gelelektrophoresesysteme und anschließende Westernblot-Analysen charakterisiert. Im Rahmen einer Kooperation wurden Proteomanalysen von TFF3 sowie Bindungsstudien mit ¹²⁵I-TFF3 durchgeführt.

In allen untersuchten Proben lag TFF3 als hochmolekulares TFF3-FCGBP und niedermolekulares TFF3-Homodimer und -Monomer vor. Auch in Kolontumoren wurden ähnliche TFF3-Formen gefunden. Bei den Analysen konnte keine Wechselwirkung von TFF3 oder TFF3-FCGBP mit Muzinen oder DMBT1 beobachtet werden. Die Proteomanalysen zeigten N- und C-terminale Verkürzungen des reduzierten TFF3-Monomers. Diese Verkürzung werden vermutlich durch Proteasen, wie Elastase in der Lunge oder Chymotrypsin im Darm verursacht.

Durch ein stufenweises Extraktionsprotokoll konnten auswaschbare Proteine (E0) von löslichen Proteinen (E1) und schwerlöslichen Proteinen (E2) getrennt werden. Die Analyse von TFF3-FCGBP in diesen Extrakten deutet auf eine geringere Löslichkeit von FCGBP in Abhängigkeit vom TFF3-Gehalt hin. Somit ist TFF3 vermutlich an der Bildung einer schwerlöslichen Matrix im Mukus beteiligt, was es möglicherweise zu einem wichtigen Faktor für angeborenen mukosale Immunabwehr macht.

Characterization of different forms of TFF3 in the human colon, lung and saliva:
formation of a complex with IgG Fc binding protein (FCGBP) and its possible
role in innate mucosal immune defense

Till Houben

Abstract

TFF3 is a 59 amino acid long, secreted polypeptide and belongs to the trefoil factor family (TFF). Unusual is the number of 7 cysteines, of which 6 form the intramolecular TFF domain that gives it its name. Via the 7th cysteine, TFF3 is able to form homodimers and heteromers. TFF3 plays a role in mucosal protection and repair mechanisms.

The aim of this work was to analyze and compare the TFF3 forms in human colon, lung, and saliva. For this purpose, protein extracts from human colon tissue, bronchial tissue, BAL fluid, bronchial secretions and saliva were analyzed by size exclusion chromatography, various gel electrophoreses and subsequent Western blotting. As part of a cooperation, proteome analyses of TFF3 and binding studies with ^{125}I -TFF3 were carried out.

In all samples analyzed, TFF3 was present as high molecular weight TFF3-FCGBP and low molecular weight TFF3-homodimer and monomer. Also in colon tumors similar TFF3-forms were found. No interaction of TFF3 or TFF3-FCGBP with mucins or DMBT1 was observed in the analyses. The proteomic analyses showed N- and C-terminal truncations of the reduced TFF3-monomer. This shortening is probably caused by proteases, such as elastase in the lung or chymotrypsin in the intestine. A stepwise extraction protocol was used to separate easy soluble proteins (E0) from soluble proteins (E1) and poorly soluble proteins (E2). The analysis of TFF3-FCGBP in these extracts indicates a low solubility of FCGBP depending on the TFF3 content. Thus, TFF3 is probably involved in the formation of a heavy soluble matrix in the mucus, making it an important factor for innate mucosal immune defense.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Mukosa	1
1.1.1 Gastrointestinaltrakt	1
1.1.2 Mundhöhle	3
1.1.3 Lunge	3
1.2 Mukus	4
1.2.1 Muzine	5
1.2.2 Trefoil Factor Family 3 (TFF3)	7
1.2.3 IgG Fc binding Protein (FCGBP)	13
1.3 Zielstellung	16
2 Ergebnisse	17
2.1 Kolon	17
2.1.1 TFF3 im humanen Kolon	18
2.1.2 Stufenweise Extraktion von humanem Kolongewebe	22
2.1.3 Hochmolekulares TFF3 im humanen Kolon	27
2.1.4 Größe des TFF3-FCGBP-Hetero(di)mers im humanen Kolon	30
2.1.5 TRIzol-Extraktion von humanem Kolongewebe	33
2.1.6 Proteomanalyse von niedermolekularem TFF3 aus dem hu- manen Kolon	36
2.1.7 TFF3 im Kolontumorgewebe	38
2.2 Speichel	42
2.2.1 Hochmolekulares TFF3-FCGBP in humanem Speichel	45
2.2.2 Niedermolekulares TFF3 in humanem Speichel	48
2.3 Lunge	50
2.4 Bindungsstudien von TFF3 in verschiedenen humanen Mukuspräparationen	56
3 Diskussion	59
3.1 Niedermolekulares TFF3	60
3.1.1 Potenzielle Lektin-Aktivität von TFF3	63
3.2 Hochmolekulares TFF3	66
3.3 TFF3 in humanen Kolon-Tumoren	70
3.4 Zustandekommen der verschiedenen TFF3-Formen	70
3.5 Mögliche Funktionen der verschiedenen TFF3-Formen	72
3.6 Zusammenfassung	72
4 Material	74
4.1 Gewebe	74
4.2 Antiseren	75
4.2.1 Affinitätsreinigung von Antiseren	75

4.3	Lektine	77
4.4	Peptide	77
4.5	Software und Datenbanken zur Datenanalyse	77
5	Methoden	78
5.1	Gewebeextraktion	78
5.1.1	Humanes Kolon	78
5.1.2	Humane Lunge	80
5.1.3	Humaner Speichel	80
5.2	Proteinreinigung über Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)	81
5.2.1	Größenausschlusschromatographie (SEC)	81
5.2.2	Ionenaustauschchromatographie	82
5.3	SDS-PAGE nach Lämmli	83
5.4	Western-Blot-Analyse	85
5.4.1	Ponceau S Färbung	85
5.4.2	Immunologische Detektion von Proteinen	86
5.4.3	Kompetitive Inhibition	86
5.4.4	'Stripping' von Membranen	87
5.4.5	Nachweis mit Hilfe von Lektinen	87
5.4.6	Silberfärbung von Proteinen	87
5.4.7	Färbung mit Hilfe der Periodsäure-Schiff-Reaktion	88
5.4.8	Coomassie-Färbung von Proteinen	89
5.4.9	Entsalzungssäulen	89
5.5	Agarose-Gelelektrophorese	90
5.5.1	Vergleich Größenstandard auf Agarose-Gel	91
5.6	Native Gelelektrophorese (Blue Native), 2D Gelelektrophorese	91
5.7	Verdau mit verschiedenen Glycosidasen	92
5.8	Nachwies von Thiolen	93
5.9	Nachweis von Sulfensäuren	93
5.10	Bindungsstudien mit ^{125}I -TFF3	94
6	Anhang	96

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht Vorkommen von Muzinen und weiterer sezernierter Proteine	7
2	TFF3-Vorkommen im humanen Körper	9
3	Biologische Aktivität von TFF3	11
4	relative TFF3-Verteilung im Kolon nach Precellys Extraktion . . .	21
5	relative TFF3-Verteilung in den Extrakten E0 und E1	27
6	Berechnete Größe von TFF3-FCGBP	32
7	relative TFF3-Verteilung Kolontumoren	40
8	relative TFF3-Verteilung im Speichel	42
9	Übersicht verwendeter Primär- und Sekundärantikörper	75
10	verwendete Lektine	77
11	verwendete TFF3-Peptide	77
12	Wasch- und Equilibrierungsschritte der Anionenaustauschersäule, SV - Säulenvolumen	82
13	Mischungsverhältnisse verschieden konzentrierter SDS-PAGE Gele	84
14	verwendete Markerproteine	84
15	Relative TFF3-Verteilung im Kolon	96

Abbildungsverzeichnis

1	Epithel mit Mukus	2
2	Aufbau eines Muzins	6
3	TFF3	8
4	mögliche TFF3-Rezeptoraktivität im GI	12
5	Schematische Darstellung von FCGBP	14
6	Vergleich TFF3-Antiseren	18
7	2D SDS-PAGE nach Blue Native PAGE eines Kolonextrakts . . .	19
8	SEC eines Kolongewebeextrakts	20
9	Elution verschiedener TFF3-Entitäten aus einem Coomassie Gel .	22
10	Extraktionsexperiment	23
11	SEC nach stufenweiser Extraktion von Kolongewebe	25
12	Analyse von hochmolekularem TFF3 auf FCGBP, DMBT1 (GP340) und MUC2	28
13	Ionenaustauschchromatographie von hochmolekularem TFF3 . . .	29
14	Abschätzung der Größe des TFF3-FCGBP Heteromers	31
15	Schematische TRIzol-Extraktion	33
16	S75HL von Kolongewebe nach TRIzol-Extraktion	34
17	SEC von Hochmolekularem TFF3	36
18	Proteomanalyse von niedermolekularem TFF3	38
19	SEC von Kolongewebe und dazugehörigem Kolontumor	39
20	Vergleich von Tumor- und Normal-Gewebe des Kolon	41
21	SEC von humanem Speichel	43
22	TFF3 im Speichel verschiedener Individuen	44
23	Mukus-assoziierte Proteine im Speichel nach SEC	46
24	Ionenaustauschchromatographie von hochmolekularem TFF3 im Speichel	47
25	Proteomanalyse von hochmolekularem Speichel	48
26	Proteomanalyse von gereinigtem niedermolekularem TFF3 . . .	49
27	SEC von humanem Lungengewebe	50
28	SEC von BAL-Flüssigkeit	52
29	SEC von humanem Bronchialsekret	53
30	Übersicht TFF3 in Bronchialgewebe, Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit	54
31	Mukus-assoziierte Proteine in BAL-Flüssigkeit	54
32	Hochmolekulares TFF3 der Lunge im Agarosegel	55
33	TFF3-Monomer vs. verkürztes Monomer	56
34	Bindungsstudie mit ¹²⁵ I-TFF3	57
35	Deglykosylierung von Mukusextrakten	58
36	Übersicht verschiedener TFF3-Formen nach SEC	60
37	Peptide Cutter Analyse von TFF3	61

38	3D Struktur TFF3	65
39	Trennung der Mukusschichten durch stufenweise Extraktion	67
40	Vergleich von hochmolekularen Fraktionen	69
41	Aufbau von Semidry- und Kapillarblot	85
42	Nachweis von Thiolen mit PEG-Maleimid	93
43	Nachweis von Sulfensäuren mit Dimedon	93
44	Vergleich von TFF3 und FCCBP	97
45	Mischexperiment mit ^{125}I -TFFs	97

Abkürzungsverzeichnis

- A4GNT** α -1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase
- AgGE** Agarosegelektrophorese
- AP** Aspartatproteasen
- APS** Ammoniumperoxodisulfat
- β ME** β -Mercaptoethanol
- BAL** bronchoalveolare Lavage
- BS** Bronchialsekret
- BSA** Bovines Serumalbumin
- C8** Domäne mit 8 Cysteinen
- CLCA1** Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1
- CXCR** Chemokinrezeptor
- DSS** Dextran Sulfate Natrium
- DMBT1** *Deleted In Malignant Brain Tumors* 1
- EMT** Epithelial-mesenchymale Transition
- EP** Extraktionspuffer
- ER** endoplasmatisches Retikulum
- ERK** *Extracellular-signal Regulated Kinase*
- FCGBP** IgG Fc Binding Protein
- FPLC** *Fast Protein Liquid Chromatography / Schnelle Proteinflüssigchromatographie*
- GI** gastrointestinal
- GlcNAc- α -1,4-Gal** N-Acetylglucosamin- α -1,4-Galactose
- GSAII** *Griffonia simplicifolia* agglutinin II
- GuHCl** Guanidinium Hydrochlorid
- HM** hochmolekular
- IBD** *Inflammatory Bowel Diseases*
- IHC** Immunhistochemie
- IL** Interleukin

IMMC Institut für Molekularbiologie und Medizinische Chemie

IP isoelektrischer Punkt

LINGO *Leucine Rich Repeat Receptor and Nogo-interacting Protein*

MAP *Mitogen Activated Protein Kinase*

MMPs Metalloproteasen

MUC Muzin

N-AcGlc N-Acetyl-D-Glucosamin

NaN₃ Natriumazid

NGS *Normal Goat Serum*

NM niedermolekular

NR nicht reduzierend

NRPP nicht reduzierender Probenpuffer

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAS *Periodic Acid Schiff (Staining)*/ Perjodsäure-Schiff-(Reaktion)

PAR Protease activated receptor

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PEG Polyethylenglycol

PTS Prolin-, Threonin-, Serin-reiche Domäne

rhTFF3 rekombinantes humanes TFF3

R reduzierend

RPP reduzierender Probenpuffer

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

SEC Größenausschlusschromatographie

SV Säulenvolumen

TEMED *N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin*

TFF *Trefoil Factor Family*

TIL Trypsin Inhibitor ähnliche Domäne

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VE-Wasser vollentsalztes Wasser

vWF von Willebrand Faktor

α -GlcNAc N-Acetylglucosamin

1 Einleitung

1.1 Mukosa

Die inneren Organe des menschlichen Körpers schützen sich durch Schleimhäute (*Mucosae*) vor den Folgen von eingedrungen Fremdkörpern und schädlichen Substanzen. Organspezifisch bestehen Mukosen aus einer ein- oder mehrschichtigen, flach- bis hochprismatischen Epithelschicht (*Lamina epithelialis mucosae*), der darunter liegenden Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*), die von der epithelialen Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*) abgeschlossen wird. Die Mukosen sitzen auf der *Tela submucosa* und dienen der Abgrenzung des Gewebes zum Lumen und dem Schutz des darunter liegenden Gewebes. Viele Mukosen realisieren hauptsächlich Aufgaben wie Sekretions- und Resorptionsprozesse ⁽¹⁾. In dieser Arbeit wurden die Schleimhäute und Sekrete von Dünndarm, Kolon, Speichel und Lunge untersucht. Dementsprechend wird im Folgenden auf die Mukosen dieser Organe näher eingegangen.

1.1.1 Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt (GI Trakt) reicht von der Speiseröhre (*Ösophagus*) über den Magen, Dünndarm, Dickdarm (*Colon*) bis zum Anus und besitzt die ange- schlossenen Drüsen *Pankreas* und Leber mit Gallenblase. Nachfolgend werden nur der Dünndarm und das Kolon näher betrachtet.

Der Dünndarm, bestehend aus *Duodenum*, *Jejunum* und *Ileum*, geht in den Dickdarm (*Colon ascendens*, *transversum*, *descendens* und *sigmoideum*) über. Im Dünndarm bildet das Epithel Krypten, die tief in der Bindegewebsschicht liegen, und der Regeneration und des Schutzes des Epithels dienen. Die fingerförmigen Ausstülpungen des Epitels werden Zotten genannt und dienen der Oberflächenvergrößerung, wodurch die Nährstoffresorption verbessert wird. Der Dickdarm besitzt nur Krypten (Abb. 1), da er in erster Linie den verbleibenden Speisebrei speichert und durch Wasserentzug eindickt. Abgesehen von kurzkettigen Fettsäuren aus meist bakterieller Gärung, nimmt der Dickdarm keine Nährstoffe mehr auf ⁽²⁾. Die *Lamina epithelialis mucosae* von Dünnd- und Dickdarm ist aus einem hochprismatischen, einschichtigen Zellverbund aufgebaut ⁽³⁾. Durch tief in den Krypten liegende Stamm- und Vorläuferzellen wird das Epithel permanent

homöostatisch erneuert. In Richtung Lumen differenzieren sich die Vorläuferzellen immer weiter in Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrine Zellen.

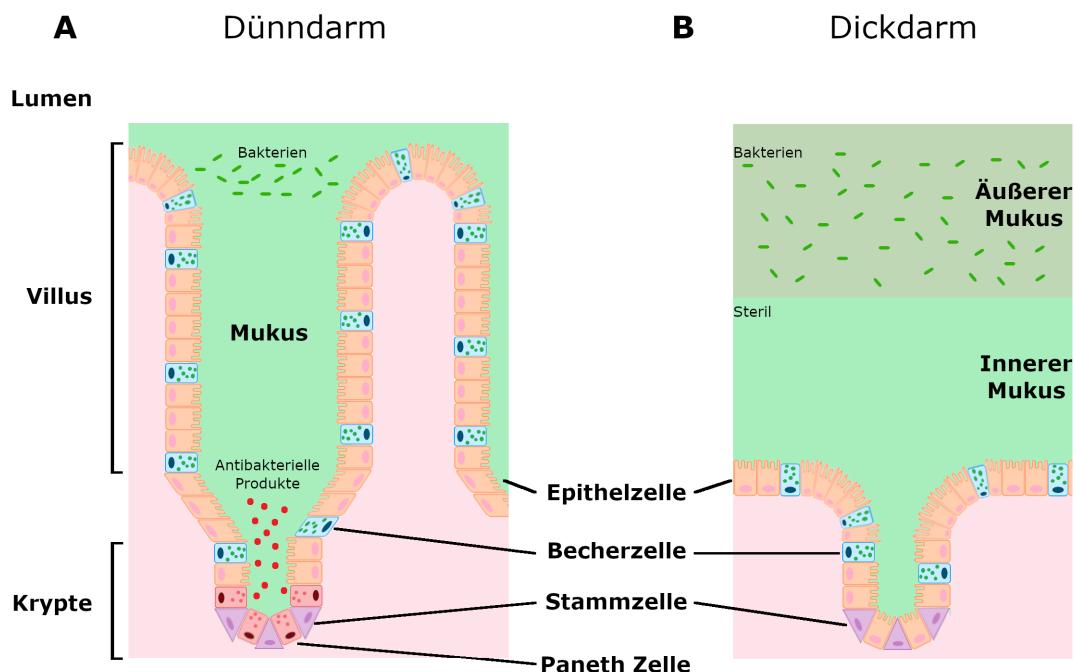


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Epithels mit Mukusschicht in Dünndarm (A) und Kolon (B) nach JOHANSSON und HANSSON (4)

Am Boden der Krypten des Dünndarms gibt es zusätzlich Paneth-Zellen. Die Paneth-Zellen sezernieren antibakterielle Proteine zum Schutz der im Kryptengrund befindlichen Stammzellen (5). Das Epithel der Dünndarmzotten und auch das Epithel des Kolon bestehen hauptsächlich aus Enterozyten, welche einen Bürstensaum zur Oberflächenvergrößerung besitzen und für die Resorption zuständig sind.

Im gesamten Darm sind zwischen den Enterozyten Becherzellen und enteroendokrine Zellen (6) angesiedelt. Die Becherzellen sezernieren Mukus, der durch die Speicherung von Wasser das Epithel vor Austrocknung schützt (7). Die Anzahl der Becherzellen nimmt in Richtung des Rektums zu. Ihre Anzahl korreliert mit der zunehmenden Anzahl an Bakterien im Verlauf des Darmtrakts (8).

Eine Besonderheit des Dünndarms sind die Brunner'schen Drüsen, die einen alkalischen Mukus sezernieren um den sauren Speisebrei des Magens zu neutralisieren

(9).

Ein Verständnis des zellulären Aufbaus der Schleimhaut ist wichtig, um zu verstehen wie homöostatische Regeneration, Resorption von Nährstoffen und Schutz der Schleimhaut gleichzeitig realisiert werden können.

1.1.2 Mundhöhle

Die Mundhöhle wird durch die *Tunica mucosa oris* ausgekleidet. Sie besteht aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, das in stark beanspruchten Bereichen verhornt ist⁽¹⁰⁾. Das Plattenepithel besteht neben den Epithelzellen aus Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. In der *Lamina propria* sitzen Lymphozyten und Makrophagen für die Immunabwehr. Anders als bei intestinalen Mukosen ist das Epithel in der Mundhöhle nicht von Becherzellen durchsetzt, die Mukus produzieren, sondern es gibt drei Hauptdrüsen (Unterzungendrüse (*Glandula sublingualis*), Unterkieferdrüse (*Glandula submandibularis*) und die Ohrspeekeldrüse (*Glandula parotis*))⁽³⁾. Die Drüsen produzieren Speichel in einem zweigeteilten Prozess. Im ersten Schritt wird der Speichel vom *Azinus* im Drüsengrund sezerniert und auf dem Weg durch den Drüsenhals mit Wasser verdünnt. Kontrolliert wird die Sekretion des Speichels durch das autonome Nervensystem⁽¹¹⁾. Der Speichel besteht zu 99% aus Wasser. Die übrigen 1% sind Muzine und Proteine wie α -Amylase und Immunglobulin A⁽¹²⁾. Durch seine Zusammensetzung befeuchtet der Speichel die Mundhöhle und schützt vor Noxen⁽¹²⁾. Außerdem fördert er die Wundheilung, nicht nur die der Mundschleimhaut. Auch auf der äußerer Haut kann eine verbesserte Heilung beobachtet werden, wenn sterilisierter Speichel appliziert wird⁽¹³⁾. Folglich beeinträchtigt eine geschädigte Speichelproduktion die Immunabwehr der Mundschleimhaut und führt zu einem erhöhten Risiko von Infektionen⁽¹⁰⁾.

1.1.3 Lunge

Der respiratorische Trakt der Lunge besteht aus der Luftröhre (*Trachea*), die sich in den rechten und linken *Bronchus* spaltet. Die Bronchien verzweigen zu immer kleineren *Bronchioli* und enden in den Lungenbläschen (Alveolen), in denen der Sauerstoffaustausch stattfindet.

Die Schleimhaut der Luftröhre (*Tunica mucosa respiratoria*) besteht aus einem mehrreihigen, hochprismatischen Flimmerepithel, gebildet durch Basalzellen, Flim-

merzellen und Becherzellen. In der darunter liegenden *Lamina propria* gibt es seromuköse Drüsen (*Glandulae tracheales*)⁽³⁾. Vom Bronchus zum *Bronchiolus* wird die Schleimhaut dünner und besteht schließlich noch aus einem einschichtigen, hochprismatischen Flimmerepithel. Das einschichtige Epithel enthält Keulenzellen (Clara Zellen, *club cells*) statt Becherzellen, auch die tiefliegenden Bronchialdrüsen fehlen⁽¹⁴⁾. Die Keulenzellen sezernieren *Club Cell Secretory Protein* (CCSP), welches die Integrität des Bronchiolus aufrechterhält und im Falle einer Verwundung zu seiner Heilung beiträgt⁽¹⁵⁾. In den Lungenbläschen geht das bronchiale Epithel in das Alveolarepithel über, welches aus Pneumozyten Typ I und Typ II besteht. Typ I sind sehr flache Zellen, die den Großteil der Oberfläche der Alveolen bedecken und für den Gasaustausch verantwortlich sind. Typ II sind kleine kubische Zellen, die das Surfactant (*surface active agent*) exprimieren, welches durch Herabsetzen der Oberflächenspannung den Gasaustausch erleichtert^(16, 17). Zusätzlich wird durch die Typ II Zellen noch das Surfactant Protein C (SFTPC) sezerniert, welches eine analoge Funktion wie CCSP aufweist⁽¹⁵⁾.

Dies zeigt, dass sich die Schleimhaut des Bronchus deutlich von der Schleimhaut der *Bronchioli* und Alveolen unterscheidet. Nur die mit Becherzellen durchsetzte Schleimhaut des Bronchus ist in der Lage Muzine zu sezernieren und Mukus zu bilden.

1.2 Mukus

Als Mukus wird die Schleimschicht bezeichnet, die an das Epithel der Mukosa angrenzt und diese vor mechanischen, chemischen und biologischen Einflüssen schützt⁽⁶⁾. Muzine (große Glycoproteine) geben dem Mukus seine viskoelastischen Eigenschaften⁽¹⁸⁾. Dabei besteht der Mukus zu über 90% aus Wasser. Je nach Organ unterscheiden sich die Anforderungen an den Mukus und damit seine Beschaffenheit und Zusammensetzung⁽¹⁹⁾.

Der Mukus des **Dünndarms** (Abb. 1, A) muss durchlässig sein für Nährstoffe, damit diese vom Epithel resorbiert werden können. Diese Durchlässigkeit kann von Pathogenen ausgenutzt werden, um dem Epithel zu schaden⁽²⁰⁾. Dies wird durch die Ausschüttung von anti-bakteriellen Proteinen durch die Paneth-Zellen im Kryptengrund verhindert^(21, 22). Der Mukus wandert vom Epithel, sezerniert von Becherzellen, in Richtung Lumen, wo er durch das Mikrobiom zersetzt und mit dem Chymus ausgeschieden wird⁽⁴⁾.

Im **Dickdarm** ist der Mukus (Abb. 1, **B**) zweischichtig, die innere kompakte Schicht ist frei von Bakterien⁽²³⁾. Die äußere Schicht des Mukus ist weniger kompakt und lose. Die Stabilität der inneren Mukusschicht nimmt durch die Wirkung von Proteasen ab⁽²⁴⁾. Die erhöhte Durchlässigkeit der äußeren Mukusschicht ermöglicht eine Besiedlung durch das Mikrobiom. Die Zweischichtigkeit des Mukus im Kolon verhindert, dass das Mikrobiom mit dem Epithel in Kontakt kommt und einen pathogenen Einfluss auf das Epithel ausübt⁽²⁵⁻²⁷⁾. Das Epithel des Kolon ist für die Resorption von Wasser und Ionen zuständig, sowie der Aufnahme von Metaboliten aus der mikrobiellen Tätigkeit, wie kurzkettige Fettsäuren⁽²⁸⁾.

Der Mukus der **Lunge** variiert in seiner Beschaffenheit im Verlauf von Luftröhre zu den Lungenbläschen. Aufgrund unterschiedlicher Funktionen wird im Bereich der *Trachea* und des *Bronchus* ein Muzin-haltiger Mukus sezerniert, der das Epithel schützt. Auftretende Noxen werden gegen die Schwerkraft durch das Flimmerepithel aus der Lunge zum *Ösophagus* transportiert, wo er über den GI Trakt ausgeschieden wird^(29, 30). In den *Bronchioli* und Aveolen wird das Surfactant sezerniert. Die oberen Atemwege besitzen, ähnlich wie der Darm, submuköse Drüsen, die Muzine produzieren. Zusätzlich gibt es im Epithel Becherzellen, die ebenfalls Muzine ausschütten.

In der **Mundhöhle** wird die Mukusschicht aus Speichel gebildet, der sich schützend und befeuchtend auf das Epithel legt⁽¹²⁾. Der Speichel wird in den Speicheldrüsen produziert und nicht durch das Epithel selbst⁽³¹⁾.

Auf Grund der unterschiedlichen Anforderung an den Mukus von Mundhöhle, Lunge und Darm gib es verschiedene Muzine aus denen sich der Mukus zusammensetzt.

1.2.1 Muzine

Muzine sind große Glykoproteine, die von Schleimhäuten sezerniert werden, um sich schützend auf das Oberflächenepithel zu legen. Strukturell werden Muzine häufig mit einem Flaschenbürsten Modell beschrieben, da sie ein Proteinrückgrat besitzen, das über *O*-glykosidische Bindungen stark mit Polysacchariden besetzt ist (Abb. 2). Die Polysaccharide machen dabei 50-70% der Molekülmasse der Muzine aus⁽⁶⁾. Durch die Glykostrukturen können Muzine Wasser binden, wodurch sie ihre viskoelastischen Eigenschaften erhalten⁽⁴⁾. Bis heute wurden 20 verschiedene humane Muzine, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert sind

(MUC1-MUC20), identifiziert⁽⁶⁾. Dabei wird zwischen Transmembran-Muzinen und sezernierte Muzinen unterschieden.

Transmembran-Muzine sind in der Plasmamembran verankert und sind über den intrazellulären C-Terminus an Signaltransduktionsprozessen beteiligt⁽³²⁾.

Bei **sezernierten Muzinen** werden die nicht-Gel-bildenden Muzine wie MUC7, MUC8 und MUC9 von den Gel-bildenden Muzinen wie MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 und MUC19 unterschieden⁽³³⁾. Die sezernierten Muzine werden via Exozytose ins Lumen der jeweiligen Organe sezerniert und sind nicht an die produzierenden Zellen gebunden. Die Muzine MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC6 sind auf dem Chromosom 11p15.5 lokalisiert. Speicheldrüsen und Lungengewebe exprimieren zusätzlich MUC7 (Speicheldrüse, Chromosom 4q13.3), MUC8 (Bronchus, Chromosom 12q24.3) und MUC19 (Speicheldrüse, Bronchus, Chromosome 12q12)⁽³¹⁾.

Gel-bildende Muzine dimerisieren im endoplasmatischen Retikulum (ER). Die Muzin-Dimere werden anschließend im Golgi O-glykosiliert⁽³⁴⁾. Abschließend multimerisieren die Muzin-Dimere und werden, in Granula verpackt, zur Zellmembran transportiert, wo sie via Exozytose ins Lumen sezerniert werden^(18, 35).

Die Gel-bildenden Muzine sind aus repetitiven Peptidsequenzen aufgebaut (Abb. 2). Terminal sind cysteinreiche Sequenzen für die Di- und Multimerisierung zuständig. Sequenzen zu finden. Den Großteil des Proteinrückgrats bilden prolin-, threonin- und serinreiche Sequenzen, die für die O-Glykosilierung verantwortlich sind⁽¹⁹⁾.

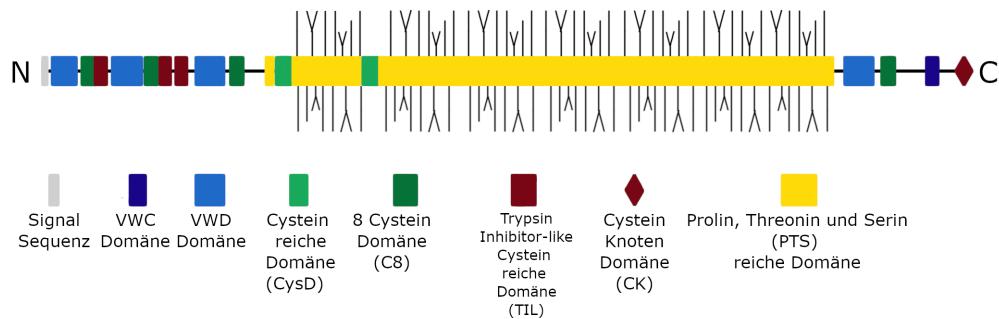


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Muzins am Beispiel von MUC2⁽¹⁸⁾

Mit den verschiedenen Anforderungen an die Schleimhaut ändert sich auch die Zusammensetzung des Mukus (Tabelle 1). Beispielsweise ist das Hauptmuzin im Speichel MUC5B⁽³¹⁾, wie auch in der *Trachea* und dem *Bronchus*⁽²⁹⁾. Zusätzlich wird in der Lunge noch MUC5AC sezerniert. Im Magen sind die Hauptmuzine

MUC6 und MUC5AC⁽¹⁸⁾. Im Dünndarm wird überwiegend MUC2 sezerniert. Allerdings wird im Duodenum von den Brunnerschen Drüsen zusätzlich MUC6 produziert. Im Kolon wird der Mukus durch MUC5B ergänzt⁽³⁴⁾.

Gewebe	Gelbildende Muzine	weitere Bestandteile des Mukus
Mundhöhle	MUC5B MUC7 MUC19	TFF3 FCGBP
Dünndarm	MUC2 (Becherzellen) MUC6 (Brunnersche Drüsen)	TFF3 FCGBP
Dickdarm	MUC2 (Becherzellen) MUC5AC	TFF3 FCGBP
Lunge	MUC5B (submuköse Drüsen) MUC5AC (Becherzellen) MUC7 MUC8 MUC19	TFF3 FCGBP

Tabelle 1: Übersicht Vorkommen von Muzinen und weiterer sezernierter Proteine^(29, 31, 36, 37)

Das Auftreten unterschiedlicher Muzine in unterschiedlichen Organen zeigt, dass die Eigenschaften der Muzine angepasst an die physiologischen Aufgaben der sezernierenden Organe sind. Auch variiert die Dicke der Mukusschicht stark in den verschiedenen Organen bzw. den verschiedenen Abschnitten eines Organs⁽²⁰⁾. Im GI Trakt ist das Epithel von einer durchgängigen Mukusschicht bedeckt, die unterschiedlich stark ausgeprägt und Zusammengesetzt ist⁽³⁴⁾. Der Mukus der Lunge zeigt dagegen keine flächendeckende Mukusschicht, sondern Bündel aus MUC5B und MUC5AC, die vom Flimmerepithel Richtung oral transportiert werden und dabei Pathogene und Fremdkörper binden⁽³⁸⁾.

Neben den Muzinen gibt es weitere Bestandteile, die den Mukus bei der angeborenen Immunabwehr unterstützen. Dazu gehören neben TFF3, FCGBP und DMBT-1 auch Immunglobuline (A und G)^(4, 18).

1.2.2 Trefoil Factor Family 3 (TFF3)

Trefoil Factor (TFF) Polypeptide sind wichtige Bestandteile des Mukus in unterschiedlichen Organen. Die Trefoil Factor Family hat 3 humane Vertreter, TFF1 (früher pS2)⁽³⁹⁾, TFF2 (früher SP)⁽⁴⁰⁾ und TFF3 (früher ITF bzw. hP1.B)⁽⁴¹⁾.

Alle TFF Peptide besitzen mindestens eine P- oder TFF Domäne (Abb. 3). Die TFF Domäne ist definiert als eine 38-39 Aminosäuren lange Sequenz mit sechs konservierten Cysteinenresten, die drei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen C_I-C_V , $C_{II}-C_{IV}$ und $C_{III}-C_{VI}$ bilden (42, 43). Durch die Disulfidbrücken entstehen drei Schleifen, die an ein Kleeblatt (engl. *Trefoil*) erinnern und damit namensgebend sind. Die *Trefoil* Struktur macht die TFFs relativ resistent gegenüber Säuren und enzymatischem Abbau (44). TFF1 und TFF3 besitzen nur eine TFF Domäne und sind in der Lage über einen siebenten Cysteinrest Homodimere und Heterodimere zu bilden (45, 46). TFF2 besitzt zwei TFF Domänen. In der Magenmukosa von Fröschen (*Xenopus laevis*) wurde xP4 entdeckt, ein TFF2- Analogon mit vier TFF Domänen (47).

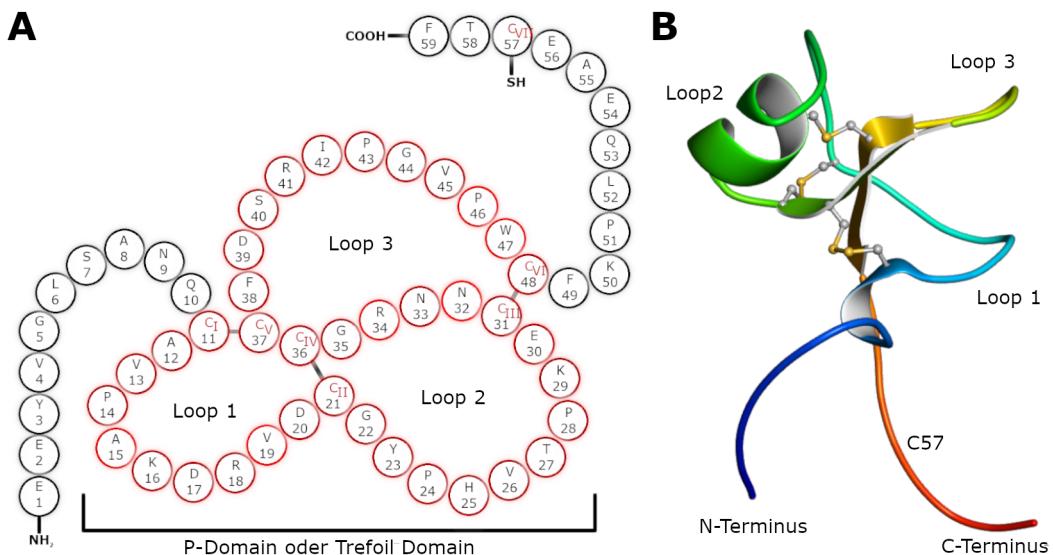


Abbildung 3: **A** Schematische Darstellung der Struktur von humanem TFF3 unter Berücksichtigung der Disulfidbrücken (48) **B** 3D Struktur des TFF3 mit intramolekularen Disulfidbindungen (<https://www.rcsb.org>, 1E9T)

Das Gen für das 59 Aminosäuren lange TFF3 liegt wie alle humanen TFF Gene auf dem Chromosom 21q22.3 (49). TFF3 wird im Menschen vor allem im Gastrointestinaltrakt gebildet, kann aber auch in Speicheldrüsen, Lunge, Bauchspeicheldrüse, Gehirn und weiteren Geweben nachgewiesen werden (50–52). TFF3 wird überwiegend exokrin zusammen mit Muzinen sezerniert und ist Bestandteil des Mukus. Im Mukus des Kolon wird TFF3 in 3 Formen gefunden: Monomer, Homodimer und Heterodimer mit IgG Binding Protein (FCGBP) (45). Kleinere Mengen von TFF3 wurden auch endokrin nachgewiesen (53, 54).

Gewebe	Literatur
Gehirn	(55), (56)
Auge	(57), (58)
Speicheldrüsen	(51), (50)
Ösophagus	(59),(50)
Magen	(59)
Gallenblase/-gang	(50)
Bauchspeicheldrüse	(50)
Dünndarm	(51)
Dickdarm	(50)
Luftröhre	(50), (50)
Lunge	(60), (50)
Weiblicher Genitaltrakt	(52), (50)
Milchdrüse/ Milch	(50), (61)
männlicher Urogenitaltrakt	(62)
Milz	(50)
Schilddrüse	(50)
Knochen	(54)

Tabelle 2: Nachweise von TFF3 in humanen Geweben

Da TFF3 im Darm, wie auch Muzine, hauptsächlich Becherzellenprodukte sind, wird angenommen, dass auch TFF3 zum Schutz der Mukosa beiträgt (48). TFF3-defizierte (TFF3 $^{-/-}$) Mäuse zeigen keine morphologischen Veränderungen im Dickdarmepithel im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (63). TFF3 $^{-/-}$ Mäuse entwickeln keinen pathologischen Phänotyp und können in Aussehen und Gewicht nicht von Wildtyp-Tieren unterschieden werden. Allerdings konnte eine geringere Migrationsgeschwindigkeit von Zellen entlang der Krypt-Willus-Achse nachgewiesen werden (63). Damit scheint TFF3 Einfluss auf die natürliche Selbsterneuerung der Mukosa zu haben und könnte ein wichtiger Faktor bei der Aktivierung von Regenerationsprozessen des Kolonepithels darstellen.

DSS-Colitis-Modell-Versuche (64) an TFF3 $^{-/-}$ Mäusen zeigten, dass 50% der TFF3 $^{-/-}$ Tiere starben und die andere Hälfte der Tiere einen starken Gewichtsverlust verzeichneten (63). In der Kontrollgruppe zeigten nur 10% der Wildtyp Tiere Symptome und nur 5% der Tiere verstarb (63). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass

eine Verwundung des Kolon mit Essigsäure durch eine Behandlung mit luminal verabreichten rekombinantem TFF3 geheilt werden konnte⁽⁶³⁾. Die protektive Wirkung von TFF3 konnte in vielen Studien belegt werden^(63, 65, 66).

Wie genau TFF3 wirkt, ist bis heute nur ansatzweise verstanden. Durch 3D Modellierung der *Trefoil* Domain von TFF2 wurde eine hydrophobe Domäne als Lektin-Bindungsstelle identifiziert⁽⁶⁷⁾. Dadurch könnte TFF2 mit seinen zwei TFF Domänen an Oligosaccharide von Muzinen binden und diese quer-vernetzen⁽⁶⁸⁾. Dies führt zu einer Viskositätszunahme des Mukus, die ebenfalls für das TFF3-Homodimer in abgeschwächter Form nachweisbar ist⁽⁶⁹⁾. Es konnte gezeigt werden, dass TFF3 mit N-Acetylglucosamin- α -1,4-Galactose (GlcNAc- α -1,4-Gal) einen Komplex bildet⁽⁷⁰⁾. Die Kristallisation bestätigte die Bindung des GlcNAc- α -1,4-Gal in der Tasche zwischen Loop 2 und Loop 3 des TFF3. Allerdings wurde diese Lektin-Bindung bisher nie an Zuckern des Kolon-Muzin MUC2 gezeigt. Interessanterweise kann TFF3 auch in Organen ohne Mukusschicht nachgewiesen werden. So kann TFF3 in Knochen und Gelenkflüssigkeit nachgewiesen werden und ist vermutlich an der Heilung von Knochenbrüchen auf Grund pro-migratorischer Eigenschaften beteiligt^(54, 71). Bei Patienten nach einem Kniegelenkaustausch ist die TFF3 Konzentration im Serum erhöht⁽⁵⁴⁾. Auch im humanen Gehirn lässt sich TFF3 nachweisen⁽⁵⁶⁾. Eine Dysregulation von TFF3 im Gehirn steht vermutlich im Zusammenhang mit Depression und degenerativen Erkrankung wie Alzheimer⁽⁵⁶⁾. Dies verdeutlicht, dass TFF3 mehr als nur ein Bestandteil der Mukusschicht ist.

Die Restitution ist ein Wundheilungseffekt bei dem die intakten Zellen der Mukosa am Rand einer Wunde beginnen in den verwundeten Bereich einzwandern und so den Zellverband schließen⁽⁷²⁾. Bei einer Beschädigung des Epithels realisieren die Zellen den Verlust ihrer Nachbarzellen auf Grund fehlender Zell-Zell Kontakte⁽⁷³⁾. Dies führt zu einer Veränderung der Morphologie der intakten Zellen von polaren Zellen hin zu wandernden Zellen⁽⁷⁴⁾. Der als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnete Prozess ist umkehrbar sobald die wandernde Zelle auf eine intakte Zelle trifft⁽⁷³⁾. Während der Wanderung verlieren die Zellen nicht den Kontakt zum Epithel sondern ziehen es mit. Nach Verschluss des verwundeten Bereichs wird die Polarität der wandernden Zellen wieder hergestellt und durch Proliferation der Zellverlust ausgeglichen⁽⁷⁵⁾.

TFF3 zeigt einen positiven Effekt auf die Restitution im Darm und verschiedenen

Zelltypen⁽⁷⁶⁾ in dem es Einfluss auf verschiedene Schritte des Restitutionsprozess nimmt⁽⁷⁷⁾. TFF3 reduziert beispielsweise die E-Cadherin, α - und β -Catenin Level und trägt so zur EMT bei⁽⁷⁸⁾. Durch den Abbau von strukturbildenden Proteinen wie E-Cadherin und Catenin verlieren die Zellen ihre Polarität und können besser migrieren. Zusätzlich beschleunigte TFF3 die Zellmigration in verschiedenen Zelllinien durch Aktivierung des ERK1/2 Signalweges⁽⁷⁷⁾.

Im Jahr 2016 wurden die Chemokinrezeptoren 4 und 7 (CXCR 4/7) als Bindungsstellen für rekombinantes humanes TFF3 (rhTFF3) in humanen Cornea Zellen entdeckt⁽⁷⁹⁾. TFF3 unterstützt die Zellmigration durch Aktivierung des MAP Kinase Pfads (*Mitogen-activated protein kinase MAPK*) und Zellproliferation durch Phosphorylierung von ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinases*). Allerdings wurde auch gezeigt, dass die TFF3 abhängige Phosphorylierung von ERK auch aktiv ist, wenn CXCR 4/7 durch Antagonisten blockiert sind⁽⁷⁹⁾. Dies weist auf einen weiteren Rezeptor für TFF3 hin.

Effekt	Zellline	Referenz
Proliferation	LoVo, SW837	(80)
Anti-Apoptose	IEC18, HCT116, IEC6, HT-29, AGS	(81), (82), (83)
Streuung und Invasion	Rat-2, MDCK	(84),(85)
Migration und Restitution	Monozyten, HT29, IEC6, NHBE, BEAS-2B, Hornhautepitel des Auges, Keratinozyten der Mundhöle	(86), (87), (88) (89), (90), (91)
Angiogenese	HUVEC	(92)
Muzin Synergie und Interaktion	IEC18, IEC6	(76), (93), (94) (69), (95), (45)
Verbesserung der Barrierefunktion	HT29/B6	(96)
Schutz und Reparatur	Mäuse und TFF3 ^{-/-} Mäuse	(97), (63), (98) (99), (100)

Tabelle 3: Biologische Aktivität von TFF3 in verschiedenen Systemen

Im selben Jahr wurde eine verringerte Ausschüttung der Interleukine IL-6 und IL-8 in der epithelialen Zelllinie HT29 durch den Zusatz von hTFF3 beschrieben⁽⁶¹⁾. Die erhöhte Interleukin-Ausschüttung konnte durch den Zusatz eines *Protease Activated Receptor 2* (PAR-2) Antagonisten oder einer siRNA gegen PAR-2 abgeschwächt werden⁽⁶¹⁾. Damit könnte PAR2 einen weiteren Rezeptor für TFF3 darstellen.

2019 wurde eine Interaktion von TFF3 mit *Leucine Rich Repeat Receptor and Nogo-interacting Protein 2* (LINGO2) beschrieben⁽¹⁰¹⁾. LINGO2 ist ein Transmembranprotein das mit der intrazellulären Domain an den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR, HER-1 oder ERBB-1) bindet und ihn blockiert⁽¹⁰²⁾. Durch die Interaktion des TFF3 mit der extrazellulären Domain des LINGO2 wurde die inhibierende Wirkung des LINGO2 auf den EGFR aufgehoben⁽¹⁰¹⁾. Der EGFR aktiviert über MAPK Signalkaskaden Proliferation und inhibiert Apoptose, weshalb seine Inhibition ein mögliches Ziel der Tumorthерапie darstellt⁽¹⁰³⁾.

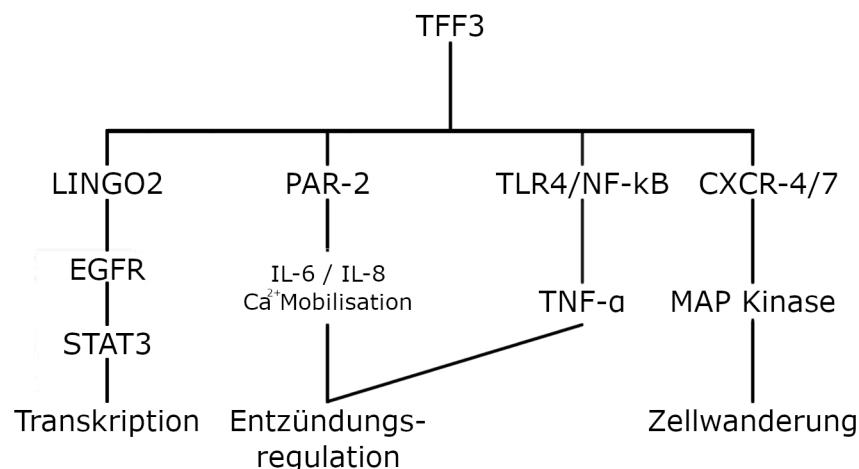


Abbildung 4: mögliche TFF3-Rezeptoraktivität im GI; Es konnte LINGO2 als Rezeptor mit schwacher Affinität für TFF3 identifiziert werden. Durch die Bindung von TFF3 wird die Deaktivierung des EGFR aufgehoben und STAT3 wird aktiviert⁽¹⁰¹⁾. Über die Bindung von hTFF3 an PAR2 von HT-29 Zellen wird eine verminderte Interleukin-Produktion und eine erhöhte Calciumionen-Mobilisation festgestellt^(61, 104). Im Mäusemodell für IBD reduziert TFF3 die Entzündungssymptome durch Verringerung der mRNA von TLR4 und NF-κ B, wodurch die Produktion von TNF-α gehemmt wurde⁽¹⁰⁵⁾. In humanen Hornhaut-Epithelzellen hat rhTFF3 eine die Wanderung der Zellen durch Aktivierung der MAP-Kinase verbessert. Dies wurde vermutlich durch CXCR-4/7 ausgelöst⁽⁷⁹⁾.

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass diese Untersuchungen *in vitro* statt fanden und TFF3-Konzentrationen verwendet wurden, die weit über dem physiologischen Bereich lagen⁽⁶⁶⁾. Des weiteren zeigten Versuche mit synthetischem TFF3 in Konzentrationen bis 10 μM keine Interaktionen mit CXCR4 oder LINGO2⁽¹⁰⁶⁾. Dies zeigt wie unvollständig die Mechanismen von TFF3 bis heute verstanden werden und wie viel Forschung noch nötig ist⁽¹⁰⁷⁾. Trotz des geringen Verständnis

wird seit einiger Zeit eine therapeutische Anwendung für TFF3 diskutiert und getestet (108, 109). Um das volle Potenzial von TFF3 nutzen zu können, müssen seine Mechanismen besser verstanden werden. Die Vielzahl an Publikationen zu den unterschiedlichen Mechanismen und biologischen Aktivitäten von TFF3 zeigen, dass TFF3 mehr zu sein scheint als ein Strukturbestandteil des Mukus.

1.2.3 IgG Fc binding Protein (FCGBP)

FCGBP wurde als Partner des TFF3 zum ersten Mal im Mukus des humanen Kolon nachgewiesen (45). Die Rolle von FCGBP im Mukus ist bis heute nicht abschließend geklärt (110). Entdeckt wurde FCGBP bereits 1989 im Darmepithel und erhielt seinen Namen, da es in der Lage war das Fc Fragment des Immunglobulin G (Ig G) zu binden (111). FCGBP konnte im Dünndarm, Dickdarm, Trachea, Schilddrüse, Plazenta, Prostata, Gebärmutter, Speicheldrüsen, Thymus, Gehirn und Nebenniere auf mRNA Ebene nachweisen (112). Analysen zur Struktur zeigten, dass es sich um ein aus 5405 Aminosäuren bestehendes, repetitiv aufgebautes Glykoprotein handelt (113). N-terminal besitzt das FCGBP eine 450 Aminosäuren lange Domäne (Abb. 5, H), die für die Bindung des Fc Fragments verantwortlich ist. Der darauf folgende Hauptteil ist aus 12 Repeats aufgebaut (Abb. 5, r1-12) . Das C-terminale Ende des FCGBP (Abb. 5, T) ist mit 170 Aminosäuren ein verkürzten Repeat. Ein kompletter Repeat (r1-12) besteht aus 400 Aminosäuren und setzt sich aus dem VON WILLEBRAND Faktor D (VWD) und den cysteinreichen Modulen C8 und TIL (Trypsin Inhibitor Like) zusammen. Die Abschnitte R1-3 sind zu 95 % identisch (Abb. 5). Neben einigen *N*- und *O*-Glykosilierungsstellen, sind besonders die vielen Cysteine (8%) im repetitiven Hauptteil auffällig. Hervorzuheben ist die konservierte CXXC Sequenz (Abb. 5). Diese Sequenz befindet sich auch im VON WILLEBRAND Faktor (vWF) oder MUC2 und ist charakteristisch für Thioredoxin und Protein Disulfide Isomerase(PDI) (113).

Thioredoxin und PDI besitzen eine oder mehrere CXXC-Motive und können damit Thiole oxidieren oder Disulfidbrücken reduzieren und sind dadurch in Lage Disulfidbrücken zu katalysieren und so die Struktur von Proteinen zu beeinflussen (115, 116). Das Redoxpotenzial der CXXC Motive ist dabei abhängig vom pKa -Wert (117) und damit von den umgebenden Aminosäuren (118). PDIs sind vornehmlich im endoplasmatischen Retikulum zu finden (115).

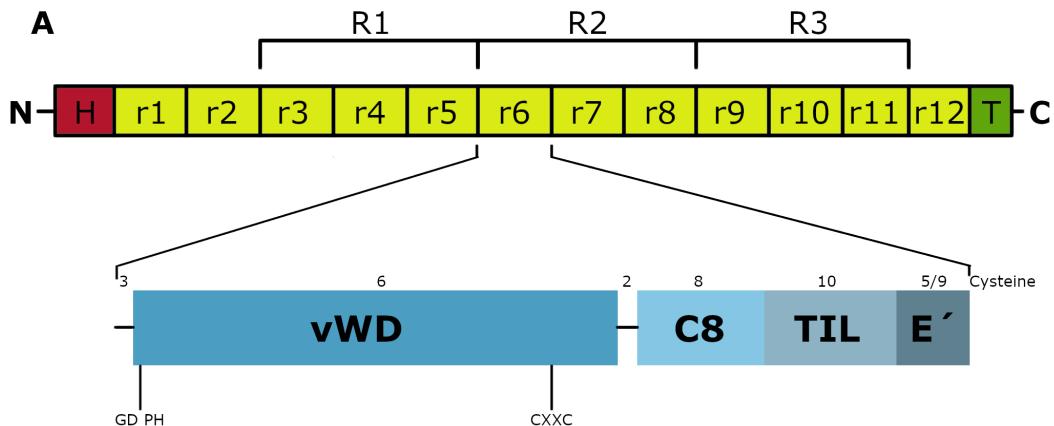


Abbildung 5: Schematische Darstellung von FCGBP: repetitiver Aufbau von FCGBP: H- Head Domain, r1-12 sind Cystein-, Serin- und Threonin-reiche Repeat Domänen, T- Tail Domäne, R1-3 sind zu 95 % identisch; Aufbau eines Repeats (r): vWD- von Willebrand Faktor D, C8- Cysteinreiches Modul mit 8 Cysteinen, TIL- Trypsin Inhibitor ähnliche Domäne, Anzahl der Cysteine sind oberhalb der Domäne angegeben. Spaltstelle (GDPH) und PDI (CXXC) sind unterhalb markiert (114).

Die Repeats r1-11 des FCGBP (Abb. 5, A) enthalten alle eine GDPH Sequenz (113), die zwischen D und P autokatalytisch gespalten wird. Diese Sequenz ist auch in MUC2 (119) und MUC5AC (120) zu finden. Die Fragmente werden jedoch von Disulfidbrücken zusammengehalten. Durch Reduktion der Disulfidbrücken kann FCGBP deshalb in Fragmente gespalten werden, die N-terminal mit Prolin beginnen. Die Asparaginsäure des neuen C-Terminus bildet möglicherweise ein reaktives Anhydrid, das in der Lage wäre primäre Amine- oder Hydroxid-Gruppen zu binden (121). Allerdings wird die Asparaginsäure durch FCGBP selbst abgeschirmt und vermutlich hydrolysiert (110).

FCGBP ist als Becherzellenprodukt Bestandteil des Mukus und damit auch Teil des angeborenen Immunsystems. Die Funktion von FCGBP ist bis heute nicht vollständig verstanden, genau so wie seine Rolle in verschiedenen Erkrankungen (122). Aufgrund der cysteinreichen Domänen wird über eine Funktion als Verbindungsglied des Mukusnetzwerkes spekuliert (121). Experimente mit Mukusproduzierenden Becherzellen zeigen, dass Becherzellen, die nicht in der Lage sind FCGBP zu sezernieren, einen durchlässigeren Mukus produzieren und anfälliger sind gegen Infektion mit *Salmonella enterica* (123). Damit hat FCGBP offensichtlich Einfluss auf die Eigenschaften des Mukus. Bis heute ist allerdings kein Phänotyp für *Fcgbp*^{-/-} Mäuse beschrieben (124).

FCGBP könnte ein Virusfänger sein, der zum Beispiel den HI-1 Virus im zervikalen Mukus einfängt⁽¹²⁵⁾ oder bei der Abwehr von SARS-CoV-2 unterstützt⁽¹²⁶⁾. In den Mukus gelangtes IgG bindet die Viruspartikel, die als FCGBP-IgG-Virus Komplex mit dem Mukus ausgeschieden werden⁽¹²⁶⁾.

Proteomanalytische Untersuchungen bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Nichtrauchern, asymptomatischen Rauchern und COPD- (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) Patienten zeigten eine erhöhte Expression von FCGBP und TFF3 bei COPD Patienten im Vergleich zu Nichtrauchern⁽¹²²⁾.

Durch Tumorgenese wird die FCGBP-Expression ebenfalls moduliert. In Prostatakarzinomen ist FCGBP bei Menschen und Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu umliegendem gesunden Gewebe⁽¹¹²⁾. In Schilddrüsen-Karzinomen wurde ebenfalls weniger FCGBP mRNA nachgewiesen als im dazugehörigen benignen Schilddrüsengewebe. Schilddrüsen-Adenome und hyperplastische, benigne Schilddrüsenknoten zeigen dagegen eine erhöhte FCGBP Produktion im Vergleich zum normalen Schilddrüsengewebe⁽¹²⁷⁾. In malignem Gallenblasengewebe ist die Expression von FCGBP erhöht, was vermutlich die EMT fördert und damit die Metastasierung⁽¹²⁸⁾. Ebenso ist die Expression von FCGBP bei Eierstockkrebs deutlich erhöht⁽¹²⁹⁾. Durch Konzentrationsbestimmung von FCGBP lassen sich möglicherweise Prognosen zum Verlauf von Krebserkrankungen ableiten⁽¹³⁰⁾. Eine erhöhte Expression bedeutet eine schlechtere Prognose für Patientinnen mit Eierstockkrebs oder niedergradigem malignen Gliom. Bei Gliomen wurde eine Korrelation zwischen erhöhtem FCGBP und der Anwesenheit von Immunzellen, wie B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen festgestellt⁽¹³⁰⁾. Entgegengesetzt verhält es sich beim Rektumkarzinom und Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom. In beiden Fällen bedeutete eine geringere Expression von FCGBP eine schlechtere Prognose⁽¹²⁹⁾. Auch im Falle des papillären Schilddrüsenkrebs wurde eine verminderte FCGBP Expression nachgewiesen und eine damit korrelierende schlechtere Prognose für Patienten⁽¹³¹⁾. Des Weiteren wird auch das gemeinsam mit FCGBP sezernierte TFF3 in deutlich geringerem Maße exprimiert. Die Infiltration des Schilddrüsentumors durch Immunzellen ist aber trotzdem erhöht⁽¹³¹⁾. Damit scheint die Infiltration des Tumors durch Immunzellen unabhängig von FCGBP angeregt zu werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass TFF3 und FCGBP zusammen einen

wichtigen Bestandteil des Mukus im Kolon darstellen und vermutlich Teil des angeborenen Immunsystems sind. Seit 2010 ist bekannt, dass TFF3 im humanen Kolon als Heterodimer mit FCGBP exprimiert wird⁽⁴⁵⁾. Vermutlich bindet TFF3 über das C-terminale Cystein (Cys57, Abb. 3) an eines der Cysteine des FCGBP in den Modulen H, r12 oder T^(45, 114). MUC2 wird mit TFF3 und FCGBP co-sezerniert, zeigt aber keine kovalente Bindung mit dem Komplex, wie anfänglich angenommen⁽¹¹⁰⁾. Inwieweit Lektin-artige Wechselwirkungen zwischen dem TFF3-FCGBP-Komplex und MUC2 oder FCGBP bestehen, ist bisher nicht bekannt. Außerdem wurde eine Kalzium-abhängige Wechselwirkung von rekombinanten TFF3-Homodimer mit DMBT1 *in vitro* beschrieben^(132, 133). Es wird vermutet, dass der TFF3-DMBT1-Komplex Teil der angeborenen Immunabwehr ist und Einfluss auf die Homöostase des Epithels hat⁽¹³²⁾.

1.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die verschiedenen Formen von TFF3 in humanem Bronchalsekret, BAL-Flüssigkeit, Lungengewebe und Speichel zu charakterisieren. Es wurde untersucht, ob hochmolekulares TFF3-FCGBP auch in genannten Proben existiert. Weiter wurde niedermolekulares TFF3 charakterisiert, um das Vorkommen verschiedener TFF3-Entitäten zu verstehen.

Des weiteren wurden Bindungsstudien von rekombinantem niedermolekularem TFF3 und gereinigten Proteinfraktionen verschiedener humaner Proben durchgeführt.

2 Ergebnisse

2.1 Kolon

Zur Untersuchung von TFF3 im Mukus wurden 15 humane Kolongewebeproben mit verschiedenen Extraktionsmethoden analysiert. Das untersuchte humane Kolongewebe stammt von Spendern, bei denen eine Operation notwendig war. Grund für die Operationen waren die Entfernung von Hyperplasien, deren Ursache teilweise auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen (IBD) zurückzuführen ist. TFF3 und andere Proteine wurden nach SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (Methoden 5.3) oder Agarosegelektrophorese (AgGE) und Kapillar Blot (Methoden 5.5) mit spezifischen Antiseren nachgewiesen. Zum Nachweis von TFF3 wurde standardmäßig das Antiserum a-hTFF3-8 verwendet, dass die C-terminale Peptidsequenz 49-59 erkennt. Dies wurde in Abbildungen immer als TFF3 abgekürzt. Das N-terminale Antiserum a-hTFF3NanoTools, welches die Aminosäuren 1-12 erkennt, wurde bei Verwendung als TFF3-15C6 gekennzeichnet. Rekombinantes TFF3-Monomer und -Homodimer werden von C-terminalen Antikörpern (aa 49-59) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen erkannt. Der a-hTFF3-8 Antikörper erkennt auch das hochmolekulare TFF3-FCGBP (Abb. 6). Der N-terminale Antikörper (a-hTFF3-15C6) erkennt nur reduziertes TFF3. FCGBP wurde standardmäßig mit einem C-terminalen Antiserum analysiert, der die Aminosäuren 5176-5344 erkennt. Seine Verwendung wurde durch die Abkürzung FCGBP gekennzeichnet. Bei Verwendung des N-terminalen Antikörpers (289-420) wurde dies durch FCGBP-N gekennzeichnet.

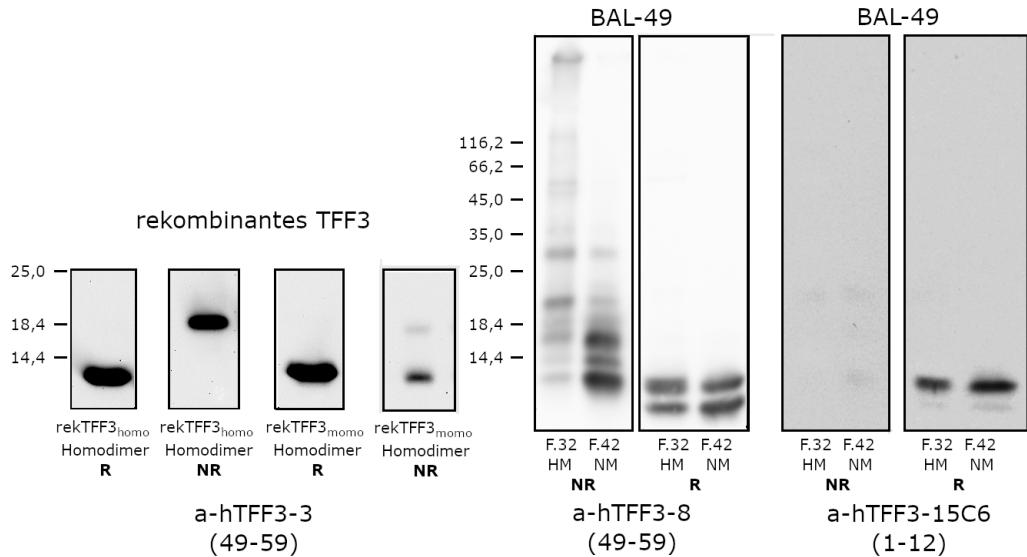


Abbildung 6: Vergleich TFF3-Antiseren; Rekombinantes TFF3-Homodimer und -Monomer wurde auf Immunreaktivität gegenüber dem C-terminalen Antiseraum a-hTFF3-3 getestet. a-hTFF3-3 erkennt die selbe Aminosäuresequenz wie das verwendete a-hTFF3-8-Antiseraum. Dieses Antiseraum erkennt in über SEC gereinigte BAL-Flüssigkeit (BAL-49) unter nicht reduzierenden Bedingungen verschiedene TFF3-Formen. Das N-terminale Antiseraum (a-hTFF3-15C6) erkennt TFF3 nur unter reduzierenden Bedingungen.

2.1.1 TFF3 im humanen Kolon

Bereits ALBERT *et al.* zeigten, dass TFF3 im humanen Kolon ein hochmolekulares Heterodimer mit FCGBP bildet und in niedermolekularen Formen vorliegt (45). Um diese Untersuchungen zu vertiefen und auszuweiten, wurde analysiert, ob im Kolon nieder- bzw. hochmolekulares TFF3 auch ohne Kochen und die denaturierenden Eigenschaften von SDS nachweisbar ist.

Die Mukusschicht wurde für die Analyse vorsichtig vom Kolongewebe ohne pathologischen Befund abgewaschen (Methoden 5.1.1) und das Extrakt mittels Blue Native Gelelektrophorese analysiert. Bei Blue Native Gelen wird das denaturierende SDS durch Coomassie Brilliant Blue G 250 ersetzt, das die native Struktur von Proteinen und Proteinkomplexen erhält, aber trotzdem einen negativ geladenen Protein-Farbstoffkomplex bildet. Nach der 1D Blue Native PAGE wurde anschließend eine 2D SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Methoden 5.6).

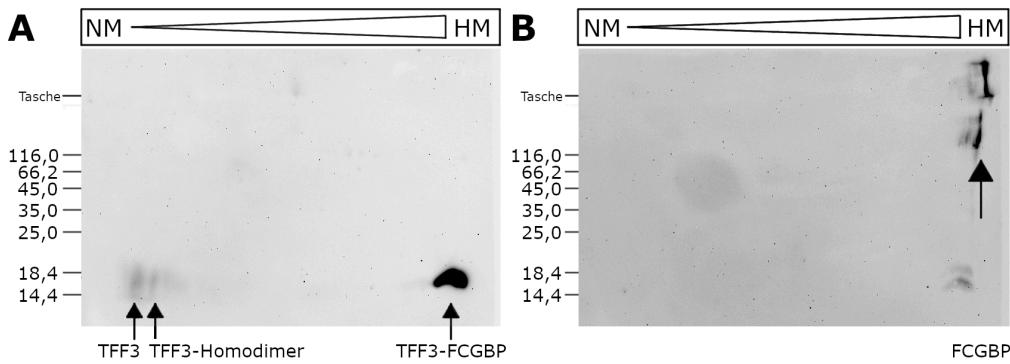


Abbildung 7: 2D SDS-PAGE nach Blue Native PAGE eines Kolonextrakts (K4.2), NM niedermolekularer Bereich, HM hochmolekularer Bereich; Ein wässriger Kolonextrakt (E0) wurde in 1. Dimension auf einem Blue Native Gel und in 2. Dimension auf einem reduzierenden SDS-PAGE getrennt. **A** TFF3 (6,6 kDa) wurde nach der Reduktion mit Mercaptoethanol mittels spezifischen Antikörpern (a-hTFF3-8) als Monomer nachgewiesen. Die 3 Signale stammen von drei verschiedenen TFF3-Formen: TFF3, TFF3-Homodimer und TFF3-FCGBP. **B** FCGBP (572 kDa) wurde mit einem C-terminalen Antikörper (FCGBP) im hochmolekularen Bereich nachgewiesen. Ein Teil des FCGBP ist so groß, dass es nicht aus der Tasche in das Trenngel migriert ist. Dies führt zu den zwei Signalen für FCGBP.

Die Analyse von TFF3 zeigte das Protein in seiner monomeren Form sowohl im hochmolekularen als auch im niedermolekularen Bereich des Blue Native Gels (Abb.7, A). Wie von ALBERT *et al.* beschreiben, liegt TFF3 hauptsächlich im hochmolekularen Bereich vor⁽⁴⁵⁾. FCGBP hingegen wurde nur oberhalb des hochmolekularen TFF3 nachgewiesen (Abb.7, B). Das FCGBP konnte auf Grund seiner Größe nur teilweise in das 2D SDS-PAGE migrieren, so dass FCGBP ebenfalls in der Tasche nachweisbar ist. Dies zeigt, dass TFF3 trotz möglichst nativer Bedingungen als TFF3, TFF3-Homodimer und TFF3-FCGBP vorliegt. Im weiteren Verlauf wird TFF3 und sein Homodimer auch als niedermolekulares TFF3 und TFF3-FCGBP als hochmolekulares TFF3 bezeichnet.

Hoch- und niedermolekulares TFF3 konnten nach möglichst nativem Versuchsaufbau nachgewiesen werden, wobei das hochmolekulare TFF3-FCGBP überwiegt (Abb. 7). Um das Verhältnis der verschiedenen TFF3-Entitäten im Mukus genauer zu analysieren, wurde Kolongewebe ohne pathologischen Befund von 5 Patienten mit Precellys homogenisiert und die Proteine des Extrakts über Größenausschlusschromatographie (SEC) aufgetrennt.

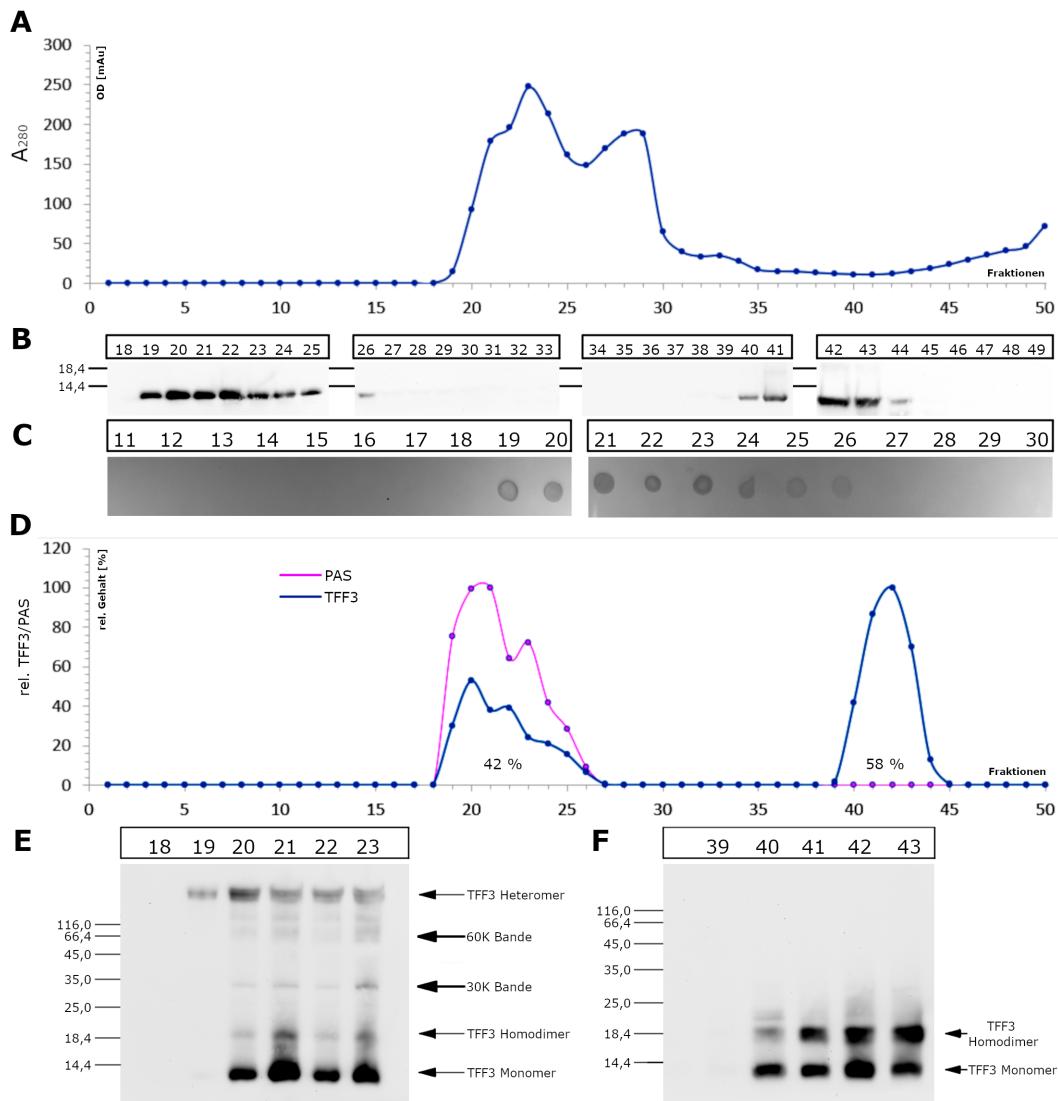


Abbildung 8: SEC eines Kolongewebeextrakts: Exemplarisch abgebildet ist die Trennung eines von fünf Kolongewebe (K-5.2) ohne pathologischen Befund nach Aufschluss mit Precellys durch SEC. (A) Elutionsprofil nach SEC bestimmt durch die Absorption bei 280 nm (B) Analyse auf TFF3 durch reduzierende 15% SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot. (C) PAS-Färbung von Glykoproteinen/Muzine nach Dot-Blot (D) Relative Verteilung von TFF3 (blaue Linie, B) bestimmt durch semiquantitative Auswertung des TFF3-Monomers nach reduzierendem Western Blot und PAS Färbung (violette Linie, C). Die Angaben in Prozent, zeigen die Verteilung von hochmolekularem (42 %) zu niedermolekularem (58 %) TFF3. (E) Hochmolekulare Fraktionen 18-23 wurden nach nicht reduzierender 15% SDS-PAGE und Western Blot bezüglich TFF3 analysiert. (F) Niedermolekulare Fraktionen 39-43 wurden nach nicht reduzierender 15% SDS-PAGE und Western Blot bezüglich TFF3 (a-hTFF3-8) analysiert.

Das Elutionsprofil zeigt einen breiten Peak im hochmolekularen Bereich (Abb. 8, A, Fr. 19-30). Dieser PAS-positive Bereich zeigt die Muzine des Kolonextrakts (Abb. 8,

C,D). Die Analyse der einzelnen Fraktionen auf TFF3 zeigt das monomere TFF3 nach Reduktion in den PAS-positiven Fraktionen 19-26 sowie im niedermolekularen Bereich 40-44 (Abb. 8, **B**). Die Untersuchung der TFF3-positiven Fraktionen unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten für das hochmolekulare TFF3 fünf verschiedene TFF3-Entitäten (Abb. 8, **E**), hochmolekulares TFF3-FCGBP, TFF3 mit einer Größe von 60 K und 30 K, sowie homodimeres und monomeres TFF3. Die TFF3-positiven Fraktionen 40-43 zeigen nur die homodimere und monomere Form des TFF3 (Abb. 8, **F**). Durch semiquantitative Auswertung des reduzierten TFF3 wurden das Verhältnis zwischen hoch- und niedermolekularem TFF3 von 42 % zu 58 % ermittelt ((Abb. 8, **D**). Die Verteilung des TFF3 variiert in den Geweben verschiedener Patienten (n=5), liegt aber bei den verwendeten Proben auf Seiten des niedermolekularen TFF3 (Tab. 4).

Probe	Extraktion	HM TFF3 [%]	NM TFF3 [%]
K-4.1	Precellys Extr.	34	66
K-5.2	Precellys Extr.	42	58
K-11	Precellys Extr.	15	85
K-12	Precellys Extr.	45	55
K-13	Precellys Extr.	39	61

Tabelle 4: relative TFF3-Verteilung im Kolon nach Precellys Extraktion

Zusammenfassend lässt sich, dass TFF3 in allen untersuchten Kolongeweben in niedrig- und hochmolekularen Formen vorkommt, wobei die Verhältnisse individuell variieren. Anders als im Blue Native Gel liegt TFF3 nach Precellys Extraktion und SEC überwiegend als niedermolekulares TFF3 vor.

Zur Verifizierung der TFF3-positiven Proteine und Proteinkomplexe nach nicht reduzierender SDS-PAGE und Western Blot (Abb. 8, **E, F**) wurde eine Coomassie Blue Färbung einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE angefertigt (Abb. 9, **A, C**). Aus dem Coomassie Gel wurde die TFF3-positiven Proteinkomplexe eluiert und reduzierend als TFF3-Monomer nachgewiesen. In der hochmolekularen Fraktion 20 wurde TFF3 in den eluierten Bereichen 2-4, also hochmolekulares TFF3, TFF3-Homodimer und -Monomer nachgewiesen (Abb. 9, **B**). Aus den Bereichen bei 30K und 60K konnte in identischen Experimenten kein TFF3 eluiert werden, vermutlich wegen zu geringer Konzentration (Daten nicht gezeigt).

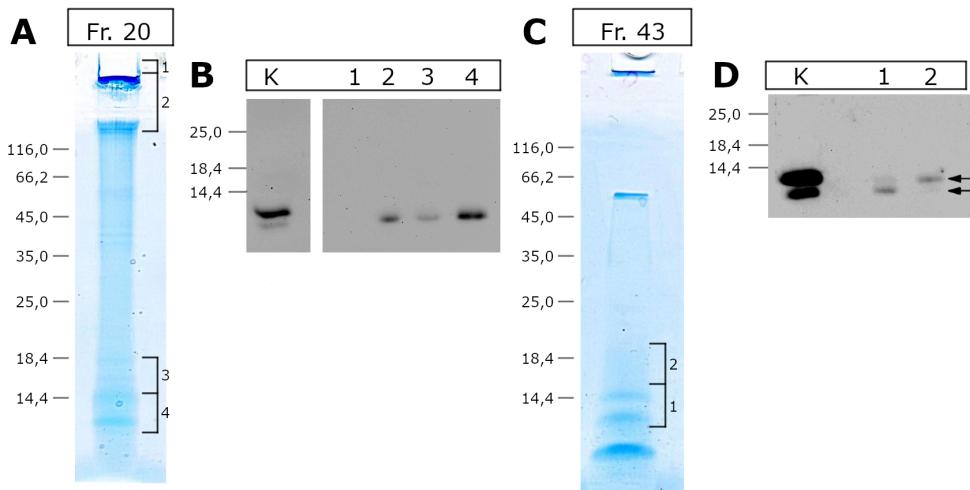


Abbildung 9: Elution verschiedener TFF3-Entitäten aus einem Coomassie Gel; Die hochmolekulare Fraktion 20 und die niedermolekulare Fraktion 43 des Kolongewebes 4 wurden nach nicht-reduzierendem 15% SDS-PAGE mit Coomassie Blau gefärbt (**A** und **C**). Aus den markierten Bereichen 1-4 bzw. 1-2 wurden die Proteine eluiert und mittels reduzierendem Western Blot auf TFF3 analysiert (**B** und **D**).

Aus der niedermolekularen Fraktion 43 konnte in beiden untersuchten Bereichen TFF3 nachgewiesen werden (Abb. 9, **D**). Damit liegt TFF3 in den niedermolekularen Fraktionen als Homodimer und Monomer vor. Bemerkenswert ist die Existenz von 2 unterschiedlichen monomeren TFF3-Formen, die aus dem Bereich des nicht reduzierten TFF3-Monomers (Abb. 9, **D**,1) eluiert werden konnten. Dabei handelt es sich vermutlich um ein vollständiges und ein verkürztes TFF3-Monomer. Das Homodimer hingegen ist nach Reduktion nur als vollständiges Monomer nachweisbar (Abb. 9, **D**,2).

Durch das Experiment konnte gezeigt werden, dass TFF3 durch SEC in hoch- und niedermolekulares TFF3 getrennt werden kann. Allerdings liegt nach der Trennung durch SEC noch niedermolekulares TFF3 in hochmolekularen Fraktionen vor. Zusätzlich wurde eine verkürzte TFF3-Form in niedermolekularen Fraktionen nachgewiesen.

2.1.2 Stufenweise Extraktion von humanem Kolongewebe

Die SEC nach mechanischer Lyse von Kolongewebe zeigte, dass TFF3 als hochmolekulares TFF3-FCGBP und niedermolekulares TFF3 vorliegt (Abb. 8). Durch eine stufenweise Extraktion wurde untersucht, ob sich unterschiedliche TFF3-

Entitäten in unterschiedlichen Extrakten anreichen lassen. Im Magen konnten durch stufenweise Extraktion von Gewebe bereits verschiedene Entitäten von TFF1 und TFF2 extrahiert werden^(46, 134).

Im ersten Schritt wurden der Mukus des Kolongewebe im Rotationsschüttler abgewaschen (E0). Anschließend wurde das verbleibende Gewebe mit Precells aufgeschlossen und die Proteine extrahiert (E1). Abschließend wurde das verbleibende Pellet mit in 1% SDS gekocht um schwerlösliche Bestandteile zu extrahieren (E2). Für Details siehe Methoden 5.1.1. Die Extrakte wurden durch reduzierende SDS-PAGE und Agarose Gele bezüglich TFF3 und FCGBP untersucht (Abb. 10).

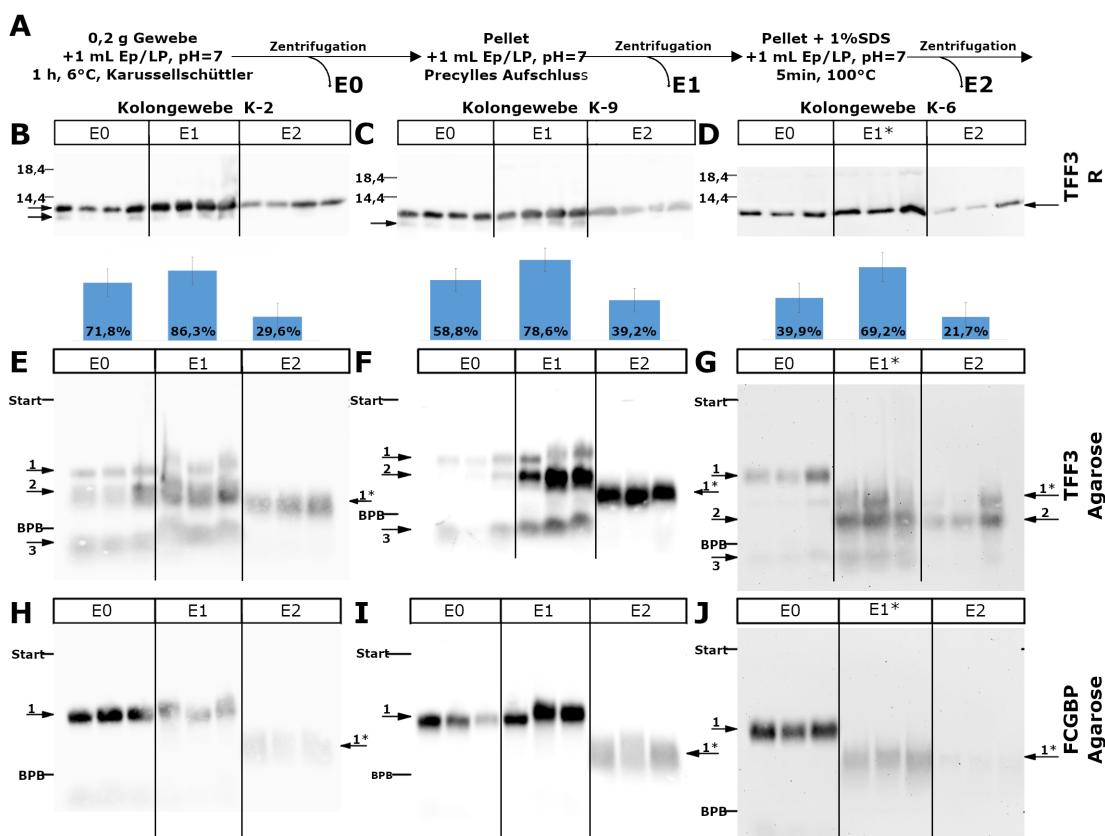


Abbildung 10: Stufenweise Extraktion von Kolongewebe (K-2, K-9, K-6); (A) Schema der stufenweisen Extraktion, für Details siehe Methoden 5.1.1, Seite 79; Der Extrakt E1* des Gewebes K-6 enthält zusätzlich 1% SDS (B-D) Die Extrakte (E0-E2, n=3 bzw. 4) wurden mittels reduzierender SDS-PAGE auf TFF3 analysiert. Die Signale wurden densitometrisch ausgewertet. (E-J) Die Extrakte (E0-E2, n=3) wurden auf einem 1 % Agarose Gel auf TFF3 (E-G) und FCGBP (H-J) untersucht. BPB-Bromphenolblau, markiert die Lauffront im Agarosegel

Die Extrakte nach Precellys Extraktion (E1) enthalten am meisten TFF3, gefolgt von E0, den abgewaschenen Proteinen (Abb. 10 **B-D**). In E2 ist deutlich weniger TFF3 enthalten. Offensichtlich ist TFF3 somit gut wasserlöslich, da bereits ohne Detergenzien ein beträchtlicher Teil des TFF3 aus dem Mukus gelöst werden kann. In den Extrakten E0 und E1 ist unterhalb des TFF3-Monomers, auch das verkürzte TFF3-Monomer zu erkennen (Abb. 10, B-D).

Zum Nachweis des hochmolekularen TFF3-FCGBP hat sich die Verwendung von Agarosegelen bewährt. Zum Vergleich von relativen molekularen Massen (M_r) wurde daher die RF-Werte herangezogen, die sich aus dem Quotienten der elektrophoretischen Gesamtlaufstrecke und der Laufstrecke des zu untersuchenden Proteins berechnen. Nach der Trennung der stufenweise extrahierten Proteine im Agarosegel wurde verschiedene TFF3-Entitäten nachgewiesen (Abb. 10, E-J). Die größte TFF3-Entität (1) mit einem RF-Wert von 0,45 wurde in den Extrakten E0 und E1 gefunden. In denselben Extrakten wurde auch FCGBP mit einem RF-Wert von 0,45 identifiziert. In den Extrakten E2 und E1* wurde eine Verschiebung des TFF3-FCGBP zu einer kleineren M_r festgestellt. Die RF-Werte der SDS-haltigen Extrakte liegen bei 0,6-0,68. Diese Verschiebung ist unabhängig vom Kochen der Extrakte zu beobachten.

Im M_r Bereich unterhalb des TFF3-FCGBP liegt in den Extrakten EO und E1 die zweitgrößte Entität (2) des TFF3 mit einem RF-Wert von 0,55 vor. Dieser Bereich ist negativ für FCGBP.

TFF3-Homodimer und -Monomer wurden unterhalb des Bromphenolblau (BPB) in den Extrakten E0 und E1 nachgewiesen (3, RF-Wert = 0,74-0,84).

Mit diesem Experiment konnte keine Anreicherung einzelner Formen des TFF3 in Abhängigkeit der Extraktionsmethode festgestellt werden. In allen Extrakten kann TFF3-FCGBP und niedermolekulares TFF3 nachgewiesen werden. Um mögliche Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Entitäten zu identifizieren, wurden die einzelnen Extrakte durch SEC der Größe nach getrennt werden.

SEC der stufenweisen Extrakte Da die stufenweise Extraktion zeigte, dass hoch- und niedermolekulare Formen des TFF3 vorhanden sind, wurden die Extrakte E0 und E1 zur Bestimmung der Verhältnisse von hochmolekularem und niedermolekularem TFF3 mittels SEC getrennt.

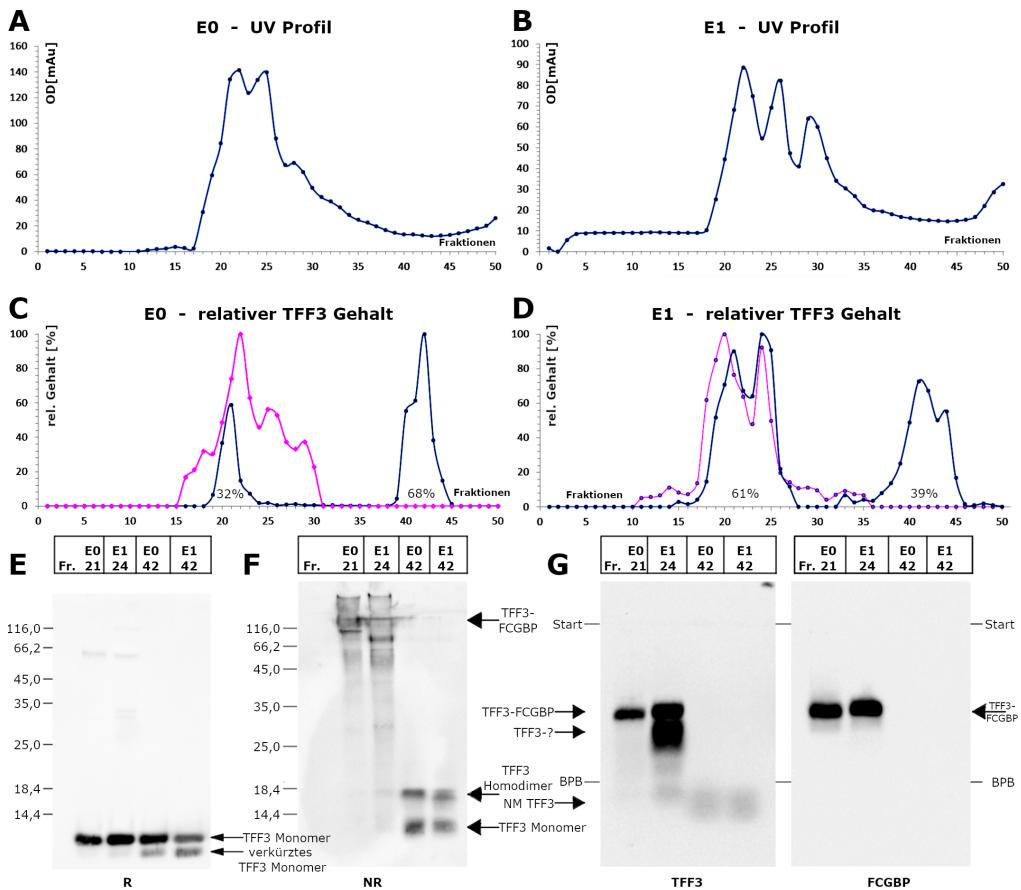


Abbildung 11: SEC nach stufenweiser Extraktion von Kolongewebe (K-9); (A und B) Elutionsprofile der Extrakte E0 und E1 nach SEC gemessen durch Absorption bei 280 nm. (C und D) Relative Verteilung des TFF3 bestimmt nach Western Blot Analyse und semiquantitativer Auswertung der Bande des TFF3-Monomers (blaue Linie). Muzine (Glykoproteine) nach PAS-Färbung sind als pinke Linie dargestellt. (E und F) Hoch- und niedermolekulare TFF3 Entitäten unter reduzierenden (R) und nicht reduzierenden (NR) Bedingungen nach Western-Blot-Analyse. (G) Hoch- und niedermolekulare TFF Entitäten nach 1% AgGE untersucht auf TFF3 und FCGBP.

Dabei zeigt die Trennung von E0 (Abb. 11 A) zwei Absorptionsmaxima (Fr. 22/25) und einer kleinen Schulter (Fr. 28). Damit ist das Absorptionsspektrum der E0 Extraktion (Abb. 11, A) sehr ähnlich zu dem Absorptionsspektrum nach mechanischer Lyse (Abb. 8, A). Der Nachweis von Glykoproteinen, vorwiegend Muzinen, durch PAS-Färbung (Abb. 11, C, pinke Kurve) ist in den Fraktionen 16-29 positiv. In den PAS-positiven hochmolekularen Fraktionen wurde auch TFF3 (Abb. 11, C, blaue Kurve) nachgewiesen. Der Hauptteil des TFF3 (68 %) wird allerdings im niedermolekularen Bereich (Fr. 39-44) gefunden.

Bei der Trennung des Extrakts E1 ist der Absorptionspeak (Abb. 11, B, Fr. 18-33) etwas breiter im Vergleich zur E0 Extraktion und besitzt drei Maxima (Fr. 22, 26, 29). Insgesamt ist die Absorption in E0 stärker als die der E1 Extraktion, was auf mehr Protein in der E0 Extraktion hinweist. PAS-positive Muzine wurden, wie in der E0 Extraktion, in den hochmolekularen Fraktionen 17-26 (Abb. 11, D, pinke Linie) der E1 Extraktion nachgewiesen. In hochmolekularen Bereich sind 61 % des TFF3 nachweisbar.

Vergleichende SDS-PAGEs der Peak-Fraktionen von E0 und E1 unter reduzierten (Abb. 11, E) bzw. nicht reduzierenden (Abb. 11, F) Bedingungen zeigen, dass es keine Unterschiede zwischen den TFF3-Formen in den Extraktren Eo und E1 gibt. In beiden Extraktionen konnten sowohl nieder- als auch hochmolekulares TFF3 nachgewiesen werden.

Nach Reduktion liegt hochmolekulares TFF3 in beiden Extraktionen als Monomer vor (Abb. 11, E,F). Dagegen erscheint niedermolekulares TFF3 in beiden Extraktionen als Doppelbande, bestehend aus Monomer und verkürztem TFF3-Monomer (Abb. 11, E,F).

TFF3 und FCGBP laufen im 1 % Agarosegel auf gleicher Höhe (Abb. 11, G). In der hochmolekularen Fraktion der Extraktion E1 existiert zusätzlich eine kleinere Bande für TFF3, die nur vom TFF3-Antikörper erkannt wird. Das niedermolekulare TFF3 kann ebenfalls im Agarosegel unterhalb der Lauffront (BPB) nachgewiesen werden.

Die SEC der Extrakte E0 und E1 nach stufenweise Extraktion zeigen keine unterschiedlichen TFF3-Entitäten. In beiden Extrakten wurde hoch- und niedermolekulares TFF3 nachgewiesen. Die Verteilung von hoch- zu niedermolekularem TFF3 in Abbildung 11 zeigt prozentual mehr TFF3-FCGBP in Extraktion E1, allerdings variiert dies von Probe zu Probe von 9-91% hochmolekularem TFF3 (Tab. 5). Auch das verkürzte TFF3-Monomer ist im niedermolekularen Bereich der SEC deutlich zu erkennen (Abb. 11).

Probe	Extraktion	HM TFF3 [%]	NM TFF3 [%]
K-2	E0	68	32
	E1	38	62
K-4	E0	75	25
	E1	50	50
K-6	E0	76	24
	E1	91	9
K-9	E0	32	68
	E1	61	39
K-10	E0	9	91
	E1	72	28

Tabelle 5: relative TFF3-Verteilung in den Extrakten E0 und E1

2.1.3 Hochmolekulares TFF3 im humanen Kolon

In den hochmolekularen TFF3-positiven Fraktionen einer SEC von Kolongewebe befinden sich neben TFF3 auch Glykoproteine. Daher wurden die hochmolekularen Fraktionen (19-26) nach Precycles Extraktion durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt und auf TFF3, FCGBP, Muzin 2 (MUC2), das Hauptmuzin des Darms und DMBT-1 untersucht (Abb. 12).

TFF3 ist in den Fraktionen 20-24 (RF-Wert = 0,30) mit FCGBP (Fr. 20-23, RF-Wert = 0,30) assoziiert nachweisbar (Abb. 12). Unterhalb des TFF3-FCGBP existiert ein breiter TFF3-positiver Bereich (RF-Wert = 0,40), der FCGBP-negativ ist. Dieser war schon in den Extraktionsexperimenten zu beobachten (Abb. 10, 11). DMBT1 zeigt eine breite Bande (RF-Wert = 0,37) im Bereich von 2000 bis 3000 Basenpaaren. MUC2 ist in den Fraktionen 20-24 positiv und zeigt eine breites Signal, das im Bereich zwischen 10.000 - 2000 Basenpaaren liegt.

In den hochmolekularen, PAS-positiven Fraktionen können TFF3, FCGBP, MUC2 und DMBT1 nachgewiesen werden. Allerdings zeigen nur TFF3 und FCGBP ein sehr ähnliches Laufverhalten im Agarosegel. MUC2 und DMBT1 sind zwar ebenfalls in den analysierten Fraktionen enthalten, co-migrieren allerdings nicht mit FCGBP-TFF3 im Agarosegel.

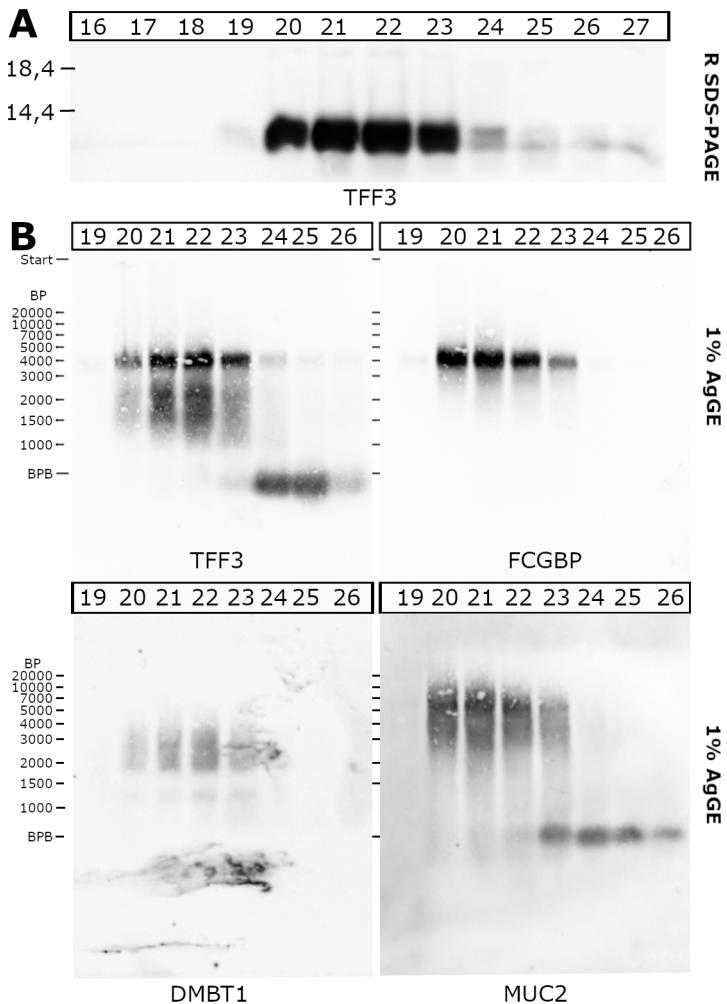


Abbildung 12: Analyse von hochmolekularen TFF3-Fraktionen bezüglich FCGBP, DMBT1 (GP340) und MUC2; (A) Hochmolekulare Fraktionen des Kolongewebes K-12 wurde nach reduzierendem Western Blot auf TFF3 analysiert. (B) Die TFF3-positiven Fraktionen 19-26 wurden nach 1% AgGE auf TFF3, FCGBP (N-Terminal), DMBT1 (GP340) und MUC2 analysiert. Als Größenmarker wurde ein DNA-Marker (Basenpaare) verwendet.

Aus dem vorhergehenden Experiment wurde geschlussfolgert (Abb. 12), dass ein hochmolekularer Proteinkomplex oder ein Gelnetzwerk aus MUC2, DMBT1 und TFF3-FCGBP durch die SEC nicht aufgetrennt werden kann und in den selben Fraktionen eluiert. Um die Co-Migration dieser Proteine weiter zu untersuchen, wurden TFF3-FCGBP-positive Fraktionen (Abb. 13, A) nach SEC in einem weiteren Trennungsschritt durch Ionenaustauschchromatografie gereinigt (Abb. 13, B-E).

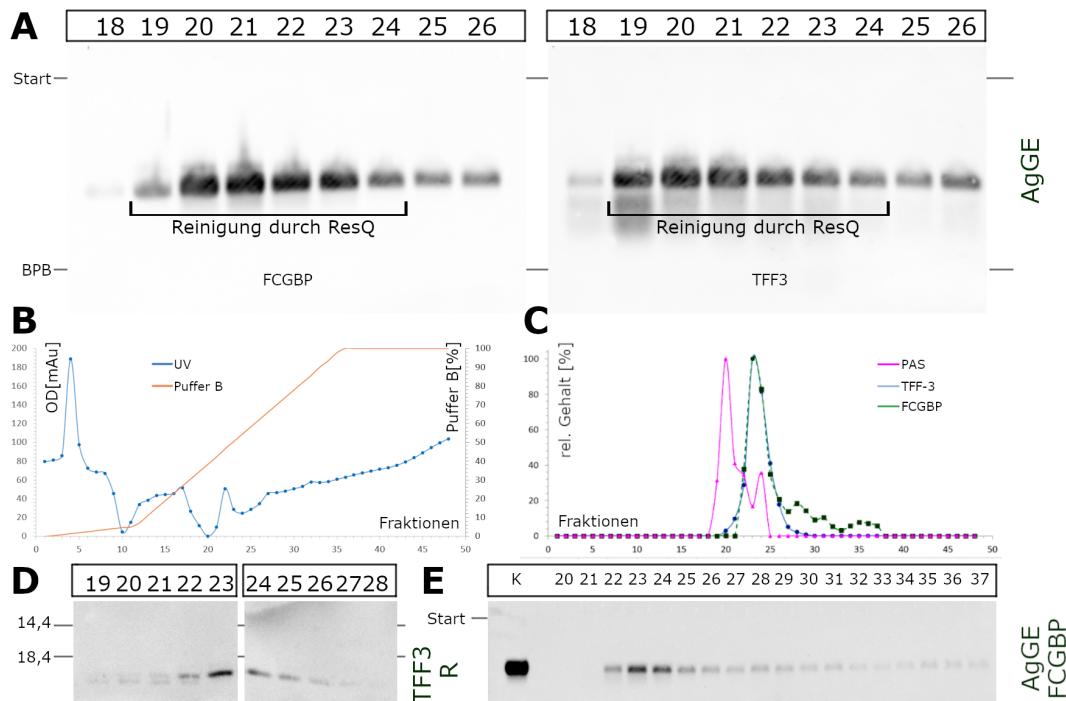


Abbildung 13: Trennung von hochmolekularen TFF3-haltigen Fraktionen durch Ionenaustauschchromatographie (ResQ); Das Kolonextrakt E0 des Kolongewebes K-1 wurde durch SEC getrennt. (A) Die hochmolekularen, TFF3-FCGBP-haltigen Fraktionen 19-24 wurden zur weiteren Reinigung durch Ionenaustauschchromatografie nach ihrem isoelektronischen Punkt getrennt. (B) Dazu wurde die Konzentration von NaCl (orange Linie) kontinuierlich angehoben und die Elution der Proteine durch Absorption (blaue Linie) bei 280 nm überwacht. (C) Die semiquantitative Auswertungen von TFF3 (blau), FCGBP (grün) und der PAS-Färbung (pink) graphisch zusammengefasst. (D) TFF3 wurde durch reduzierende Western Blot in den Fraktionen 19-27 nachgewiesen. (E) FCGBP wurde nach AgGE in den Fraktionen 21-37 mit einem Maximum in Fraktion 23 nachgewiesen.

Nach dem zweiten Trennungsschritt durch Ionenaustauschchromatografie wurde TFF3 in den Fraktionen 19-27 nachgewiesen (Abb. 13 D). Auch FCGBP konnte in den Fraktionen 22-37 nachgewiesen werden (Abb. 13 E). Beide Proteine haben eine Konzentrationsmaximum in den Fraktionen 23 und 24. MUC2 und DMBT1 konnten mit Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigte die PAS-Färbung, Glykoproteine in den Fraktionen 19-24 mit einem Maximum in Fraktion 19.

Dies zeigt, das TFF3 und FCGBP nach Trennung mittels SEC und Ionenaustauschchromatographie co-migrieren. Die PAS-positiven Proteine und TFF3-FCGBP zeigen dagegen eine Trennung, da die Maxima nicht mehr in den gleichen Fraktionen nach Ionenaustauschchromatografie eluieren.

2.1.4 Größe des TFF3-FCGBP-Hetero(di)mers im humanen Kolon

Welche Größe das TFF3-FCGBP Hetero(di)mer besitzt ist bis heute nicht geklärt. Wie bereits besprochen ist FCGBP repetitiv aufgebaut, wird autokatalytisch gespalten und dennoch sind die Fragmente über Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Kapitel 1.2.3, Seite 13)⁽¹¹⁰⁾. Daher ist schwer zu sagen welche relative Molare Masse (M_r) FCGBP wirklich besitzt. Selbst bei einer 7 % SDS-PAGE läuft FCGBP so gut wie nicht in das Gel ein und verbleibt im Sammelgel (Anhang Abb. 44).

Die standardmäßig verwendeten Proteinmarker decken in der Regel nur einen Massenbereich bis 300 k ab. FCGBP hat allerdings ein Molekulargewicht von 572017 g/mol (572 k) ohne Glykosylierung (UniProt, Q9Y6R7). Als Alternative zum SDS-PAGE haben sich zur Trennung von Proteinen dieser Größe Agarosegele bewährt. Nur gibt es für Agarosegele keine Proteinmarker zur Abschätzung der relativen molekularen Masse. Als Orientierung und Größenvergleich wurde ein DNA-Marker auf Agarosegelen verwendet. Dadurch konnten Proteingrößen verglichen und ihre RF-Werte bestimmt werden.

Zur Abschätzung der Größe des TFF3-FCGBP Komplexes wurden ein DNA-Marker und 3 kommerzielle *prestained* Proteinmarker bis 300 k zusammen mit einer TFF3-FCGBP-haltigen Fraktion aus dem Kolon auf einem 1 % Agarosegel getrennt (Abb. 14). Der Gelsteifen mit dem DNA-Marker wurde vor dem Blotten vom Gel abgeschnitten. Der DNA-Marker wurde im Gel mit Fluoreszenzfarbstoff (GelRed Nucleic Acid Gel Stain) gefärbt und die fluoreszierenden DNA Fragmente im UV Licht aufgenommen. Diese Aufnahme wird digital auf den Blot angepasst (Abb. 14, D).

Nach dem blotten des restlichen Gels, wurden die *prestained* Proteinmarker auf der Membran mit Bleistift markiert (Abb. 14, B). Die im SDS-PAGE gut zu unterscheidenden Banden der Proteinmarker (Abb. 14, A) sind nach AgGE nur als breite, farbige Banden zu erkennen. Abschließend wurde auf der Membran TFF3 nachgewiesen (Abb. 14, C).

Die Bestimmung der RF-Werte der DNA- und Protein-Marker zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen RF-Wert und dem Logarithmus der relativen molaren Masse (Abb. 14, E).

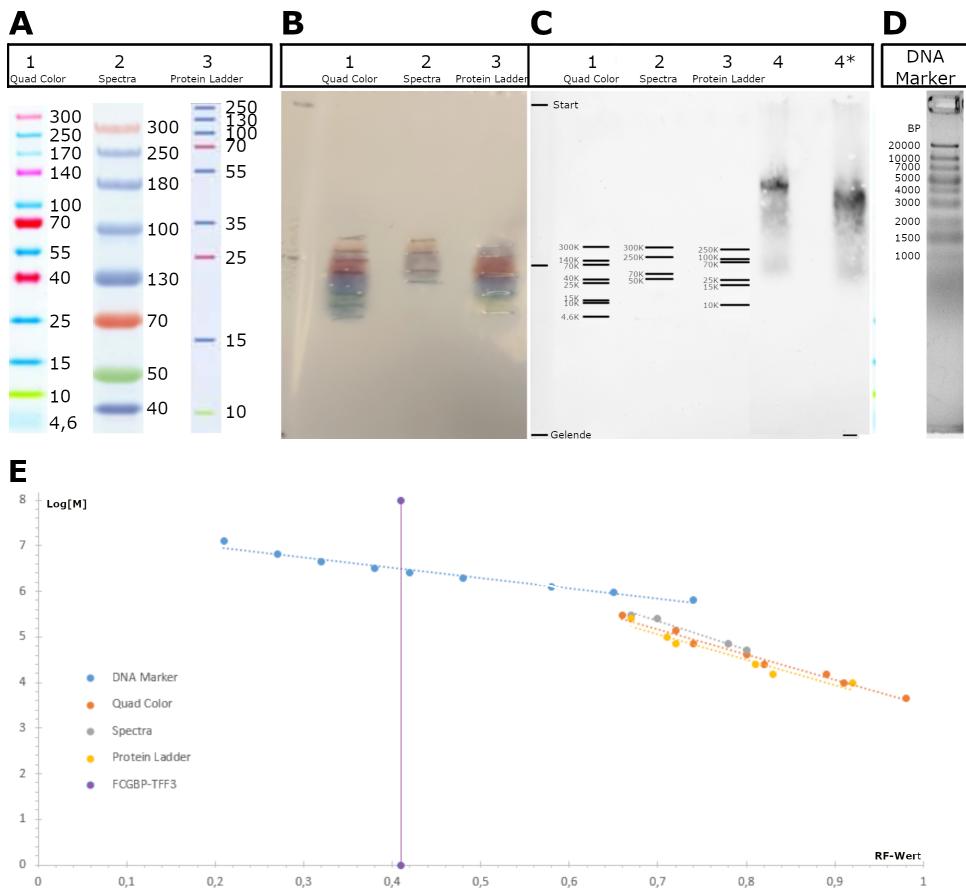


Abbildung 14: Abschätzung der Größe des TFF3-FCGBP Heteromers; Auf einen 1% Agarose Gel wurde der DNA Marker (Gene Ruler 1 kB Plus DNA Ladder, Thermo Scientific), drei prestained Protein Marker (1, QuadColor; 2, Spectra; 3, Protein Ladder) und eine FCGBP-TFF3 haltige Kolonfraktion nach SEC aufgetragen (4, native Probe; 4*, Probe gekocht mit SDS). Die Elektrophorese lief für 120 min bei 40V. (A) zeigt die Proteinbanden der *prestained* Proteinmarker nach Herstellerangaben. (B) Die Proteinbanden der *prestained* Proteinmarker nach dem Blottern und markieren der Banden, die für die Bestimmung der RF-Werte benutzt wurden. (C) Nach dem Nachweis von TFF3 wurden eingezeichnete Banden der *prestained* Proteinmarker digital übertragen. (D) Der DNA-Marker wurde nach dem Färben mit GelRed Flouressenzfarbstoff und Dokumentation unter UV Licht digital an den Agarose Western angepasst. Dazu dienten die Tasche und das Gelende als Markierung. (E) Der RF-Wert des DNA Marker bzw. der Marker Proteine wurden mit LabImage bestimmt und gegen den Logarithmus der relativen molaren Masse (g/mol) aufgetragen. Mit Violett wurde der RF-Wert von TFF3-FCGBP eingezeichnet.

Die Auswertung der verschiedenen Marker zeigte, dass die RF-Werte mit dem dazugehörigen Logarithmus der Molmassen aller Protein- und DNA-Marker in linearem Zusammenhang stehen. Dabei verhalten sich die Ausgleichsgeraden der Protein-Marker sehr ähnlich. Die Steigung der Ausgleichsgeraden des DNA-Markers unterscheidet sich allerdings deutlich von der der Protein-Marker. Damit kann

der DNA-Marker zwar als interner Standard verwendet werden aber nicht für die Größenbestimmung von Proteinen herangezogen werden. Durch die Extrapolation der Ausgleichsgeraden der Markerproteine konnten relative molare Massen (Tabelle 6) für TFF3-FCGBP näherungsweise bestimmt werden. Diese schwanken zwischen 4635 k und 13779 k, je nach zu Grunde liegendem Protein Marker. Damit liegen die geschätzten relativen molaren Massen deutlich über der theoretisch zu erwartenden Masse von 572 k für ein FCGBP-Monomer. Diese Beobachtungen wurden auch bei murinem Fcgbp gemacht, dass ebenfalls deutlich größer ist als ein monomeres Fcgbp⁽¹²⁴⁾. Auch nach nicht-reduzierender Denaturierung durch Kochen mit SDS ist TFF3-FCGBP immer noch deutlich größer (Tabelle 6, 4*) als die theoretisch zu erwartenden 572 k. Offensichtlich ist diese Art der Denaturierung nicht stark genug um FCGBP in ein Monomer zu überführen. Eine weitere Denaturierung der Probe durch Reduktion ist jedoch nicht möglich, da diese FCGBP in einzelne proteolytische Fragmente (r1-12, Abb. 5) trennen würde.

Marker	Gleichung	Natives TFF3-FCGBP	gekochtes TFF3-FCGBP
		4 (RF=0,41) rel. mol. Masse [k]	4* (RF=0,47) rel. mol. Masse [k]
DNA Marker	$y = -2,28x + 7,43$	3151	2299
1 Quad Color	$y = -5,56x + 9,08$	6392	2966
2 Spectra	$y = -6,21x + 9,69$	13779	5841
3 Protein Ladder	$y = -5,53x + 8,93$	4635	2547

Tabelle 6: Berechnete Größe von TFF3-FCGBP, natives TFF3-FCGBP (4) nach normaler Agarose Gel Elektrophorese, gekochtes TFF3-FCGBP (4*) wurde vor der Agarose Gel Elektrophorese 5 min mit 1% SDS gekocht

Dies lässt vermuten, dass hochmolekulares TFF3-FCGBP-Heteromer aus mehreren FCGBP Monomeren besteht, da seine näherungsweise bestimmte Molmasse deutlich über der Molmasse eines FCGBP-Monomers von 572 k liegt.

2.1.5 TRIzol-Extraktion von humanem Kolongewebe

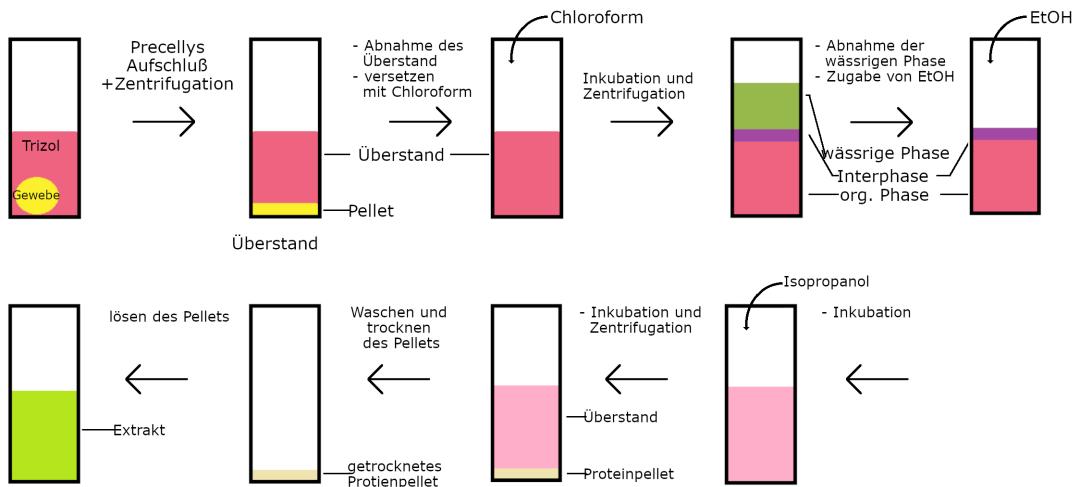


Abbildung 15: Schematische TRIzol-Extraktion; Das Gewebe wird mittels Precellys und Trizol-Reagenz mechanisch aufgeschlossen. Durch Zentrifugation werden die Zelltrümmer abgetrennt. Durch Extraktion des Überstands mit Chloroform und anschließender Zentrifugation wurden 3 Phasen erhalten. Die wässrige Phase enthält die RNA und wird verworfen. Die Inter- und org. Phase werden mit Ethanol (EtOH) und Isopropanol versetzt, extrahiert und zentrifugiert. Das Proteinpellet wird nach Zentrifugation vom Überstand separiert, gewaschen und getrocknet. Das trockene Pellet wird gelöst und der erhaltene Extrakt kann analysiert werden. Für Details siehe 5.1.1, Seite 79

Bisher wurde in allen hier untersuchten humanen Kolongeweben TFF3 in niedermolekularen und hochmolekularen Formen nachgewiesen. Ungeklärt ist bis heute wie die verschiedenen Formen zustande kommen. Eine Möglichkeit ist der Abbau des hochmolekularen TFF3-FCGBP Komplexes, wodurch TFF3 und sein Homodimer freigesetzt werden. Um dies zu untersuchen, wurde Kolongewebe mit TRIzol extrahiert. TRIzol ist eine Flüssigkeit, die unter anderem Guanidinhydrochlorid enthält und normalerweise zur RNA-Extraktion verwendet wird. Dabei werden die chaotropen Eigenschaften des Guanidinhydrochlorid genutzt um Enzyme zu denaturieren und dadurch den Abbau der RNA oder der Proteine zu verhindern. Der Extrakt nach TRIzol-Extraktion wurde mittels SEC gereinigt und mit Western Blot auf TFF3 untersucht.

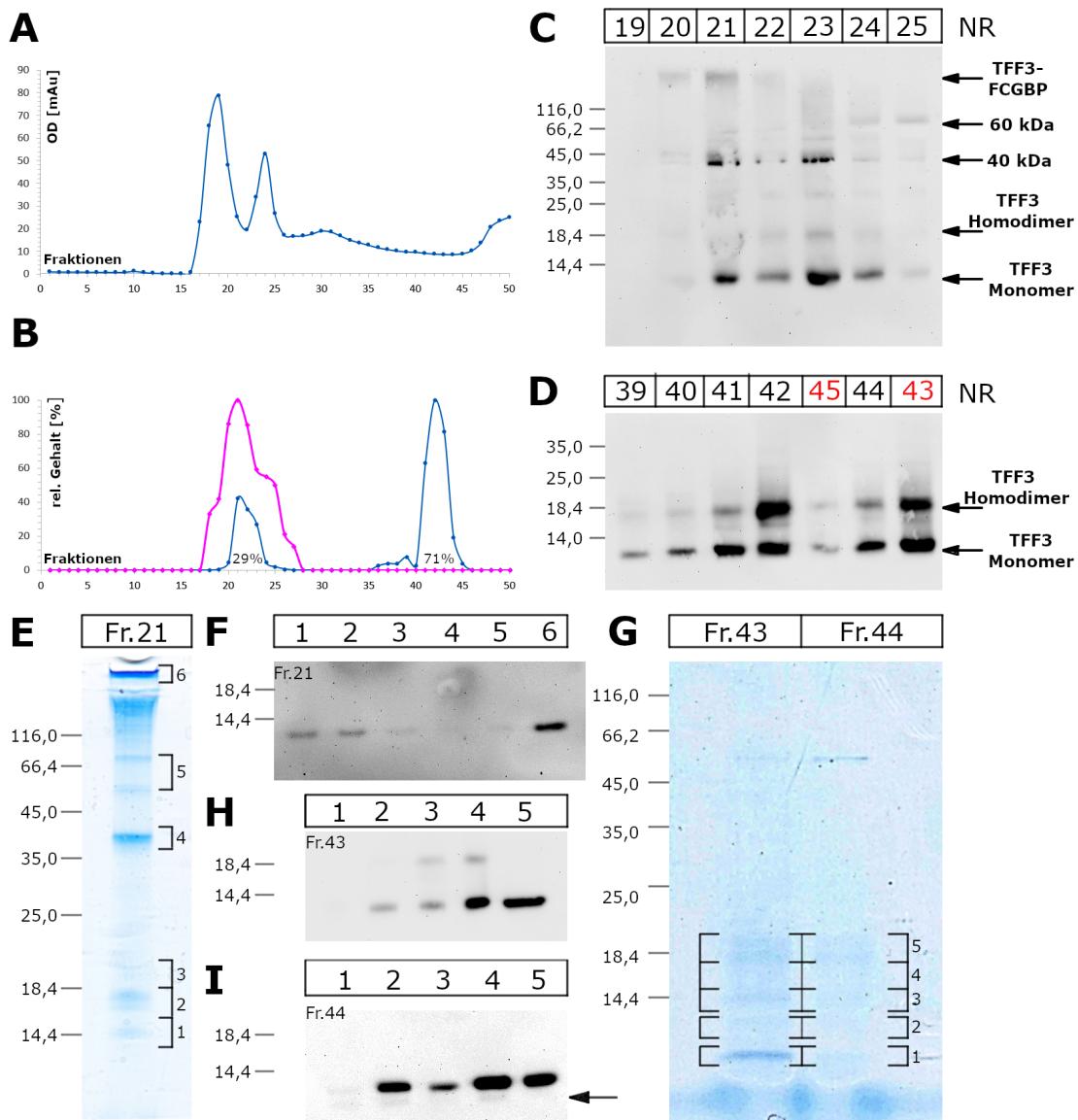


Abbildung 16: Analyse von Kolongewebe K-4.5 nach Trizol-Extraktion; Das Kolonextrakt nach TRIzol-Extraktion wurde durch SEC der Größe nach getrennt. (A) Elutionsprofile nach SEC wurde durch die Absorption bei 280 nm aufgenommen. (B) Die Verteilung des TFF3 (blau) in den Fraktionen der SEC wurde durch die typische 7k-Bande des TFF3-Monomers nach reduzierendem Western und semiquantitativer Auswertung bestimmt. Glykoproteine (pink) wurden durch PAS-Färbung nachgewiesen und semiquantitativ Ausgewertet. Die Angaben in Prozent zeigen das Verhältnis von hoch- zu niedermolekularem TFF3. (C) TFF3 in hochmolekularen Fraktionen 19-25 der SEC nach nicht-reduzierendem 15% SDS-PAGE und Western Blot. (D) TFF3 in niedermolekularen Fraktionen 39-45 der SEC nach nicht-reduzierendem 15% SDS-PAGE und Western Blot. (E) Hochmolekulares TFF3 der Fraktion 21 wurde durch nicht-reduzierendes 15% SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Die Bereiche 1-6 wurde ausgeschnitten und eluiert. (F) Die Eluate 1-6 wurden reduzierend (β ME, 100°C, 5min) nach Westernblot auf TFF3 analysiert. (G) Niedermolekulares TFF3 der Fraktion 43 und 44 wurde durch nicht-reduzierendes 15% SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Die Bereiche 1-5 wurde ausgeschnitten und eluiert. (H/I) Die Eluate 1-5 wurden unter reduzierenden Bedingungen (β ME, 100°C, 5min) mittels SDS-PAGE und Westernblot auf TFF3 analysiert.

TFF3 konnte nach SEC sowohl hoch- als auch niedermolekular nachgewiesen werden (Abb. 16 B). Die semiquantitative Auswertung des TFF3-Monomers nach reduzierenden Western Blot zeigte, dass 29% des TFF3 hochmolekularen, PAS-positiven Bereich vorliegen. Der Großteil des TFF3 (71%) liegt damit deutlich im niedermolekularen Bereich. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass das Protein-Pellet nach der TRIzol-Extraktion nicht vollständig in Lösung gebracht werden konnte. Dadurch kann die prozentuale Verteilung verzerrt sein.

Dies zeigt bereits, dass trotz denaturierender TRIzol Extraktion TFF3 sowohl hoch- als auch niedermolekular vorliegt. Dies bedeutet, dass das niedermolekulare TFF3 bereits vor der Extraktion im Mukus vorlag.

Beide TFF3-Entitäten wurden nach nicht-reduzierendem SDS-PAGE untersucht, um die verschiedenen Formen des TFF3 zu identifizieren. Die hochmolekularen Fraktionen 19-25 (Abb. 16, C) zeigen nach nicht-reduzierendem Western verschiedene TFF3 Formen in den Bereichen 116k (TFF3-FCGBP), 60k, 40k, sowie Homodimer bei 18,4k und Monomer unterhalb von 14,4k. In den niedermolekularen Fraktionen 39-45 (Abb. 16, D) werden vor allem TFF3-Homodimer und -Monomer erkannt.

Damit existieren dieselben TFF3-Formen im Kolongewebe und sind keine Artefakte, die durch die Extraktionsmethode verursacht werden.

Da die Immunreakтивität des TFF3 durch das FCGBP maskiert wird, wurde untersucht in welchem Verhältnis die verschiedenen Formen des TFF3 in den niedermolekularen und hochmolekularen Fraktionen vorliegen. Die Abbildung 16 C lässt vermuten, dass TFF3 hauptsächlich als Monomer unterhalb von 14,4k vorliegt. Daher wurde ein Coomassie Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen angefertigt und aus der hochmolekularen Fraktion 6 Banden (16 E) und aus den niedermolekularen Fraktionen 5 Banden (16 G) ausgeschnitten. Anschließend wurden die Proteine aus den Banden eluiert, mit β -Mercaptoethanol (β ME) reduziert und nach Western Blot auf TFF3 untersucht.

In der hochmolekularen Fraktion 21 (16 E) ist das meiste TFF3 in der Bande 6 oberhalb von 116 kDa, gefolgt vom TFF3-Homodimer bei 18,4 k und Monomer unterhalb von 14,4 k (16 F). Auch im Bereich bei 60 k und 40 k konnten Spuren von TFF3 nachgewiesen werden.

Um die Verteilung des TFF3 in hochmolekularen Fraktionen zu bestätigen, wurden hochmolekulare Fraktionen erneut durch SEC getrennt.

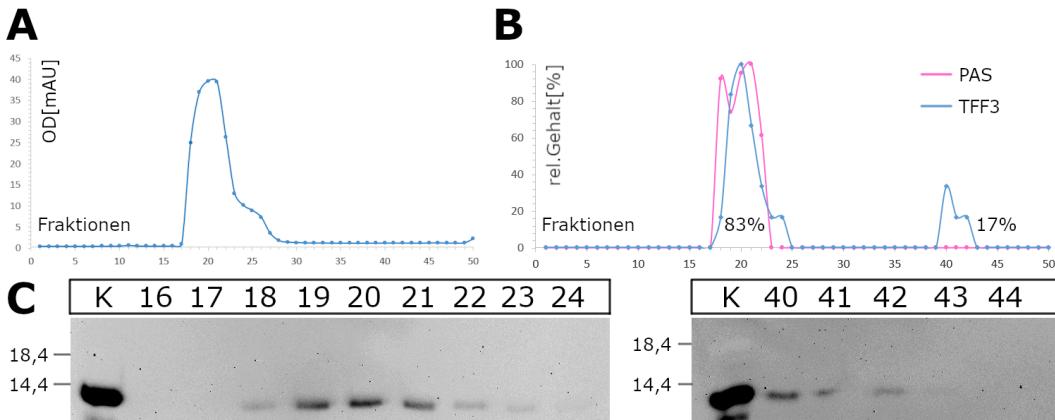


Abbildung 17: SEC von hochmolekularem, TFF3-positiven Fraktion 18-26 (K-4.5); (A) Elutionsprofil nach SEC aufgenommen durch die Absorption bei 280 nm. (B) Verteilung des TFF3 in den Fraktionen der SEC bestimmt durch semiquantitative Auswertung des TFF3-Monomers (blau) nach reduzierendem Western. Glykoproteine (pink), wie Muzine, wurden nach PAS-Färbung semiquantitativ ausgewertet. (C) TFF3 nachgewiesen als Monomer nach reduzierendem Western Blot in hochmolekularen Fraktionen 18-23 und niedermolekularen Fraktionen 40-43.

Nach dieser zweiten Trennung hochmolekularer Fraktionen konnten 83 % des TFF3 als hochmolekulares TFF3 und 17 % als niedermolekulares TFF3 nachgewiesen werden. Die 60k und 40k großen TFF3-Komplexe konnte nach der erneuten Trennung nicht nachgewiesen werden. Die SEC bestätigt die Maskierung des TFF3 durch FCGBP und zeigt deutlich, dass das hochmolekulare TFF3-FCGBP die Hauptentität des TFF3 in hochmolekularen Fraktionen darstellt.

Niedermolekulares TFF3 wurde ebenfalls bezüglich der verschiedenen TFF3-Formen analysiert (Abb. 16 G). Dabei konnte vor allem TFF3-Homodimer nachgewiesen werden und weniger TFF3-Monomer (Abb. 16 H,I). Schwach ist sogar das verkürzte TFF3-Monomer zu erkennen (Abb. 16 I, Pfeil).

Somit konnten trotz denaturierender TRIzol-Extraktion sämtliche TFF3-Formen nachgewiesen werden.

2.1.6 Proteomanalyse von niedermolekularem TFF3 aus dem humanen K_olon

Niedermolekulares TFF3 liegt unter nicht-reduzierenden Bedingungen als Homodimer und als Monomer vor (Abb. 11 F). Unter reduzierenden Bedingungen gibt es neben dem Monomer noch eine verkürzte Form des Monomers (Abb. 11 E).

Zur weiteren Charakterisierung der beiden Monomere, wurde in Kooperation mit Frau Dr. Haupenthal Kolongewebe mechanisch aufgeschlossen und durch Ionen-austauschchromatographie getrennt. In den ersten Fraktionen (Abb. 18 **A**) wurde TFF3 unter reduzierenden Bedingungen (β ME, 100°C, 5min) überwiegend in den kleinen Formen nachgewiesen. Die Fraktionen 1 bis 5 wurden daher anschließend durch SEC weiter gereinigt. Das TFF3 wurde in den Fraktionen 40-47 identifiziert (Abb. 18 **B**). Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich in diesen Fraktionen nur das verkürzte TFF3-Monomer (Abb. 18 **C**). So konnte die verkürzte Form des TFF3 erfolgreich isoliert werden. Zur Identifikation der Aminosäuresequenz des verkürzten TFF3-Monomers wurde das isolierte TFF3 tryptisch verdaut und mittels Massenspektroskopie (MS) analysiert (Kooperation mit Herrn Prof. Schlüter, UKE Hamburg). Dazu wurde die gereinigte verkürzte Form des TFF3 über reduzierendes SDS-PAGE getrennt und nach Coomassie Blue Färbung aus dem Gel eluiert.

Nach der Elution der Bereiche 1-3 aus dem Coomassie Gel (Abb. 18 **D**) konnte TFF3 vor allem in der Bande 2 nachgewiesen werden (Abb. 18 **E**). Dieselben Bereiche wurden aus einem Coomassie Gel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen proteomanalytisch untersucht (Abb. 18 **G**). Die Proteine in den Bereichen A und B bzw. a und b wurden im Gel tryptisch verdaut, eluiert und mittels MS auf Fragmente von TFF3 untersucht.

Nach Elution aus einem reduzierendem Coomassie Gel (R) konnte der vollständige N-Terminus des TFF3 im Bereich B nachgewiesen werden. Am C-Terminalen Ende fehlte jedoch ein Phenylalanin (F59) (Abb. 18, **G**, rot markierte Aminosäuren wurden vom MS nachgewiesen). In der Gelbande A konnte kein TFF3 nachgewiesen werden.

Die Fragmente des TFF3, eluiert aus dem nicht reduzierenden Coomassie Gel (NR) zeigen Verkürzungen von TFF3 am N-Terminus um 3 bis 5 Aminosäuren. Der C-Terminus von TFF3 konnte durch die MS Analysen leider nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde das verwendetet Antiserum (a-hTFF3-8, Abb. 18, **A**, **C**, **E**) gegen das C-terminale Epitop 49-59 generiert⁽⁵⁹⁾. Da dieser TFF3 nach der Elution erkennt (Abb. 18, **E**), kann der C-Terminus nicht vollständig fehlen. Damit wurde gezeigt, dass es im Kolonextrakt tatsächlich verkürzte Formen des TFF3-Monomers gibt.

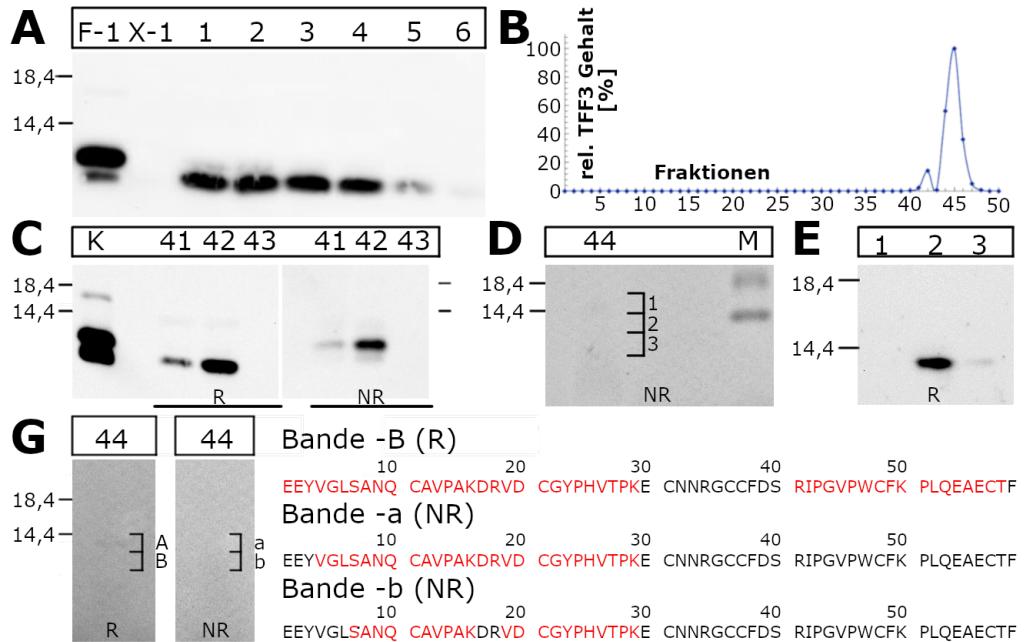


Abbildung 18: Proteomanalyse von niedermolekularem TFF3; Kolongewebe wurde mit Precellys aufgeschlossen und durch Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. (A) Die TFF3-positiven Fraktionen 1-5 wurden vereinigt und mittels SEC weiter gereinigt. (B) Nach der SEC wurde TFF3 im niedermolekularen Bereich durch reduzierende Western-Blot-Analyse nachgewiesen und semiquantitativ ausgewertet. (C) TFF3-positive Fraktionen 41-43 analysiert mittels reduzierendem (β ME, 100°C, 5min) (R) und nicht-reduzierendem (NR) Western-Blot. (D) Die nicht-reduzierende SDS-PAGE der Fraktion 44 wurde zur Elution des TFF3 mit Coomassie-Blau gefärbt. (E) Die eluierten Banden 1-3 wurden mittels reduzierendem Western Blot auf TFF3 untersucht. (G) Aus einem Coomassie-Blau gefärbten Gel wurden die Bereiche A und B (NR) bzw. a und b (R) ausgeschnitten. Die Proteine dieser Gelbanden wurden tryptisch verdaut und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Die rot gefärbten Aminosäuren des TFF3 wurden massenspektrometrisch identifiziert. In der Bande A konnte kein TFF3 nachgewiesen werden.

2.1.7 TFF3 im Kolontumorgewebe

Kolontumore zeigen eine erhöhte TFF3-Expression⁽¹³⁵⁾. Bisher ungeklärt ist die Frage, ob TFF3 im Tumor in den selben Formen vorkommt, wie in gesundem Kolongewebe. Um das Vorkommen von verkürztem TFF3 zu untersuchen, wurden Kolontumore und deren umliegendes Gewebe ohne pathologischen Befund von drei Individuen verglichen.

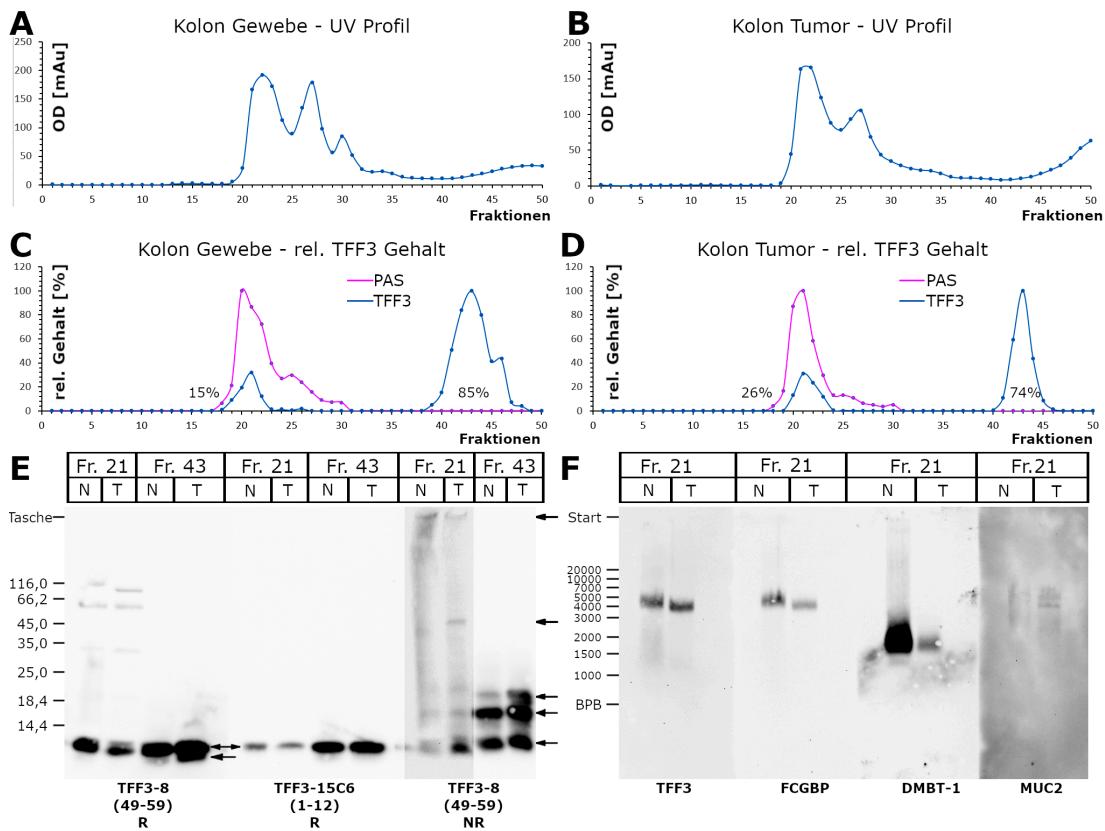


Abbildung 19: SEC von Kolongewebe und dazugehörigem Kolontumor; Kolongewebe K-11 und Kolon Tumor K-11Tu wurden mit Precellys aufgeschlossen und durch SEC getrennt. (**A und B**) Die Elutionsprofile der SEC wurden durch die Absorption bei 280 nm aufgenommen. (**C und D**) Die Verteilung des TFF3 (blau) in den Fraktionen der SEC wurde durch reduzierende Western-Blot-Analysen untersucht und die charakteristische 7k Bande des TFF3-Monomers semiquantitativ ausgewertet. Muzine und Glykoproteine (pink) wurde mittels PAS-Färbung analysiert und semiquantitativ ausgewertet. Die Prozentangaben beziehen sich auf TFF3 und geben das Verhältnis zwischen hoch- und niedermolekularem TFF3 an. (**E**) TFF-positive Fraktionen wurden mit verschiedenen Antisera gegen TFF3 nach reduzierendem (R) und nicht-reduzierendem (NR) Western-Blot analysiert. Das Epitop, das vom Antikörper erkannt wird, ist unter dem Antikörper in Klammer vermerkt. (**F**) Die hochmolekularen Fraktionen 21 wurden nach AgGE auf TFF3, FCGBP, DMBT-1 und MUC2 analysiert.

Die Kolongewebe und -tumore wurden mechanisch mit Precellys aufgeschlossen und die Extrakte mittels SEC getrennt. Im Kolongewebe ohne pathologischen Befund liegen 15% des TFF3 (Abb. 19 C) in den Fraktion 19-22 vor. Im dazugehörigen Tumorgewebe (Abb. 19 D) liegen 26% des TFF3 hochmolekular vor.

In den Proben aller drei Individuen, unabhängig ob Kolontumor oder Kolongewebe ohne pathologischen Befund überwiegt das niedermolekulare TFF3 mit 55 % - 85 % (Tabelle 7). Diese Ergebnisse ähneln somit den vorangegangenen Untersuchungen

von Kolongeweben.

Probe		HM TFF3 [%]	NM TFF3 [%]
K-11	Precycles	15	85
K-11Tu	Precycles	26	74
K-12	Precycles	45	55
K-12Tu	Precycles	21	79
K-13	Precycles	39	61
K-13Tu	Precycles	20	80

Tabelle 7: relative TFF3-Verteilung Kolontumoren

Zur weiteren Untersuchung der verschiedenen TFF3-Entitäten wurden niedermolekulares und hochmolekulares TFF3 mittels SDS-PAGE bzw. Agarosegel getrennt. Die TFF3-reichsten niedermolekularen und hochmolekularen Fraktionen (Abb. 19 E) aus der SEC des Kolongewebes und dem Kolontumor wurden unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen mit dem C-terminalen Antiserum TFF3-8⁽⁵⁹⁾ und dem N-terminalen Antiserum TFF3-15C-6 (NanoTools) untersucht.

Die Fraktion 21 zeigen TFF3 nach nicht-reduzierendem Western Blot in den Bereichen oberhalb 116k (TFF3-FCGBP), 40k, 18k (Homodimer) und unterhalb 14k Monomer. In den niedermolekularen Fraktionen 43 liegt TFF3 nur als Monomer (unterhalb 14k), Homodimer (18k) und in einer 20k großen Form vor.

Nach Reduktion (β ME, 100°C, 5 min) der Fraktionen 21 und 43 kann TFF3 nur als Monomer nachgewiesen werden. Allerdings zeigt das C-terminalen Antiserum TFF3-8 für die Fraktion 43 eine deutliche und für Fraktion 21 eine schwache Doppelbande. Das N-terminalen TFF3-15C5 Antiserum erkennt unter reduzierenden Bedingungen nur das TFF3-Monomer aber nicht die verkürzte Form des TFF3-Monomers. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigt das TFF3-15C6 Antiserum überhaupt keine Immunreaktivität gegenüber TFF3, da vermutlich die Disulfidbrücke zwischen C11 und C37 die Anlagerung des Antikörpers verhindert (Abb. 37, 61). Dies zeigt wieder die N-Terminal Verkürzung des TFF3-Monomers, die bereits in Kapitel 2.1.6 besprochen wurde.

Im Vergleich zwischen Kolongewebe ohne pathologischen Befund und Tumorgewebe (Abb. 20) zeigte sich, dass mehr TFF3 im Tumor ist, als in den Geweben ohne pathologischen Befund. Vor allem in den niedermolekularen Fraktionen wird dies deutlich. Es gibt jedoch keine Unterschiede beim Nachweis der verschiedenen

TFF3-Formen zwischen nicht pathologischem Gewebe und Tumor. In allen Proben der 3 Patienten wurde TFF3 in nieder- und hochmolekularer Form nachgewiesen, welche sich aus dem Monomer und dem verkürzten Monomer zusammensetzen.

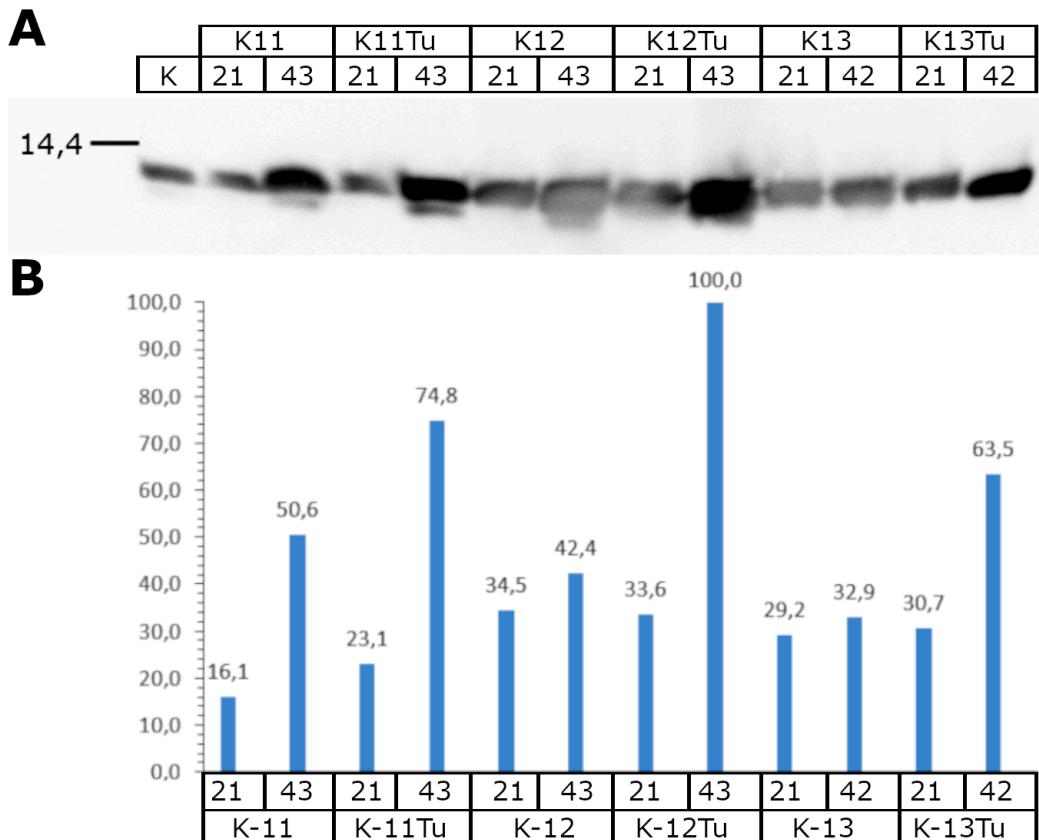


Abbildung 20: Vergleich von Tumor- und Normal-Gewebe des Kolon; (A) Die Hauptfraktionen der verschiedenen Entitäten von Tumor und angrenzendem Kolongewebe ohne Befund wurden im reduzierenden SDS-PAGE bezüglich TFF3 verglichen. K/D-Kontrolle Darm. (B) Die Immunreaktivität wurde semiquantitativ ausgewertet.

Zur Untersuchung der Assoziation von TFF3 mit Glykoproteinen des Mukus wurden die Proben nach AgGE mit Antiseren bezüglich TFF3, FCGBP, MUC2 und DMBT-1 analysiert (Abb. 19 F). TFF3 und FCGBP sind als deutliche Bande mit vergleichbarer Laufhöhe nachweisbar (Abb. 19 F). Dies bestätigt das TFF3-FCGBP auch im Tumor vorliegt. Allerdings kann dabei eine unterschiedliche relative molare Massen des TFF3-FCGBP im Kolongewebe und des Kolontumor beobachtet werden. DMBT-1 kann im gesunden Kolongewebe (Abb. 19 F) deutlich unterhalb des TFF3-FCGBP-Komplex nachgewiesen werden. Im Tumor ist deutlich weniger DMBT-1 vorhanden. Ebenfalls ist das Hauptmuzin des Kolon MUC2 als

breiter Bereich nachweisbar (Abb. 19 **F**).

Unterschiede bei den verschiedenen Formen des TFF3 konnten nicht festgestellt werden. Damit sind im Kolon immer die selben Formen des TFF3 gefunden wurden. Ob diese Formen auch in anderen TFF3 sezernierenden Geweben auftreten wird in den nächsten Kapiteln untersucht.

2.2 Speichel

TFF3 kommt nicht nur im Mukus des Kolon vor, sondern konnte auch im Gewebe der Speicheldrüsen nachgewiesen werden⁽⁵¹⁾. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, in welchen Formen TFF3 im Speichel vorliegt.

Dazu wurde Speichel von 5 gesunden Individuen untersucht. Von einigen Probanden wurden mehrfach Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt. Dadurch wurden insgesamt 17 Trennungen von Speichelproben durch SEC durchgeführt. In Abbildung 21 ist exemplarisch die Trennung des Speichels S-6.3 dargestellt.

Individuum	Probe	HM TFF3 [%]	NM TFF3 [%]
Spender 1	S-1	41	58
	S-1.1	43	57
Spender 2	S-2	53	47
	S-2.1	56	44
	S-2.2	56	44
	S-3	48	52
	S-3.1	58	42
	S-3.2	78	21
Spender 3	S-4	68	32
	S-5	64	36
	S-6	46	64
	S-6.1	18	82
Spender 4	S-6.2	55	45
	S-6.3	39	70
	S-7	44	56
Spender 5	S-8	70	30

Tabelle 8: relative TFF3-Verteilung im Speichel, Die unterschiedlichen Probennummern sind auf unterschiedliche Zeitpunkte der Probenahme und Reinigung zurückzuführen. HM TFF3-hochmolekularer TFF3-FCGBP Komplex; NM TFF3- niedermolekulares TFF3 (Monomer, sein Homodimer und das verkürzte TFF3

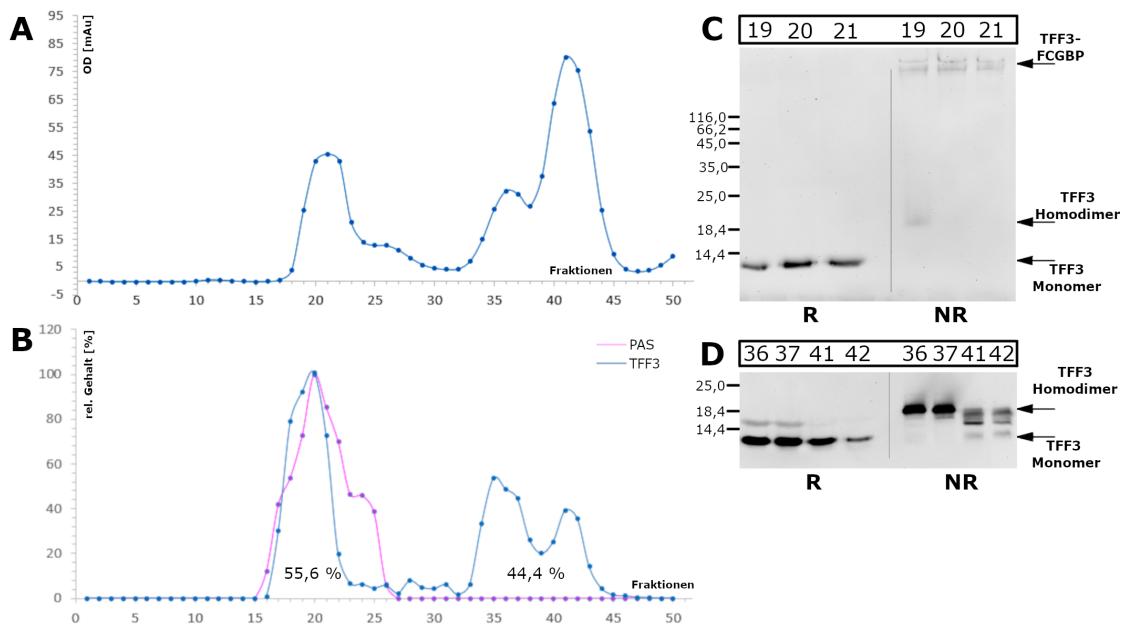


Abbildung 21: SEC von humanem Speichel; (A) Die SEC von zentrifugiertem Speichel (S-6) wurde durch Absorption bei 280 nm dokumentiert . (B) Relative Verteilung von TFF3 nach SEC bestimmt durch semiquantitative Auswertung der typischen 7k Bande des TFF3-Monomers nach reduzierenden Western Blot Analysen. Muzine und Glykoproteine wurde durch PAS-Färbung analysiert und semiquantitativ ausgewertet. (C) Die hochmolekularen Fraktionen 19-21 wurden nach reduzierendem (R) und nicht-reduzierendem (NR) Western-Blot auf TFF3 untersucht. (D) Die niedermolekularen Fraktionen 36, 37 und 41, 42 wurde nach reduzierendem (R) und nicht-reduzierendem (NR) Western-Blot auf TFF3 untersucht.

Das Chromatogramm der SEC zeigt hochmolekulare Proteine in den Fraktionen 18-24 mit einem Maximum in Fraktion 21 (Abb. 21 A). Die Absorption bei 280 nm nimmt im niedermolekularen Bereich (Fr. 34-45) mit 2 Maxima (Fr. 36 & 41) stark zu. Dies stellt einen Unterschied zu den SEC der Kolonextrakte dar, bei denen der Großteil der Proteine hochmolekular vorliegt. Im hochmolekularen Bereich wurden durch PAS-Färbung Muzine und Glykoproteine nachgewiesen (Abb. 21 B). Die Analyse von TFF3 nach reduzierendem Western Blot zeigt TFF3 in hochmolekularen- und niedermolekularen Fraktionen (Abb. 21 B). Das hochmolekulare TFF3 ist im nicht-reduzierenden Western Blot als im Startbereich des Gels oberhalb von 116k als TFF3-FCGBP nachweisbar (Abb. 21 C). Niedermolekulares TFF3 liegt nach nicht-reduzierendem Western Blot überwiegend als Homodimer vor (Abb. 21 D). In den Fraktionen 41 und 42 wird TFF3 unter nicht-reduzierenden Bedingungen auch in monomerer Form nachgewiesen. In der abgebildeten Speichelanalyse liegen hoch- und niedermolekulares TFF3 in einem

Verhältnis von 55,6% zu 44,4% vor. Die prozentuale Verteilung variiert allerdings. So wurden in allen Analysen hochmolekulares TFF3 in einem Bereich von 18% bis 78% gefunden. Selbst beim selben Individuum variiert dieses Verhältnis in Abhängigkeit des Probenahmezeitpunkts. So schwankt der Anteil des hochmolekularen TFF3 in 4 Proben eines Probanden zwischen 48% und 78% (Tabelle 8). Des weiteren wurden die auftretenden TFF3-Formen von 3 verschiedene Speichelproben verglichen. Dazu wurden hoch- und niedermolekulares TFF3 nach SDS-PAGE und AgGE analysiert.

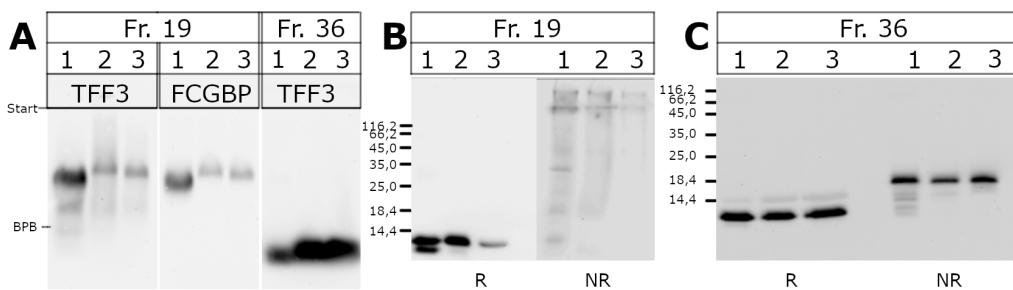


Abbildung 22: TFF3 im Speichel drei verschiedener Individuen (1 S-1, 2 S-2, 3 S-6); (A) Hochmolekulares (Fr. 19) und niedermolekulares (Fr. 36) TFF3 wurden nach AgGE mit Antiseren gegen TFF3 und FCGBP untersucht. (B) Die hochmolekularen Fraktionen 19 aller drei Speichelproben wurden bezüglich TFF3 nach reduzierendem (R) und nicht-reduzierendem (NR) Western Blot mit einander verglichen. (C) Die verschiedenen TFF3-Formen in den niedermolekularen Fraktionen 36 aller drei Speichelproben wurden nach reduzierendem (R) und nicht-reduzierendem (NR) Western Blot analysiert.

Im Speicheldrüsengewebe wurde FCGBP nachgewiesen (136, 137). Auch im Speichel wurde FCGBP zusammen mit TFF3 nachgewiesen (Abb. 22 A). Beide Proteine zeigen ein ähnliches Laufverhalten im Agarosegel. Allerdings unterscheiden sich die relativen molaren Massen des TFF3-FCGBP zwischen den Proben der verschiedenen Probanden.

Der direkte Vergleich von hochmolekularem TFF3 unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen, zeigt eine deutliche Abnahme der Immunreakтивität des TFF3-FCGBP Heterodimers gegenüber dem TFF3-Monomer (Abb. 22 B). In der Probe des Individuums 1 wurde unter reduzierenden Bedingungen neben dem Monomer eine verkürzte TFF3-Form nachgewiesen (Abb. 22 B).

Das niedermolekulare TFF3 kann im Agarose Gel ebenfalls unterhalb der Bromphenolblau-Lauffront (BPB) gefärbt werden (Abb. 22, A, Fr. 36). Aufgrund der begrenzten Trennschärfe des Agarosegels, gibt es keine Auftrennung der niedermolekularen TFF3-Formen.

molekularen TFF3-Formen. Eine vergleichende SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen von niedermolekularem TFF3 (Fr.36) zeigt deutlich die Reduktion des TFF3-Homodimers zum TFF3-Monomer (Abb. 22 C). Somit wurde TFF3 im Speichel in hochmolekularer Form zusammen mit FCGBP und in niedermolekularer Form nachgewiesen.

2.2.1 Hochmolekulares TFF3-FCGBP in humanem Speichel

Der Speichel enthält neben TFF3 und FCGBP weitere Proteine, die seine Eigenschaften bestimmen. Dazu zählt auch das Muzin MUC5B, das als gelbindendes Muzin maßgeblich für die Viskosität des Speichels verantwortlich ist⁽¹³⁸⁾. Der hochmolekulare PAS-positive Bereich nach SEC wurde deshalb mit spezifischen Antikörpern bezüglich MUC5B bzw. MUC5AC untersucht (Abb. 23). Auch wurden durch das Lektin GSAII Glykoproteine nachgewiesen, die eine α -1-4-Acetylglukosamin-Einheit besitzen (Abb. 23).

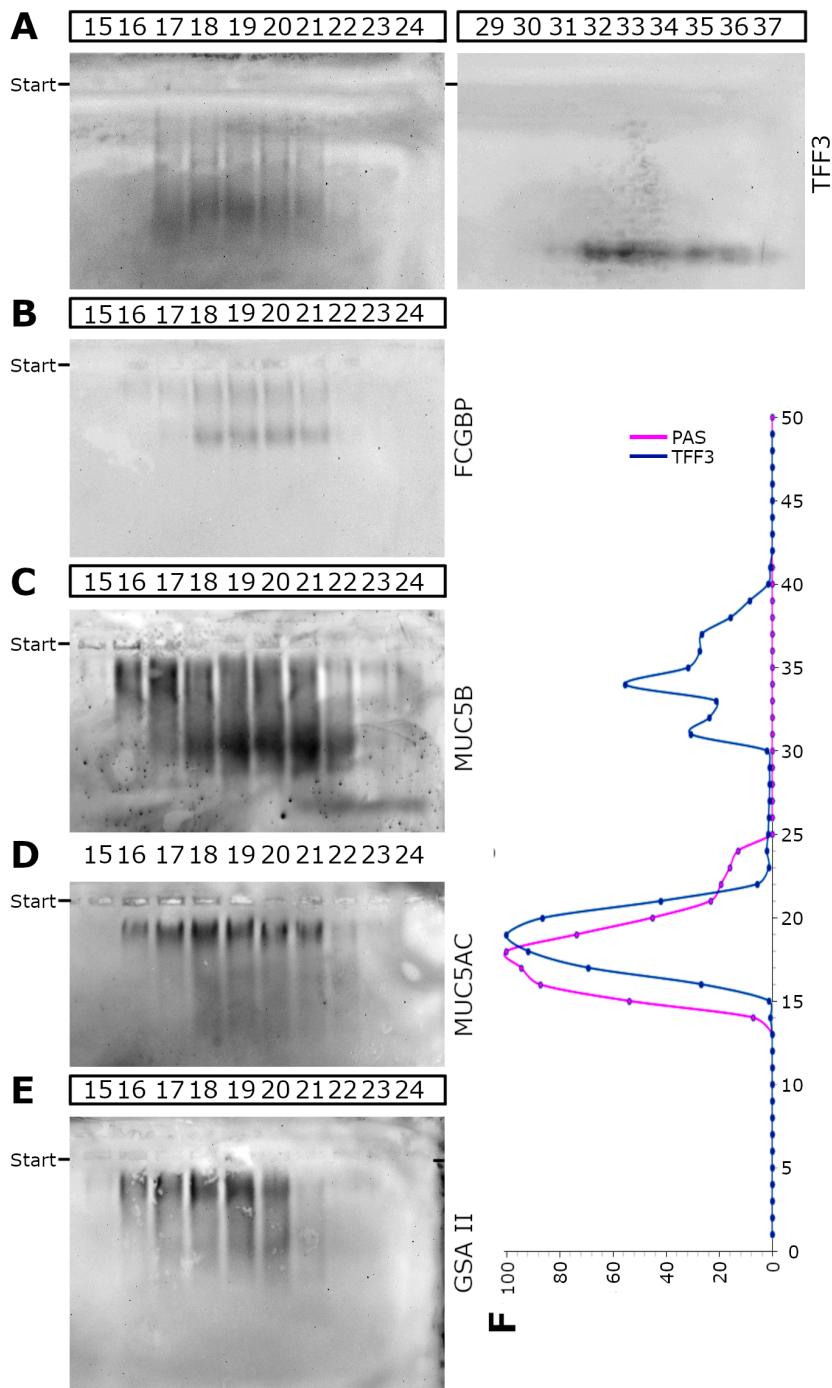


Abbildung 23: Mukus-assoziierte Proteine im Speichel nach SEC; Hochmolekulare Fraktionen einer SEC von humanem Speichel (S-5) wurden im 1 % Agarosegel getrennt und nach Kapillar-Blot mit spezifischen Antikörpern bezüglich TFF3 (**A**), FCGBP (**B**), MUC5B (**C**), MUC5AC (**D**) und mit dem N-Acetylglucosamin-spezifischen Lektin GSAII (**E**) analysiert. (**F**) PAS-Färbung und TFF3-Monomer nach reduzierendem Western Blot wurden semiquantitativ ausgewertet.

Um zu untersuchen, ob diese Proteine im Speichel assoziiert sind wurden hochmolekulare Fraktionen durch Ionenaustauschchromatographie nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt. Die UV Absorption bei 280 nm detektierte Proteine in den ersten Fraktionen und in den Fraktionen 20 bis 35 (Abb. 24 **A**). In diesen Fraktionen wurde auch die stärkste PAS-Färbung nachgewiesen (Abb. 24 **B**). Die Analyse von TFF3 war dagegen nur in den Fraktionen 24 bis 33 positiv (Abb. 24 **B**). Im selben Bereich konnte auch FCGBP (Abb. 24, **E**) im Agarose Gel nachgewiesen werden. Beide Proteine zeigen ihr Maximum in Fraktion 29. MUC5B und MUC5AC wurden dagegen in den PAS positiven Fraktionen 18-31 mit einem Maximum in Fraktion 24 detektiert (Abb. 24 **F,G**).

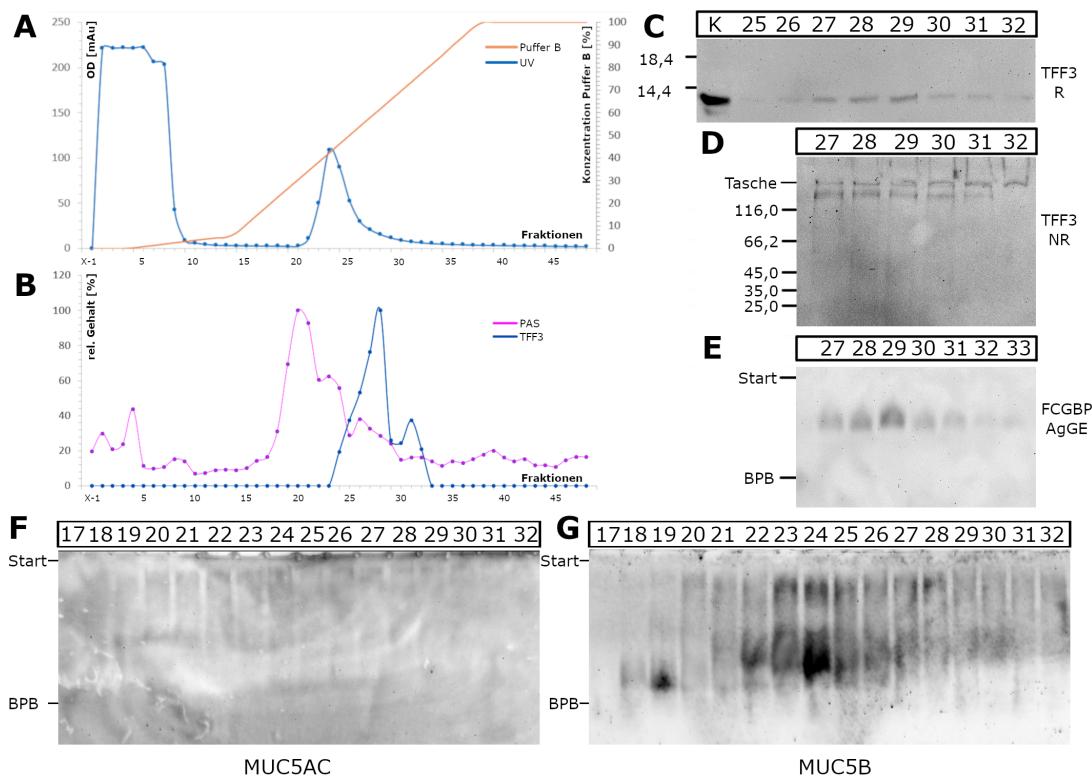


Abbildung 24: Ionenaustauschchromatographie von hochmolekularem TFF3 im Speichel (S-6); **A** Das Elutionsprofil der hochmolekularen Fraktionen (S-6.1-3, Fr. 17-21) während der Ionenaustauschchromatographie wurde durch die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. **B** Relative Verteilung von TFF3 bestimmt durch die charakteristische 7k Bande des TFF3-Monomer nach Reduktion. In violett ist die relative Verteilung der PAS-positiven Fraktionen dargestellt. **C** Die Fraktionen 25-32 zeigen TFF3-Monomer nach reduzierendem (R) Western Blot. **D** In den Fraktionen 27-32 liegt TFF3 als hochmolekulares TFF3 unter nicht-reduzierenden Bedingungen (NR) vor. **E** Nach Agarose-Gelelektrophorese kann in den Fraktionen 27-33 FCGBP nachgewiesen werden. **F,G** Die Analyse bezüglich MUC5AC bzw. MUC5B erfolgte nach Agarose-Gelelektrophorese der Fraktionen 17-32.

Muzine und TFF3-FCGBP zeigen eine ähnliches Laufverhalten bei der Trennung durch SEC. Durch Ionenaustauschchromatographie eluieren die Maxima von Muzinen (Fr.24) und TFF3-FCGBP (Fr.29) dagegen in unterschiedlichen Fraktionen (Abb. 24). Erwähnenswert ist dabei der Nachweis von MUC5AC im Speichel, da es hauptsächlich im Magen und der Lunge exprimiert wird⁽¹⁸⁾. MUC5AC konnte auch in Proteomanalysen von hochmolekularem Speichel nachgewiesen werden (Abb. 25 C). TFF3 konnte nur durch Western Blot Analysen in den markierten Bereichen nachgewiesen werden (Abb. 25 B).

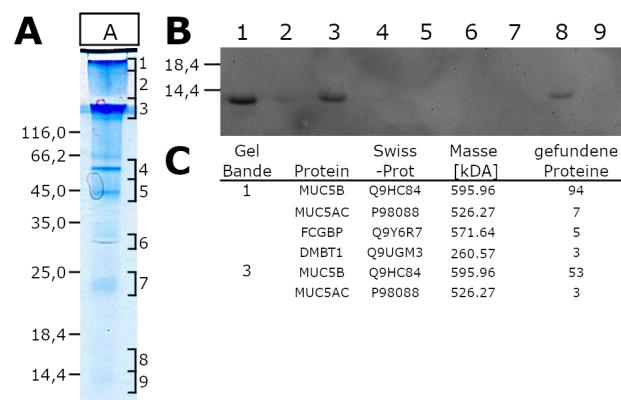


Abbildung 25: Proteomanalyse von hochmolekularem Speichel (S-3); **A** Die mittels SEC und anschließender Ionenaustauschchromatographie gereinigten, hochmolekularen Speichel-Fraktionen 22-25 (A) wurden vereinigt, durch 15% SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Die markierten Bereiche wurden ausgeschnitten. **B** Nach Elution der Proteine aus den ausgeschnittenen Gel-Banden wurde diese reduzierend auf TFF3 untersucht. **C** Die Proteine der ausgeschnittenen Gel-Banden wurden danach tryptisch verdaut und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert.

2.2.2 Niedermolekulares TFF3 in humanem Speichel

In niedermolekularen TFF3-haltigen Fraktionen des humanen Speichels konnten, wie bereits im Kolon, unterschiedlich große TFF3-Formen nachgewiesen werden (Abb. 21 D; Abb. 22 C). Es ist von Interesse, die verkürzten TFF3-Formen mit denen im Speichel zu vergleichen, da im Speichel bzw. Kolon unterschiedliche Proteasen aktiv sind. Zur Untersuchung der verschiedenen niedermolekularen Formen des TFF3 wurden die niedermolekularen Fraktionen des Speichels eines Individuum nach SEC vereinigt und die Proteine dieser Fraktionen durch Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt.

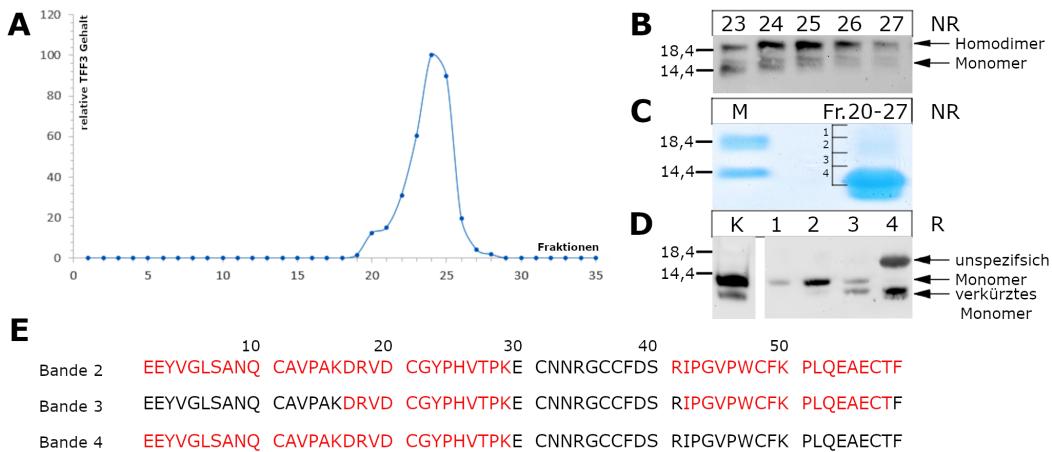


Abbildung 26: Proteomanalyse von gereinigtem niedermolekularem TFF3 aus humanem Speichel (S-3); **A** Die relative Verteilung von TFF3 nach Ionen austausch chromatografie des niedermolekularen TFF3 wurde durch semiquantitative Auswertung der charakteristischen 7k Banden des TFF3-Monomers nach reduzierendem (R) Western Blot bestimmt. **B** TFF3 wurde in den Fraktionen 23-27 durch nicht-reduzierende (NR) SDS-PAGE nachgewiesen. **C** Ein Konzentrat aus den Fraktionen 20 bis 27 wurde durch 15% SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Die markierten Bereiche wurden ausgeschnitten. **D** Die Proteine der ausgeschnittenen Gel-Banden wurden eluiert und unter reduzierenden Bedingungen auf TFF3 analysiert. **E** Nach tryptischer Verdauung der ausgeschnittenen, nicht-reduzierten Gel-Banden (**C**,) wurden die Proteine mit LC-ESI-MS/MS analysiert. Die rot markierten Aminosäuren wurden vom LC-ESI-MS/MS identifiziert.

TFF3 wurde unter reduzierenden Bedingungen nach SDS-PAGE als Monomer in den Fraktionen 20-27 nachgewiesen (Abb. 26 **A**). Nicht-reduzierend wurde TFF3 als Homodimer bei 18,4k und Monomer 14,4k detektiert. Das zweifach gereinigte niedermolekulare TFF3 wurde durch nicht-reduzierende SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Blue gefärbt (Abb. 26, **C**). Aus dem Coomassie Gel wurden 4 Bereiche zwischen 20k und 6k ausgeschnitten, eluiert und reduzierend nach SDS-PAGE auf TFF3 untersucht (Abb. 26 **D**). TFF3-Monomer konnte in den Gel-Banden 1 bis 3 nachgewiesen werden. In den Gel-Banden 2 bis 4 wurde zusätzlich eine verkürzte Form des TFF3-Monomers durch das Antiserum erkannt. Die 4 Gelbanden wurden tryptisch verdaut und mit Massenspektroskopie (LC-ESI-MS/MS) charakterisiert (Abb. 26, **C**). Dabei konnten in den Banden 2-4 TFF3-Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 26, **E**). In Bande 3 wurden ein um eine Aminosäure (F) verkürztes C-terminales Fragment identifiziert.

Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass TFF3 im Speichel in hoch- und niedermolekularer Form vorliegt.

2.3 Lunge

Es ist bekannt, das TFF3 und FCGBP in der Lunge sezerniert werden^{(60), (139)}. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob TFF3 in der Lunge, so wie im Kolon und im Speichel, ein Heterodimer mit FCGBP bildet. Zusätzlich wurde geprüft, ob verkürzte TFF3-Formen auch in der Lunge nachweisbar sind. Dazu wurden Extrakte von humanem Lungengewebe nach SEC auf TFF3 und FCGBP untersucht. Dabei wurde zwischen Gewebe des Bronchus und des Parenchyms unterschieden. Die SEC des Bronchus-Extrakts zeigt TFF3 in 3 Entitäten (Abb. 27 **B**). Die Western-Blot-Analysen der größten Entität (Fr. 20 und 21) zeigten unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein hochmolekulares TFF3 bei 116k (Abb. 27 **C**). Die Signale bei 35k und 14,4k sind vermutlich unspezifisch, da sie durch Reduktion unverändert bleiben (Abb. 27 **C**).

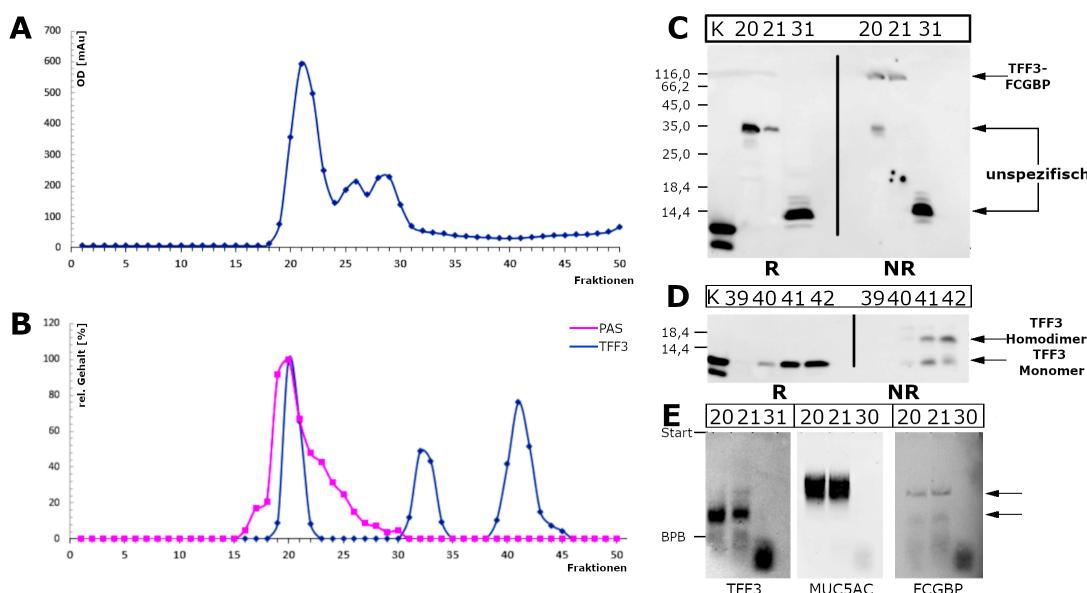


Abbildung 27: SEC von humanem Lungengewebe; **A** Das Elutionsprofil des Lungengewebe-Extrakts (L-2) nach SEC wurde durch die Absorption bei 280 nm aufgenommen. **B** Die relative Verteilung von TFF3 wurde durch semiquantitative Auswertung des TFF3 nach reduzierendem Western Blot bestimmt (blaue Kurve). Die Verteilung der PAS-positiven Proteine durch semiquantitative Auswertung des Dot Blots ermittelt (violette Kurve). **C** Die hochmolekularen Fraktionen 20; 21 und 31 wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen bezüglich TFF3 nach Western Blot analysiert. **D** Die niedermolekularen Fraktionen 39 bis 42 wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen bezüglich TFF3 nach Western Blot analysiert. **E** Nach Agarose-Gelelektrophorese wurden die hochmolekularen Fraktionen 20; 21; 31 mit spezifischen Antikörpern bezüglich TFF3, MUC5AC und FCGBP analysiert.

Die mittlere TFF3-Entität (Fr. 31-34) liegt unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen 14,4k vor und bildet eine Banden-Quartett (Abb. 27 **C**), von dem nur die kleinste Bande einem TFF3-Monomer entspräche. Die niedermolekulare TFF3-Entität (Fr. 39-45) ist nach nicht-reduzierendem Western-Blot als Homodimer und Monomer nachweisbar und kann durch Reduktion vollständig in ein Monomer überführt werden (Abb. 27 **D**). Die Analyse der hochmolekularen und mittleren TFF3-Entität bezüglich TFF3, MUC5AC und FCGBP zeigen, das alle drei Proteine nur in den hochmolekularen Fraktionen 20 und 21 nachweisbar sind (Abb. 27 **E**). TFF3 und FCGBP bilden zwei Banden mit ähnlichen Laufegenschaften. Die mittlere Entität zeigt ein Signal für alle 3 Proteine unterhalb der Bromphenolblau Lauffront. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Proben von Tumorpatienten oder Patienten mit einem COPD Hintergrund stammen und damit artifiziell sein können. Frühere Untersuchung weiterer Bronchialgewebe zeigten nur hochmolekulares TFF3-FCGBP und niedermolekulares TFF3 (sein Homodimer und verkürztes TFF3-Monomer)⁽¹¹⁴⁾. All diese Indizien legen nahe, dass es sich bei der mittleren TFF3-Entität (Fr. 31-34) vermutlich um eine Artefakt handelt.

Da Lungengewebe schwerer zugänglich ist als die Sekrete der Lunge, wurden in erster Linie Bronchialsekret (BS) und Broncho-Alveolare Lavage (BAL-Flüssigkeit) untersucht. Die Sekrete stammen von Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD). Da es sich bei Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit um viskose Flüssigkeiten handelt, mussten sie für die Analysen aufbereitet werden (Methoden 5.1.2, Seite 80).

In der BAL-Flüssigkeit sind nach SEC hoch- und niedermolekulares TFF3 nachweisbar (Abb. 28 **B**). Dabei überwiegt die niedermolekulare Form in den 3 untersuchten BAL-Flüssigkeiten mit 71% bis 93%. Western-Blot-Analysen der hochmolekularen Fraktionen 22 bis 24 bezüglich TFF3 zeigen unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein TFF3-FCGBP oberhalb von 116,0k und Spuren eines TFF3-Monomers (Abb. 28 **C**). Nach Reduktion liegt TFF3 als Monomer und verkürztes Monomer vor. Identische Analysen der niedermolekularen Fraktionen 45 bis 47 zeigen unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Banden-Triplett aus TFF3-Monomer, Homodimer und einer TFF3-Form mit einer Größe von etwa 20k (Abb. 28 **C**). Die Analyse des hochmolekularen TFF3 (Fr. 22-24) nach Agarose-Gelelektrophorese zeigt ein ähnliches Laufverhalten von TFF3 und FCGBP (Abb. 28 **D**).

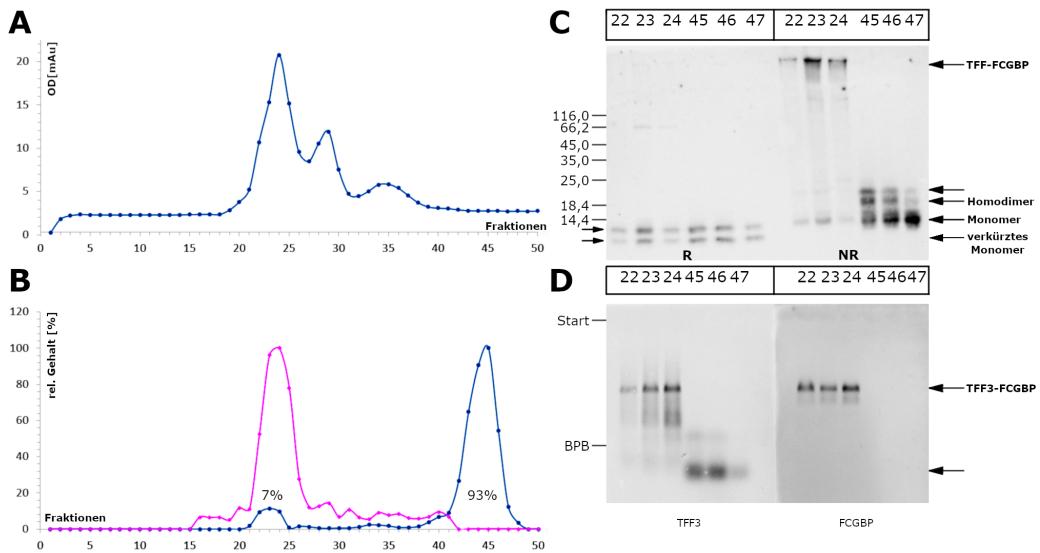


Abbildung 28: SEC von humaner BAL-Flüssigkeit; **A** Das Elutionsprofil der BAL-Flüssigkeit (BAL 49) nach SEC wurde durch die Absorption bei 280 nm aufgenommen. **B** Die relative Verteilung von TFF3 wurde durch semiquantitative Auswertung der charakteristischen 7k Bande des TFF3-Monomers nach reduzierendem Western Blot bestimmt (blaue Kurve). Die Verteilung der PAS-positiven Proteine durch semiquantitative Auswertung des Dot Blots ermittelt (violette Kurve). **C** Die hochmolekularen Fraktionen 22 bis 24 und die niedermolekularen Fraktionen 45 bis 47 wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen bezüglich TFF3 nach Western Blot analysiert. **D** Die hochmolekularen Fraktionen 22 bis 24 und die niedermolekularen Fraktionen 45 bis 47 wurden bezüglich FCGBP (aa 5176-5344) und TFF3 nach Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Die Untersuchung von Bronchialsekret zeigt nach SEC TFF3 in hoch- und niedermolekularer Form (Abb. 29 **B**). Die Western-Blot-Analyse der hochmolekularen Fraktionen 18, 23, 26 und 27 zeigten unter-nicht reduzierenden Bedingungen ein TFF3-FCGBP oberhalb von 116k und 3 kleinere TFF3-Proteinkomplexe (Abb. 29 **C**). Nach Reduktion dieser Fraktionen liegt TFF3 nur noch als Monomer und verkürztes Monomer vor. Das niedermolekulare TFF3 der Fraktionen 39, 41 und 43 wurde als Homodimer und Monomer unter nicht-reduzierenden Bedingungen nachgewiesen (Abb. 29 **D**). Durch Reduktion wurde das TFF3 in Monomer und verkürztes Monomer überführt. Die Analyse von TFF3-FCGBP in den hochmolekularen Fraktionen 19-23 nach Agarose Gelelektrophorese war positiv und zeigt ein ähnliches Laufverhalten für beide Proteine (Abb. 29 **E**). TFF3 bildet zusätzlich, anders als FCGBP, einen breiten Schmier unterhalb der TFF3-FCGBP Banden.

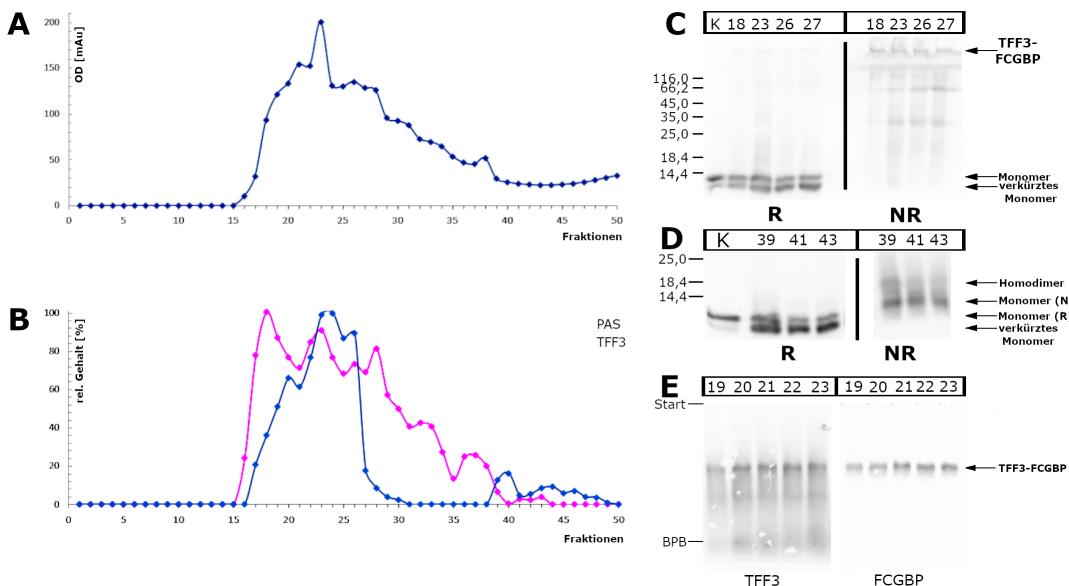


Abbildung 29: SEC von von humanem Bronchialsekret; **A** Das Elutionsprofil des Bronchialsekrets (BS-9) nach SEC wurde durch die Absorption bei 280 nm aufgenommen. **B** Die relative Verteilung von TFF3 wurde durch semiquantitative Auswertung des TFF3 nach reduzierendem Western Blot bestimmt (blaue Kurve). Die Verteilung der PAS-positiven Proteine durch semiquantitative Auswertung des Dot-Blots ermittelt (violette Kurve). **C** Die hochmolekularen Fraktionen 18, 23, 26 und 27 wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen bezüglich TFF3 nach Western-Blot analysiert. **D** Die niedermolekularen Fraktionen 39, 41 und 43 wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen bezüglich TFF3 nach Western-Blot analysiert. **E** Die hochmolekularen Fraktionen 19 bis 23 wurden bezüglich FCGBP (aa 5176-5344) und TFF3 nach Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Der Vergleich des hoch- und niedermolekularen TFF3 aus Bronchialgewebe, Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit zeigt, dass es sich um die selben Formen handelt (Abb. 30). Nach Agarose-Gelelektrophorese zeigen TFF3 und FCGBP ähnliche Banden (Abb. 30 A). Das TFF3-FCGBP des Bronchialsekrets schmiert dabei stark und ist etwas kleiner als TFF3-FCGBP aus dem Bronchialgewebe. In der BAL-Flüssigkeit ist TFF3-FCGBP nur schwach nachweisbar und kleiner als TFF3-FCGBP aus dem Bronchialgewebe. Das hochmolekulare TFF3 kann nach nicht-reduzierendem SDS-PAGE in allen 3 Proben oberhalb von 116,0k und schwach als Homodimer und Monomer nachgewiesen werden (Abb. 30 B). Durch Reduktion kann das TFF3 nur noch als Monomer und verkürztes Monomer unterhalb von 14,4k vom Antiserum erkannt werden. Die niedermolekularen Fraktionen enthalten TFF3 als Homodimer und Monomer (Abb. 30 B). Im Bronchialgewebe (L) ist zusätzlich noch eine TFF3-Form mit einer Größe von ca. 20k zu finden. Durch

Reduktion können alle Formen wieder in TFF3-Monomer und verkürztes Monomer überführt werden.

Damit kann gezeigt werden, das TFF3 in Bronchialgewebe, Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit in den gleichen Formen vorkommt, als hochmolekulares TFF3-FCGBP und niedermolekulares TFF3.

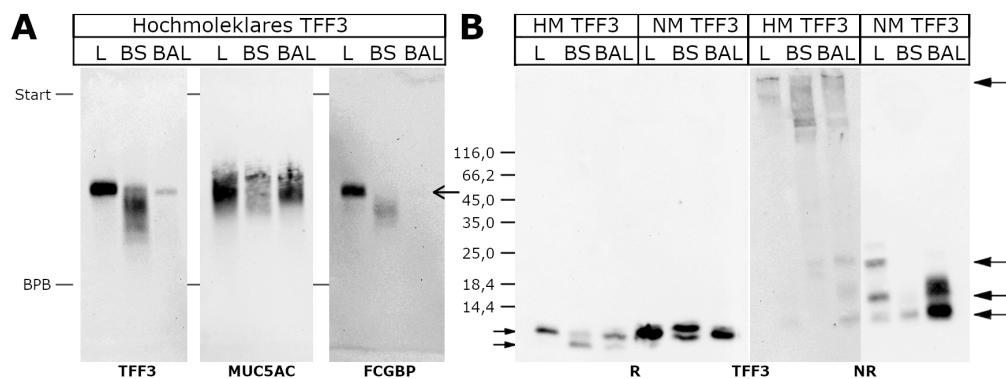


Abbildung 30: Übersicht TFF3 in Bronchialgewebe (L), Bronchialsekret (BS) und BAL-Flüssigkeit (BAL); **A**. Hochmolekulare Fraktionen (L-13, BS-8, BAL-22) nach SEC wurden nach Agarose-Gelelektrophorese bezüglich TFF3, FCGBP (aa 5176-5344) und MUC5AC analysiert. **B** Hoch- (HM) und niedermolekulare (NM) Fraktionen (L-13, BS-9, BAL-49) wurden unter reduzierenden (R) und nicht-reduzierenden (NR) Bedingungen nach Western Blot auf TFF3 untersucht.

Hochmolekulares TFF3 in der humanen Lunge Hochmolekulare Fraktionen nach SEC einer BAL-Flüssigkeit wurden nach Agrose-Gelelektrophorese bezüglich MUC5AC, MUC5B und DMBT1 untersucht.

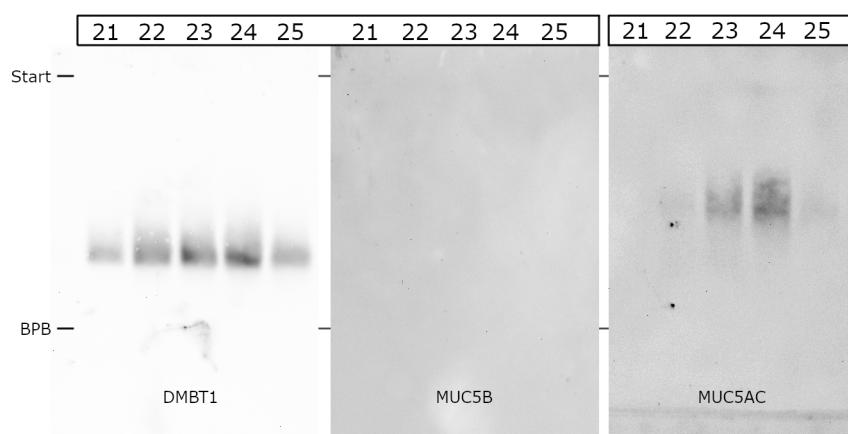


Abbildung 31: Mukus assoziierte Proteine in BAL-Flüssigkeit; Hochmolekulare Fraktionen (Fr. 21-25) der SEC von BAL-Flüssigkeit (BAL-3) untersucht mit spezifischen Antikörpern auf DMBT1, MUC5B und MUC5AC nach Agarosegel.

Die gelbildenden Muzine der Lunge sind MUC5B und MUC5AC⁽³⁰⁾. Allerdings konnte MUC5B mit 2 unterschiedlichen Antiseren (a-hMUC5B-1, a-hMUC5B-4) nicht nachgewiesen werden (Abb. 31). Die verwendenden Antiseren konnten allerdings MUC5B im Speichel erkennen (Abb. 23 C). MUC5AC kann jedoch in hochmolekularen Fraktionen nach SEC von BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden (Abb. 31). Dabei ist auffällig, dass MUC5AC im Bronchialsekret eine geringere relative Molmasse aufweist als im Speichel (Abb. 23 D) oder im Magen (Abb. 32).

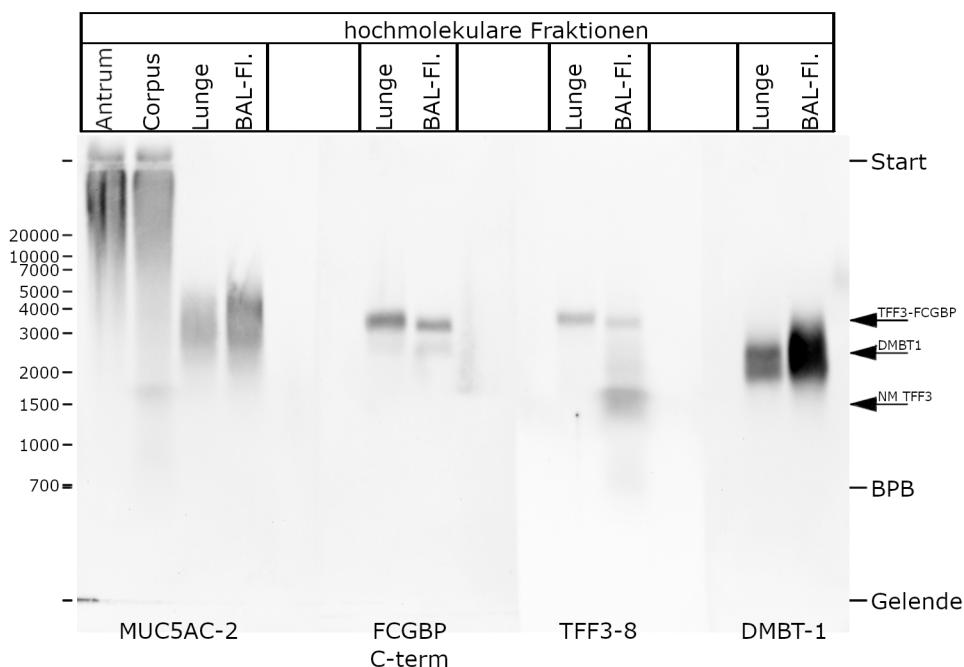


Abbildung 32: Hochmolekulares TFF3 der Lunge im Agarosegel; 1% Agarose Gel nach 120 min Laufzeit bei 40V. Aufgetragen wurden Magen Antrum; Magen Corpus; Lunge; BAL. Der DNA Marker ist in BP angegeben. Das Agarose Gel wurde nach Kapillar Blot mit Antikörpern gegen MUC5AC-2, FCGBP (C-terminal), TFF3-8, DMBT-1 untersucht.

Im direkten Vergleich von hochmolekularen Fraktionen nach SEC aus dem Magen, der Lunge und der BAL-Flüssigkeit bezüglich MUC5AC, FCGBP, TFF3 und DMBT1 wird offensichtlich, dass TFF3-FCGBP sich von DMBT1 trennt (Abb. 32). Auch der Größenunterschied zwischen MUC5AC in Magen und Lunge ist deutlich zu erkennen. Dies zeigt, dass TFF3-FCGBP neben MUC5AC und DMBT1 hochmolekular in der Lunge vorliegt, sich die Proteine allerdings durch Agarose Gelelektrophorese trennen lassen.

Niedermolekulares TFF3 in der humanen Lunge Die Analyse von hochmolekularen Fraktionen (Fr. 21-24) und niedermolekularen (Fr. 44-47) Fraktionen nach reduzierendem Western-Blot bezüglich TFF3 zeigt unter Verwendung des C-terminalen Antiseraums TFF3-8 eine Doppelbande, bestehend aus Monomer und verkürztem Monomer (Abb. 33). Das N-terminale Antiserum TFF3-15C6 hingegen erkennt unter reduzierenden Bedingungen nur das größere TFF3-Monomer aber nicht das N-terminal verkürzte TFF3-Monomer. Unter nicht reduzierenden Bedingungen erkennt das N-terminale Antiserum TFF3 nicht, vermutlich verhindert die Disulfidbrücke zwischen C11 und C37 eine Anlagerung des Antikörpers (Abb. 6).

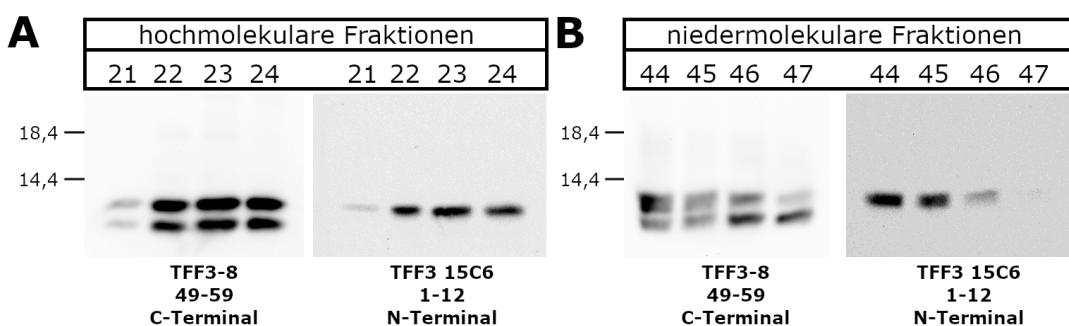


Abbildung 33: Anaylse verschiedener TFF3-Formen nach reduzierender Western-Blot-Analyse mit verschiedenen TFF3 Antiseren.; Hoch- (A, Fr. 21-24) und niedermolekulare (B, Fr. 44-47) Fraktionen nach SEC einer BAL-Flüssigkeit (BAL-3) wurden nach reduzierendem Western Blot mit C-terminalem TFF3-8 und N-terminalem TFF3-15C6-Antiseren analysiert.

2.4 Bindungsstudien von TFF3 in verschiedenen humanen Mukuspräparationen

Für TFF1 und TFF2 sind Bindungen als Lektine an Glykoproteine beschrieben (46, 134). Auch TFF3 bindet als Lektin an „Sigma-Muzin“, einer kommerziell erhältlichen Muzin-Präparation aus dem Schweinemagen (70). Allerdings kommt TFF3 physiologisch kaum im Magen vor. Daher wurde die Bindungsaffinität von TFF3-Monomer und TFF3-Homodimer gegenüber TFF3-positiven hochmolekularen Fraktionen aus Kolon, Lunge und Speichel getestet. Dazu wurden FCGBP und organ-spezifische Muzine durch Agarose-Gelelektrophorese und Kapillar Blot membrangebunden und anschließend mit ¹²⁵I-markiertem TFF3-Monomer bzw. -Homodimer inkubiert. In einem weiteren Experiment wurden die Muzin- und FCGBP-haltigen Fraktionen direkt mit ¹²⁵I-TFF3 inkubiert. Das Gemisch wurde

dann durch nicht reduzierende SDS-PAGE und Western Blot getrennt. Durch Autoradiografie wurde die mögliche Bindung des radioaktiv markierten TFF3 an Proteine der hochmolekularen Fraktion dokumentiert. Diese Arbeit mit radioaktivem Material wurde von Herrn Stürmer durchgeführt.

Das als *Positivkontrolle* verwendetet „Sigma-Muzin“ aus dem Schwein bindet ^{125}I -TFF3 und ^{125}I -TFF3-Homodimer, wodurch bekannte Ergebnisse reproduziert werden konnten⁽⁷⁰⁾. An die hochmolekularen Proteine FCGBP und Muzine aus Kolon, Speichel und Lunge war keine Bindung des ^{125}I -TFF3 nachweisbar, unabhängig ob TFF3-Monomer oder TFF3-Homodimer verwendet wurde.

Es konnte somit gezeigt werden, dass weder das chemisch synthetisierte TFF3-Monomer noch das TFF3-Homodimer an humanen Mukus aus Kolon, Lunge und Speichel bindet. Allerdings konnte die aus der Literatur bekannte Bindung von TFF3 an Mukus aus dem Schweinemagen reproduziert werden.

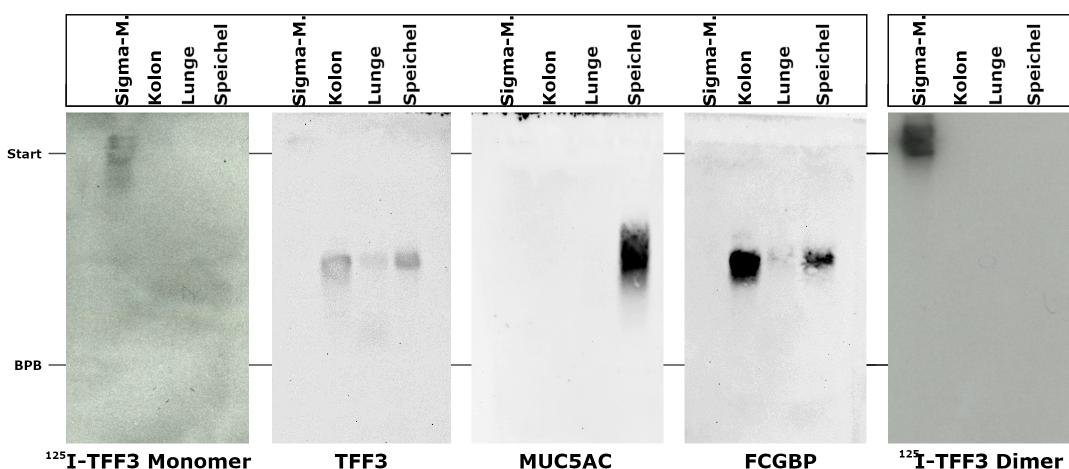


Abbildung 34: Bindungsstudie mit ^{125}I -TFF3 an Mukuspräparationen, Repräsentative hochmolekularen Fraktionen von humanem Kolon (K-2), Speichel (S-6), Lunge (L-13) sowie Sigma-Muzin (kommerziell erhältliche Mukuspräparation aus dem Schweinemagen) wurden nach 1 % Agarose Gel (NR) und Kapillar Blot auf Membran übertragen. Die Membran wurde in 5 Steifen geteilt. Einer wurden mit ^{125}I -TFF3-Monomer und einer mit ^{125}I -TFF3-Homodimer inkubiert. Beide wurde mittels Autoradiographie auf Spuren von ^{125}I untersucht. Die übrigen 3 Membran-Streifen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen TFF3, FCGBP und MUC5AC untersucht.

Deglykosylierung von TFF3-FCGBP Rohextrakte aus Duodenum und Kolon wurde mit N- und O-Glykosidase inkubiert und anschließend nach Agarose-Gelelektrophorese bezüglich TFF3 analysiert. Die Versuche, eine mögliche Bindung von TFF3 und FCGBP über eine Lektinwechselwirkung mittels Glykosidase zu

lösen, waren erfolglos (Abb. 35). Nur die Inkubation mit Mercaptoethanol (0,178 M, 100°C, 5min) war in der Lage TFF3-FCGBP zu spalten, so dass TFF3 nach Agarose-Gelelektrophorese nur noch im niedermolekularen Bereich nachweisbar ist (Abb. 35). Bemerkenswert ist, dass die Proben aus dem Duodenum (D-14) und dem Kolon (K-14) von einer Person unterschiedlich große TFF3-FCGBP-Heteromer bilden (Abb. 35).

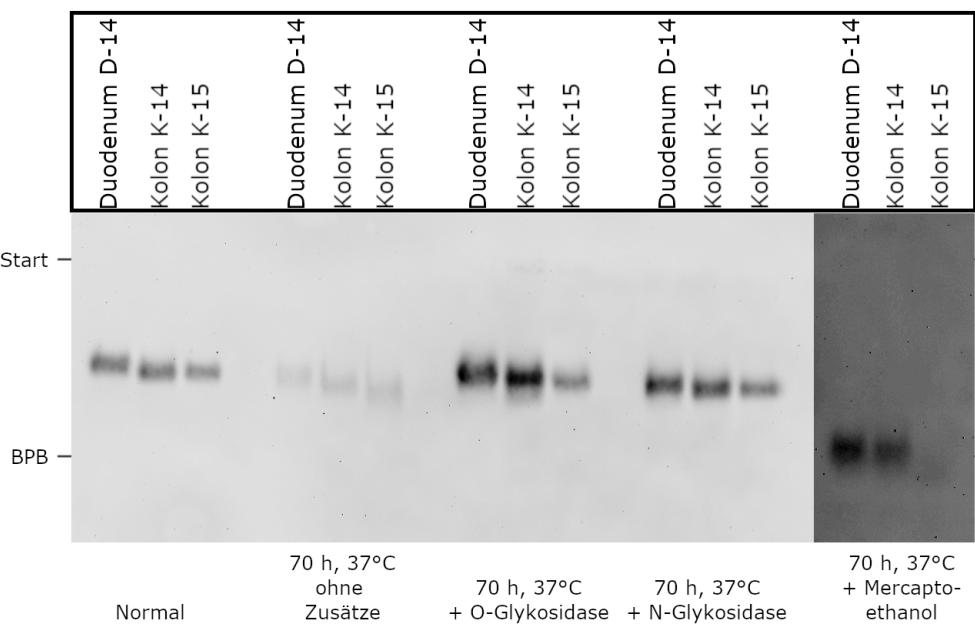


Abbildung 35: Deglykosylierung von Mukusextrakten, Rohextrakte aus Geweben des Duodenum (D-14) und Kolon (K-14, K-15) wurden mit Mercaptoethanol (0,178 M, 100°C, 5min) bzw. *O*- oder *N*-Glykosidase (70h, 37°C) inkubiert und mittels Agarose-Gel und Kapillar-Blot bezüglich TFF3 untersucht.

3 Diskussion

TFF3-Expression konnte bis heute in vielen humanen Geweben auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden (Tab. 2) (140). Dabei wurde auf Proteinebene meistens nur die Existenz von niedermolekularem TFF3 in den jeweiligen Geweben mit Hilfe von Westernblots nach reduzierender SDS-PAGE untersucht. Bisher wurde nur im Kolon TFF3 systematisch analysiert. Dabei zeigt sich, dass TFF3 vermutlich kovalent an FCGBP bindet (45).

In der vorliegenden Arbeit konnte außer im Lungenparenchym, in allen untersuchten humanen mukösen Geweben und Flüssigkeiten TFF3 sowohl als hochmolekulare Form in Assoziation mit FCGBP als auch als niedermolekulare Form nachgewiesen werden (Kolon Abb. 8, Speichel Abb. 21, Lunge Abb. 28). Die prozentuale Verteilung in den Geweben und Flüssigkeiten zeigt große individuelle Unterschiede. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Gewebeproben zwar meist ohne pathologischen Befund sind, allerdings von erkrankten Spendern stammen. Es ist bekannt, dass verschiedene entzündliche Erkrankungen und Tumore die TFF3-Sekretion verändern können (53, 140). Sogar in den untersuchten Speichelproben, die von gesunden Spendern stammen, variierte die prozentuale Verteilung stark.

Durch die Trennung der Gewebeextrakte und Flüssigkeiten nach ihrer Größe liegt TFF3 als hochmolekulares TFF3-FCGBP und niedermolekulares TFF3 (Monomer und Homodimer) vor (Abb. 36). Die nicht-reduzierenden Westernblot-Analysen zeigen, dass in hochmolekularen Fraktionen nach SEC nicht nur hochmolekulares TFF3-FCGBP Heteromer vorliegt, sondern auch kleinere TFF3-Formen nachweisbar sind, nämlich 60k und 30k große TFF3-Heterodimere sowie TFF3-Homodimer und -Monomer (Abb. 8). Vermutlich lösen sich die kleineren TFF3-Formen aus dem TFF3-FCGBP Komplex während der Probenvorbereitung oder des SDS-PAGE. Die 60k große TFF3-Form wurde auch proteomanalytisch in der Lunge nachgewiesen (114). Niedermolekulares TFF3 ist als Homodimer und Monomer nach nicht-reduzierendem Westernblot nachweisbar. Durch Reduktion werden alle TFF3-Formen in Monomere oder verkürzte Monomere überführt.

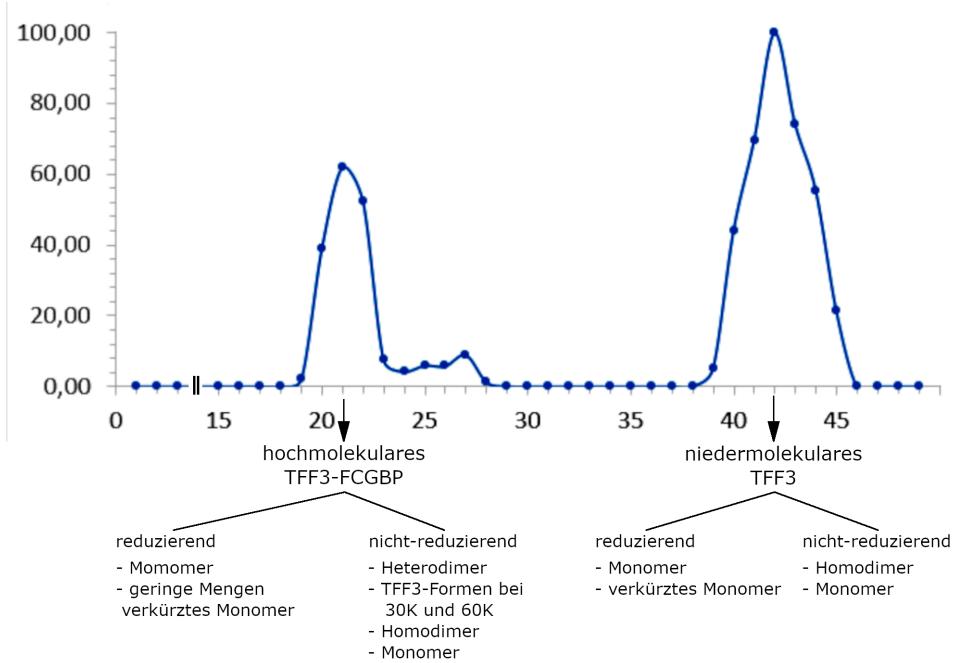


Abbildung 36: Schematische Übersicht der verschiedenen TFF3-Formen nach Auf trennung durch SEC und anschließender Westernblot-Analyse.

3.1 Niedermolekulares TFF3

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es zwei Formen des niedermolekularen TFF3 gibt. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen liegt TFF3 als Homodimer und Monomer vor. Nach der Reduktion mit Mercaptoethanol ist TFF3 nur als Monomer und verkürztes Monomer nachweisbar (Abb. 9, 11). Durch Elution aus einem nicht-reduzierenden Coomassie Gel konnte gezeigt werden, dass das Homodimer aus vollständigen TFF3-Monomeren besteht. Das nicht-reduzierte Monomer verhält sich nach Elution und Reduktion wie eine verkürzte Form des TFF3-Monomers (Abb. 9, 11). Ob die Verkürzung für die Bildung des Monomers verantwortlich ist oder nur das Monomer abgebaut werden kann, ist unklar. Das vermehrte Auftreten der verkürzten TFF3-Form in niedermolekularen Fraktionen legt nahe, dass eine Heteromerisierung mit FCGBP vor dem Abbau schützt. Eine ähnliche Beobachtung für TFF3 wurde in zervikalem Mukus gemacht (141).

Ob TFF3-Monomere direkt ins Lumen des Darms sezerniert oder erst durch Reduktion im Mukus gebildet werden, ist nicht bekannt. Rekombinant in Hefe gebildetes TFF3 bildet ebenfalls Homodimere (142). Selbst synthetisches TFF3

dimerisiert sofern das C-terminale Cystein nicht geschützt ist⁽¹⁰⁶⁾. Allgemein sind ungepaarte Cysteinreste in sezernierten Proteinen ungewöhnlich, da sie im endoplasmatischen Retikulum (ER) in der Regel zu Disulfidbrücken verknüpft werden⁽¹⁴³⁾.

Ein verkürztes TFF3-Monomer wurde erstmals im humanen Magensaft nachgewiesen⁽⁵⁹⁾. Es wurde vermutet, dass es sich um einen Abbau durch Pepsin handelt⁽⁵⁹⁾. Bei Abbauexperimenten von synthetischem TFF3-Monomer und Homodimer mit Pepsin (pH 1,3) oder Pankreasenzyme (pH 6,8), wiesen diese N- und C-terminale Verkürzungen auf⁽¹⁰⁶⁾. Allerdings gibt es einen TFF3-Metaboliten (TFF3_{7-54/55}) der nicht weiter abgebaut wird⁽¹⁰⁶⁾. Die Proteomanalysen von TFF3 zeigen vor allem N-terminale Verkürzungen um drei bis fünf Aminosäuren (EEY bzw. EEYVG)(Abb. 18). Dadurch kann das verkürzte TFF3-Monomer nicht vom N-terminalen Antiserum (TFF3-15C6, AS 1 bis 12) erkannt werden (Abb. 37). Das Antiserum TFF3-15C6 erkennt nur reduziertes TFF3, da die Disulfidbrücke zwischen C11 und C37 die Bindungsstelle vermutlich maskiert (Abb. 6). Eine weitere Verkürzung um die C-terminale Aminosäure (F) wurde ebenfalls durch Proteomanalysen von TFF3 im Speichel und Kolon nachgewiesen (Abb. 18, Abb. 26). Diese terminalen Verkürzungen sind vermutlich auf enzymatischen Abbau zurückzuführen, was interessant ist, da TFF-Peptide gemeinhin als resistent gegenüber Proteolyse gelten⁽⁴⁴⁾.

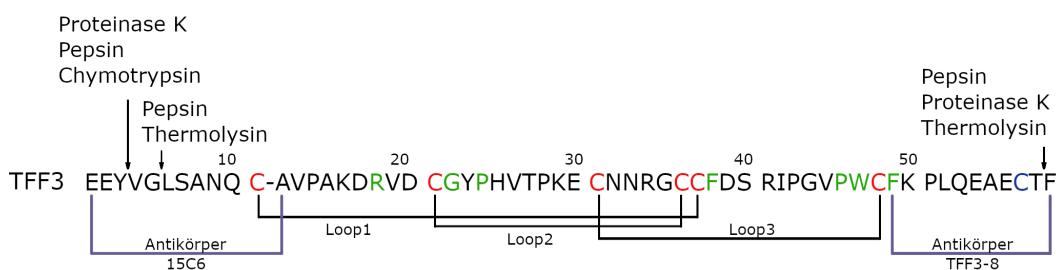


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Schnittstellen verschiedener Proteasen an TFF3 an den Aminosäuren 3-5 und 58/59 nach Expasy Peptide Cutter. Die Cysteine sind rot und konservierte Aminosäuren der TFF-Domäne sind grün markiert.

Der systematische Abbau von synthetischem TFF3 und seinem Homodimer wurden *in vitro* durch Inkubation in gastrischer Umgebung (Pepsin, pH 1,3) und in intestinaler Umgebung (Pankreasenzyme, pH 6,8) untersucht⁽¹⁰⁶⁾. In beiden Umgebungen konnten verkürzte TFF3-Monomere nachgewiesen werden. Die Di-

sulfidbrücke des TFF3-Homodimers wird während der Inkubation gebrochen⁽¹⁰⁶⁾. Erst im Anschluss beginnt der Abbau des TFF3-Monomers⁽¹⁰⁶⁾. Das TFF3-Monomer wird stückchenweise verkürzt und bildet einen gastrointestinal stabilen Metaboliten (TFF3_{7-54/55}), das N-terminal um 6 und C-terminal um 5 bzw. 4 Aminosäuren verkürzt ist⁽¹⁰⁶⁾. Dabei bleibt die Trefoil Domain erhalten und auch die anti-apoptotische Aktivität in Zellassays ist vergleichbar mit der des TFF3s und seinem Homodimer⁽¹⁰⁶⁾. Theoretisch kann das F59 des TFF3 durch Pepsin, Proteinase K, und Thermolysin abgespalten werden (Abb. 37). Allerdings können diese drei Proteasen die Verkürzung *in vivo* im Kolon, in der Lunge oder im Speichel nicht erklären. Pepsin wird bei einem pH-Wert von 7 irreversibel denaturiert und verliert somit seine Aktivität nach der Neutralisation im Duodenum. In Lunge und Mundhöhle wird kein Pepsin sezerniert. Thermolysin und Proteinase K werden nur von Bakterien (*Bacillus thermoproteolyticus*)⁽¹⁴⁴⁾ bzw. Pilzen⁽¹⁴⁵⁾ natürlich produziert.

Die N-terminalen Aminosäuren 3-5 können ebenfalls durch Pepsin, Thermolysin und Proteinase K und zusätzlich durch Chymotrypsin gespaltet werden (Abb. 37). Chymotrypsin wird im Pankreas exprimiert und ins Duodenum abgegeben⁽¹¹⁵⁾. Daher könnte Chymotrypsin für die N-terminale Spaltung von TFF3 im Duodenum und Kolon verantwortlich sein. Allerdings werden diese Verkürzungen auch im TFF3 des Speichels und der Lunge gefunden, wo Chymotrypsin nicht vorkommt.

Metalloproteasen (MMP) sind im Gastrointestinaltrakt zu finden, wie Carboxypeptidase A1, die mit dem Pankreasssaft sezerniert wird, oder Aminopeptidase, die im Dünndarm N-terminal Proteine abbaut^(115, 146). Die MMP *Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1* (CACL1) wird eine Rolle bei der Umwandlung von innerem, sterilem Mukus in äußerem, losen Mukus im Kolon zugeschrieben⁽²⁴⁾. In der Lunge gibt es die neutrophile Elastase, ein zentrales Enzym der Immunabwehr⁽¹⁴⁷⁾. Sie gehört zu den Serinproteasen. Produziert wird die neutrophile Elastase von neutrophilen Zellen, die als erste Immunzellen am Entzündungsherd eintreffen^(147, 148). Da die unterschiedlichen Lungengewebe, Bronchialsekrete und BAL-Flüssigkeiten von Patienten mit COPD-Erkrankung stammen, ist die Präsenz von neutrophiler Elastase sehr wahrscheinlich, da neutrophile Elastase bei Entzündungen vermehrt sezerniert wird⁽¹⁴⁹⁾. Außerdem wird vermutet, dass neutrophile Elastase mit weiteren Proteasen zusammenarbeitet, wie beispielsweise der

Metalloprotease (MMP) MMP-12⁽¹⁴⁹⁾. MMP2 und MMP14 sind unter physiologischen Bedingungen in der Lunge nachweisbar^(150, 151). Auch CACL1 wird in der Lunge unter entzündlichen Bedingungen sezerniert⁽¹⁵²⁾. Im Speichel können große Mengen an Serpinen (Serinprotease-Inhibitoren) nachgewiesen werden, die zur Regulation von Serinproteasen, wie beispielsweise *Lactoferrin*, nötig sind^(153, 154). Bei Patienten mit *Parodontitis* ist die MMP8 Produktion erhöht im Vergleich zum Speichel gesunder Menschen⁽¹⁵⁵⁾. Des Weiteren müssen auch pathogene Proteasen berücksichtigt werden, wie beispielsweise von *Candida albicans*, ein Pilz der die Mundhöhle befällt und dort Aspartatproteasen sezerniert⁽¹⁵⁶⁾.

Wie die C- und N-terminalen Verkürzungen des TFF3 zustande kommen, ist somit weiterhin unklar. In dieser Arbeit wurde niedermolekulares TFF3 nach Reduktion in allen untersuchten Geweben als vollständiges und verkürztes TFF3-Monomeren nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen beiden TFF3-Formen um das vollständige TFF3 und den gastrointestinal stabilen Metaboliten (TFF3_{7-54/55})⁽¹⁰⁶⁾. Ein Vergleich des in dieser Arbeit beschrieben verkürzten TFF3-Monomers mit dem TFF3_{7-54/55} wäre erforderlich, um dies zu bestätigen. Es ist denkbar, dass die verwendeten Antikörper (a-hTFF3-8 und a-hTFF3 15C6) das TFF3_{7-54/55} nicht erkennen und weitere verkürzte TFF3-Monomere existieren. Eine Möglichkeit wäre die Generierung eines neuen Antikörpers, der den Mittelteil des TFF3 erkennt, allerdings zeigten institutseigene Antikörper (a-hTFF3-7, a-rTFF3-11, a-rTFF3-15) kaum Immunreaktivität gegen TFF3, nicht einmal unter reduzierenden Bedingungen (β ME, 100°C, 5min).

3.1.1 Potenzielle Lektin-Aktivität von TFF3

TFF3 zeigt in vielen *in vitro* Versuchen mannigfaltige biologische Effekte (Tab. 3)⁽¹⁵⁷⁾. Bis heute ist nicht geklärt, wie TFF3 diese völlig unterschiedlichen und teilweise gegensätzlichen Effekte auslösen kann. Die gemessenen Effekte wurden im Konzentrationsbereich von 10⁻⁶ bis 10⁻⁷ M TFF3 beobachtet⁽¹⁵⁷⁾ und konnten bisher nicht durch unabhängige Forschung reproduziert werden⁽¹⁰⁶⁾. Diese Konzentrationen liegen weit über der Konzentration von typischen hoch-affinen Peptid-Liganden. Es sind zwar mittlerweile die Bindungsstellen CXCX4/7, LINGO und PAR2 mit geringer Affinität für TFF3 beschrieben, allerdings ist nicht bekannt, auf welche Art TFF3 an diese bindet^(61, 79, 101). Da auf Grund der Konzentration nicht von einer klassischen Peptid-Rezeptor-Wechselwirkung auszu-

gehen ist, liegt eine Bindung als Lektin nahe.

Für alle 3 humanen TFF-Peptide ist eine Lektin-Aktivität beschrieben, die mit terminalem α -N-Acetylglucosamin (α -1-4-GlcNAc) im Zusammenhang steht (70, 158). Für die Biosynthese von terminalem α -1-4-GlcNAc ist α -1,4-N-Acetylglucosaminyl-Transferase (A4GNT) nötig (159). A4GNT ist in MUC6 sezernierenden Zellen im Magen (Nebenzellen und Antrum-Drüsenzellen) sowie in den Brunner'schen Drüsen im Duodenum und in „deep crypt secretory cells“ im Kolon zu finden (66, 160).

Untersuchungen von TFF2 legen die Vermutung nahe, dass die Tasche zwischen Loop 2 und 3 der TFF-Domäne als mögliche Bindungsstelle für Zucker verantwortlich ist (43, 67). Diese Tasche könnte somit eine wichtige Rolle bei der Lektin-Aktivität der TFFs spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Bindung von 125 I-markiertem TFF3-Monomer und -Homodimer an Muzine aus dem Schweinemagen nachgewiesen (Abb. 34). Dies bestätigte Literatur bekannte Ergebnisse und diente als Positivkontrolle (70). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit keine Bindung von 125 I-markiertem TFF3-Monomer oder -Homodimer an Muzine und FCGBP aus Kolon, Lunge oder Speichel des Menschen nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebene Lektin-Aktivität von TFF-Peptiden wurde mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Muzin Präparation aus dem Schweinemagen (Sigma-Aldrich) untersucht (70). Wenn α -GlcNAc enzymatisch aus der Muzinpräparation entfernt wurde, konnte keine Lektin-Bindung von TFF-Peptiden mehr nachgewiesen werden (70). Auch Untersuchungen von TFF1, zeigen eine Lektin-Bindung an MUC6 aber nicht an MUC5AC im menschlichen Magen (46). Im Gegensatz zu MUC5AC ist MUC6 α -GlcNAc positiv (46). Weiter wurde beschrieben, dass TFF-Peptide nicht an α -D-GlcNAc als Monosaccharid binden. Für die Lektin-Bindung ist vermutlich mindestens ein GlcNAc- α -1,4-Gal Disaccharid nötig (70).

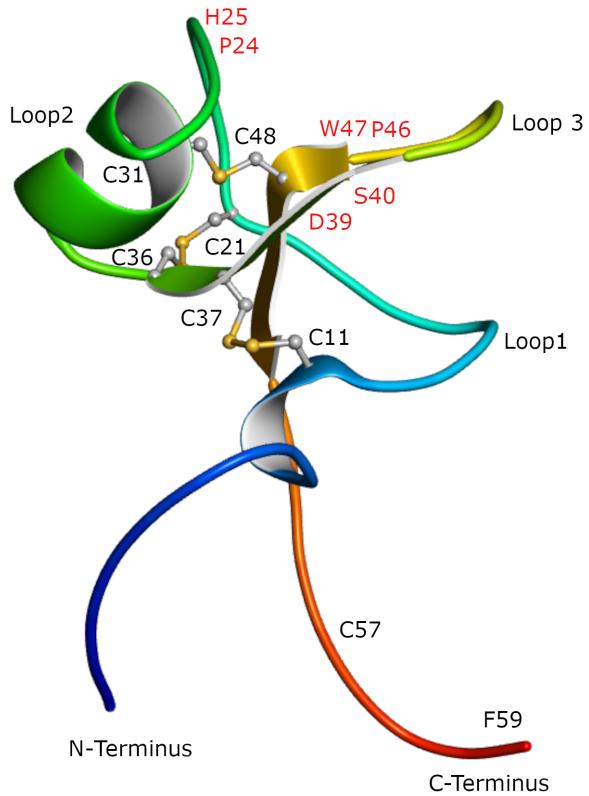


Abbildung 38: 3D Struktur von TFF3 ⁽¹⁶¹⁾

Die Analysen von Zuckerstrukturen in verschiedenen Abschnitten des Duodenums und des Kolons zeigten keine GlcNAc- α -1,4-Gal Disaccharide ⁽¹⁶²⁾. Bei der Analyse von MUC2, dem Hauptmuzin des Kolon, mittels Massenspektroskopie wurden über 100 O-Glykane mit Längen zwischen 2 und 12 Monosacchariden nachgewiesen ⁽¹⁶³⁾. Unter den nachgewiesenen Zuckerstrukturen ist aber kein GlcNAc- α -1,4-Gal Disaccharid. Es konnte jedoch eine große Heterogenität in der Glykosylierung von Muzinen in verschiedenen Darmregionen eines Individuums gezeigt werden ⁽¹⁶²⁾. Dies passt zu eigenen Beobachtungen, dass TFF3-FCGBP Heteromere eines Individuums im Kolon und Duodenum unterschiedlich groß sind (Abb. 35).

Eine Bindung von TFF3 an Muzine des Darms konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 34). Dies liegt vermutlich daran, dass nur wenige Zellen im Darm in der Lage sind GlcNAc- α -1,4-Gal für Glykosylierung zu verwenden ^(66, 160). TFF1 und TFF2 binden ebenfalls nicht an Mukuspräparationen aus dem humanen Speichel (Anhang, Abb. 45).

Des Weiteren ist beschrieben, das TFF1 und TFF3 an Glyko-Strukturen von *Helicobacter pylori* bindet, allerdings nicht TFF2⁽¹⁶⁴⁾. Auch in diesem Fall ist ebenfalls ein GlcNAc relevant für die Bindung als Lektin⁽¹⁶⁵⁾. *H. pylori* kommt hauptsächlich im Magen vor und hat somit kaum Kontakt mit TFF3. Allerdings könnte auf Grund der Lektin-artigen Wechselwirkung von TFF3 mit *H. pylori* auch Bindungen von Zuckerstrukturen des intestinalen Mikrobioms in Betracht gezogen werden und TFF3 so eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr einnehmen. Die N- oder C-terminalen Verkürzungen des TFF3 sollten eine potenzielle Lektin-Aktivität von TFF3 nicht beeinflussen, da die Verkürzungen außerhalb der TFF-Domäne liegen.

3.2 Hochmolekulares TFF3

Nach JOHANSSON *et al.* (2009) besteht der Mukus des humanen Kolon aus zwei Schichten⁽¹²¹⁾. Diese werden als äußerer, loser und innerer, fester, steriler Mukus beschrieben. Die äußere Mukusschicht ist besiedelt mit den Bakterien des Mikrobioms, die innere Schicht ist dagegen frei von Bakterien. Als Ursache für die unterschiedlichen Schichten wurde unter anderem die kovalente Verknüpfung von MUC2 und FCGBP in der inneren Mukusschicht diskutiert⁽¹²¹⁾. In darauffolgenden Arbeiten derselben Arbeitsgruppe wurden keine Indizien für eine kovalente Bindung zwischen MUC2 und FCGBP gefunden⁽¹²⁴⁾. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden keine Hinweise für eine kovalente Bindung zwischen MUC2 und FCGBP gefunden.

MUC2 lässt sich durch AgGE von TFF3-FCGBP nicht direkt trennen, aber TFF3-FCGBP bildet eine definierte Bande, wohingegen MUC2 einen breiten Schmier bildet (Abb. 12). Wenn MUC2 und FCGBP kovalent verknüpft wären, sollte das Laufverhalten beider Proteine im Agarosegel ähnlich sein.

Um die beiden Mukusschichten des Kolon näher zu untersuchen wurde eine stufenweise Extraktion (Kapitel 5.1.1) durchgeführt. Dazu wurde die lose Mukusschicht unter milden Bedingungen aus Kolongewebe herausgewaschen (leicht lösliche Fraktion E0). Das verbleibende Gewebe wurde mechanisch aufgeschlossen, um die Mukussicht aus dem Kolongewebe zu extrahieren (lösliche Fraktion E1). Das restliche Pellet wurde mit 1% SDS gekocht, um mögliche schwerlösliche TFF3-Formen zu extrahieren (schwerlösliche Fraktion E2) (Abb. 39).

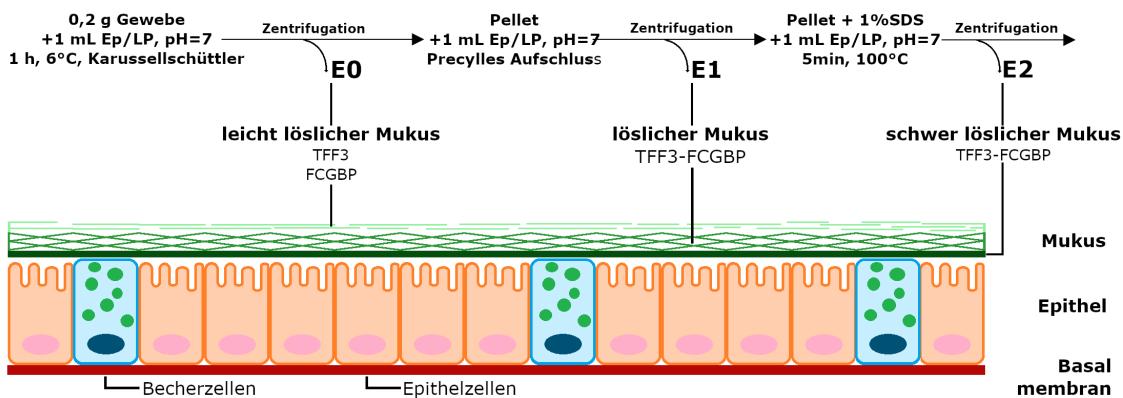


Abbildung 39: Durch stufenweise Extraktion lassen sich die verschiedenen TFF3-Formen in unterschiedlichen Verhältnissen aus mukösem Gewebe herauslösen.

Es zeigte sich, dass TFF3 und FCGBP sehr gut löslich sind (E0) und sich ohne mechanischen Aufschluss aus dem Mukus herauswaschen lassen. Die SEC des E0-Extraktes enthält TFF3 überwiegend als niedermolekulares TFF3-Homodimer sowie als Monomer (Abb. 11). Das Extrakt nach mechanischem Aufschluss (E1) enthält am meisten TFF3, das allerdings überwiegend als TFF3-FCGBP vorliegt. Der Vergleich der Immunreaktivität von TFF3 und FCGBP nach AgGE zeigt, dass der TFF3-Anteil des TFF3-FCGBP zunimmt von E0 nach E2 (Abb. 10). Das deutet darauf hin, dass TFF3 das Herauslösen von FCGBP aus dem Mukus erschwert.

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Untersuchungen des zervikalen Mukus⁽¹⁴¹⁾. Auf welche Art und Weise die Stabilisierung des FCGBP durch TFF3 im Mukus (MUC2) erfolgt, ist jedoch noch unklar, da eine kovalente Bindung zwischen MUC2 und FCGBP nicht bestätigt wurde⁽¹¹⁰⁾.

Vor Kurzem zeigte GORMAN *et al.*, dass FCGBP und MUC2 in gemeinsam gepackten Granula aus Becherzellen sezerniert werden⁽¹⁶⁶⁾. Sie konnten ebenfalls keine kovalente Bindung zwischen MUC2 und FCGBP nachweisen. Allerdings sind laut GORMAN *et al.* die Mukus-assoziierten Proteine (MAP) TFF3, CLCA1 und Zymogen Granule Protein 16 (ZG16) durch Protein-Protein Wechselwirkung mit FCGBP verknüpft⁽¹⁶⁶⁾. Diese MAPs interagieren wiederum durch nicht-kovalente Bindung mit N-Glykanen des MUC2⁽¹⁶⁶⁾. Die dadurch entstehende Vernetzung von MUC2 und FCGBP würde eine erhöhte Permeabilität des Mukus von „FCGBP-knock-out“ Becherzellen gegenüber Parasiten und fluoreszierenden Partikeln oder den Phänotyp von Tff3^{-/-} Mäusen erklären^(63, 123, 167). Dies weist

auf eine Stabilisierung von FCGBP im Mukus durch eine mögliche Lektin-Aktivität von TFF3 hin.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine kovalente Bindung zwischen TFF3 und FCGBP durch Bildung einer Disulfidbrücke hin, da sich TFF3-FCGBP nur durch Reduktion aber nicht durch kochen mit SDS separieren lassen. Allerdings kann eine starke Lektin-Bindung nicht ausgeschlossen werden, ganz ähnlich wie sie zwischen TFF2 und MUC6 im Schweinemagen beschrieben ist⁽¹⁶⁸⁾.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Vernetzung von FCGBP durch TFF3 ohne die Beteiligung von MUC2. Beide Möglichkeiten würden erklären, warum ein stärker TFF3-dekoriertes FCGBP schwerer aus dem Mukus zu lösen ist.

Eine grobe Abschätzung der Größe des TFF3-FCGBP Proteinkomplexes nach AgGE (Abb. 14) legt nahe, dass der Proteinkomplex nicht nur monomeres FCGBP enthält. Die ermittelten Massen des Proteinkomplex (Tab. 6) entsprechen je nach verwendetem Marker einem FCGBP-Tri bzw. Oligomer. Die Masse des TFF3 wurde gegenüber FCGBP vernachlässigt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Bestimmung der Masse von oligomerem, murinem Fcgbp (mFcgbp)⁽¹²⁴⁾. Das mFcgbp wurde durch native PAGE und SEC auf eine relative Größe von 720k geschätzt. Durch den Einfluss von SDS sinkt die relative Größe auf 460k, was immer noch einem Trimer des mFcgbp (Monomer 127 kDa, UniProt, Q8K0P6) entspricht⁽¹²⁴⁾. Ein ähnlicher Einfluss von SDS auf das TFF3-FCGBP wurde im humanen Kolon und im zervikalen Mukus beobachtet (Abb. 14)⁽¹⁴¹⁾. Das humane TFF3-FCGBP nimmt zwar durch Kochen mit SDS in seiner Größe ab, ist aber immer noch größer als ein monomeres FCGBP. Dies kann an der Veränderung des hydrodynamischen Radius von denaturiertem TFF3-FCGBP liegen oder an einer Verkleinerung bzw. Fragmentierung des TFF3-FCGBP.

Im Proteom des Speichels ist neben MUC5B und MUC5AC auch DMBT1 nachweisbar (Abb. 25 Seite 48). Dieses Glykoprotein ist in der Lage, verschiedene Bakterien und Viren zu binden⁽¹³²⁾. *In vitro* wurde gezeigt, dass DMBT1 an immobilisierte TFF3-Homodimere bindet, aber nicht an monomeres TFF3 oder an TFF2. Vergleichende AgGE von Kolon, Lungengewebe und BAL-Flüssigkeit (Abb. 12, Seite 28; Abb. 32, Seite 55) zeigen, dass TFF3, FCGBP, DMBT1 und gewebespezifisches Muzin (MUC2, MUC5AC) in den selben Fraktionen nach SEC vorhanden sind. Da sich TFF3-FCGBP, DMBT-1 und Muzine (MUC2, MUC5AC) durch AgGE trennen lassen (Abb. 40, Abb. 32), gibt es vermutlich keine Bindung

zwischen diesen Proteinen.

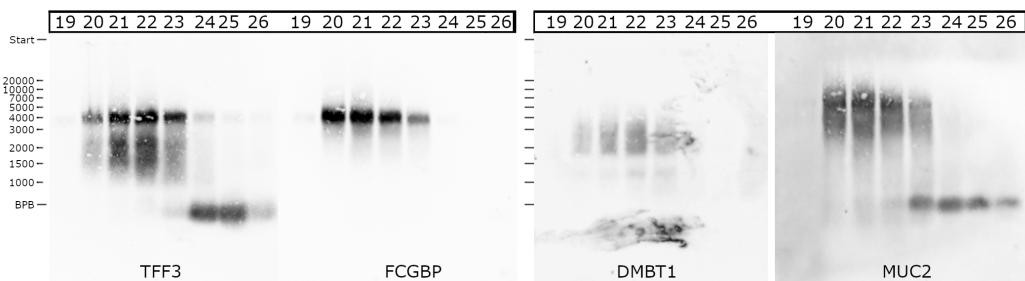


Abbildung 40: Vergleich von hochmolekularen Fraktionen; Die hochmolekularen Fraktionen (19-26) des Kolonextrakt K-12 wurde nach SEC bezüglich TFF3, FCGBP, DMBT1 und MUC2 nach Agarosegel-Elektrophorese untersucht.

DMBT-1 ist ein Agglutinin, das Bakterien binden kann und damit eine Funktion in der angeborenen Immunabwehr hat⁽¹²²⁾. Die Funktion von FCGBP dagegen wird auch als strukturbildend beschrieben und weniger als Bindungspartner für Immunglobulin G (IgG)⁽¹²⁴⁾. Im Gegensatz zum humanen FCGBP besitzt murines Fcgbp kein IgG-bindendes Fragment (UniProt, Q8K0P6).

Bei COPD-Patienten führt eine erhöhte Expression von FCGBP und TFF3 zu einer Veränderung des Bronchialmukus hin zu einem zwei-schichtigem Mukus, der dem des Kolon ähnelt⁽¹²²⁾. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FCGBP *in vitro* MUC2 stabilisiert und die Durchlässigkeit des Mukus gegenüber *Salmonella enterica* verringert⁽¹²³⁾.

Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem mFcgbp weisen auf eine N-terminale Dimerbildung hin. Dies könnte zur Bildung eines elastischen Knäuels führen, wodurch mFcgbp in der Lage wäre, Stöße zu dämpfen⁽¹²⁴⁾. Die Größe des humanen FCGBP im nativen PAGE legt die Bildung eines Tetramers nahe⁽¹²⁴⁾. Dadurch hätte humanes FCGBP die Möglichkeit, größere Komplexe zu bilden, die mit den extrapolierten Molekülmassen von TFF3-FCGBP übereinstimmen (Tab. 6).

FCGBP besteht aus Cystein-reichen Modulen, allerdings sind die meisten Cysteinreste vermutlich intramolekular verknüpft⁽¹¹⁴⁾. Nur die C- und N-terminalen Abschnitte r1 und r12 des FCGBPs besitzen eine ungerade Anzahl an Cysteinresten (Abb. 5). Somit wäre eine Di- bzw. Multimerisierung vor allem in diesen Abschnitten möglich. Diese Cysteinreste sind vermutlich auch die Bindungsstellen für TFF3, wodurch TFF3 die Länge des FCGBP-Multimers regulieren könnte

⁽¹¹⁴⁾.

Über die Rolle von TFF3 in dem Proteinkomplex kann bisher nur spekuliert werden. Eigene Ergebnisse zeigen, dass eine Bindung von TFF3 an FCGBP die Löslichkeit des Proteinkomplexes erniedrigt. Vermutlich beruht die Stabilisierung des FCGBP-Komplexes durch TFF3 auf Lektin-artigen Wechselwirkungen. Auch die Regulation der Größe des FCGBP durch Blockierung eines Cysteinrestes, welches für die Modulation der Oligomerisierung nötig ist, ist durch TFF3 denkbar. Dies verdeutlicht, dass die Funktionen von TFF3 und FCGBP immer noch nicht abschließend geklärt sind, aber vieles auf eine strukturgebende Rolle hinweist.

3.3 TFF3 in humanen Kolon-Tumoren

Der Vergleich von 3 Kolontumoren mit ihrem umliegenden Gewebe ohne pathologischen Befund, zeigte eine höhere TFF3-Konzentration im Tumorgewebe (Abb. 20). Eine erhöhte Expression von TFF-Peptiden wurde bereits für kolorektale Karzinome beschrieben ^(169, 170). Die nachgewiesenen TFF3-Formen unterscheiden sich dabei nicht zwischen Kolontumor und umliegendem Gewebe. Es wurde in allen Geweben hoch- und niedermolekulares TFF3 gefunden, so wie im Speichel oder der Lunge (Abb. 19). Dabei wurde ebenfalls das verkürzte TFF3 Monomer nachgewiesen.

Für die erhöhte TFF3-Expression in Tumoren gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits wird eine epigenetische Regulation durch Methylierung des TFF3-Promoters vermutet ^(171, 172). Andererseits wird TFF3-Expression auch durch Entzündungsmediatoren erhöht ⁽¹⁷³⁾. TFF3 kann sogar seine eigene Genexpression aktivieren ⁽¹⁷⁴⁾.

3.4 Zustandekommen der verschiedenen TFF3-Formen

Es gibt verschiedene Formen des TFF3: TFF3-FCGBP, 60k und 30k große TFF3-Formen, TFF3-Homodimer, TFF3-Monomer und verkürztes TFF3. Im folgenden werden Hypothesen zur Entstehung der verschiedenen TFF3-Formen diskutiert. Kürzlich wurde FCGBP in den MUC2-Granula von Becherzellen nachgewiesen ⁽¹⁶⁶⁾, daher ist von einem ähnlichen Sekretionsweg für beide Proteine auszugehen. Nach der Translokation des Peptidrückgrats ins ER, werden Cysteinreste zu in-

transmolekularen Disulfidbrücken verknüpft und die *N*-Glykosilierung findet statt (18, 143, 175). Muzine bilden im ER bereits Dimere, möglicherweise tut FCGBP dies auch. Im Golgi-Apparat findet dann die *O*-Glykosilierung der PTS-Domäne der Muzine statt. Abschließend werden die Muzin-Dimere polymerisiert und mit Ca^{2+} in Granula verpackt (18, 175).

Auf welchem Weg freies TFF3 seinen Weg ins Lumen findet, ist nicht genau bekannt. Nach Translokation ins ER gibt es mehrere Möglichkeiten. Beispielsweise könnte TFF3-Monomer über den siebten Cysteinrest kovalent an FCGBP gebunden werden und dort bis zur gemeinsamen Sekretion verharren. Da TFF3 offensichtlich eine wichtige Rolle im Mukus spielt, wird es vermutlich im Überschuss gebildet, so dass immer genug TFF3 vorhanden ist, um an FCGBP zu binden. Ungebundenes TFF3-Monomer könnte zu Homodimeren verknüpft und ebenfalls mit den Granula ins Lumen sezerniert werden. Die Bildung des TFF3-Monomers könnte aber auch auf eine Reduktion zurückzuführen sein. TFF3-FCGBP und TFF3-Homodimer können zum Beispiel durch H_2S reduziert werden (45). H_2S wird unter anderem von Darmbakterien gebildet (176, 177). Die Möglichkeit, auf diese Weise reduktive Einflüsse im Darm zu neutralisieren, wurde bereits früher als mögliche Funktion von TFF3 diskutiert (45).

Eine weitere Möglichkeit der Verknüpfung von TFF3-Homodimeren und FCGBP, wäre durch die PDI-Domänen des FCGBP gegeben (113). Die Verknüpfung durch Isomerisierung von Disulfidbrücken könnte durch Änderung der Umgebungsbedingungen im Lumen des Darms wieder zurück reagieren und so TFF3-Homodimer und -Monomer im Lumen freisetzen.

Bei den 60k und 30k großen TFF3-Entitäten könnte es sich um Fragmente des FCGBP handeln, an denen noch TFF3 gebunden ist (45).

Bei dem verkürzten TFF3-Monomer handelt es sich vermutlich um einen Abbau durch Proteasen. Da das verkürzte TFF3-Monomer überwiegend im niedermolekularen Bereich zu finden ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung mit FCGBP vor einem Abbau schützt. Ein ganz ähnliches Ergebnis wurde bei Untersuchungen der Zervix erhalten (141).

Dies verdeutlicht, dass die Entstehung der verschiedenen TFF3-Entitäten nicht ohne weiteres zu erklären ist und mit der Funktion von TFF3 zusammenhängen könnte. Wenn TFF3 den Mukus modulieren soll, wäre die Sekretion als Proteinkomplex mit FCGBP zielführend. Sollte die Hauptfunktion des TFF3 die

Regeneration der Mukosa sein, wäre eine Sekretion als Homodimer oder Monomer vermutlich von Vorteil.

3.5 Mögliche Funktionen der verschiedenen TFF3-Formen

Für TFF3 wurden unterschiedliche biologische Aktivitäten beschrieben (Tab. 3, Seite 11), darunter anti-apoptotische⁽¹⁷⁸⁾ und motogene Eigenschaften^(54, 79). Dabei muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass die Effekte nur bei relativ hohen TFF3-Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-7} M nachweisbar waren⁽¹⁵⁷⁾. Hochaffine Peptid- Liganden , wie beispielsweise der epitheliale Wachstumsfaktor (EGF), wirken allerdings bereits bei Konzentrationen von 10^{-10} M⁽¹⁷⁹⁾. Das sezernierte TFF3-Homodimer und -Monomer sind vermutlich an der Homöostase des Epithels beteiligt, da *Tff3^{-/-}* Mäuse eine gehemmte Zellmigration in den Kolonkrypten zeigen⁽⁶³⁾. Bei einer Verwundung des Epithels kommt TFF3 mit dem basolateralen Teil der Epithelzellen in Berührung, wodurch es die Migration (Restitution) beeinflusst und auch seine anti-apoptotischen Eigenschaften zum tragen kommen⁽⁷⁹⁾.

Des Weiteren erhöht TFF3 die Mukusstabilität und ist somit Teil des angeborenen Immunsystems^(69, 175). Auch als Heteromer mit FCGBP ist TFF3 im Mukus enthalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass TFF3-FCGBP schlechter löslich ist als FCGBP allein. Dies ist vermutlich auf Lektin-artige Bindungen von TFF3 zurückzuführen^(70, 164). Diese Lektin-Aktivität könnte auch zu einer Bindung von Viren und Bakterien im Mukus beitragen und so auch Teil des angeborenen Immunsystems sein^(36, 125, 126, 166, 180). Zusätzlich könnte FCGBP Immunglobulin G (IgG) nach Transzytose im Mukus fixieren und so eine Verbindung von angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellen⁽¹⁸¹⁾.

3.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TFF3 in Proben aus humanem Kolon, der Lunge und im Speichel sowohl als hochmolekulares TFF3-FCGBP als auch in niedermolekularen Formen vorkommt. Diese TFF3-Formen wurden auch in Kolon-Tumoren nachgewiesen. Außerdem konnten N- und C-terminal verkürzte TFF3-Formen im Kolon und im Speichel nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur

Lektin-Aktivität von TFF3 gegenüber Muzinen aus Kolon, Speichel und Lunge waren negativ. Nur die aus der Literatur bekannte, Lektin-artige Bindung von TFF3 an Muzine aus dem Schweinemagen konnte bestätigt werden⁽⁷⁰⁾.

4 Material

Die in diesem Kapitel beschrieben Methoden sind nach Standardprotokollen des Instituts für Molekularbiologie und Medizinische Chemie (IMMC) der medizinischen Fakultät (FME) der Otto-von-Guerike-Universität Magdeburgs durchgeführt und teilweise individuell modifiziert wurden. In dieser Arbeit wurden, soweit nicht anderes deklariert, Chemikalien in analysenreiner Qualität der Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), Merck (Darmstadt, D), Riedel-de-Ha n (Seelze, D), Roth (Karlsruhe, D), Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D) verwendet. Vollentsalztes (VE) Wasser (Ultra Clear TWF, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, D) wurde zum Ansetzen aller Lösungen und Puffer verwendet. Werden keine Angaben bezüglich der Temperatur gemacht, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

4.1 Gewebe

Die Untersuchungen, einschließlich der Entnahme aller menschlichen Gewebe und Sekrete wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg genehmigt (Ethikkommissionsvotum: 102/03 Lungengewebe, 82/11 Bronchialsekret und bronchoalveolare Lavage (BAL), 95/06 Kolongewebe, 51/99 Speichel) und unter Einhaltung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Entnahme der Kolon-Proben wurde durch die Mitarbeiter von Prof. Meyer des Universitätsklinikums Magdeburg, Klinik für Chirurgie durchgeführt und nach histologischer Befundung durch das Institut für Pathologie bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Speichelproben wurden von gesunden, freiwilligen Probanden gesammelt, mit Proteasehemmer (50µL/mL, cOmplete™, EDTA-free, Roche, Schweiz) versetzt und bei -80°C gelagert. Lungengewebe, Pleuraergüsse, Bronchoalveolare Lavage (BAL) Proben und Bronchialsekrete wurden durch die Mitarbeiter von Prof. Schreiber des Universitätsklinikums Magdeburg, Klinik für Pneumologie gewonnen. Bronchalsekrete, Pleuraergüsse und BAL-Proben wurden mit Proteasehemmer (cOmplete™, EDTA-free, Roche, Schweiz) versetzt und bei -80°C gelagert. Gewebe wurde ohne weitere Behandlung eingefroren und bei -80°C gelagert. Die verwendeten Gewebe sind zwar teilweise ohne pathologischen Befund, allerdings sind sie immer bei notwendigen Operationen entnommen worden und stammen aus einer pathologischen Umgebung. Dies gilt auch für die analysier-

ten Bronchialsekrete und BAL-Proben. Eine Ausnahme bilden die verwendeten Speichelproben, die von freiwilligen gesunden Spendern stammen.

4.2 Antiseren

Für den Nachweis von TFF3, MUC5AC und MUC5B wurden hauseigene, affinitätsreinigte, polyklonale Antiseren verwendet. Außerdem wurden Antiseren zum Nachweis von TFF3, MUC2 und FCGBP kommerziell erworben. Sofern nicht anders angegeben, wurde für den Nachweis von FCGBP immer der C-terminale Antikörper von Cloud-Clone Corp. verwendet. Das Antiserum gegen DMBT-1 wurde von der Arbeitsgruppe HOLMSKOV (University of Southern Denmark,) zur Verfügung gestellt⁽¹⁸²⁾. Peroxidase-markierte Antiseren gegen Kaninchen- und Mäuse-Antikörper wurden als sekundäre Antiseren verwendet.

Antikörper	Antigen	Kopplung	Verdünnung	Literatur
a-hTFF3-7	aa 1-14	KLH	1:500	-
a-hTFF3-8	aa 49-59	KLH	1:4000	(59)
a-rTFF3-11	aa 1-23	KLH	1:500	-
a-rTFF3-15	aa 2-20	KLH	1:500	-
a-hTFF3 NanoTools	aa 1-12	KLH	1:500	15C6, NanoTools, D
a-hMUC5AC-2	RNQDQQGPFKMC	KLH	1:2000	(59)
a-hMUC5B-4	PQGFYKRVAGQC	KLH	1:500	-
a-hMUC5B-1	RNREQVGKFKMC	KLH	1:500	-
a-hMUC2	unbekannt	KLH	1:500	GTX100664, GeneTex, USA
FCGBP	aa 5176-5344	KLH	1 µg/mL	PAP389Hu01, Cloud-Clone Corp., USA
FCGBP-N	aa 289-420	KLH	1:500	HPA003564, Sigma-Aldrich, D
DMBT1 Hyb-213-06	unbekannt	KLH	1:1000	(182)
anti Kaninchen	-	Peroxidase	1:4000	PI-1000
anti Maus	-	Peroxidase	1:1000	PI-2000 Vector Laboratories, USA

Tabelle 9: Übersicht verwendeter Primär- und Sekundärantikörper

4.2.1 Affinitätsreinigung von Antiseren

Durch diese Reinigung der Antiseren werden Antikörper angereichert, die spezifisch an das zur Immunisierung verwendete Epitop binden. Dieses Verfahren minimiert unspezifische Bindungen zwischen Proteinen. Zur Isolierung der Antiseren aus dem Endserum wurde auf einer Membran das Peptid fixiert, das als Antigen

verwendet wurde. Dazu wurde die Membran mit dem in PBS gelösten Antigen inkubiert und gewaschen. Die Peptid-überzogene Membran wurde über Nacht mit dem Endserum inkubiert, damit die Antigen-spezifischen Antikörper an das Peptid binden können. Bei einem pH-Wert von 2,5 wurde die Bindung zwischen Antigenen und Antikörpern denaturiert. Die gelösten Antikörper wurde durch Dialyse umgepuffert und renaturiert. Das renaturierte Antiserum wurde mit Hilfe von Filtrationszentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 4000 rpm, 4°C; Sartorius, Vivaspin 20) auf eine geeignete Konzentration eingeengt.⁽⁶⁰⁾

Beschichtung der Membran Eine Nitrozellulosemembran (6,5 x 9 cm, Amersham, Protran 0.1 µm NC, GH Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England) wurde für 5 min in PBS (10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4, 155 mM NaCl) gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran mit 20 mL PBS inkubiert und 200 µL KLH-MBS gekoppeltes Peptid (1 mg/mL) dazugegeben. Über Nacht wurde das Gemisch bei Raumtemperatur leicht geschüttelt (Taumler). Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x mit PBS gewaschen. Die Membran kann zwischen 2 Filterpapieren (Sartorius Stedim, Blotting Paper, BF2, 195 g/cm²) im Kühlschrank bis zu 6 Monaten gelagert werden. Zum Abschluss der Beschichtung wird die Membran für 1 h mit Normal Goat Serum (NGS, Pan-Systems P30/1001, 5%, filtriert durch 0,2 µm Filteraufsatz (Millex GV Filter, Merck, Darmstadt, D) blockiert.

Reinigung der Antiseren Jede Membran wurden mit 20 ml Lösung aus Antiserum und Blockierungslösung (5 % NGS, 0,05 % NaN₃) im Verhältnis 1:50 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgenommen und mittels Westernblot-Analyse auf Antiseren geprüft. Die Membran wurde 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 mL Elutionspuffer (0,167 M Glycin, 0,15 M NaCl, 0,1 % (w/v) BSA, pH 2,5) für 30 min inkubiert. Das Eluat wurde abgenommen und mit 1/5 (2 mL) 2M Tris/HCl (pH 8) neutralisiert. Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier (Roth, pH-Fix 0-14) geprüft. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C dialysiert (Visking, Typ 20/32, Roth, Karlsruhe, D) gegen 2 L PBS. Nach 3 Stunden wurde das PBS einmal gewechselt. Das Antiserum im Dialyseschlauch wurde durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 4000 rpm, 4°C; Sartorius, Vivaspin 20) auf 5 mL konzentriert und mittels SDS-

PAGE und Western-Blot getestet.

4.3 Lektine

Griffonia simplicifolia Lectin II (GSA II) wurde zum Nachweis von N-AcGlc Strukturen verwendet. Diese Zuckerstruktur des MUC6 wird ausschließlich in den Nebenzellen des Magen und den Brunner'schen Drüsen exprimiert⁽¹⁸³⁾. Das GSA II ist Biotin-gekoppelt und wird über Meerrettichperoxidase (POD) markiertes Streptavidin nachgewiesen.

Lektin	Abkürzung	Bindungsmotiv	Verdünnung	Bezug
biotiniertes <i>Griffonia simplicifolia Lectin II</i>	GSAII	α - und β - N-AcGlc	1:1000	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching ,DE
Streptavidin-POD-Konjugat	-	Biotin	1:1250	Roche AG, CH

Tabelle 10: verwendete Lektine

4.4 Peptide

Für Bindungsstudien und Kontrollgele wurden rekombinante und synthetische TFF3-Peptide verwendet. Das synthetische TFF3-Monomer ist durch eine Acetaminomethyl-Schutzgruppe am Cystein (C57) vor Dimerisierung geschützt. Die synthetischen TFF3-Peptide wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Muttenthaler zur Verfügung gestellt⁽¹⁰⁶⁾. Die rekombinanten TFF3-Peptide stammen von Dr. L. Thim⁽¹⁴²⁾.

Bezeichnung	Peptide	Herstellung
rekTFF3 _{mono}	Monomer	rekombinant
rekTFF3 _{dimer}	Dimer	rekombinant
synthTFF3 _{mono}	Monomer	synthetisch
synthTFF3 _{dimer}	Dimer	synthetisch

Tabelle 11: verwendete TFF3-Peptide

4.5 Software und Datenbanken zur Datenanalyse

Zur Erstellung dieser Arbeit und zur Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Software verwendet.

- Latex (freeware)

- Bibtex (freeware)
- Gimp (freeware)
- PubMed
- Microsoft Office 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- LabImage (Kapelan, Leipzig, D)
- GeneTools (SynGene, Cambrige, UK)
- GeneSnap (SynGene, Cambrige, UK)
- ChemDraw (PerkinElmer, Waltham, USA)
- UNIProt
- MEROPS

5 Methoden

5.1 Gewebeextraktion

5.1.1 Humanes Kolon

Standard Gewebeextraktion Die Gewebeextraktion wurde nach einem Protokoll des IMMC durchgeführt⁽¹⁸⁴⁾. Während der gesamten Extraktion wurden das Gewebe und die Extrakte auf Eis gelagert. Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde auf einer gekühlten und desinfizierten Glasplatte mit einem Einwegskalpell in dünne Scheiben geschnitten. Das eingewogene Gewebe wurde mit der 5-fachen Menge Extraktionspuffer (EP, 30 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7, 0,5 mM Benzamidin, 0,1 mM PefaBloc SC, 1µg/mL Leupeptin) versetzt und mit Keramikkügelchen bestückt. Das Gewebe wurde im Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff eingefroren und dann mit Precellys 24 (30 s, 6800 RPM; peglab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) mechanisch homogenisiert. Nach 5 min im Eisbad wurde der Homogenisierungsprozess wiederholt. Die Zelltrümmer und Keramikkügelchen wurden durch Zentrifugation (Hettich Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, D) abgetrennt (16000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und mit gleicher Menge Chloroform extrahiert.

Nach der Abtrennung ($16000 \times g$, 10 min, 4°C) der organischen Phase, wurde die wässrige Phase für Analysen und Reinigungsschritte weiterverwendet.

Stufenweise Gewebeextraktion Die stufenweise Extraktion (Abb. 10 A, Abb. 39) nach einem Protokoll des IMMC⁽¹³⁴⁾ wurde leicht modifiziert. Während der gesamten Extraktion wurde das Gewebe auf Eis gelagert. Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde auf einer gekühlten und desinfizierten Glasplatte in dünne Scheiben geschnitten. Das eingewogene Gewebe wurde mit der 5-fachen Menge EP versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 1h im Karussellschüttler (Mixing Rotor, Variotim/Variospeed, Renner GmbH, Dannstadt, D) bei mittlerer Geschwindigkeit und $4\text{--}6^\circ\text{C}$ gedreht und anschließend zentrifugiert ($16000 \times g$, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde mit der selben Menge Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde in weiteren Analyse als **E0** bezeichnet. Das Pellet wurde erneut mit der 5-fachen Menge EP versetzt und die Standard Gewebeextraktion (siehe oben) durchgeführt. Die wässrige Phase wurde in weiteren Analysen als **E1** bezeichnet. Das Pellet wurde wieder mit der 5-fachen Menge EP und 1% SDS resuspendiert, 5 min im Wasserbad gekocht (100°C) und zentrifugiert ($16000 \times g$, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und in der selben Menge Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde als **E2** bezeichnet.

TRIzol-Gewebeextraktion Diese Extraktion basiert auf einer Publikation von Chomczynski und Sacchi (1987)⁽¹⁸⁵⁾. Etwa 0,2 g Gewebe wurden in ein Reaktionsgefäß eingewogen, analog zur Standard-Gewebeextraktion. Zum Gewebe und den Keramikkügelchen wurde die 5-fache Menge TRIzol-Reagenz (ambion by life technologies, Waltham Massachusetts, USA) gegeben, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels Precellys (30s bei 6800 RPM) homogenisiert. Das Einfrieren und Homogenisieren wurde nach 5 min im Eisbad wiederholt. Durch Zentrifugation ($22000 \times g$, 10 min, 4°C) wurden Zelltrümmer und Keramikkügelchen abgetrennt und der Überstand mit der selben Menge Chloroform versetzt. Nach kurzem Vortexen und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert ($16000 \times g$, 15 min, 4°C). Es entstehen 3 Phasen. Die wässrige Phase und Interphase wurde entnommen und verworfen. Die organische Phase wurde mit 1/5 Volumen Ethanol versetzt, gevortext und inkubiert (5 min, RT). Das Gemisch wurde mit 1,5 mL *i*-Propanol versetzt. Nach kurzem Vortexen und 10 min Inkubation bei

Raumtemperatur wurde zentrifugiert ($12000 \times g$, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot auf Proteine geprüft und verworfen. Das Protein-Pellet wurde 3x für 20 min mit Guanidiniumhydrochlorid-Lösung (0,3 M GuHCl in 95% EtOH) bei Raumtemperatur gewaschen. Zum Abschuss wurde das Protein-Pellet mit 100% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Protein-Pellet wurde in $200 \mu\text{L}$ 1% SDS Lösung auf 50°C erhitzt und gelöst. Nach abschließender Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 min, 4°C) konnte der Überstand für Analysen genutzt werden.

5.1.2 Humane Lunge

Gewebe Lungengewebe (Bronchus oder Parenchym) wurde nach der Standard Gewebeextraktion (5.1.1) aufgeschlossen.

Bronchialsekrete Bronchialsekrete wurden zentrifugiert (20 min, $23000 \times g$, 4°C). Der Überstand wurde mit 1/3 Volumen EP verdünnt um die Viskosität für die Größenausschlusschromatographie zu verringern. Die verdünnten Bronchialsekrete wurden direkt analysiert oder bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Bronchoalveolare Lavage (BAL) Aufgrund des schlechten Laufverhaltens in der SDS-PAGE wurden die Proteine der BAL-Proben mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend gelöst. Dazu wurde die visköse BAL-Flüssigkeit aufgetaut und je 1 mL in ein 2 mL Eppendorfgefäß pipettiert. Diese wurde für 20 min bei $23000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem doppelten Volumen gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde 1 h bei 4°C im Karussellschüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 4°C , $23000 \times g$) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Proteinpellet wurde in $200 \mu\text{L}$ EP gelöst und wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert werden. Proben mit hoher Viskosität und sehr hohem TFF3-Gehalt wurden verdünnt (siehe Brochialsekrete). Proben mit geringer Viskosität wurden zentrifugiert (20 min, $23000 \times g$, 4°C) und der Überstand direkt verwendet.

5.1.3 Humaner Speichel

Der Speichel wurde mit einem cOmplteTMProteasehemmer-Cocktail ($50 \mu\text{L}/\text{mL}$, EDTA-free, Roche, CH) versetzt. Dazu wurde eine 25-fach konzentrierte Stamm-

lösung hergestellt (1 Tablette, 2 mL VE-Wasser) und 50 μ L pro 1 mL Probe dazugegeben. Die Proben wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen der Proben wurde zentrifugiert (12000 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand für die Analysen weiterverwendet.

5.2 Proteinreinigung über Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Für die Proteinreinigung wurden alle Puffer und Lösungen steril filtriert (Millipore Express PLUS (PES), Filter 22 μ m, Merck) und für 15 min im Ultraschallbad entgast (Emmi-H22, Mörfelden-Walldorf, DE). Die Puffer wurden für die Größenausschlusschromatographie (SEC) auf pH 7 und bei der Ionenaustauschchromatographie auf pH 8 eingestellt.

5.2.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der SEC werden Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Als stationäre Phase dient poröses Material mit definierter Porengröße. Das Proteinextrakt wird durch die mobile Phase (Laufpuffer (LP), 30 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, mM pH 7, 0,5 mM Benzamidin, 0,1 mM PefaBloc SC, 1 μ g/mL Leupeptin) über die Säule geführt. Dabei liegt eine leichter Druck an. Die Proteine migrieren entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell in der Säule. Kleinere Proteine legen einen längeren Weg zurück, da sie besser in die Poren eindringen können und eluieren damit später von der Säule als große Proteine. Proteine die zu groß für die Poren sind, eluieren direkt nach dem Totvolumen der Säule. Die SEC wurde mit einem FPLC-System (ÄKTATM Prime Plus oder ÄKTATM-UPC-900, Amersham Biosciences, Freiburg, D) und Säulen mit unterschiedlicher Trennleistung durchgeführt. Hauptsächlich wurde eine HiLoadTM 16/600 SuperdexTM 75 prep grade Säule (120 mL Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Calfont, UK) verwendet. Für die Trennung größerer Proteine wurde eine HiLoadTM 16/60 SepharcylTM S-500 HR-Säule (120 mL Säulenvolumen, GE Healthcare Life Science, Little Calfont, UK) genutzt. Vor Beginn wurde die Säule mit 1,5 Säulenvolumen (SV) LP equilibriert. Anschließend wurde max. 5 mL proteinhaltiges Extrakt aufgetragen und getrennt. Die Flussrate (Flowrate) betrug 1 mL/min und wurde bei Druckproblemen auf 0,5 mL/min reduziert. Ein Elutionsprofil wurde durch

Messung der Absorption bei 280 nm aufgenommen. Das Eluat wurde in 2 mL Fraktionen aufgefangen und in Eppendorfgefäß überführt. Das Eluat wurde bei -20°C bzw. bei längerer Lagerung bei -80 °C eingefroren.

5.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie trennt Stoffe nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die stationäre Phase besitzt funktionelle, geladene Gruppen, die in Anionen- und Kationenaustauscher unterscheiden werden. Die Proteine der Probe binden an die geladenen funktionellen Gruppen. Durch Erhöhung der Salzkonzentration werden die Proteine von der stationären Phase verdrängt und gehen in die mobile Phase über. Die freien Proteine werden mit dem Eluat aufgefangen. Vor der Nutzung des Anionenaustauschers ResourceTM 6 (ResQ 6, Anionenaustauschersäule, 6 mL Säulenvolumen (SV), GE Healthcare Life Science, Little Calfont, UK) wurde die Säule gewaschen und equilibriert (Tabelle 12).

Lösung	Volumen
VE Wasser	7 SV
2 M NaCl	5 SV
VE Wasser	5 SV
1 M NaOH	5 SV
VE Wasser	5 SV
1 M HCl	5 SV
VE Wasser	5 SV
2M NaCl	5 SV
VE Wasser	5 SV
Puffer A	5 SV

Tabelle 12: Wasch- und Equilibrierungsschritte der Anionenaustauschersäule, SV - Säulenvolumen

Nach der Äquilibrierung der ResQ 6 mit 5 SV Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 7, 0,5 mM Benzamidin, 0,1 mM PefaBloc SC, 1µg/mL Leupeptin) wurde die Probe injiziert und das Durchlaufvolumen aufgefangen. Während des Laufs wurde die Konzentration von Puffer B (20 mM Tris/HCl, 1M NaCl pH 7, 0,5 mM Benzamidin, 0,1 mM PefaBloc SC, 1 µg/mL Leupeptin) kontinuierlich erhöht. Zu Beginn über 1,5 SV auf 5 % Puffer B, dann über 4 SV auf 100 %. Diese Konzentration wurde noch für 2 SV gehalten und anschließend der Lauf beendet. Die Laufgeschwindigkeit betrug 5 mL/min und es wurden 1 mL-Fraktionen gesammelt. Der Lauf wurde durch die Messung der UV-Absorption bei 280 nm dokumentiert. Die Fraktionen wurden bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

5.3 SDS-PAGE nach Lämmli

Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat, SDS)-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Standardmethode der Biochemie zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld⁽¹⁸⁶⁾. Die zu trennenden Proteine werden erhitzt und denaturiert. In Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat kommt es zur Anlagerung des anionischen Tensids, wodurch eine Renaturierung verhindert wird. Es bildet sich ein negativ geladener Protein-SDS-Komplex bei dem Ladung und Masse proportional zueinander sind. Der Protein-SDS-Komplex wird auf ein Polyacrylamid Gel aufgetragen und wandert durch Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Dabei wandern kleine Proteine schneller als große.⁽¹⁸⁷⁾

Probenvorbereitung Alle Proben wurden mit reduzierendem- (RPP; 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 39 % (w/v; 5,47 M) Glycerin, 5 % (w/v; 2,86 M) 2-Mercaptoethanol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, 1 % SDS) oder nicht-reduzierendem Probenpuffer (NRPP; 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 39 % (w/v; 5,47 M) Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, 1 % SDS) im Verhältnis (1:4) gemischt, 5 min im Wasserbad gekocht, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Stark konzentrierte Proben wurden mit VE-Wasser verdünnt.

Herstellung der Polyacrylamid Gele Vor dem Zusammenbau der Gelgießapparaturen (BioRAD, MiniProteane III) wurden die Glasplatten mit 70 % Ethanol gereinigt. Zuerst wurde eine Lösung für das Trengel hergestellt (Mischverhältnisse in Tabelle 13). Davon wurde 1 mL abgenommen, mit 5 μ L Tetramethylethylenediamin (TEMED) und 10 μ L Ammoniumperoxodisulfat (APS, 20 %) gemischt und zwischen die Glasplatten der Gelgießvorrichtung pipettiert. Nach ca. 5 min war das Fußgel ausgehärtet und das restliche Trengel wurde gegossen. Dieses wurde mit 50 % *i*-Propanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation wurde das *i*-Propanol mit VE-Wasser abgewaschen, mit Filterpapier getrocknet und das Sammelgel (Mischverhältnisse in Tabelle 13) gegossen. In dieses wurden die Probenkämme eingesetzt. Ausgehärtete Gele wurden bis zu einer Woche in feuchtem Milieu bei 4-6°C gelagert.

Chemikalien	15 %	7 %	6 %
	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
VE-Wasser	20 mL	10,33 mL	7,2 mL
30 % Acrylamid/	20 mL	4,67 mL	2,5 mL
Bisacrylamid-Lsg. 37,5:1			
Trenngelpuffer	10 mL	5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,5 mL
20 % SDS	-	-	100 μ L
20 % APS	120 μ L	60 μ L	100 μ L
TEMED	56 μ L	28 μ L	10 μ L

Tabelle 13: Mischungsverhältnis verschieden konzentrierter SDS-PAGE Gele, Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 1 % (w/v) SDS, Sammelgelpuffer: 1 M Tris/HCl, pH 6,8

Durchführung Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach LÄMMLI⁽¹⁸⁶⁾ durchgeführt. Die Gele wurden in die Laufkammern eingespannt und mit Laufpuffer nach Lämmlie (25 mM Tris/HCl, pH 8,5, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt. Nach Befüllen der Taschen im Sammelgel mit Markerproteinen (siehe Tabel 14; Unstained Protein Molecular Weight, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Kontrolle (2 μ L Rohextrakt Kolon, 20,5 μ L VE-Wasser, 7,5 μ L Probenpuffer (reduzierend)) und Proben (siehe Probenvorbereitung), wurde an das vertikal stehende Gel eine Spannung von 70 V angelegt (BioRad, PowerPac Basic, USA). Diese wurde auf 100 V erhöht sobald die Proben aus dem Sammelgel ins Trenngel eingedrungen waren. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreichte.

Protein	M _r
β -Galaktosidase	116,0 k
Bovines Serumalbumin	66,2 k
Ovalbumin	45,0 k
Laktat-Dehydrogenase	35,0 k
REase Bsp98I	25,0 k
β -Laktoglobulin	18,4 k
Lysozym	14,4 k

Tabelle 14: verwendete Markerproteine

5.4 Western-Blot-Analyse

Da Proteine im Polyacrylamid-Gel schwer zu untersuchen sind, werden sie nach ihrer Trennung auf eine Membran übertragen. Dazu wird das Gel auf eine Membran gelegt und ein elektrischen Feld angelegt. Die zur Anode wandernden Proteine sind nicht in der Lage die Membran zu penetrieren und lagern sich an ihr ab (Abb. 41 A).⁽¹⁸⁷⁾ Gel und Nitrozellulosemembran (Amersham, Protran 0,1 µm NC, GH Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England) werden zwischen puffergetränkten Filterpapiere (Sartorius Stedim, Blotting Paper, BF2, 195 g/cm²) im Semi Dry Blotter (20x20 cm, BioStep GmbH, Jahnisdorf, D) platziert. Filterpapiere und Membran wurden vor Verwendung in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 23 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,8) getränkt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befanden. Der Transfer erfolgte für 70 min bei einem Stromfluss von 0,8 mA/cm². Um die Diffusion kleiner Proteine bei späteren Arbeitsschritten zu verhindern wurde die Membran für 30 min mit Glutaraldehyd (10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4, 155 mM NaCl, 2,1 mM Glutaraldehyd) fixiert, anschließend 2x 5 min mit PBS-T (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4, 155 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) und 1x 5 min TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 155 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) gewaschen.

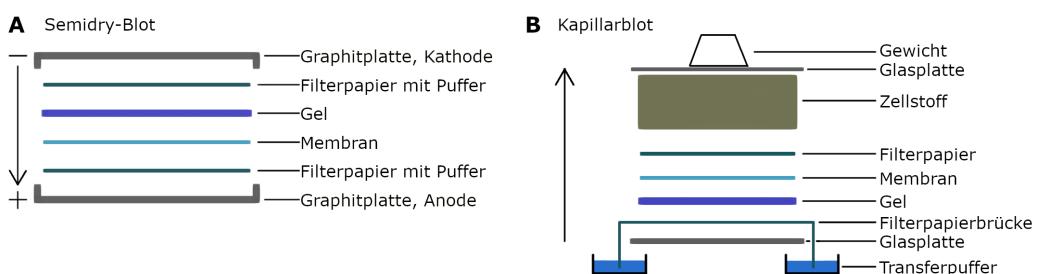


Abbildung 41: **A** Semydry-Blot, **B** Kapillarblot

5.4.1 Ponceau S Färbung

Die Membran wurde für 3-5 min mit Ponceau S Lösung (3 mM Ponceau S, 18 mM Trichloressigsäure) inkubiert und anschließend mit VE-Wasser gewaschen. Die Bänder des verwendeten Markers wurden mit einem Bleistift markiert. Proteinbanden wurden durch Scan oder Photo dokumentiert.

5.4.2 Immunologische Detektion von Proteinen

Um Proteine auf Membranen nachzuweisen, wurden Primär-Antiseren (Tabelle 9) und Lektine (Tabelle 10) verwendet, die an spezifische Proteine binden. Zur Detektion der Protein-Antikörper-Bindung wurde ein Sekundär-Antikörper verwendet, der an den Primär-Antikörper bindet. Der Sekundär-Antikörper besitzt eine Modifikation, die ihn nachweisbar macht. Dies können Chromophore, Fluorophore oder Enzyme sein. Hier wurde ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundär-Antikörper verwendet, der über *enhanced Chemiluminiscence* (ECL) nachgewiesen wurde. Nach einstündiger Blockierung (20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 0,1 % Tween 20, 1 % BSA, 1 % Trockenmilch) wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 9) inkubiert. Überschüssiger Primär-Antikörper wurde durch 3 x 5min Waschen mit TBS-T entfernt. Für 45 min wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 9) inkubiert und 2 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden durch ECL detektiert. Dazu wurden 2 Lösungen hergestellt, Lösung 1 (2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarsäure, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) und Lösung 2 (100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 0,02 % (w/v) H₂O₂). Diese wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und direkt auf die Membran gegeben. Nach 2-minütiger Inkubation wurden die licht-emittierenden Proteinbanden mit einem Gel-Imager (GeneGnome, Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, GBR bzw. ChemoStar, Intas, Göttingen, D) detektiert. Mit der dazugehörigen Analyse-software (Syngene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, GBR bzw. LabImage, Kapelan, Leipzig, D) wurden die Aufnahmen dokumentiert und semi-quantitativ ausgewertet.

5.4.3 Kompetitive Inhibition

Die kompetitive Inhibition dient zur Kontrolle der erhaltenen Signale durch die immunologische Detektion von Proteinen, hier der Signale von TFF3. Dabei wurde dem Primär-Antikörper das Peptid zugesetzt, das als Immunogen verwendet wurde. Die Primär-Antikörper binden das Immunogen, wodurch die Immunreakтивität des Membran gebundenen Proteins abgeschwächt wird oder erlischt. Dazu wurden eine Lösung aus 4 µg Immunogen je 1 µL Antikörper angesetzt. Mit dieser wurde die Membran über Nacht inkubiert. Anschließende wurde wie im Abschnitt

immunologische Detektion von Proteinen (siehe 5.4.2) weiter verfahren.

5.4.4 'Stripping' von Membranen

Um Western-Blots erneut zu verwenden, wurden zuvor gebundene Antikörper durch Reduktion mit „Stripping“ Puffer (1,6 % SDS (w/v); 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,7 % 2-Mercaptoethanol) von der Membran gewaschen. Die membran-fixierten Proteine konnten so mit weiteren Antiseren analysiert werden. Dazu wurde die Membran 1 h mit 'Stripping' Puffer bei 50°C im Trockenschrank (innicaTM, New Brunswick Scientific, Edison, USA) inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit VE-Wasser und 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Dann konnte die Membran erneut blockiert und mit neuem Primär-Antikörper inkubiert werden. Für Details siehe immunologische Detektion von Proteinen (siehe 5.4.2).

5.4.5 Nachweis mit Hilfe von Lektinen

Lektine binden spezifisch an bestimmte Zuckerstrukturen. Sie sind mit z.B. Biotin gekoppelt, das einen Nachweis möglich macht. Dabei muss auf die Fixierung mit Glutaraldehyd verzichtet werden, da diese die Lektin-Anlagerung stört. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran mittels Kapillarblot, wurde mit 2 % Gelatine-Lösung (2 % Gelatine in TBS-T) für 1 h blockiert. Das in 1 % Gelatine-Lösung (1 % Gelatine in TBS-T) gelöste Lektin (Verdünnung siehe Tabelle 10) wurde zur Inkubation für 30 min auf die Membran gegeben. Zur Beseitigung von überschüssigem Lektin wurde 2 x für 10 min mit TBS-T und 2 x für 10 min mit 1 % Gelatine gewaschen. Zur Detektion des Lektins wurde 30 min mit Streptavidin-Peroxidase (Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH) inkubiert. Abschließend wurde noch 4 x für 10 min mit TBS-T gewaschen. Der Nachweis durch ECL ist unter Kapitel 5.4.2 zu finden.

5.4.6 Silberfärbung von Proteinen

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine Proteinfärbung im Gel. Silberionen (Ag^+) lagern sich an negative geladenen Teile der im Gel befindlichen Proteine an. Nach einem Waschschritt werden die Silberionen reduziert und das ausgefallene Silber wird im Gel sichtbar. Die Färbung ist unspezifisch, aber sehr empfindlich und wurde genutzt um die Reinheit von Proben zu prüfen.⁽¹⁸⁷⁾ Nach der SDS-PAGE

wurden die Proteine im Gel für 1 h bei Raumtemperatur fixiert (Fixierlösung; 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, VE-Wasser). Anschließend wurde 2 x mit 30 % (v/v) Ethanol und 1 x mit VE-Wasser für 20 min gewaschen. Die Sensibilisierung erfolgte mit 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat Lösung. Überschüssiges Natriumthiosulfat wurde mit VE-Wasser (3 x 20 sec) entfernt und das Gel für 20 min mit Färbelösung (0,2 % (w/v) Silbernitrat, 0,02 % (v/v) Formaldehyd (37 %)) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschnitt (3 x 20 sec, VE-Wasser) wurden die Silberionen mit Entwicklungslösung (3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,0005 % (w/v) Natriumthiosulfat, 0,05 % (w/v) Formaldehyd (37 %)) gefällt. Dieser Prozess ist abhängig von der Menge an Protein im Gel und kann zwischen 5 und 15 min dauern. Beendet wurde der Entwicklungsprozess durch Inkubation mit Fixierlösung für 5 min. Die Dokumentation erfolgte mit Scanner(CanoScan8800F, Canon, JPN) und Gel-Imager (GeneGnome, Synegene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, GBR bzw. ChemoStar, Intas, Göttingen, D).

5.4.7 Färbung mit Hilfe der Periodsäure-Schiff-Reaktion

Die Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) wird zum Nachweis von Oligosacchariden verwendet. Vicinale Diole in Zuckerstrukturen werden durch Periodsäure zu Aldehyden oxidiert. Diese bilden mit Fuchsin unter schwefelsauren Bedingungen violette Komplexe. Es wurde ein Dot-Blot angefertigt. Dazu wurden auf einer Membran Punkte aus 5 µL Probenlösung in 1 cm Abständen aufgetragen. Nachdem die Proben vollständig getrocknet waren, wurde die Membran für 5 min mit VE-Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Membran 30 min in einer Lösung aus 1 % (w/v) Periodsäure, 3 % (v/v) Eisessig inkubiert. Um überschüssige Periodsäure zu reduzieren, wurde die Membran 2 x mit Natriumthiosulfat (0,1 % (w/v) Natriumthiosulfat, 1mM HCl) gewaschen. Zur Färbung wurde die Membran mit Schiff-Reagenz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) behandelt. Je nach Stärke der Färbung wurde die Behandlung nach 5-20 min beendet und erneut 2 x in Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran wurde das Ergebnis mittels Scanner (CanoScan8800F, Canon, JPN) und Gel-Imager (GeneGnome, Synegene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, GBR bzw. ChemoStar, Intas, Göttingen, D) dokumentiert.

5.4.8 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Blau-Färbung ist die Methode der Wahl um Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen und die Banden weiter zu analysieren, z.B. durch Elution und Proteomanalysen⁽¹⁸⁷⁾. Coomasse-Blau gehört zu den Triphenylmethanfarbstoffen und hat den Vorteil, unspezifisch an Proteine durch kationische und hydrophobe Wechselwirkung zu binden ohne deren Struktur zu verändern. Da die Nachweisgrenze dieser Methode je nach verwendetem Protokoll zwischen 100 ng und 1 µg liegt⁽¹⁸⁷⁾, mussten die Proben häufig konzentriert werden (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, D; mit Kühlfalle, Bachhofer, Reutlingen, D; und Vakuumpumpe, Vacuumbrand GmbH+CO KG, Wertheim, D). Dadurch steigt auch die Salzkonzentration, die sich störend auf die SDS-PAGE auswirkt. Das Salz wurde mittels Entsalzungssäulen entfernt (siehe 5.4.9). Nach SDS-PAGE (siehe 5.3) wurde das Gel 3 x 5 min mit VE-Wasser gewaschen und für 1 h in Coomassie Lösung (Bio-Safe Coomassie G250, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit VE-Wasser entfärbt, bis die Banden oder der Marker sichtbar wurden. Dokumentiert wurde die Färbung mittels Scanner (CanoScan8800F, Canon, JPN) und Gel-Imager (GeneGnome, Synegene Bioimaging, Synoptics Ltd., Cambridge, GBR bzw. ChemoStar, Intas, Göttingen, D).

5.4.9 Entsalzungssäulen

Bei Proteinanreicherungen erhöht sich oft die Salzkonzentration. Dies kann die Trennung mit elektrophoretischen Trennmethoden stören. Dasselbe gilt für die Reaktionen mit Dimedon und Maleimid gekoppeltes Polyethylenglycol (PEG). Um die Proteine von den störenden Salzen und kleinen Molekülen zu trennen wurde, diese über eine Entsalzungssäule gereinigt. Die Entsalzungen wurden mit einer PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences™, Little Chalfont, UK) durchgeführt. Zuerst wurde die Säule mit 1 SV des entsprechenden Eluent (VE Wasser oder Elutionspuffer) equilibriert. Dann wurde die Probe (max. 2,5 mL) aufgetragen und mit dem gewählten Eluenten eluiert. In 1,5 mL Eppendorfgefäß wurden 1 mL Fraktionen gesammelt und durch Westernblot-Analysen die interessierenden Fraktionen identifiziert. Diese wurden vereinigt und konzentriert.

5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Hochmolekulare Proteine wurden in 1 %, horizontalen Agarosegelen getrennt (187, 188). Dazu wurde 0,8 g Agarose (peqGOLD MegaBase Agarose, peqlab, Erlangen, D) in 80 mL Laufpuffer (40 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS) in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg,D) aufgekocht und gelöst. Die Lösung wurde unter leichtem Schütteln (Taumelschüttler, Heidolph, Polymax 1040, Roth, DE) abgekühlt und handwarm in eine Gelkammer (WIDE MINI-SUB-CELL GT, BioRAD) gegossen. Nach vollständigem Erkalten des Gels wurde die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und die Proben (3:1 Probe:Puffer; 40 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) aufgetragen. In die erste Tasche des Gels wurden 15 μ L eines DNA Markers (Gene Ruler 1 kB Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA) gegeben. Die nächste Tasche wurde frei gelassen, dann folgten die Proben. Die Elektrophorese wurde für 90 bis 120 min bei 40 V durchgeführt. Nach Entnahme des Agarosegels wurde der DNA-Marker abgeschnitten und Proteine mittels Kapillar-Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Kapillar-Blot Das Agarosegel wurde auf die Nitrozellulosemembran gelegt und die Taschen, das Gel-Ende und die Lauffront des Bromphenolblau auf der Membran markiert. Dadurch konnte mittels digitaler Bearbeitung der DNA Marker wieder angepasst werden. Membran und Aragosegel wurden zwischen Filterpapier gelegt (Abb. 41 B). Dazu wurden zwei Schalen mit Transferpuffer (0,6 M NaCl, 0,06 M Tri-Natriumcitrat) gefüllt und so positioniert, dass mittels einer Glasplatte eine Brücke gebildete werden konnte. Auf die Glasplatte wurde eine Filterpapierstreifen gelegt, so dass er mit beiden Enden in den Tansferpuffer tauchte. Anschließend wurde auf den Filterpapierstreifen das Gel, die Membran und ein Stapel saugfähiges Papier (ZickZack, Handtücher weiß, 24 x 23 cm) platziert. Das Papier wurde noch mit einer weiteren Glasplatte und einer 2 L Schott-Flasche beschwert. Nach 24 h konnte der Blot angebaut und die Membran analysiert werden.⁽¹⁸⁷⁾

Größenstandard Agarose-Gel Der Gelstreifen mit dem DNA-Marker wurde 10 min in bidest. Wasser gewaschen und 30 min in Färbelösung (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10000x, Biotium, Fremont, USA) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20

mM Eisessig, 0,4 mM EDTA)) inkubiert. Der Gelstreifen wurde über Nacht in einem 50 mL Falcon (Plastikreagenzglas mit Schraubverschluss) im Kühlschrank gelagert und die fluoreszierenden Marker-Banden am nächsten Tag im Fluoreszenz Imager (ChemoStar, Intas, Göttingen,D) detektiert. Das Ergebnis wurde digital in den Blot eingefügt.

5.5.1 Vergleich Größenstandard auf Agarose-Gel

Um große Proteine wie Muzine oder FCGBP zu trennen eignen sich Agarosegele sehr gut. Leider gibt es in diesem Größenbereich keine Protein-Marker. Daher wurde ein DNA-Marker als relativer Standard verwendet. Zum Vergleich von DNA Marker mit Protein-Marker wurden 3 *Prestained* Marker im Bereich von 300 - 4,6 KDa verwendet (ProSieve QuadColor Protein Marker, Biozym, Hessisch Oldendorf, D; Spectra mehrfarbige Proteinleiter, Thermo Scientific, Waltham, USA; PageRule Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Waltham, USA). Der DNA-Marker wurde digital an das Bild des Blot mit den Markern angeglichen, als Referenz dienten der Start (Taschen im Gel) und das Gelende. Auf dem Blot wurden die Protein-Marker-Banden mit Bleistift markiert. Da diese keine klaren Banden zeigen, wurden die Grenzen zwischen den Farben markiert (Abb. 14,C). Ist einer Farbe eine einzelne Molmasse zuzuordnen, wurde die Mitte dieser Bande zur RF-Wert Bestimmung herangezogen. Sind einem Farbbereich mehrere Molmassen zugehörig, wurde der höhere Wert am oberen Rand und niedriger Wert am unteren Rand abgetragen. Die genauen Messpunkte sind in Abbildung 14,B markiert. Aus dem zusammengefügten Bild (Abb. 14,A+B) wurden mittels LabImage die RF-Werte bestimmt. Als Lauffront wurde die kleinste Protein-Marker-Bande verwendet, da diese weiter gelaufen ist als das Bromphenolblau (BPB). Die RF-Wert wurden gegen den Logarithmus des Molgewichts aufgetragen (Abb. 14 F).

5.6 Native Gelelektrophorese (Blue Native), 2D Gelelektrophorese

Die Native Gelelektrophorese wurde mit dem SERVAGel™ N Native Gel Starter Kit (Kat.-Nr. 43204.01) durchgeführt und, soweit nicht weiter angegeben, nach Herstelleranleitung verwendet. Als Probe wurde ein Rohextrakt (K-620, E0)

verwendet und davon je 10, 15, 20, 25 μ L aufgetragen. Die Laufzeit betrug 10 min bei 50 V und wurde dann auf 200 V für 90 min erhöht. Dem Anodenpuffer wurde Coomassie Blue beigemischt (siehe Herstellerangaben). Das Gel wurde ohne Entfärbung per Scanner dokumentiert und für die 2D Gel-Elektrophorese und Proteindetektion weiter verwendet. Das Gel wurde in feuchtem Milieu im Kühlschrank gelagert.

2D Gel-Elektrophorese Aus dem Blue Native Gel wurden die Trennspuren ausgeschnitten und in reduzierendem Probenpuffer (2x RPP, 0,250 M Tris/HCl, pH 6,8, 10,5 M Glycerin, 10 % (5,5 M) 2-Mercaptoethanol, 1 Spatelspitze Bromphenolblau, 2 % SDS) für 20 s in der Mikrowelle (MICROMAT Typ EEH8733, AEG-Electrolux, Nürnberg, D) erhitzt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurde der abgekühlte Probenpuffer entfernt und der Gel-Streifen 3 x für 2 min mit VE-Wasser gewaschen. Der reduzierte Gel-Streifen wurde auf ein 15 % SDS-PAGE aufgelegt und lief als SDS-PAGE (siehe 5.3, Durchführung) ⁽¹⁸⁷⁾. Die Elektrophorese wurde beendet als das Bromphenolblau der mitlaufenden Markerproteine das untere Ende des Gels erreichte (ca. 2h). Das Gel wurde inklusive reduziertem Gel-Streifen per Semi Dry Blot (siehe 5.4) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

5.7 Verdau mit verschiedenen Glycosidasen

O-Glycosidase Für die Spaltung von O-gebundenen Zuckern wurden 21 μ L Probe mit 6 μ L Puffer (250 mM Na₃PO₄, pH 5) und 3 μ L O-Glycosidase (AdvantecBio O-Glycanase, ProZyme, GK80090, 12 Einheiten/mL) gemischt und ca. 3 Tage bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Acetonfällung gestoppt. Dazu wurden 100 μ L -20°C kaltes Aceton zum Ansatz gegeben und für 1 h bei -20°C im Gefrierschrank inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (23000 x g, 15 min, 4°C) wurde das Aceton abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet im Ultraschallbad in Elutionspuffer gelöst und nach Auftrennung über ein Agarosegel analysiert.

N-Glycosidase In einem 1 ml Eppendorfgefäß wurden 20 μ L Probe mit 100 μ L VE-Wasser, 15 μ L Puffer (0,5 M Na₂HPO₄, pH 7) und 20 μ L N-Glycosidase (Roche, rekombinant aus *E.Coli*, 1 Einheit/ μ L) gemischt und ca. 3 Tage bei 37°C

inkubiert. Anschließend die Reaktion durch Acetonfällung abgebrochen (siehe *O*-Glycosidase).

5.8 Nachwies von Thiolen

Zum Nachweis von freien Thiolen wird Maleimid (1H-Pyrrol-2,5-dion) eingesetzt⁽¹⁸⁷⁾. Dieses wird nukleophil von Thiolen angegriffen und bildet eine kovalente Bindung aus. Hierzu wurde an Polyethylenglycol gekoppeltes Maleimid verwendet. Durch die zusätzliche Masse (PEG, $M_n=5000$ g/mol, $M_n=20000$ g/mol) kann eine Verschiebung der Proteinbande in der SDS-PAGE besser beobachtet werden.

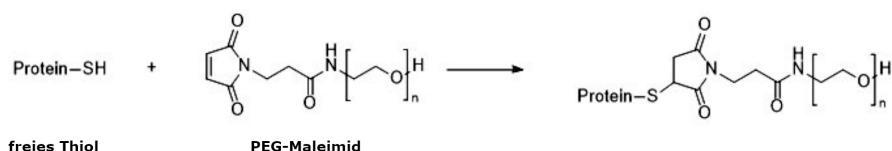


Abbildung 42: Nachweis von Thiolen mit PEG-Maleimid

Es wurde eine 1 mM Stammlösung aus PEG-Maleimid (CAS-NR: 99126-64-4, $M_n=5$ k; JKA3115, $M_n=20$ k, Sigma-Aldrich, USA) in Dimethylsulfoxid hergestellt. Ein Gemisch (0,75 mM PEG-Maleimid) aus Probe und Stammlösung reagierte über Nacht bei 4°C. Die Reaktion wurde durch Acetonfällung gestoppt (siehe 5.7). Das Pellet wurde in selben Volumen der eingesetzten Probe mit EP gelöst und entsalzt (siehe 5.4.9). Das Ergebnis wurde nach SDS-PAGE und Western Blot mit Antikörpern analysiert.

5.9 Nachweis von Sulfensäuren

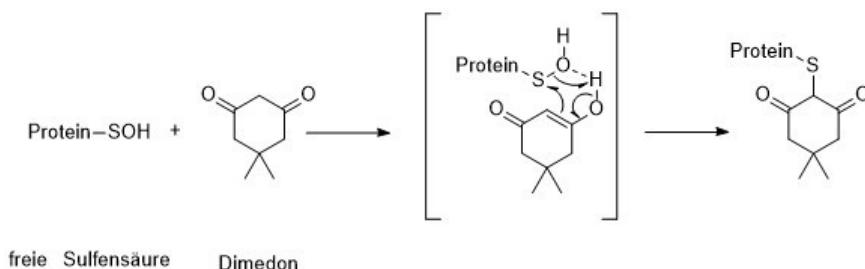


Abbildung 43: Nachweis von Sulfensäuren mit Dimedon

Dimedon (5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion) reagiert selektiv mit Sulfensäuren und wurde als Nachweis dieser verwendet⁽¹⁸⁹⁾. Es wurde normales und Biotin gekoppeltes Dimedon (DCP-Bio1, Kerafast, Newark, USA) verwendet. Die TFF3-haltigen Proben wurden mit gelöstem Dimedon versetzt, so dass eine Zielkonzentration von 1 mM Dimedon eingestellt wurde. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 6°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz gekocht und per SDS-PAGE, Western Blot und Antikörper analysiert.

5.10 Bindungsstudien mit ^{125}I -TFF3

Versuche mit radioaktivem Material wurde ausschließlich von Herrn Stürmer durchgeführt. Um eine lektin-artige Bindung von TFF3 an FCGBP zu prüfen, wurde TFF3 mit ^{125}I radioaktiv markiert. Bindet das radioaktiv markierte TFF3 an ein Protein auf dem Blot (Overlay Assay) oder in der flüssigen Probe (Misch-experiment), kann es durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Die Autoradiographie ist eine der empfindlichsten Nachweismethoden für elektrophoretisch getrennte Proteine⁽¹⁸⁷⁾.

Iodierung mit Iodogen Iodogen ist in der Lage ^{125}I auf Tyrosin und Histidin zu übertragen⁽¹⁹⁰⁾. Dies wird genutzt um Proteine radioaktiv zu markieren. Eine iodogenhaltigen Lösung (20 μL ; 0,46 mM/L Iodogen in Dichlormethan, Sigma-Aldrich, USA) wurde in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß pipettiert. Im Eisbad verdampft das Dichlormethan und es bildet sich ein Film aus Iodogen auf der Wand des Eppendorfgefäßes. Zum immobilisierten Iodogen wurden 6 μL einer rekTFF3 Lösung (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ TFF3 in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4) und 5 μL einer Natriumiodid Lösung (Na^{125}I , 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$; 2000 Ci/mmol, Hartmann Analytic, Braunschweig, D) gegeben. Das Gemisch wurde 20 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein unbeschichtetes Eppendorfgefäß überführt und weitere 40 min im Eisbad inkubiert. 11 μL des Iodierungsansatz wurden mit 50 μL Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4, 0,1 % Natriumazid) gemischt und säulenchromatografisch (Bio-Spin 6-Säule, Bio-Rad, 732-6227; Material: 800 μl Bio-Gel P-6) getrennt. Es wurden 30 Fraktionen zu je 50 μL gesammelt und mit einem Hidex-Counter (Software MikroWin 300 SL) vermessen. Dazu wurden 10 μL Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint®eco plus, LSC-Universalcocktail, Roth, D) mit 2 μL Fraktion gemischt. Die ^{125}I -TFF3 positiven Fraktionen wurden gesammelt

und in einem Bleigefäß bei 4°C gelagert.

Overlay Assay mit ^{125}I -TFF3 Um die Bindung von TFF3 an FCGBP zu untersuchen, wurden FCGBP-haltige Fraktionen nach Agarose-Gelelektrophorese und Kapillarblot mit ^{125}I markiertem TFF3 inkubiert (191). Eine Protein-beschichtete Nitrozellulosemembran (Agarose Gelelektrophorese 5,5 und Kapillarblot 5,5) wurde für eine Stunde blockiert (20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 0,1 % Tween 20, 1 % BSA, 1 % Trockenmilch), 3 mal 5 min mit TBS-T (20 mM Tris/HCl, pH 7,2, 155 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) gewaschen und 4 h mit ^{125}I -TFF3 (ca. 10000 cpm/10 mL, ca. 5 pg/ μL , 20 mM Tris/HCl, pH 7,0; 0,5 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂) inkubiert (191). Der pH-Wert wurde variiert. Im Anschluss wurde die Membran 3 mal 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde getrocknet und ein Film (Carestream® Kodak® BioMax® MS Film, Sigma-Aldrich, USA) auflegt. Membran und Film wurden je nach Signalstärke in einer lichtundurchlässigen Kassette exposizioniert. Die Expositionszeit konnte zwischen 4 h und 1 Woche betragen. Die Filme wurden ausschließlich in einer Dunkelkammer bearbeitet. Nach Abschluss der Exposition, wurde der Film eine Minute entwickelt (Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer, Sigma-Aldrich, U.S.A), mit VE-Wasser gewaschen und für eine Minute fixiert (Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer, Sigma-Aldrich, U.S.A). Zum Abschluss wurde der Film mit VE-Wasser gewaschen, getrocknet und mittels Scanner (CanoScan8800F, Canon, JPN) dokumentiert.

Mischexperimente Zur Testung einer Lektinbindug zwischen TFF3 und FCGBP wurde ^{125}I -markiertes TFF3 mit 22,5 μL FCGBP-haltigen Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (191). Anschließend wurden die Proteine durch SDS-PAGE (5.3) getrennt und durch Western Blot (5.4) auf Nitrozellulosemembran übertragen. Das ^{125}I wurde durch Autoradiographie detektiert (siehe Overlay Assay).

6 Anhang

Probe	Gewebe	Extraktion	HM TFF3 [%]	NM TFF3 [%]
K-1	K-583	E0	86	15
K-2.1	K-599	E0	68	32
K-2.2	K-599	E1	38	62
K-3	K-601	Extrakt, 1% Mercapto, 5 min, 100°C	0	100
K-4.1	K-620	Precyldes Extr.	34	66
K-4.2	K-620	E0	75	25
K-4.3	K-620	E1	50	50
K-4.4	K-620	E0 +1% SDS, 15 mM EDTA, 5 min, 100°C	75	25
K-4.5	K-620	TRIzol Extr.	28	72
K-5.1	K-626	TRIzol Extr.	80	20
K-5.2	K-626	Precycles Extr.	42	58
K-6.1	K-670	E0	76	24
K-6.2	K-670	E1	91	9
K-7.1	K-674	E0	70	30
K-7.2	K-674	TRIzol Extr.	29	71
K-7.3	K-674	TRIzol Extr.	40	60
K-7.4	K-674	TRIzol Extr.	26	74
K-7.5	K-674	TRIzol Extr.	50	50
K-8	K-675	TRIzol Extr.	25	75
K-9.1	K-675	TRIzol Extr.	50	50
K-9.2	K-675	E0	32	68
K-9.3	K-675	E1	61	39
K-10.1	K-695	E0	9	91
K-10.2	K-695	E1	72	28
K-11	K-555	Precyldes	15	85
K-11 Tu	K-555 Tumor	Precyldes	26	74
K-12	K-578	Precyldes	45	55
K-12 Tu	K-578 Tumor	Precyldes	21	79
K-13	K-580	Precyldes	39	61
K-13 Tu	K-580 Tumor	Precyldes	20	80
D-14	D-680	Rohextrakt	-	-
K-14	K-680	Rohextrakt	-	-
K-15	K-677	Rohextrakt	-	-

Tabelle 15: Relative TFF3-Verteilung im Kolon; die unterschiedlichen Probennummern sind auf unterschiedliche Zeitpunkte der Aufreinigungen oder der Durchführung mehrerer Läufe zurückzuführen.

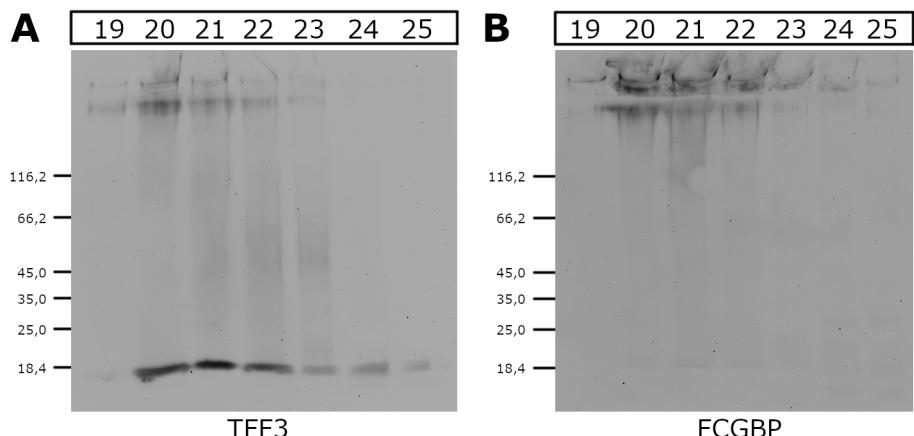


Abbildung 44: Hochmolekulare Fraktionen von gewaschenem Kolongewebe (E0) nach SEC wurden im nicht-reduzierenden 7% SDS-PAGE getrennt und nach Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen TFF3 (**A**) bzw. FCGBP (**B**) analysiert.

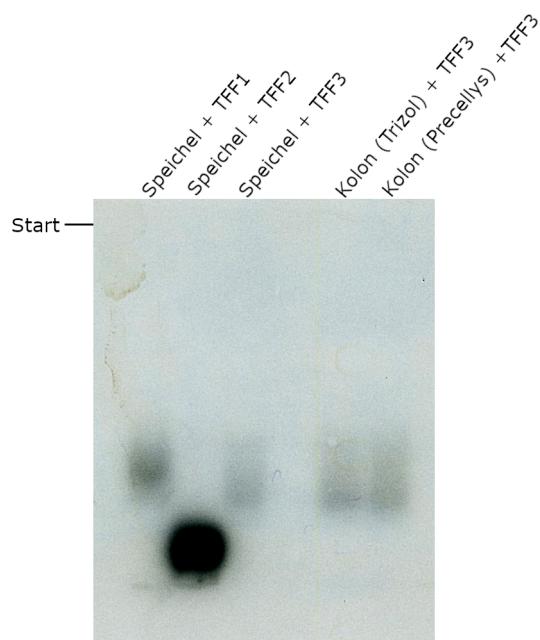


Abbildung 45: Mischexperiment mit ^{125}I -TFFs; Hochmolekulare Fraktionen nach SEC von humanem Speichel und humanem Koton wurden mit ^{125}I markierten TFFs inkubiert. Die Gemische wurde per nicht-reduzierender 15 % SDS-PAGE getrennt. Nach anschließendem Western-Blot wurden die radioaktiven TFFs mittels Autoradiographie auf einem Film nachgewiesen.

Literatur

- (1) Doherty, M. M. und Charman, W. N. (2002). The Mucosa of the Small Intestine. *Clin. Pharmacokinet.* *41*, 235–253.
- (2) Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R. und Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv. Immunol.* *121*, 91–119.
- (3) Kuehnel, W., *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*; Georg Thieme Verlag: 2002.
- (4) Johansson, M. E. V. und Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 639–649.
- (5) Bevins, C. L. (2006). Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 263–6.
- (6) Kim, Y. S. und Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* *12*, 319–30.
- (7) Leedham, S. J., Brittan, M., McDonald, S. A. C. und Wright, N. A. (2005). Intestinal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* *9*, 11–24.
- (8) Karam, S. M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci.* *4*, 286–98.
- (9) Krause, W. J. (2000). Brunner's Glands: A Structural,Histochemical and Pathological Profile. *Prog. Histochem. Cytochem.* *35*, 255–367.
- (10) Squier, C. A. und Kremer, M. J. (2001). Biology of oral mucosa and esophagus. *JNCI Monographs.*, 7–15.
- (11) Dodds, M. W. J., Johnson, D. A. und Yeh, C.-K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *J. Dent.* *33*, 223–233.
- (12) Almeida, P., Grégio, A., Machado, M., Lima, A. und Azevedo, L. (2008). Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J. Contemp. Dent. Pract.* *9*, 72–80.
- (13) Brand, H. S., Ligtenberg, A. J. M. und Veerman, E. C. I. (2014). Saliva and wound healing. *Monogr. Oral Sci.* *24*, 52–60.
- (14) Schittny, J. C. und Burri, P. H., *Anatomie des Respirationstraktes*; Springer: 1999, S. 17–28.

- (15) Behrend, S. J., Giotopoulou, G. A., Spella, M. und Stathopoulos, G. T. (2021). A role for club cells in smoking-associated lung adenocarcinoma. *Eur. Respir. Rev.* 30.
- (16) Wang, Y., Tang, Z., Huang, H., Li, J., Wang, Z., Yu, Y., Zhang, C., Li, J., Dai, H., Wang, F., Cai, T. und Tang, N. (2018). Pulmonary alveolar type I cell population consists of two distinct subtypes that differ in cell fate. *PNAS* 115, 2407–2412.
- (17) Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *BBA - Mol. Basis Dis.* 1408, 79–89.
- (18) McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P. und Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 265–278.
- (19) Bansil, R. und Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11, 164–170.
- (20) Ermund, A., Schütte, A., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K. und Hansson, G. C. (2013). Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, 341–347.
- (21) Meyer-Hoffert, U., Hornef, M. W., Henriques-Normark, B., Axelsson, L.-G., Midtvedt, T., Pütsep, K. und Andersson, M. (2008). Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 57, 764–71.
- (22) Wallaeys, C., Garcia-Gonzalez, N. und Libert, C. (2023). Paneth cells as the cornerstones of intestinal and organismal health: a primer. *EMBO Mol. Med.* 15, 16427.
- (23) van der Waaij, L. A., Harmsen, H. J. M., Madjipour, M., Kroese, F. G. M., Zwiers, M., van Dullemen, H. M., de Boer, N. K., Welling, G. W. und Jansen, P. L. M. (2005). Bacterial Population Analysis of Human Colon and Terminal Ileum Biopsies with 16S rRNA-based Fluorescent Probes: Commensal Bacteria Live in Suspension and Have No Direct Contact with Epithelial Cells. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11, 865–871.
- (24) Nyström, E. E. L., Birchenough, G. M. H., van der Post, S., Arike, L., Gruber, A. D., Hansson, G. C. und Johansson, M. E. V. (2018).

- Calcium-activated Chloride Channel Regulator 1 (CLCA1) Controls Mucus Expansion in Colon by Proteolytic Activity. *EBioMedicine* **33**, 134–143.
- (25) Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L. und Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *PNAS* **105**, 15064–9.
- (26) Shanahan, F., Ghosh, T. S. und O'Toole, P. W. (2021). The Healthy Microbiome—What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterol.* **160**, 483–494.
- (27) Martel, J., Chang, S.-H., Ko, Y.-F., Hwang, T.-L., Young, J. D. und Ojcius, D. M. (2022). Gut barrier disruption and chronic disease. *TEM* **33**, 247–265.
- (28) de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M. und Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut* **71**, 1020–1032.
- (29) Thornton, D. J., Rousseau, K. und McGuckin, M. A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 459–86.
- (30) Bonser, L. R. und Erle, D. J. (2017). Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *J. Clin. Med.* **6**.
- (31) Derrien, M., van Passel, M. W., van de Bovenkamp, J. H., Schipper, R. G., de Vos, W. M. und Dekker, J. (2010). Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *GM* **1**, 254–268.
- (32) Hattrup, C. L. und Gendler, S. J. (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* **70**, 431–57.
- (33) Andrianifahanana, M., Moniaux, N. und Batra, S. K. (2006). Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *BBA* **1765**, 189–222.
- (34) Paone, P. und Cani, P. D. (2020). Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* **69**, 2232–2243.
- (35) Ambort, D., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Nilsson, H. E., Ermund, A., Johansson, B. R., Koeck, P. J. B., Hebert, H. und Hansson, G. C. (2012). Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *PNAS* **109**, 5645–5650.
- (36) Ligtenberg, A. J. M., Veerman, E. C. I., Nieuw Amerongen, A. V. und Mollenhauer, J. (2007). Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a

- single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. *Biol. Chem.* 388, 1275–89.
- (37) Agnel, M., Vermat, T. und Culouscou, J.-M. (1999). Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea11hCaCC-1, hCaCC-2 and hCaCC-3 sequences were deposited in GenBank database under accession numbers: AF127035; AF127036 and AF127980 respectively. *FEBS Lett.* 455, 295–301.
- (38) Ermund, A., Meiss, L. N., Rodriguez-Pineiro, A. M., Bähr, A., Nilsson, H. E., Trillo-Muyo, S., Ridley, C., Thornton, D. J., Wine, J. J., Hebert, H., Klymiuk, N. und Hansson, G. C. (2017). The normal trachea is cleaned by MUC5B mucin bundles from the submucosal glands coated with the MUC5AC mucin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 492, 331–337.
- (39) Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A. und Chambon, P. (1982). Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids. Res.* 10, 7895–903.
- (40) Jørgensen, K. H., Thim, L. und Jacobsen, H. E. (1982). Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul. Pept.* 3, 207–19.
- (41) Suemori, S., Lynch-Devaney, K. und Podolsky, D. K. (1991). Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *PNAS* 88, 11017–11021.
- (42) 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 letters* 250, 85–90.
- (43) Lemercinier, X., Muskett, F. W., Cheeseman, B., McIntosh, P. B., Thim, L. und Carr, M. D. (2001). High-resolution solution structure of human intestinal trefoil factor and functional insights from detailed structural comparisons with the other members of the trefoil family of mammalian cell motility factors. *Biochem.* 40, 9552–9.

- (44) Wong., W. M., Poulsom, R. und Wright, N. A. (1999). Trefoil peptides. *Gut* 44, 890.
- (45) Albert, T. K., Laubinger, W., Müller, S., Hanisch, F.-G., Kalinski, T., Meyer, F. und 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, 3108–17.
- (46) Heuer, J., Heuer, F., Stürmer, R., Harder, S., Schlüter, H., Braga Emidio, N., Muttenthaler, M., Jechorek, D., Meyer, F. und Hoffmann, W. (2020). The Tumor Suppressor TFF1 Occurs in Different Forms and Interacts with Multiple Partners in the Human Gastric Mucus Barrier: Indications for Diverse Protective Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 21.
- (47) Hauser, F. und Hoffmann, W. (1991). xP1 and xP4. P-domain peptides expressed in Xenopus laevis stomach mucosa. *J. Biol. Chem.* 266, 21306–9.
- (48) Thim, L. (1997). Trefoil peptides: from structure to function. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 888–903.
- (49) Gött, P., Beck, S., Machado, J. C., Carneiro, F., Schmitt, H. und Blin, N. (1996). Human Trefoil Peptides: Genomic Structure in 21q22.3 and Coordinated Expression. *Eur. J. Hum. Genet.* 4, 308–315.
- (50) Madsen, J., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L. und Holmskov, U. (2007). Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 505–13.
- (51) Jagla, W., Wiede, A., Hinz, M., Dietzmann, K., Göllicher, D., Gerlach, K. L. und Hoffmann, W. (1999). Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell. Tissue Res.* 298, 161–6.
- (52) Wiede, A., Hinz, M., Canzler, E., Franke, K., Quednow, C. und Hoffmann, W. (2001). Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res.* 303, 109–15.
- (53) Hoffmann, W. (2021). Trefoil Factor Family (TFF) Peptides and Their Links to Inflammation: A Re-evaluation and New Medical Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 22.
- (54) Krüger, K., Schmid, S., Paulsen, F., Ignatius, A., Klinger, P., Hotfiel, T., Swoboda, B. und Gelse, K. (2019). Trefoil Factor 3 (TFF3) Is Involved in Cell Migration for Skeletal Repair. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

- (55) Probst, J. C., Zetzsche, T., Weber, M., Theilemann, P., Skutella, T., Landgraf, R. und Jirikowski, G. F. (1996). Human intestinal trefoil factor is expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for a novel neuropeptide. *FASEB J.* *10*, 1518–23.
- (56) Bernstein, H.-G., Dobrowolny, H., Trübner, K., Steiner, J., Bogerts, B. und Hoffmann, W. (2015). Differential regional and cellular distribution of TFF3 peptide in the human brain. *J. Amino Acids* *47*, 1053–63.
- (57) Langer, G., Jagla, W., Behrens-Baumann, W., Walter, S. und Hoffmann, W. (1999). Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *IVOS* *40*, 2220–4.
- (58) Paulsen, F. P., Hinz, M., Schaudig, U., Thale, A. B. und Hoffmann, W. (2002). TFF peptides in the human efferent tear ducts. *IOVS* *43*, 3359–64.
- (59) Kouznetsova, I., Peitz, U., Vieth, M., Meyer, F., Vestergaard, E. M., Malfertheiner, P., Roessner, A., Lippert, H. und Hoffmann, W. (2004). A gradient of TFF3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa. *Cell and tissue research* *316*, 155–65.
- (60) Wiede, A., Jagla, W., Welte, T., Köhnlein, T., Busk, H. und Hoffmann, W. (1999). Localization of TFF3, a new mucus-associated peptide of the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* *159*, 1330–5.
- (61) Barrera, G. J. und Tortolero, G. S. (2016). Trefoil factor 3 (TFF3) from human breast milk activates PAR-2 receptors, of the intestinal epithelial cells HT-29, regulating cytokines and defensins. *Bratisl. Lek. List* *117*, 332–9.
- (62) Rinnert, M., Hinz, M., Buhtz, P., Reiher, F., Lessel, W. und 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*, 639–47.
- (63) Mashimo, H., Wu, D. C., Podolsky, D. K. und Fishman, M. C. (1996). Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Sci.* *274*, 262–5.
- (64) Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. und Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol.* *104*, 15251–152514.

- (65) Taupin, D. und Podolsky, D. K. (2003). Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. 4*, 721–732.
- (66) Hoffmann, W. (2021). Trefoil Factor Family (TFF) Peptides. *Ency. 1*, 974–987.
- (67) Gajhede, M., Petersen, T. N., Henriksen, A., Petersen, J. F., Dauter, Z., Wilson, K. S. und Thim, L. (1993). Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides. *Struct. 1*, 253–262.
- (68) Hoffmann, W. (2015). TFF2, a MUC6-binding lectin stabilizing the gastric mucus barrier and more (Review). *Int. J. Oncol. 47*, 806–816.
- (69) Thim, L., Madsen, F. und Poulsen, S. S. (2002). Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur. J. Clin. Invest. 32*, 519–527.
- (70) Järvå, M. A., Lingford, J. P., John, A., Soler, N. M., Scott, N. E. und Goddard-Borger, E. D. (2020). Trefoil factors share a lectin activity that defines their role in mucus. *Nat. Comm. 11*, 2265.
- (71) Popp, J., Schicht, M., Garreis, F., Klinger, P., Gelse, K., Sesselmann, S., Tsokos, M., Etzold, S., Stiller, D., Claassen, H. und Paulsen, F. (2019). Human Synovia Contains Trefoil Factor Family (TFF) Peptides 1-3 Although Synovial Membrane Only Produces TFF3: Implications in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci. 20*.
- (72) Silen, W. und Ito, S. (1985). Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. *Annu. Rev. Physiol. 47*, 217–29.
- (73) Dongre, A. und Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 20*, 69–84.
- (74) Fenteany, G., Janmey, P. A. und Stossel, T. P. (2000). Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Curr. Biol. 10*, 831–8.
- (75) Liu, C. Y., Polk, D. B., Frey, M. R. und Said, H. M. in *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition)*; Acad. Press: 2018, S. 683–708.
- (76) Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L. und Podolsky, D. K. (1994). Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J. Clin. Invest. 94*, 376–83.

- (77) Hoffmann, W. (2005). TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 2932–8.
- (78) Meyer zum Büschchenfelde, D., Hoschützky, H., Tauber, R. und Huber, O. (2004). Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex. *Pept.* *25*, 873–83.
- (79) Dieckow, J., Brandt, W., Hattermann, K., Schob, S., Schulze, U., Mentlein, R., Ackermann, P., Sel, S. und Paulsen, F. P. (2016). CXCR4 and CXCR7 Mediate TFF3-Induced Cell Migration Independently From the ERK1/2 Signaling Pathway. *IOVS* *57*, 56–65.
- (80) Uchino, H., Kataoka, H., Itoh, H., Hamasuna, R. und Koono, M. (2000). Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterol.* *118*, 60–9.
- (81) Kinoshita, K., Taupin, D. R., Itoh, H. und Podolsky, D. K. (2000). Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4680–90.
- (82) Chen, Y. H., Lu, Y., De Plaen, I. G., Wang, L. Y. und Tan, X. D. (2000). Transcription factor NF-kappaB signals antianoxic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *274*, 576–82.
- (83) Taupin, D. R., Kinoshita, K. und Podolsky, D. K. (2000). Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *PNAS* *97*, 799–804.
- (84) Emami, S., Le Floch, N., Bruyneel, E., Thim, L., May, F., Westley, B., Rio, M., Mareel, M. und Gespach, C. (2001). Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J.* *15*, 351–61.
- (85) Chan, V. Y. W., Chan, M. W. Y., Leung, W.-K., Leung, P.-S., Sung, J. J. Y. und Chan, F. K. L. (2005). Intestinal trefoil factor promotes invasion in non-tumorigenic Rat-2 fibroblast cell. *Reg. Pept.* *127*, 87–94.
- (86) Cook, G. A., Familiari, M., Thim, L. und Giraud, A. S. (1999). The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett.* *456*, 155–9.

- (87) Liu, D., el-Hariry, I., Karayannakis, A. J., Wilding, J., Chinery, R., Kmiot, W., McCrea, P. D., Gullick, W. J. und Pignatelli, M. (1997). Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Lab Invest.* 77, 557–63.
- (88) Chinery, R. und Playford, R. J. (1995). Combined intestinal trefoil factor and epidermal growth factor is prophylactic against indomethacin-induced gastric damage in the rat. *Clin. Sci.* 88, 401–3.
- (89) Göke, M. N., Cook, J. R., Kunert, K. S., Fini, M. E., Gipson, I. K. und Podolsky, D. K. (2001). Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 264, 337–44.
- (90) Oertel, M., Graness, A., Thim, L., Bühlung, F., Kalbacher, H. und Hoffmann, W. (2001). Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 418–24.
- (91) Storesund, T., Hayashi, K., Kolltveit, K. M., Bryne, M. und Schenck, K. (2008). Salivary trefoil factor 3 enhances migration of oral keratinocytes. *Eur. J. Oral Sci.* 116, 135–40.
- (92) Rodrigues, S., Van Aken, E., Van Bocxlaer, S., Attoub, S., Nguyen, Q.-D., Bruyneel, E., Westley, B. R., May, F. E. B., Thim, L., Mareel, M., Gespach, C. und Emami, S. (2003). Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J.* 17, 7–16.
- (93) Tan, X. D., Liu, Q. P., Hsueh, W., Chen, Y. H., Chang, H. und Gonzalez-Crussi, F. (1999). Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelial cells and induces nitric oxide production: priming and enhancing effects of mucin. *Biochem. J.* 338, 745–51.
- (94) Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Lynch-Devaney, K. und Podolsky, D. K. (1995). Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterol.* 109, 516–23.
- (95) Kjellev, S., Nexø, E., Thim, L. und Poulsen, S. S. (2006). Systemically administered trefoil factors are secreted into the gastric lumen and increase the viscosity of gastric contents. *Br. J. Pharmacol.* 149, 92–9.

- (96) Meyer zum Büschchenfelde, D., Tauber, R. und Huber, O. (2006). TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Pept.* 27, 3383–90.
- (97) Kjellev, S., Thim, L., Pyke, C. und Poulsen, S. S. (2007). Cellular localization, binding sites, and pharmacologic effects of TFF3 in experimental colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1050–9.
- (98) Beck, P. L., Wong, J. F., Li, Y., Swaminathan, S., Xavier, R. J., Devaney, K. L. und Podolsky, D. K. (2004). Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* 126, 796–808.
- (99) Poulsen, S. S., Kissow, H., Hare, K., Hartmann, B. und Thim, L. (2005). Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Reg. Pept.* 126, 163–71.
- (100) Zhang, B.-H., Yu, H.-G., Sheng, Z.-X., Luo, H.-S. und Yu, J.-P. (2003). The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regul. Pept.* 116, 53–60.
- (101) Belle, N. M., Ji, Y., Herbine, K., Wei, Y., Park, J., Zullo, K., Hung, L.-Y., Srivatsa, S., Young, T., Oniskey, T., Pastore, C., Nieves, W., Somsouk, M. und Herbert, D. R. (2019). TFF3 interacts with LINGO2 to regulate EGFR activation for protection against colitis and gastrointestinal helminths. *Nat. Comm.* 10, 4408.
- (102) Inoue, H., Lin, L., Lee, X., Shao, Z., Mendes, S., Snodgrass-Belt, P., Sweigard, H., Engber, T., Pepinsky, B., Yang, L., Beal, M. F., Mi, S. und Isaacson, O. (2007). Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *PNAS* 104, 14430–5.
- (103) Sabbah, D. A., Hajjo, R. und Sweidan, K. (2020). Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 20, 815–834.
- (104) Barrera, G. J., Sanchez, G. und Gonzalez, J. E. (2012). Trefoil factor 3 isolated from human breast milk downregulates cytokines (IL8 and

- IL6) and promotes human beta defensin (hBD2 and hBD4) expression in intestinal epithelial cells HT-29. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 12, 256–64.
- (105) Teng, X., Xu, L.-F., Zhou, P., Sun, H.-W. und Sun, M. (2009). Effects of trefoil peptide 3 on expression of TNF-alpha, TLR4, and NF-kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis mice. *Inflamm.* 32, 120–9.
- (106) Braga Emidio, N., Meli, R., Tran, H. N. T., Baik, H., Morisset-Lopez, S., Elliott, A. G., Blaskovich, M. A. T., Spiller, S., Beck-Sickinger, A. G., Schroeder, C. I. und Muttenthaler, M. (2021). Chemical Synthesis of TFF3 Reveals Novel Mechanistic Insights and a Gut-Stable Metabolite. *J. Med. Chem.* 64, 9484–9495.
- (107) Braga Emidio, N., Hoffmann, W., Brierley, S. M. und Muttenthaler, M. (2019). Trefoil Factor Family: Unresolved Questions and Clinical Perspectives. *Trends Biochem. Sci.* 44, 387–390.
- (108) Peterson, D. E. u. a. (2009). Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled study of recombinant human intestinal trefoil factor oral spray for prevention of oral mucositis in patients with colorectal cancer who are receiving fluorouracil-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 4333–8.
- (109) Schulze, U., Sel, S. und Paulsen, F. P. (2010). Trefoil factor family peptide 3 at the ocular surface. A promising therapeutic candidate for patients with dry eye syndrome? *LASIK* 45, 1–11.
- (110) Ehrencrona, E., van der Post, S., Gallego, P., Recktenwald, C. V., Rodriguez-Pineiro, A. M., Garcia-Bonete, M.-J., Trillo-Muyo, S., Bäckström, M., Hansson, G. C. und Johansson, M. E. V. (2021). The IgGFc-binding protein FCGBP is secreted with all GDPH sequences cleaved but maintained by interfragment disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 297, 100871.
- (111) Kobayashi, K., Blaser, M. J. und Brown, W. R. (1989). Identification of a unique IgG Fc binding site in human intestinal epithelium. *J. Immunol.* 143, 2567–74.
- (112) Gazi, M. H., He, M., Cheville, J. C. und Young, C. Y. F. (2008). Down-regulation of IgG Fc binding protein (Fc gammaBP) in prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* 7, 70–5.
- (113) Harada, N., Iijima, S., Kobayashi, K., Yoshida, T., Brown, W. R., Hibi, T., Oshima, A. und Morikawa, M. (1997). Human IgGFc binding protein

- (FcgammaBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J. Biol. Chem.* 272, 15232–41.
- (114) Weste, J., Houben, T., Harder, S., Schlüter, H., Lücke, E., Schreiber, J. und Hoffmann, W. (2022). Different Molecular Forms of TFF3 in the Human Respiratory Tract: Heterodimerization with IgG Fc Binding Protein (FCGBP) and Proteolytic Cleavage in Bronchial Secretions. *Int. J. Mol. Sci.* 23.
- (115) Heinrich, P. C., M, M. und L, G., *Loeffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*; Springer Berlin, Heidelberg: 2014.
- (116) Fu, J., Gao, J., Liang, Z. und Yang, D. (2020). PDI-Regulated Disulfide Bond Formation in Protein Folding and Biomolecular Assembly. *Mol.* 26.
- (117) Lundström, J. und Holmgren, A. (1993). Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochem.* 32, 6649–55.
- (118) Chivers, P. T., Prehoda, K. E. und Raines, R. T. (1997). The CXXC Motif: A Rheostat in the Active Site. *Biochem.* 36, 4061–4066.
- (119) Lidell, M. E., Johansson, M. E. V. und Hansson, G. C. (2003). An auto-catalytic cleavage in the C terminus of the human MUC2 mucin occurs at the low pH of the late secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 278, 13944–51.
- (120) Lidell, M. E. und Hansson, G. C. (2006). Cleavage in the GDPH sequence of the C-terminal cysteine-rich part of the human MUC5AC mucin. *Biochem. J.* 399, 121–9.
- (121) Johansson, M. E. V., Thomsson, K. A. und Hansson, G. C. (2009). Proteomic Analyses of the Two Mucus Layers of the Colon Barrier Reveal That Their Main Component, the Muc2 Mucin, Is Strongly Bound to the Fcgbp Protein. *J. Proteome Res.* 8, 3549–3557.
- (122) Fernández-Blanco, J. A., Fakih, D., Arike, L., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Martínez-Abad, B., Skansebo, E., Jackson, S., Root, J., Singh, D., McCrae, C., Evans, C. M., Åstrand, A., Ermund, A. und Hansson, G. C. (2018). Attached stratified mucus separates bacteria from the epithelial cells in COPD lungs. *JCI insight* 3.

- (123) Gorman, H., Moreau, F., Beaupre, E. und Chadee, K. (2022). Colonic MUC2 Mucin Is Stabilized By FCGBP To Resist *Salmonella Enterica* Invasion In Goblet Cells. *FASEB J.* *36*.
- (124) Ehrencrona, E. The Role of FCGBP in Mucus - Structure, Processing and Function, Diss., Institute of Biomedicine, University of Gothenburg, 2021.
- (125) Schwartz, J. L. (2014). Fcgbp - A Potential Viral Trap in RV144. *Open AIDS J.* *8*, 21–4.
- (126) Kobayashi, K., Tachibana, M. und Tsutsumi, Y. (2021). Neglected roles of IgG Fc-binding protein secreted from airway mucin-producing cells in protecting against SARS-CoV-2 infection. *Innate Immun.* *27*, 423–436.
- (127) O'Donovan, N., Fischer, A., Abdo, E.-M., Simon, F., Peter, H. J., Gerber, H., Buergi, U. und Marti, U. (2002). Differential expression of IgG Fc binding protein (FcgammaBP) in human normal thyroid tissue, thyroid adenomas and thyroid carcinomas. *J. Endocrinol.* *174*, 517–24.
- (128) Xiong, L., Wen, Y., Miao, X. und Yang, Z. (2014). NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res.* *355*, 365–74.
- (129) Wang, K., Guan, C., Shang, X., Ying, X., Mei, S., Zhu, H., Xia, L. und Chai, Z. (2021). A bioinformatic analysis: the overexpression and clinical significance of FCGBP in ovarian cancer. *Aging* *13*, 7416–7429.
- (130) Yan, T., Tian, D., Chen, J., Tan, Y., Cheng, Y., Ye, L., Deng, G., Liu, B., Yuan, F., Zhang, S., Cai, L. und Chen, Q. (2021). FCGBP Is a Prognostic Biomarker and Associated With Immune Infiltration in Glioma. *Front. Oncol.* *11*, 769033.
- (131) Yang, L., Zhang, X., Zhang, J., Liu, Y., Ji, T., Mou, J., Fang, X., Wang, S. und Chen, J. (2022). Low expression of TFF3 in papillary thyroid carcinoma may correlate with poor prognosis but high immune cell infiltration. *Future Oncol.* *18*, 333–348.
- (132) Madsen, J., Sorensen, G. L., Nielsen, O., Tornøe, I., Thim, L., Fenger, C., Mollenhauer, J. und Holmskov, U. (2013). A variant form of the human deleted in malignant brain tumor 1 (DMBT1) gene shows increased

- expression in inflammatory bowel diseases and interacts with dimeric trefoil factor 3 (TFF3). *PloS one* 8, 64441.
- (133) Gustafsson, J. K. und Johansson, M. E. V. (2022). The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nat. Rev. 19*, 785–803.
 - (134) Heuer, F., Stürmer, R., Heuer, J., Kalinski, T., Lemke, A., Meyer, F. und Hoffmann, W. (2019). Different Forms of TFF2, A Lectin of the Human Gastric Mucus Barrier: In Vitro Binding Studies. *Int. J. Mol. Sci. 20*.
 - (135) Zhang, Y., Liu, Y., Wang, L. und Song, H. (2019). The expression and role of trefoil factors in human tumors. *Transl. Cancer Res. 8*, 1609–1617.
 - (136) Denny, P. u. a. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J. Proteome Res 7*, 1994–2006.
 - (137) Kouznetsova, I., Gerlach, K. L., Zahl, C. und Hoffmann, W. (2010). Expression analysis of human salivary glands by laser microdissection: differences between submandibular and labial glands. *Cell. Physiol. Biochem. 26*, 375–82.
 - (138) Faruque, M., Wanschers, M., Ligtenberg, A. J., Laine, M. L. und Bikker, F. J. (2022). A review on the role of salivary MUC5B in oral health. *J. Oral Biosci. 64*, 392–399.
 - (139) Kobayashi, K., Ogata, H., Morikawa, M., Iijima, S., Harada, N., Yoshida, T., Brown, W. R., Inoue, N., Hamada, Y., Ishii, H., Watanabe, M. und Hibi, T. (2002). Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *Gut 51*, 169–76.
 - (140) Yang, Y., Lin, Z., Lin, Q., Bei, W. und Guo, J. (2022). Pathological and therapeutic roles of bioactive peptide trefoil factor 3 in diverse diseases: recent progress and perspective. *Cell Death Dis. 13*, 62.
 - (141) Laskou, A., Znalesniak, E. B., Harder, S., Schlüter, H., Jechorek, D., Langer, K., Strecker, C., Matthes, C., Tchaikovski, S. N. und Hoffmann, W. (2024). Different Forms of TFF3 in the Human Endocervix, including a Complex with IgG Fc Binding Protein (FCGBP), and Further Aspects of the Cervico-Vaginal Innate Immune Barrier. *Int. J. Mol. Sci. 25*.
 - (142) Thim, L., Wöldike, H. F., Nielsen, P. F., Christensen, M., Lynch-Devaney, K. und Podolsky, D. K. (1995). Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochem. 34*, 4757–64.

- (143) Riemer, J., Bulleid, N. und Herrmann, J. M. (2009). Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Sci.* *324*, 1284–7.
- (144) Endo, S. (1962). Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.* *40*, 346.
- (145) Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bhat, S. G. und Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine Enhyodontium album BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochem.* *41*, 956–961.
- (146) Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M. A. und Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Rev. Iberoam. Micol.* *33*, 76–82.
- (147) Kawabata, K., Hagio, T. und Matsuoka, S. (2002). The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* *451*, 1–10.
- (148) Heutinck, K. M., ten Berge, I. J. M., Hack, C. E., Hamann, J. und Rowshani, A. T. (2010). Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol. Immunol.* *47*, 1943–55.
- (149) Voynow, J. A. und Shinbashi, M. (2021). Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomol.* *11*, 1065.
- (150) Greenlee, K. J., Werb, Z. und Kheradmand, F. (2007). Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol. Rev.* *87*, 69.
- (151) Craig, V. J., Zhang, L., Hagood, J. S. und Owen, C. A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *53*, 585–600.
- (152) Patel, A. C., Brett, T. J. und Holtzman, M. J. (2009). The role of CLCA proteins in inflammatory airway disease. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 425–49.
- (153) Chmelař, J., Kotál, J., Langhansová, H. und Kotsyfakis, M. (2017). Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *7*, 216.
- (154) Sharma, A., Subramaniam, P. und Moiden, S. (2017). Analysis of Salivary IgA, Amylase, Lactoferrin, and Lysozyme Before and After Comprehensive Dental Treatment in Children: A Prospective Study. *Contemporary clinical dentistry* *8*, 526–530.

- (155) Ebersole, J. L., Schuster, J. L., Stevens, J., Dawson, D. 3., Kryscio, R. J., Lin, Y., Thomas, M. V. und Miller, C. S. (2013). Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J. Clin. Immunol.* *33*, 271–9.
- (156) Schaller, M., Korting, H. C., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W. und Hube, B. (1999). Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* *34*, 169–80.
- (157) 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*.
- (158) Hanisch, F.-G., Bonar, D., Schloerer, N. und Schroten, H. (2014). Human trefoil factor 2 is a lectin that binds -GlcNAc-capped mucin glycans with antibiotic activity against Helicobacter pylori. *J. Biol. Chem.* *289*, 27363–75.
- (159) Nakayama, J. (2014). Dual Roles of Gastric Gland Mucin-specific O-glycans in Prevention of Gastric Cancer. *Acta* *47*, 1–9.
- (160) Salm, F., Znalesniak, E. B., Laskou, A., Harder, S., Schlüter, H. und Hoffmann, W. (2023). Expression Profiling along the Murine Intestine: Different Mucosal Protection Systems and Alterations in Tff1-Deficient Animals. *Int. J. Mol. Sci.* *24*.
- (161) Protein Data Bank Japan (2022). 1E9T. *PDBj*.
- (162) Robbe, C., Capon, C., Coddeville, B. und Michalski, J.-C. (2004). Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochem. J.* *384*, 307–16.
- (163) Larsson, J. M. H., Karlsson, H., Sjövall, H. und Hansson, G. C. (2009). A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiol.* *19*, 756–66.
- (164) Reeves, E. P., Ali, T., Leonard, P., Hearty, S., O'Kennedy, R., May, F. E. B., Westley, B. R., Josenhans, C., Rust, M., Suerbaum, S., Smith, A., Drumm, B. und Clyne, M. (2008). Helicobacter pylori lipopolysaccharide interacts with TFF1 in a pH-dependent manner. *Gastroenterol.* *135*, 2043–54.
- (165) Braga Emidio, N., Baik, H., Lee, D., Stürmer, R., Heuer, J., Elliott, A. G., Blaskovich, M. A. T., Haupenthal, K., Tegtmeier, N., Hoffmann, W., Schroeder, C. I. und Muttenthaler, M. (2020). Chemical synthesis of

- human trefoil factor 1 (TFF1) and its homodimer provides novel insights into their mechanisms of action. *Chem. Comm.* *56*, 6420–6423.
- (166) Gorman, H., Moreau, F., Dufour, A. und Chadee, K. (2023). IgGFc-binding protein and MUC2 mucin produced by colonic goblet-like cells spatially interact non-covalently and regulate wound healing. *Front. Immunol.* *14*, 1211336.
- (167) Gorman, H., Moreau, F., Kim, A. und Chadee, K. (2021). FCGBP stabilizes colonic MUC2 mucin structural integrity in innate host defense against *Entamoeba histolytica*. *FASEB J.* *35*.
- (168) Stürmer, R., Müller, S., Hanisch, F.-G. und Hoffmann, W. (2014). Porcine gastric TFF2 is a mucus constituent and differs from pancreatic TFF2. *Cell. Physiol. Biochem.* *33*, 895–904.
- (169) Yusufu, A., Shayimu, P., Tuerdi, R., Fang, C., Wang, F. und Wang, H. (2019). TFF3 and TFF1 expression levels are elevated in colorectal cancer and promote the malignant behavior of colon cancer by activating the EMT process. *Int. J. Oncol.* *55*, 789–804.
- (170) Jahan, R., Shah, A., Kisling, S. G., Macha, M. A., Thayer, S., Batra, S. K. und Kaur, S. (2020). Odyssey of trefoil factors in cancer: Diagnostic and therapeutic implications. *BBA* *1873*, 188362.
- (171) Vestergaard, E. M., Nexø, E., Tørring, N., Borre, M., Ørntoft, T. F. und Sørensen, K. D. (2010). Promoter hypomethylation and upregulation of trefoil factors in prostate cancer. *Int. J. Cancer* *127*, 1857–65.
- (172) Nørgaard, M., Haldrup, C., Storebjerg, T. M., Vestergaard, E. M., Wild, P. J., Høyer, S., Borre, M., Ørntoft, T. F. und Sørensen, K. D. (2017). Comprehensive Evaluation of TFF3 Promoter Hypomethylation and Molecular Biomarker Potential for Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- (173) Loncar, M. B., Al-azze, E.-d., Sommer, P. S. M., Marinovic, M., Schmehl, K., Kruschewski, M., Blin, N., Stohwasser, R., Gött, P. und Kayademir, T. (2003). Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* *52*, 1297–303.

- (174) Sun, Y., Wang, L., Zhou, Y., Mao, X. und Deng, X. (2016). Human Trefoil Factor 3 induces the transcription of its own promoter through STAT3. *Sci. Rep.* 6, 30421.
- (175) Bansil, R. und Turner, B. S. (2018). The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124, 3–15.
- (176) Kimura, H. (2014). Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 783–93.
- (177) Khattak, S., Rauf, M. A., Khan, N. H., Zhang, Q.-Q., Chen, H.-J., Muhammad, P., Ansari, M. A., Alomary, M. N., Jahangir, M., Zhang, C.-Y., Ji, X.-Y. und Wu, D.-D. (2022). Hydrogen Sulfide Biology and Its Role in Cancer. *Mol.* 27.
- (178) Aihara, E., Engevik, K. A. und Montrose, M. H. (2017). Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 357–380.
- (179) Chwieralski, C. E., Schnurra, I., Thim, L. und 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, 528–37.
- (180) Dunne, C., Naughton, J., Duggan, G., Loughrey, C., Kilcoyne, M., Joshi, L., Carrington, S., Earley, H., Backert, S., Robbe Masselot, C., May, F. E. B. und Clyne, M. (2018). Binding of Helicobacter pylori to Human Gastric Mucins Correlates with Binding of TFF1. *Microorganisms* 6.
- (181) Lencer, W. I. und Blumberg, R. S. (2005). A passionate kiss, then run: exocytosis and recycling of IgG by FcRn. *Trends in cell biology* 15, 5–9.
- (182) Holmskov, U., Lawson, P., Teisner, B., Tornoe, I., Willis, A. C., Morgan, C., Koch, C. und Reid, K. B. (1997). Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. *J. Biol. Chem.* 272, 13743–9.
- (183) Ishihara, K., Kurihara, M., Goso, Y., Urata, T., Ota, H., Katsuyama, T. und Hotta, K. (1996). Peripheral alpha-linked N-acetylglucosamine on the carbohydrate moiety of mucin derived from mammalian gastric gland mucous cells: epitope recognized by a newly characterized monoclonal antibody. *Biochem. J.* 318, 409–16.

- (184) Hanisch, F.-G., Ragge, H., Kalinski, T., Meyer, F., Kalbacher, H. und Hoffmann, W. (2013). Human gastric TFF2 peptide contains an N-linked fucosylated N,N'-diacetyllactosidamine (LacdiNAc) oligosaccharide. *Glycobiol.* 23, 2–11.
- (185) Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–9.
- (186) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227, 680–5.
- (187) Jens Kurreck, F. L., Joachim W. Engels, *Bioanalytik*; 4.Auflage, Hrsg.; Springer Spektrum: 2022.
- (188) Thornton, J. R., Daum, H. A. 3. und Case, S. T. (1995). Agarose gel electrophoresis of high molecular mass protein complexes. *BioTechniques* 18, 324–7.
- (189) Gupta, V. und Carroll, K. S. (2014). Sulfinic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *BBA* 1840, 847–875.
- (190) Salacinski, P. R., McLean, C., Sykes, J. E., Clement-Jones, V. V. und Lowry, P. J. (1981). Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal. Biochem.* 117, 136–46.
- (191) Stürmer, R., Harder, S., Schlüter, H. und 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.