

Untersuchungen zu tanninbindenden Speichelproteinen des Rehs und anderer Wiederkäuer

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
in der Wissenschaftsdisziplin Ernährungsphysiologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Janin Gehrke

Dezember 2001

Inhaltsverzeichnis

<i>Einleitung</i>	<i>1</i>
1 Literaturübersicht	3
1.1 Einteilung der Wiederkäuer in Ernährungstypen	3
1.1.1 Konzentratselektierer (KS)	3
1.1.2 Gras- und Rauhfutterfresser (GR)	5
1.1.3 Intermediärer Ernährungstyp (IM)	5
1.2 Evolution der Wiederkäuer	6
1.3 Pflanzliche Sekundärmetabolite	7
1.3.1 Einteilung der pflanzlichen Sekundärmetabolite	7
1.3.2 Tannine	9
1.3.2.1 Struktur der Tannine	9
1.3.2.2 Biologische Aktivität der Tannine	10
1.3.2.3 Tannine in Pflanzen	12
1.4 Tanninaufnahme durch Wiederkäuer	13
1.5 Schutzmechanismen der Wiederkäuer gegen pflanzliche Sekundärmetabolite	14
1.5.1 Spezifische Detoxifikationsmechanismen	14
1.5.2 Tanninbindende Speichelproteine	15
1.6 Funktion, Vorkommen und Struktur prolinreicher Proteine (PRPs)	16
2 Methoden	20
2.1 Probenmaterial	20
2.1.1 Gesamtspeichel	20
2.1.2 Parotisspeichel	20
2.1.3 Mischspeichel	22
2.1.4 Gefriertrocknen des Parotisspeichels	23
2.1.5 Entsalzen des Speichels	23
2.2 BCA-Methode zur Proteinbestimmung	23
2.3 Tanninbindungsassay	24

2.4	Isolierung prolinreicher Speichelproteine	27
2.4.1	Fällung mit Trichloressigsäure	27
2.4.2	Gelfiltration	27
2.5	Analyse der Aminosäurezusammensetzung	28
2.6	Polyacrylamidgelelektrophorese	28
2.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	28
2.6.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	29
2.6.3	Coomassie Brilliant Blue-Färbung	29
2.6.4	Coomassie Brilliant Blue Färbung für prolinreiche Proteine	29
2.6.5	Silberfärbung	30
2.7	Qualitativer Nachweis der Tanninbindung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	30
2.8	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	31
2.8.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	31
2.8.2	Zweite Dimension: SDS-PAGE	32
2.9	Qualitativer Glykoproteinnachweis	32
2.10	Aminosäuresequenzbestimmung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	33
2.10.1	Umkehrphasenchromatographie und N-terminale Sequenzierung	33
2.10.2	Anionenaustauschchromatographie	34
2.10.3	Trypsin-Verdau	34
2.11	Nukleotidsequenzbestimmung mittels RT – PCR	34
2.11.1	RNA-Isolierung	35
2.11.2	Reverse Transkription	36
2.11.3	PRP-spezifische PCR	36
2.11.4	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.11.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	37
2.11.6	Klonierung	37
2.11.7	Sequenzierung	38
2.12	Nukleotidsequenzbestimmung mittels Hybridanreicherung	38
2.12.1	Anreicherung der cDNA nach Adaptoren-Ligation	39
2.12.2	Hybridisierung	39
2.12.3	Auswertung der Sequenzen	40

3	<i>Ergebnisse</i>	41
3.1	Tanninbindungskapazitäten des Speichels des Rehs im Vergleich zu anderen Wiederkäuern	41
3.2	Tanninbindende Proteine im Speichel des Rehs und anderer Wiederkäuer	44
3.2.1	Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine	45
3.2.1.1	Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	45
3.2.1.2	Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine des Elchs	46
3.2.1.3	Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine anderer Wiederkäuer	46
3.2.2	Tanninbindungseigenschaften der TCA-löslichen Speichelproteine	48
3.2.2.1	Qualitativer Nachweis der Tanninbindungsfähigkeit der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	48
3.2.2.2	Die relativen Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs und anderer Wiederkäuer	51
3.3	Charakteristika der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	52
3.3.1	Molekulargewichte und isoelektrische Punkte	52
3.3.2	Glykosylierung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	56
3.3.3	Sequenzen der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs	56
3.3.3.1	N-terminale Aminosäuresequenzen der TCA-löslichen Speichelproteine	56
3.3.3.2	Nukleotidsequenzen von prolinreichen Proteinen des Rehs	59
4	<i>Diskussion</i>	66
4.1	Tanninbindungskapazitäten des Rehspeichels im Vergleich zu anderen Wiederkäuern	66
4.1.1	Tanninbindungskapazität der verschiedenen Ernährungstypen	66
4.1.2.	Spezifität der Wechselwirkung zwischen Tanninen und Speichelproteinen	67
4.1.2	Generelle Einschätzung des Tanninbindungsassays	68
4.2	Tanninbindende Speichelproteine von Wiederkäuern	69
4.2.1	Prolingehalte der TCA-löslichen Speichelproteine	69
4.2.2	Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine	70
4.2.3	Wirkungsweise der tanninbindenden Proteine	72
4.3	Charakteristika und Sequenz der prolinreichen Proteine des Rehs	73

5	<i>Zusammenfassung</i>	77
6	<i>Summary</i>	79
7	<i>Anhang</i>	81
7.1	Übersicht über die hergestellten Klone	81
7.2	Verzeichnis der wissenschaftlichen Tiernamen	82
7.3	Abkürzungsverzeichnis	83
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	85
	<i>Danksagung</i>	96
	<i>Lebenslauf</i>	98

Einleitung

Höhere Pflanzen haben gegen ihre Fressfeinde (Herbivoren), eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt. Zur chemischen Abwehrstrategie gehören Gift- und Abschreckstoffe, Substanzen, die den Nährwert herabsetzen und Hormonanaloga oder -blocker. Einige Herbivoren können durch anatomische und molekulare Anpassungen ihres Verdauungssystems die Wirkung der von der Pflanze gebildeten sekundären Stoffwechselprodukte umgehen.

Die am häufigsten vorkommenden Sekundärmetabolite der Pflanzen mit einem breiten Wirkungsspektrum sind die Tannine. Diese Polyphenole haben eine verdauungshemmende (antinutritive) Wirkung auf nicht adaptierte Spezies. Dadurch wird ein hemmender Effekt auf das Wachstum ausgeübt (Mole und Waterman 1987, Salawu *et al.* 1997). Tannine können Bluteindickung, reduzierte Futteraufnahme, erhöhten Stickstoffverlust und Tod hervorrufen (Jung 1977, Mole und Waterman 1987).

Durch die Produktion tanninbindender Speichelproteine sind einige Spezies an den Tanningehalt der Nahrung angepasst. Induktionsversuche an Ratten und Mäusen haben gezeigt, dass es sich meist um Proteine mit relativ hohem Prolingehalt handelt (Mehansho *et al.* 1983, 1985, Jansmann *et al.* 1994). Prolinreiche Proteine (PRPs) wurden in mehr als 15 Spezies nachgewiesen.

Im Speichel von einigen selektierenden Wiederkäuern (Browsern) wurden tanninbindende Proteine gefunden. Das Nahrungsspektrum dieser Wiederkäuer hat einen hohen Anteil an Dikotyledonen, die viele Sekundärmetaboliten enthalten. Im Gegensatz dazu ernähren sich die grasfressenden Wiederkäuer (Grazer) fast ausschließlich von polyphenolarmen Gräsern. Grasfresser haben sich aus den mit den heutigen Browsern vergleichbaren ursprünglichen Wiederkäuern herausgebildet. Dabei entwickelten sie die Fähigkeit, die gleichzeitig entstehenden zellulosereichen Gräser zu verdauen, während die Verwertung von Dikotyledonen nachließ. Im Speichel von Grazern konnten tanninbindende Proteine nicht nachgewiesen werden.

Über die tanninbindenden Proteine der Browser ist wenig bekannt. Beim Maultierhirsch konnte für diese Speichelproteine ein hoher Prolingehalt festgestellt werden (Austin *et al.* 1989, Mole *et al.* 1990). Im Speichel von Elch und Reh wurden tanninbindende Proteine nachgewiesen (Fickel *et al.* 1998, Juntheikki 1996), ob diese prolinreich sind, ist bisher nicht untersucht worden.

Die Wiederkäuer-Ernährungstypen haben sich mit ihrem Verdauungsapparat an ihr jeweiliges Nahrungsspektrum angepasst. Die tanninreiche Nahrung des Rehs (Konzentratselektierer) zeigt, dass bei ihm die Anpassungsmechanismen an Sekundärmetaboliten stark ausgeprägt sein müssen (Tixier 2000). Im Parotisspeichel des Rehs konnten bereits tanninbindende Proteine nachgewiesen werden (Joest 1998). Auch der Speichel anderer Wiederkäuer, die tanninhaltige Nahrung aufnehmen, sollte in der Lage sein, diese Polyphenole zu binden.

Ziele: Daraus lässt sich die Frage ableiten, ob der Speichel von Browsern (Konzentratselektierern) eine im Vergleich zu anderen Wiederkäuertypen hohe Tanninbindungsfähigkeit hat. So kann auf das Vorhandensein von tanninbindenden Speichelproteinen geschlossen werden. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob es sich bei den detektierten tanninbindenden Proteinen um PRPs handelt. In die Untersuchungen wurde der Speichel von Intermediärtypen mit einbezogen. Intermediärtypen, deren Ernährungsverhalten und anatomische Kennzeichen zwischen den Selektierern und Grasfressern liegen, zeichnen sich durch eine hohe Anpassungsfähigkeit an unterschiedliches Nahrungsangebot aus. Bei ihnen wurde wie bei Konzentratselektierern bisher davon ausgegangen, dass sie in der Lage sind, tanninbindende Proteine zu bilden.

Da die meisten der untersuchten Wiederkäuer Wildtiere sind, hing die Auswahl und Anzahl der untersuchten Tiere von deren Erreichbarkeit ab. Das IZW hält in der Feldstation Niederfinow im Norden Berlins eine Anzahl Rehe. Sie sind die am weitesten verbreiteten Wild-Wiederkäuer Europas und haben sich erfolgreich an die unterschiedlichsten Habitate und saisonal variierende Vegetationsbedingungen angepasst. Das Reh diente als Modell eines Konzentratselektierers für weitergehende Untersuchungen der tanninbindenden Speichelproteine. Ziel dieser Arbeit war die Sequenzierung dieser Proteine, um die Erkenntnisse später auf andere Wiederkäuer übertragen und evolutive Zusammenhänge ableiten zu können.

1 Literaturübersicht

1.1 Einteilung der Wiederkäuer in Ernährungstypen

Vergleichende Ernährungs- und Anatomiestudien führten in den siebziger Jahren zu einer von der Körpergröße unabhängigen Klassifizierung der Wiederkäuer in drei Ernährungstypen: Konzentratselktierer (KS), Gras- und Rauhfutterfresser (GR) und Intermediärtypen (IM) (Hofmann und Stewart 1972). Aufgrund ihrer Ernährungsweise wurden KS und IM vorher unter dem Begriff Buschfresser (engl. Browser) zusammengefasst. Im Gegensatz zum Grasfresser (engl. Grazer, Abweiden der Nahrung) pflücken Browser einzelne Pflanzenteile ab (Hofmann und Stewart 1972).

Untersuchungen zur Physiologie der Wiederkäuerverdauung fanden dennoch eine Abhängigkeit des Ernährungstypen von der Körpermasse, die die nach morphologischen Kriterien erfolgte Einteilung der Ernährungstypen von Hofmann nicht unterstützte (Gordon und Illius 1994, Robbins *et al.* 1995). Die Ernährungstypen sind aber nicht gleichmäßig zwischen den verschiedenen Gewichtsklassen verteilt. Die meisten Buschfresser haben ein niedriges (< 25 kg), die meisten Grasfresser dagegen ein hohes Körpergewicht (> 50 kg) (Van Wieren 1996). Daher werden sowohl die Klassifizierung nach Hofmann und Stewart (1972) als auch die Abhängigkeit der Physiologie vom Körpergewicht in der Literatur in gleichem Maße diskutiert (Clauss 1998, Van Wieren 1996).

Diese Arbeit folgt der Einteilung der Ernährungstypen nach Hofmann und Stewart (1972). Die Klassifizierung einer Auswahl europäischer Wiederkäuer ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

1.1.1 Konzentratselktierer (KS)

KS ernähren sich von stärke- und eiweißreichen, leicht verdaulichen Dikotyledonen, deren Früchten, sowie von Busch- und Baumblättern (Hofmann 1976, Hofmann und Stewart 1972, Owen-Smith 1996). Der Grasanteil in ihrer Nahrung ist niedrig und beträgt 9 - 20 % (Stubbe 1997, Van Wieren 1996). Der Zellulosegehalt der Nahrung des Rehs (*Capreolus capreolus*, KS) ist mit 9 - 23% etwa halb so groß wie der des Schafes (*Ovis ammon*, GR, 51% Zellulosegehalt) (Deutsch 1995). Der Begriff Konzentratselktierer leitet sich von der auf Pflanzen mit höherwertigen Zellinhaltsstoffen ausgerichteten Ernährung ab (Hofmann 1993). Viele Autoren benutzen wegen möglicher semantischer Missverständnisse die Bezeichnung 'Browser', unterscheiden ihn aber vom intermediären Ernährungstyp (Van Wieren 1996).

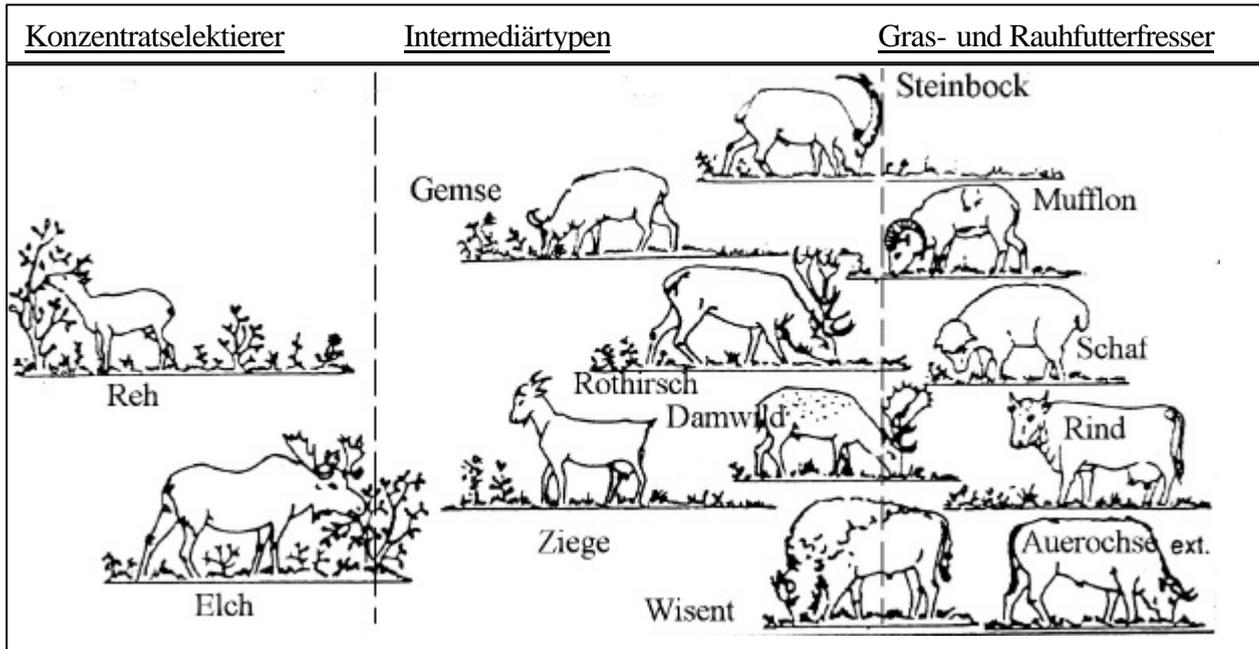


Abbildung 1.1 Einteilung europäischer Wiederkäuer in drei Ernährungstypen (Hofmann 1976).

Das Vormagensystem der KS hat verglichen mit den anderen zwei Ernährungstypen das kleinste relative Gewicht, die kleinste Kapazität, die geringste Unterkammerung und die größten Öffnungen zwischen den einzelnen Vormagenabteilungen (Hofmann 1988, Hofmann 1989). Die Schichtung des Vormageninhalts ist wenig ausgeprägt (Hofmann 1976, Nygren und Hofmann 1990). Die Retentionszeit der Nahrung im Pansen ist insgesamt kurz (Behrend 1999, Clauss 1998), was durch das Vorhandensein von gleichmäßig dicht verteilten Zotten und dünnen Pfeilern (Einfaltungen der Pansenwand) im Pansen gestützt wird (Hofmann 1976, Hofmann 1993). Die geringe Größe des Vormagensystems (Van Soest 1994), die wenig ausgeprägte selektive Retention der Nahrungspartikel (Clauss *et al.* 2001), sowie kurze Wiederkauperioden und häufige Nahrungsaufnahmen (Hofmann 1989) beschränken die Aufnahme und das Verdauen zellulosereicher Nahrung. Der hintere Verdauungstrakt (Darm) ist relativ lang und gut für eine zweite Fermentation (Verdau von Hemizellulose, Absorption von Nährstoffen, Wasser, Elektrolyten und Mineralien) geeignet (Hofmann 1989).

Die relative Masse der Ohrspeicheldrüse der KS ist mit 0,18 - 0,22 % des Körpergewichts ca. vier mal größer als die anderer Ernährungstypen (GR: 0,05 - 0,07% des Körpergewichts) (Hofmann 1985, Hofmann 1988). Eine Ausnahme ist der Große Kudu (*Tragelaphus strepiceros*), der als KS relativ kleine Speicheldrüsen aufweist (0,07%) (Robbins *et al.* 1995). Im Gegensatz zu Robbins *et al.* (1995), die an Tieren mit Ösophagusfistel keinen Unterschied bezüglich des relativen Speichelvolumens bei verschiedenen Ernährungstypen feststellen

konnten, zeigten Göritz *et al.* (1994) und Fickel *et al.* (1998) mit Hilfe einer Kathedertechnik, dass KS ein größeres Volumen eines überwiegend serösen Speichels produzieren als IM und GR.

Zu den KS werden unter anderem Rehe (*Capreolus capreolus*), Weißwedelhirsche (*Odocoileus virginiana*), Maultierhirsche (*Odocoileus hemionus*), Elche (*Alces alces*), Giraffen (*Giraffa camelopardalis*), Kudus (*Tragelaphus*) und Ducker (*Cephalophinae*) gezählt (Hofmann 1988, Owen-Smith 1996).

1.1.2 Gras- und Rauhfutterfresser (GR)

Die Nahrung der GR besteht aus faser- und zellulosereichen Gräsern und Korbblütlern (Hofmann und Stewart 1972, Owen-Smith 1996). Tiere dieses Ernährungstyps können unterteilt werden: der selektive Grasfresser ist an frisches Gras und Wasser gebunden, während der nicht selektive Grasfresser in hohem Maß an Nahrung aus Gebieten mit hoher Trockenheit angepasst ist. Letzterer hat den Höchststand der Spezialisierung auf rohfasereiche und zeitweilig proteinarme Nahrung erreicht, was jedoch mit einer geringen Adaptationsfähigkeit an leicht verdauliche, rasch zu fermentierende Pflanzen einhergeht (Hofmann 1976). Die Zelluloseverdauung der GR ist effektiver als die der KS (Van Wieren 1996).

GR haben relativ zur Körpermasse kleine Speicheldrüsen, einen voluminösen Pansen und ein großes mit zahlreichen Blättern versehenes Omasum (Blättermagen). Kräftige Pfeiler teilen den Pansen in Kammern und ermöglichen dadurch eine Verzögerung der Nahrungspassage (Hofmann 1976, Hofmann 1988). Durch eine ausgeprägte selektive Retention der Nahrungspartikel (Clauss *et al.* 2001) kommt es zu einer Schichtung der Nahrungsbestandteile im Pansen. Die Nahrung kann so im Vormagen effektiver fermentiert werden.

Vertreter der Gras- und Rauhfutterfresser sind Rinder (*Bos taurus*), Bisons (*Bison bison*), Schafe (*Ovis*), Mufflons (*Ovis orientalis musimon*), Oryx (*Taurotragus oryx*), Gnus (*Connochaetes*), Kuhantilopen (*Alcelaphinae*), Wasserböcke (*Kobus ellipsiprymnus*) und Pferdeantilopen (*Hippotraginae*) (Owen-Smith 1996).

1.1.3 Intermediärer Ernährungstyp (IM)

In Abhängigkeit von saisonaler Verfügbarkeit und Qualität des Futters ernähren sich die Vertreter dieses Ernährungstyps von einer Mischnahrung, die in ihrer Rohfaser-, Rohprotein- und Stärkezusammensetzung stark wechselt. Sowohl die anatomischen Strukturen des

Gastrointestinaltraktes, als auch die Größe der Speicheldrüsen, die Größe und Struktur des Magens und die Länge des Darms liegen in ihrer Ausprägung zwischen denen von KS und GR. An den jahreszeitlichen Wechsel der Nahrungszusammensetzung können sich IM durch Umstellung der Verdauungsart und mechanische Adaptation des Magens anpassen. Hofmann (1993) konnte eine Änderung der Pansenkapazität um 30 - 40 % innerhalb von 3 - 4 Wochen beobachten.

Zu den Intermediärtypen gehören Rothirsche (*Cervus elaphus*), Damhirsche (*Cervus dama*), Ziegen (*Capra hircus*), Elen-Antilopen (*Tragelaphus (taurotragus) oryx*), Gemsen (*Rupicapra rupicapra*), Wisente (*Bison bonasus*), Rentiere (*Rangifer tarandus*), Moschusochsen (*Ovibos moschatus*), Thomsongazellen (*Gazella thomsoni*) und Impala-Antilopen (*Aepyceros melampus*) (Hofmann 1976, Owen-Smith 1996).

1.2 Evolution der Wiederkäuer

In der in Kapitel 1.1 vorgestellten Klassifizierung der rezenten Wiederkäuerarten spiegeln sich auch die evolutionären Vorgänge wider. Wiederkäuer sind im Vergleich zu anderen Pflanzenfressern eine evolutionsbiologisch junge Gruppe mit hoher Dynamik.

Vor ca. 65 Millionen Jahren, zu Beginn des Paläozäns, gingen aus den Stammformen der Protoungulaten die *Artiodactyla* (Paarhufer; Pferde- und Nashornartige) einerseits und die *Perissodactyla* (Unpaarhufer; Schweine- und Flusspferdartige) andererseits hervor (Janis 1976, Van Soest 1994). Aus den Unpaarhufern entwickelten sich später im Oligozän vor 38 - 26 Millionen Jahren die eigentlichen Wiederkäuer. Die vor der Ausbreitung der Gräser lebenden Wiederkäuer waren klein, hatten ein Körpergewicht von weniger als 18 kg und wiesen ein einfach gebautes Vormagensystem auf, in dem die Nahrung nur kurze Zeit fermentiert wurde (Van Soest 1994). Daher waren sie, wie auch die rezenten Konzentratselktierer, auf besonders nährstoffreiche, leicht verdauliche Pflanzen und Pflanzenteile von Dikotyledonen angewiesen.

Vor etwa 20 Millionen Jahren, im Miozän, setzte durch kühleres und trockeneres Klima eine Versteppung ein. Die Ausbreitung der Wiederkäuer wurde beschleunigt und die Entwicklung der Grasfresser wurde unterstützt (Van Soest 1994). Durch die Versteppung breiteten sich die Gräser aus und mit ihnen wurde eine neue Ressource in großen Mengen verfügbar: die Zellulose. Für den Aufschluss der β -1,4-glykosidischen Bindung dieses Kohlenhydrates waren jedoch zusätzliche zellulolytische Mikroorganismen und eine längere Verdauungszeit notwendig, so dass sich im Zuge der Evolution Arten mit auf Zellulose spezialisierter Verdauung herausbildeten. Verzögerungsstrukturen im Verdauungstrakt ermöglichten eine

längere Retentionszeit der Nahrung und dadurch einen verbesserten Aufschluss der zellulosereichen Nahrung. Die ausgeprägte Anpassung der Grasfresser an die Verdauung zellulosereicher Pflanzen hatte eine Einschränkung ihrer Fähigkeit, Dikotyledonen zu verarbeiten, zur Folge (Hofmann 1976).

Die ausgeprägten Eis- und Warmzeiten des Pleistozäns vor 2 Millionen Jahren waren durch das Aussterben großer Herbivorenarten und das Entstehen arktischer Wiederkäuer gekennzeichnet. Sie führten weitestgehend zur Herausbildung der rezenten Wiederkäuerarten (Van Soest 1994).

1.3 Pflanzliche Sekundärmetabolite

1.3.1 Einteilung der pflanzlichen Sekundärmetabolite

Pflanzliche Sekundärmetabolite sind Teil der chemischen Abwehr des Pflanzenorganismus gegen umweltbedingte Aggressionen (Krankheitserreger, Herbivore). Ihre Schutzwirkung kann aus Abstoßung (bitterer Geschmack, beißender Geruch), direktem Vergiften (Toxine) oder ernährungs- und wachstumshemmenden Effekten bestehen (Harborne 1991). Aufgrund ihrer chemischen Struktur werden Sekundärmetaboliten in drei Hauptgruppen eingeteilt: stickstoffhaltige Verbindungen, Terpenoide und Polyphenole (Harborne 1991).

Stickstoffhaltige Verbindungen: Als Abwehrmechanismus sind die stickstoffhaltigen Verbindungen wenig bedeutend, da sie nur in ca. 20 % der angiospermen Pflanzen vorkommen. Die bekanntesten Vertreter dieser heterogenen, ungefähr 10.000 Strukturen umfassenden Gruppe sind die Alkaloide. Andere stickstoffhaltige Metabolite sind nichtproteinogene Aminosäuren, cyanogene Glucoside oder Glucosinolate. Ihre abstoßende Wirkung auf Farmtiere in Australien, Südafrika und Nordamerika ist dokumentiert, ihr Effekt auf Wildtiere aber noch nicht gut untersucht (Harborne 1991).

Terpenoide: Ausgehend von Isopentenyl- und Dimethylallylpyrophosphat werden die Terpenoide nach der Anzahl ihrer C₅-Gruppen unterschieden. Die Wirkung erfolgt z.B. durch Hormonnachahmung, Giftigkeit oder abstoßenden Geruch und Geschmack (Harborne 1991).

Polyphenole: Zu den Polyphenolen gehören Lignine, Tannine und andere durch Oxidation polymerisierte Phenole (Van Soest 1994). Sie bilden unter den Sekundärmetaboliten eine bedeutende Gruppe, da sie extrem häufig und ubiquitär vorkommen (Bravo 1998, Haslam 1989, Sechovic 1990). Phenolverbindungen entfalten ihre Wirkungen in den Herbivoren auf verschiedene Weise. Während einige Phenole direkt nach Nahrungsaufnahme allergen oder geschmacksbeeinträchtigend wirken, haben andere einen lang anhaltenden Effekt, indem sie

die Fruchtbarkeit (Nachahmung von Östrogenen) oder das Wachstum (Verdauungshemmung) behindern (Harborne 1991).

Lignin ist einer der bedeutendsten Abwehrstoffe der Pflanzen gegen Wiederkäuer, da es zum Herabsetzen der Zellwandverdaulichkeit führt (Van Soest 1994). Auch andere pflanzliche Sekundärmetaboliten wirken inhibitorisch auf den Metabolismus des Wiederkäuer oder hemmen die Aktivität der Pansenbakterien. In Tabelle 1.1 sind Vertreter aller drei Sekundärmetabolitengruppen, ihr Vorkommen und ihre Wirkung gegen Wiederkäuer aufgelistet.

Tabelle 1.1 Beispiele pflanzlicher Abwehrstoffe, ihr Vorkommen und Wirkung auf Wiederkäuer (Van Soest 1994).

<i>Sekundärmetabolit</i>	<i>Vorkommen</i>	<i>Wirkung</i>
N-haltige Verbindungen		
Alkaloide	Weißfaden (<i>Leucaena</i>)	Haarverlust und Tod (Mimosin)
	Rohrglanzgras (<i>Phalaris</i>)	Angriff auf das Nervensystem Inhibition der Pansenbakterien
Cyanogene Glucoside	Schwingelgras (<i>Festuca</i>)	Toxizität; wirkt nicht auf anaerobe Pansenbakterien
	in gestressten Pflanzen	
Terpenoide		
flüchtige Terpene	Nadelhölzer (<i>Coniferae</i>)	teilweise toxisch
Saponine	Hülsenfrüchte (<i>Leguminosae</i>) u.a.	Hämolyse, Blähsucht
Polyphenole		
Lignine	hölzerne Strukturen	Herabsetzen der Verdaulichkeit der Zellwand
Tannine	viele Dikotyledonen	Enzymhemmung, Herabsetzen der Verdaulichkeit
Isoflavone	Hülsenfrüchte (<i>Leguminosae</i>) u.a.	Hormonaktivität (östrogene Wirkung), antifungale Eigenschaften

1.3.2 Tannine

Als Tannine werden wasserlösliche Polyphenole mit einem Molekulargewicht > 500 bezeichnet. Sie haben die Fähigkeit, Proteine aus wässrigen Lösungen zu präzipitieren (Mehansho *et al.* 1987a). Ihre Namensgebung bezieht sich auf den Fakt, dass sie beim Gerben von Tierhäuten ein Braunfärbung des Leders („tanning“) bewirken (Van Soest 1994). Als pflanzliche Abwehrstoffe gegen Herbivorie binden sie an verschiedene biologische Makromoleküle (Proteine, Zellulose). Das kann zum Herabsetzen der Löslichkeit dieser Moleküle, ihrer geringeren Verdaulichkeit und zur Hemmung der zellulolytischen Aktivität der Pansenorganismen führen (Van Soest 1994).

1.3.2.1 Struktur der Tannine

Aufgrund ihrer chemischen Struktur werden Tannine in die zwei Gruppen hydrolysierbare und kondensierte Tannine eingeteilt.

Hydrolysierbare Tannine (HT) sind Ester aus Kondensationsprodukten der Gallussäuren und Kohlenhydraten (meist Glukose). Je nach Art der Gallussäure werden sie als Gallotannine, Ellagitannine, Taragallotannine oder Caffeetannine bezeichnet (Van Soest 1994). Sie sind alkalilabil und können von gastrointestinalen Esterasen oder von Tannin-Acyl-Hydrolasen hydrolysiert werden (Mehansho *et al.* 1987a). Tanninsäure, ein wichtiger Vertreter der HT besteht aus Glukose, die über Esterbrücken mit 8 - 10 Gallussäuremolekülen verbunden ist (Abbildung 1.2).

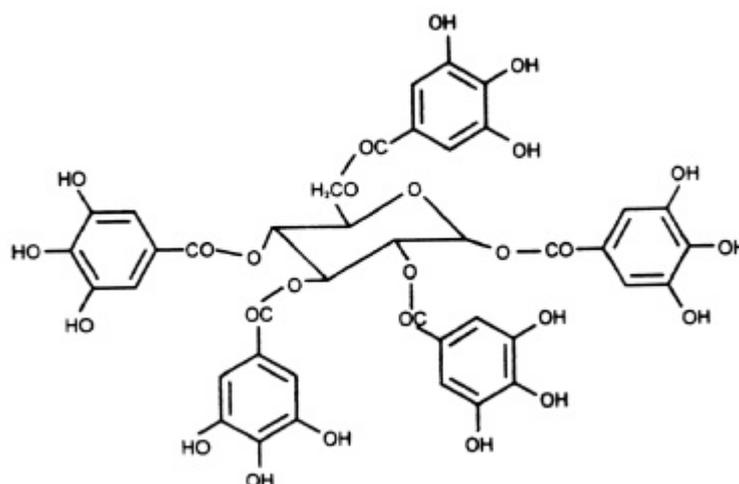


Abbildung 1.2 Strukturformel von Tanninsäure (HT) (Bravo 1998).

Kondensierte Tannine (CT; Proanthocyanidine) sind Polymere des Flavan-3-ols, die durch Kohlenstoffbrücken verbunden sind (Hagerman und Butler 1991). Die unter stark sauren Bedingungen stattfindende Depolymerisierung zu Anthocyanidinpigmenten und anderen weniger gut charakterisierten Produkten führt z.B. im Herbst zu einer roten Verfärbung der Blätter (Robbins 1983). Abbildung 1.3 zeigt die Strukturformel eines Proanthocyanidins.

Sowohl CT als auch HT bilden lösliche Komplexe mit Proteinen, die auf nichtkovalenten Bindungen, hydrophobischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen basieren (Goldstein und Swain 1965, Hagerman und Butler 1978, 1981, 1989, Mitaru *et al.* 1984, Oh *et al.* 1980).

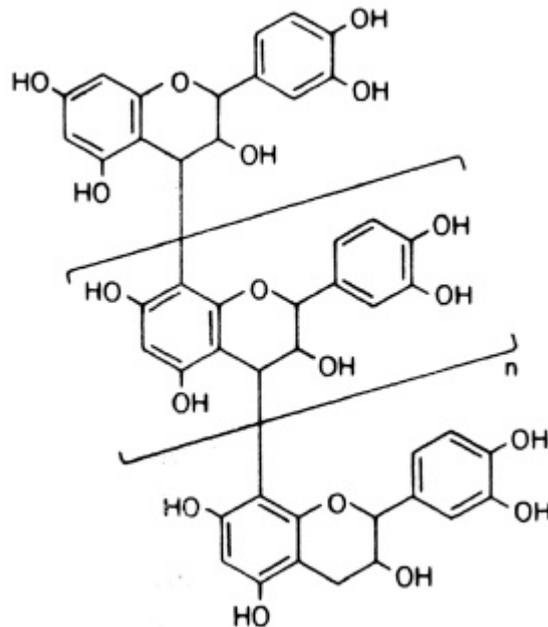


Abbildung 1.3 Strukturformel eines Proanthocyanidins (CT) mit 4,8-Verknüpfung (Hagerman und Butler 1991). $n = 1 - 10$

1.3.2.2 Biologische Aktivität der Tannine

Die hohe Bindungsfähigkeit an Makromoleküle und Metallionen ist Ursache für die vielseitigen biologischen Wirkungen der Tannine (Barry und McNabb 1999, Van Soest 1994, Haslam 1989). Tannine werden als antinutritive Faktoren angesehen. Sie können andererseits aber auch einen gesundheitsfördernden Effekt haben, da sie z.B. über ein antioxidatives Potential verfügen (Hagerman *et al.* 1998, Lodovici *et al.* 2001). Sie werden sogar als Bestandteile in pharmazeutischen Produkten genutzt (Haslam 1989).

Ernährung und Gesundheit der Tiere und Menschen können durch die adstringierende

Wirkung der Tannine beeinträchtigt werden (Bate-Smith 1973). Folgende Eigenschaften sind dafür ausschlaggebend (Harborne 1995, Van Soest 1994):

1. Hemmung von Verdauungsenzymen (Bravo 1998, Fish und Thompson 1991, Oh *et al.* 1985)
2. Bildung von unverdaulichen Komplexen mit Nahrungsproteinen (Kumar und Singh 1984, Robbins *et al.* 1987, Salawu *et al.* 1997, Terrill *et al.* 1992) bzw. Herabsetzen der Nutzbarkeit der verdauten und adsorbierten Nährstoffe (Butler 1989a)
3. Verlangsamung des Wachstums (Barry und McNabb 1999, Donnelly und Anthony 1969, Kumar und Singh 1984, Mehansho *et al.* 1987a)
4. Hemmung der Mikrobenflora (Bravo 1998, Chung *et al.* 1998a, Getachew *et al.* 2000)

Bei nichtangepassten Tieren wurde verminderte Nahrungsverdaulichkeit und eine erhöhte Mortalitätsrate beobachtet. Hamster (*Mesocricetus auratus*), denen man eine Nahrung mit 4 % Tannin aus der Mohrenhirse (*Sorghum*) verabreichte, litten unter erheblichen Gewichtsverlust und starben innerhalb von drei bis 21 Tagen (Mehansho *et al.* 1987b). Bei Ratten (*Rattus norvegicus*), Hühnern (*Gallus domesticus*), Schweinen (*Sus scrofa*) und Rindern wurde nach Tanninfütterung eine herabgesetzte Verdaulichkeit der Nahrung beobachtet. Küken zeigten Beinabnormitäten und verloren die Fähigkeit, aufrecht zu stehen (Butler *et al.* 1986). Kudu-Antilopen sowie Weißwedel- und Maultierhirsch zeigten hohe Mortalitätsraten, als sie wegen jahreszeitlichen Nahrungsmangels auf tanninreiches Futter umsteigen mußten (Abel *et al.* 1995, Laycock 1978).

Ein hoher Gehalt an kondensierten Tanninen (76 - 90 g CT/kg Trockenmasse) führte bei Schafen zu einer verringerten Wachstumsrate und einem reduzierten Wollwachstum (Barry und McNabb 1999, Terrill *et al.* 1992). Neben dem Einfluss auf den Pansenmetabolismus können Tannine bei Wiederkäuern den Zelluloseabbau beeinträchtigen, das Wachstum und die Morphologie der Bakterien beeinflussen und die Proteolyse hemmen (Kumar und Singh 1984). Im Gegensatz zu oben genannten Wirkungen konnte bei mittleren Konzentrationen an CT (30 - 40 g/kg Trockenmasse) in der Nahrung der Schafe eine erhöhte Aufnahme von essentiellen Aminosäuren aus dem Dünndarm, ein stärkeres Wollwachstum, eine gesteigerte Milchsekretion und eine erhöhte Reproduktionsrate gefunden werden (Barry und McNabb 1999).

Epidemiologische Studien stellten ein erhöhtes Auftreten von Ösophaguskrebs in Gebieten mit überdurchschnittlichem Teegenuss fest und führten das auf die Wirkung der im Tee enthaltenen Tannine zurück (Morton 1972). Allerdings wurden auch antikarzinogene und

antimutagene Wirkungen der Tannine beschrieben (Chung *et al.* 1998b). Verschiedenen anderen physiologisch nachteiligen Effekten der Tannine, wie z.B. Hepatotoxizität, Blutverklumpung und Beeinflussung der Immunantwort (Chung *et al.* 1998b, Zhu und Filippich 1992) stehen gesundheitsfördernde Eigenschaften gegenüber. Zu ihnen gehören neben der oben erwähnten antioxidativen Wirkung (Hagerman *et al.* 1998, Lodovici *et al.* 2001) auch eine Inhibierung der Cyanogenese (Bernays *et al.* 1989), eine gesteigerte Aufnahme essentieller Aminosäuren (Barry und McNabb 1999, Waghorn *et al.* 1987), ein Verhindern der Blähsucht bei Wiederkäuern (Jones *et al.* 1973, Reid *et al.* 1974) und eine höhere Toleranz gegenüber Wurmparasiten bei Lämmer und Ziegen (Kabasa *et al.* 1999, Niezen *et al.* 1998). Außerdem konnte eine Hemmung des Clostridienwachstums festgestellt werden, aus der eine mögliche Prävention gegen Enterotoxemien abgeleitet wurde (Aschfalk *et al.* 2000).

1.3.2.3 Tannine in Pflanzen

Der Gehalt an Sekundärmetaboliten variiert nicht nur zwischen den Pflanzenarten, sondern auch in jeder Pflanze selbst. Das ist abhängig vom Pflanzenteil, dessen Alter bzw. Reifegrad (Früchte) sowie vom Standort (Bryant *et al.* 1992, Owen-Smith *et al.* 1993). Viele höhere Pflanzen, vor allem Dikotyledonen, enthalten Tannine (Okuda *et al.* 1992, Van Soest 1988). Hervorzuheben sind (Haslam 1989):

- Hülsenfrüchte (*Leguminosae*, z.B. Akazien)
- Balsamgewächse (*Anacardiaceae*, z.B. Essig- und Quebrachobäume)
- Langfadengewächse (*Combretaceae*, z.B. Kirschkpflaumen)
- Mangroven (*Rhizophoraceae*, z.B. Mangrovenbaum)
- Myrtengewächse (*Myrtaceae*, z.B. Eukalyptus)
- Knöterichgewächse (*Polygonaceae*, z.B. Canaigrewurzel).

Gräser produzieren nur wenig Sekundärmetaboliten (Cheeke und Palo 1995, Iason und Van Wieren 1997). Sechovic (1990) verglich Kräuter einer Naturwiese mit Futtergräsern und fand einen höheren Tanningehalt (5 - 10 g/kg) und eine höhere biologische Aktivität (Index für die Fähigkeit zur Bindung an Makromoleküle) in den Kräutern. Bei afrikanischen Savannenpflanzen fand (Owen-Smith *et al.* 1993) den höchsten Gehalt an CT in immergrünen Bäumen und Sträuchern. Obwohl versucht wird, den Tanningehalt von Futterpflanzen (Mais, Alfalfa) durch Züchtung zu verringern, enthalten einige (z.B. rote Weizenkleie), Gerstenkörner und Mohrenhirsesamen) Tannine, die sie vor Schädlingen schützen können (Van Soest 1988). Viele Samen der Leguminosen, z.B. Acker- und Gartenbohnen und die Fruchthülle der

Erdnuss haben einen hohen Tanningehalt (Van Soest 1994). In Eichen sind hydrolysierbare Tannine zu finden. Kondensierte Tannine traten nur in älteren Blättern in hohen Mengen auf (Harborne 1995). Tannine sind u.a. für den Geschmack von Bier, Tee und einigen Fruchtsäften verantwortlich. Zur Adstringenz, der Farbe und dem Geschmack des Rotweins tragen kondensierte Tannine aus der Schale der Beeren (Weintrauben) wesentlich bei (Van Soest 1988).

1.4 Tanninaufnahme durch Wiederkäuer

Über die maximal eingenommene Tanninmenge oder die Tanningehalte der natürlichen Nahrung von Wiederkäuern sind nur wenig Daten vorhanden. Durch Fütterungsversuche konnten vor allem Vermeidungsverhalten untersucht werden (Clauss 2002). Ablehnung oder Auswahl von tanninhaltigem Futter hing dabei nicht nur von der Tanninmenge ab.

Konzentratsselektierer: KS nehmen Tannine in Form von Blättern, Knospen und Früchten zweikeimblättriger Pflanzen auf. Gräser, die weniger Tannin enthalten (Scehovic 1990), machen nur einen Anteil von ca. 9 - 20 % aus (Stubbe 1997, Van Wieren 1996). Vom Reh, das in dieser Arbeit als Modelltier für die KS herangezogen wurde, ist bekannt, dass es trotz seines sehr breiten Nahrungsspektrums eine sehr spezialisierte Ernährungsweise zeigt. (Duncan *et al.* 1998, Stubbe 1997). Das Nahrungsspektrum erstreckt sich über mindestens 305 taxonomische Pflanzengruppen und ist von der durch Habitateigenschaften und Jahreszeit beeinflussten Erreichbarkeit abhängig (Tixier und Duncan 1996). In Laubwäldern in Westfrankreich machten eine kleine Anzahl an Pflanzen, unter ihnen Efeu (*Hedera helix*), Sternhyazinthe (*Hyacinthoides*), Hainbuche (*Carpinus*), Weißdorn (*Crataegus*) und Hartriegel (*Cornus*) 22 - 50 % der Nahrung der Rehe aus (Tixier *et al.* 1997). Kaluzinski (1982) fand, dass sechs von insgesamt 85 genutzten Pflanzen 66 % der von Rehen genutzten Futterbiomasse ausmachten. Außerdem konnte Tixier *et al.* (1997) eine Korrelation zur Futterqualität feststellen: Rehe bevorzugten Nahrung mit hohem Gehalt an löslichen Kohlenhydraten. Gleichzeitig wählten sie in einem Kurzzeitversuch (14 Tage) Pflanzen mit einem hohen Tanninanteil (Tixier 1996). Auch (Klötzli 1965) fand bei Rehen eine positive Korrelation zwischen der ausgewählten Pflanze und deren Tanningehalt (s.a. Duncan *et al.* 1998). Bei einem Auswahlversuch, bei dem Rehe zwischen pelletiertem Futter mit unterschiedlichem Tanningehalt wählen konnten, nahmen Rehe freiwillig einen bestimmten Gehalt an hydrolysierbarem Tannin aus der Kastanie (HT) auf (Verheyden-Tixier *et al.* 1999, Verheyden-Tixier und Duncan 2000). Er betrug 28 g HT pro kg pelletiertem Futter, überstieg 35 g HT pro kg Pellets nicht.

Intermediärtyp: Wiederkäuer, die dem intermediären Ernährungstyp angehören, sind wahrscheinlich in der Lage, Tannine aufzunehmen. Ziegen, denen bei einem Auswahlversuch unterschiedliche Kombinationen an proteinreichen bzw. -armen und tanninreichen bzw. -armen Futter angeboten wurde, bevorzugten die proteinreiche Kost, auch wenn sie einen hohen Tanningehalt hatte (Provenza und Malechek 1984).

Gras- und Rauhfutterfresser: GR haben mit ca. 75 % einen sehr hohen Grasanteil in ihrer Nahrung, wodurch sie mit Tanninen kaum in Berührung kommen (Van Wieren 1996). Von ihnen bevorzugte Dikotyledonen, wie Luzerne und Klee, enthalten keine Tannine (Owen-Smith 1996).

1.5 Schutzmechanismen der Wiederkäuer gegen pflanzliche Sekundärmetabolite

Herbivoren, die mit ihrer Nahrung gleichzeitig antinutritive Sekundärmetaboliten aufnehmen ohne Fitnessverlust zu erleiden, müssen über Mechanismen verfügen, die sie vor ernsten physiologischen Schäden schützen. Laycock (1978) stellte mögliche Adaptationstheorien zur Koexistenz von Abwehrstoff produzierenden Pflanzen einerseits und großen Pflanzenfressern andererseits (Koevolution) auf. Danach umgehen die Herbivoren die pflanzlichen Schutzmechanismen durch:

- eine generalisierte Futterwahl, durch die die Gesamtmenge eines Sekundärmetaboliten gering gehalten wird,
- die Fähigkeit der Detektion antinutritiver oder toxischer Sekundärmetaboliten und die Vermeidung der entsprechenden Pflanzen oder
- die Ausbildung spezifischer Detoxifikationsmechanismen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.5.1 Spezifische Detoxifikationsmechanismen

Wiederkäuer haben durch die Aktivitäten der Pansenbakterien eine Möglichkeit, auf pflanzliche Abwehrstoffe zu reagieren (Butler 1989b, Freeland und Janzen 1974). Auf Hawaii und Indonesien gibt es z.B. Wiederkäuer, die gegen den toxischen Sekundärmetabolit Mimosin der tropischen Weißfaden-Pflanze (*Leucaena leucophala*) resistent sind. Ihre Mägen enthalten anaerobe gram-negative Stäbchenbakterien, die Mimosin und dessen toxisches Stoffwechselprodukt 3-Hydroxy-4(III)-Pyridon (DHP) entgiften können (Cheeke und Palo 1995). Weiterhin wurden tannintolerante Rumenbakterien in einigen ostafrikanischen

Wiederkäuern und Tannin-Protein-Komplex-abbauende Pilze in Fäces von Rindern gefunden (Odenyo und Osuji 1998, Bhat *et al.* 1996). Auch andere Tiergruppen sind durch ihre Darmflora an Tannine angepasst. So wurden im Koala (*Phascolarctos cinereus*) Tannin-Protein-Komplex-abbauende Enterobakterien gefunden (Osawa 1992).

Bei der Detoxifizierung sind eine Reihe von Enzymen, darunter Oxidasen (z.B. Cytochrom P450), Reduktasen, Hydrolasen und Transferasen von Bedeutung. Die Toxine werden dabei katabolisiert, oder sie werden in eine wasserlösliche Form überführt, die ausgeschieden werden kann (Brattsten 1992). Die Detoxifizierungsreaktionen finden vor allem in der Leber statt (Cheeke und Palo 1995). Die Größe der Leber kann als Index für die physiologische Kapazität von Detoxifizierungsmechanismen herangezogen werden (Duncan *et al.* 1998). Hofmann (1993) fand in KS höhere Lebergewichte als in anderen untersuchten Ernährungstypen. Sie ist mit 1,9-2,6 % des Körpergewichts doppelt so groß wie beim GR. Daraus leitet er eine bessere Fähigkeit der KS ab, auf Sekundärmetaboliten zu reagieren.

Einen weiteren Detoxifikationsmechanismus, der bereits bei der Aufnahme der Nahrung einsetzt, stellt die Sekretion von tanninbindenden Speichelproteinen dar.

1.5.2 Tanninbindende Speichelproteine

Tanninbindende Proteine sind bisher im Speichel von Schwarzbären (*Ursus americanus*), Ratten, Mäusen (*Mus musculus*), Bibern (*Castor canadensis*), Wühlmäusen (*Microtus oeconomus*), Schneehasen (*Lepus timidus*) und Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) nachgewiesen worden (Asquith *et al.* 1985, Hagerman und Robbins 1993, Jansman *et al.* 1994, Juntheikki *et al.* 1996, Mehansho *et al.* 1985, Mehansho *et al.* 1987b, Mole *et al.* 1990). In Ratte und Maus konnte die Bildung der tanninbindenden Proteinen durch Tanningabe induziert werden (Jansman *et al.* 1994, Mehansho *et al.* 1983, 1985). Bei der Ratte ergaben Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung dieser Proteine einen Gehalt von 42 % Prolin, 25 % Glutamat und 24 % Glycin. Außerdem fehlten aromatische und schwefelhaltige Aminosäuren (Mehansho *et al.* 1983). Ein Prolingehalt von 16 - 44 % verbunden mit einem hohen Anteil an Glutamat und Glycin ist charakteristisch für prolinreiche Proteine (PRPs) (Bennick 1982, Carlson 1993).

KS und IM nehmen mit ihrer Nahrung einen hohen Tanninanteil auf, ohne gesundheitliche oder verdauungshemmende Nachteile zu erleiden (Duncan *et al.* 1998, Owen-Smith 1996, Robbins *et al.* 1987, Verheyden-Tixier und Duncan 2000). Die im Vergleich zu anderen Wiederkäuern großen Speicheldrüsen (vergl. Kap. 1.1.1) sind möglicherweise Produktionsort tanninbindender Speichelproteine (Hofmann 1989, Ramisch 1978). Bisher wurden

tanninbindende Proteine im Speichel von einigen wenigen Konzentratselektierern gefunden. Im Maultierhirsch (*Odocoileus hemionus*) wurde ein tanninbindendes Protein mit einem Prolingehalt von 19 % nachgewiesen (Austin *et al.* 1989). Der Prolingehalt der tanninbindenden Proteine des Weißwedelhirsches (*Odocoileus virginiana*) beträgt nur 7 % (Mole *et al.* 1990). Des Weiteren konnte die Produktion von tanninbindenden Proteinen bei Elch und Reh gezeigt werden (Fickel *et al.* 1998, Hagerman und Robbins 1993, Juntheikki 1996). Diese wurden jedoch hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung bisher nicht untersucht.

1.6 Funktion, Vorkommen und Struktur prolinreicher Proteine (PRPs)

Funktion: McArthur *et al.* (1995) erklären in einer Übersichtsarbeit die Vielzahl an Strukturen und Sekretionsraten der prolinreichen Speichelproteine mit deren multifunktionaler Natur. Es wird die Hypothese vertreten, dass die Evolution der PRPs im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Mundraumfunktionen (orale Homeostase) steht. Die Tanninbindung stellt eine abgeleitete sekundäre Funktion dar, die spezialisierten Ernährungstypen die Aufnahme von tanninhaltigen Pflanzen erlaubt.

PRPs tragen nach dieser Hypothese bei niedrigem Sekretionslevel zur oralen Homeostase bei. Die beinhaltet vor allem die Regulation des Kalziumhaushaltes. Durch die Fähigkeit der an den Zahnschmelz angelagerten PRPs, Kalziumphosphate zu binden, kann eine schützende Umgebung für die Zähne gewährleistet werden (Bennick *et al.* 1983, Johnsson *et al.* 1993, Moreno *et al.* 1979, Schupbach *et al.* 2001). Glykosylierte PRPs dienen dem Gleitfähig-machen der Nahrung (Lubrikation) (Hatton *et al.* 1985). Die Lubrikation erleichtert sowohl den Kauvorgang als auch den Schluckprozess. Die Aggregation von Bakterien ist eine weitere Funktion, die PRPs bei der oralen Homeostase ausüben (Bennick 1982, Foley und McArthur 1994).

Bei hohen Sekretionsleveln erfolgt die Bindung der PRP an die in der Nahrung vorkommenden Tannine (McArthur *et al.* 1995). Die dadurch gehemmte Bindung zwischen den Tanninen und den Nahrungsproteinen bzw. Verdauungsenzymen ermöglicht eine hohen Energiegewinn aus der Nahrung. Die Tannin-Protein-Wechselwirkungen sind sowohl für die Tannine als auch die Proteine spezifisch (Asquith und Butler 1986, Hagerman und Robbins 1993, Lu und Bennick 1998). Funktionale Zusammenhänge zwischen sekretorischen Proteinen und der Bindung an die Tannine kann durch verschiedene methodische Ansätze nachgewiesen werden:

- Induktion prolinreicher Speichelproteine durch tanninhaltige Nahrung (Asquith *et al.* 1985, Jansman *et al.* 1994, Mehansho *et al.* 1983, Mehansho 1992)

- qualitativer Nachweis der Bindung durch Verdunklung der Proteinbanden oder des scheinbaren Molekulargewichts (mobility shift) im Polyacrylamidgel (Austin *et al.* 1989, Hagerman und Klucher 1986, Juntheikki 1996)
- quantitative Bestimmung der Tanninbindungskapazität durch Proteinpräzipitationsassays bzw. Tanninbindungsassays (Asquith und Butler 1985)

Vorkommen: Prolinreiche Proteine wurden im Speichel zahlreicher Arten nachgewiesen (Tabelle 1.2). Der Anteil der PRPs an den Speichelproteinen beträgt bei der Ratte ca. 50 % und beim Menschen ca. 66 % (Kauffman und Keller 1979, Muenzer *et al.* 1979). Sie konnten aus der Ohrspeichel- (*Glandula parotis*) und der Unterkieferdrüse (*Glandula submandibularis*) isoliert werden (Mehansho *et al.* 1987a). Kleinere Mengen an PRPs, deren genaue Funktionen jedoch unbekannt sind, wurden außerdem im Pankreas (Ito *et al.* 1983) und im menschlichen Tracheo-Bronchialsekret (Warner und Azen 1984) gefunden.

Eigenschaften: PRPs sind eine Proteinfamilie mit vielen Besonderheiten. Eine davon ist die fehlende oder nur geringe Adsorption bei 280 nm und ihre Löslichkeit in Trichloressigsäure (Bennick 1982, Butler *et al.* 1986, Carlson 1993). PRPs werden in saure und basische Proteine eingeteilt (Bennick 1982, McArthur *et al.* 1995). Saure prolinreiche Proteine haben einen isoelektrischen Punkt (pI) um 4,5 und ein N-terminales Peptid, das einen Anteil von 20 - 30 % am Protein hat und nicht prolinreich ist (Oppenheim *et al.* 1985, Wong und Bennick 1980, Ziemer *et al.* 1984). Sie gehören zu den PRPs mit geringerem Prolingehalt (16 - 30 %) (McArthur *et al.* 1995). Saure PRPs können phosphoryliert und glykosyliert sein (Bennick 1982, Carpenter und Proctor 1999). Der Prolingehalt der basischen prolinreiche Proteine beträgt ca. 40 %, ihr pI liegt über neun und sie können glykosyliert sein (Carpenter und Proctor 1999).

Struktur: PRP haben eine offene Tertiärstruktur, die vor allem durch die helixbrechenden Proline hervorgerufen wird. Die Ausbildung von Disulfidbrücken ist wegen der Abwesenheit von Cystein nicht möglich (McArthur *et al.* 1995).

Genetik: Von einigen PRPs ist die Nukleinsäuresequenz bekannt. Beim Menschen wurden bisher Sequenzen von bis zu 20 PRP gefunden (Azen *et al.* 1984, Carlson 1993, Kim *et al.* 1993, Maeda *et al.* 1985, Minaguchi und Bennick 1997, Stubbs *et al.* 1998). Außerdem sind die PRP-Sequenzen des Makaken (*Macaca fascicularis*, Ann und Lin 1993, Lin *et al.* 1991), des Hamsters (Ann *et al.* 1987), der Ratte (Clements *et al.* 1985, Ziemer *et al.* 1984) und der Maus (Ann und Carlson 1985, Clements *et al.* 1985) bekannt. PRPs können in vier Regionen unterteilt werden (Carlson 1993, Clements *et al.* 1985, Abb. 1.4). Dazu gehören ein putatives

Tabelle 1.2 Übersicht über Vorkommen und Prolingehalt von prolinreichen Speichelproteinen (PRPs). Aussagen über die Tanninbindungsfähigkeiten der Proteine lagen nicht immer vor. Für die prolinreichen Speichelproteine von Schwein, Rind und Opossum wurden geringe Tanninbindungsfähigkeiten gemessen (Mole et al. 1990).

<i>Tier</i>	<i>Prolingehalt</i>	<i>Referenz</i>
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	27 - 41 %	Bennick und Connell 1971 Kauffman und Keller 1979 Azen et al. 1984
Makake (<i>Macaca fascicularis</i>)	31 %	Ann und Lin 1993 Lin et al. 1991 Oppenheim et al. 1985
Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)	25 - 40 %	Muenzer et al. 1979 Clements et al. 1985
Maus (<i>Mus musculus</i>)	29 - 46 %	Ann und Carlson 1985 Asquith et al. 1985 Clements et al. 1985
Hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	20 - 31 %	Mehansho et al. 1987b
Schwein (<i>Sus crofa domestica</i>)	46 %	Mole et al. 1990
Koala (<i>Phascolarctos cinereus</i>)	31 %	Mole et al. 1990
Schneehase (<i>Lepus timidus</i>)	19 %	Mole et al. 1990
Kaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	13 - 21 % hoher Gly- und Glx-Gehalt	Rajan und Bennick 1983 Spielman und Bennick 1989 Mole et al. 1990
Schaf (<i>Ovis ammon</i>)	20 %	Mole et al. 1990
Maultierhirsch (<i>Odocoileus hemionus</i>)	20 %	Austin et al. 1989
Rind (<i>Bos taurus</i>)	57 %	Mole et al. 1990
Opossum (<i>Pseudocheirus perigrinus</i>)	31 %	Mole et al. 1990

Signalpeptid, eine Übergangsregion, eine Wiederholungsregion und ein carboxylterminales Ende. Die Proline treten überwiegend in repetitiven Sequenzen in der Wiederholungsregion auf.

Signalpeptid	1 MLVVLFTVALLALSS
Übergangsregion	16 AQQPREELQNQIQIPNQR 34 PPPSGFQPRPPVNGSQQG
Wiederholungsregion	52 PPPPGGPQPRPPQG 66 PPPPGGPQPRPPQG 80 PPPPGGPQPRPPQG 94 PPPPGGPQPRPPQG 108 PPPPGGPQPRPPQG 122 PPPPGGPQPRPPQG 136 PPPPGGPQLRPPQG 150 PPPPAGPQPRPPQG 164 PPPPGGPQPRPPQG 178 PPTT-GPQPRPPQG 191 PPPTGGPQQRPPQG 205 PPPPGGPQQRPPQG 219 PPPPGGPQPSPTQG
Carboxylterminales Ende	233 PPPTGGPQQTPPLAGNTQG 252 PPQGRPQGPRSTOP

Abbildung 1.4 Aminosäuresequenz und Struktur eines glykosylierten PRPs der Maus (Carlson 1993).

Die PRPs der Speicheldrüsen von Säugetieren sind als Multigenfamilien codiert (Carlson 1993). Beim Menschen wurden 6 Genloci auf dem Chromosom 12 nachgewiesen. Zwei davon sind für die Bildung saurer PRPs verantwortlich; basische und glykosylierte PRP sind auf den anderen vier Loci codiert (Carlson 1993, Kim *et al.* 1993). Homologe ungleiche Crossover-Ereignisse und post-translationale Proteolyse führen zu einem ausgeprägten Polymorphismus der PRPs (Azen 1993, Lyons *et al.* 1988).

Die Regulation der Synthese und Sekretion der PRPs erfolgt wahrscheinlich β -adrenerg über die Aktivierung der Adenylatcyclase (Ann und Lin 1993, Mehansho 1992).

2 Methoden

2.1 *Probenmaterial*

2.1.1 Gesamtspeichel

Die Gesamtspeichelproben stammten von 11 **Rehen** und vier **Mufflons** der Feldstation des Instituts für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Niederfinow. Die Entnahme des Speichels erfolgte während der regelmäßigen Behandlung der Tiere zur Vitamin- und Antibiotikaversorgung, bei der die Rehe wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben narkotisiert wurden. Die Entnahme von Mufflonspeichel erfolgte ohne Narkose. Der Speichel wurde in 50 ml-Röhrchen aufgefangen oder der Mundraum mit Baumwolltupfern ausgewischt. Durch Zentrifugation mit einer Salivette (Sarstedt, Nümbrecht) wurde der Speichel aus den Tupfern gewonnen. Der unter Narkose entnommene Gesamtspeichel von sieben **Moschusochsen** und zwei **Rentieren** (3 mg/Tier Ethorphan-Hydrochlorid in Kombination mit 20 mg/Tier Xylazin-Hydrochlorid) wurde vom Institut für Arktische Tiermedizin der Norwegischen Hochschule für Veterinärwissenschaften (Tromsø Norwegen) zur Verfügung gestellt. Der Speichel von sieben weiblichen **Damhirschen** wurde im Gut Hirschau (Bergholz, Brandenburg) ohne Narkose aus dem Mundraum der in der Fangvorrichtung gehaltenen Tiere entnommen und anschließend durch Zentrifugation mit Salivetten (20 min bei 5450 x g, 12 °C) gewonnen. Aus der Rinderklinik der Freien Universität Berlin stammen die Speichelproben von neun **Rindern**. Sie wurden ohne Narkose mit Hilfe von Baumwolltupfer aus dem Mundraum entnommen, die in Salivetten wie oben beschrieben zentrifugiert wurden. **Humaner Speichel** wurde von sechs Mitarbeitern des IZW bereitgestellt. Einen Überblick über das Probenmaterial bietet Tab. 2.1.

2.1.2 Parotisspeichel

13 Rehe (Wildfänge) aus dem Nationalreservat in Chizé, Südwest-Frankreich, Département Deux-Sèvres wurden durch intramuskuläre Gabe von Xylazin-Hydrochlorid (40 mg/Tier; RompunTM 10 %, BayerVital GmbH Co. KG, Leverkusen) in Kombination mit Ketamin-Hydrochlorid (80 mg/Tier; KetaminTM 10 %, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen) immobilisiert. Während der Narkose erfolgte eine Sauerstoffbeatmung mit 1,5 – 2 % Isofluran (Isofluran-Baxter, Baxter GmbH, Unterschleißheim). Die Entnahmen von Parotisspeichel erfolgten durch den verantwortlichen Tierarzt mit einer von am IZW entwickelten nicht-invasiven Methode (Fickel *et al.* 1998, Göritz *et al.* 1994). Unter

Tabelle 2.1 Herkunft des untersuchten Gesamtspeichels. KS – Konzentratsselektierer, IM – Intermediärtyp, GR – Gras- und Rauhfutterfresser. n - Anzahl der Tiere/Personen

<i>Tierart</i>	<i>Familie - Unterfamilie</i>	<i>Typ</i>	<i>n</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Nar- kose</i>
Reh <i>Capreolus capreolus</i>	Cervidae - Odocoileinae	KS	11	Feldstation des IZW in Niederfinow	+
Rentier <i>Rangifer tarandus</i>	Cervidae - Odocoileinae	IM	2	Institut für Arktische Tiermedizin der Norwegischen Hochschule für Veterinärwissenschaften, Tromsø Norwegen	+
Damwild <i>Dama dama</i>	Cervidae - Cervinae	IM	8	Gut Hirschau, Birkholz, Brandenburg	-
Moschusochse <i>Ovibos moschatus</i>	Bovidae - Caprinae	GR	6	Institut für Arktische Tiermedizin der Norwegischen Hochschule für Veterinärwissenschaften, Tromsø Norwegen	+
Mufflon <i>Ovis orientalis musimon</i>	Bovidae - Caprinae	GR	4	Feldstation des IZW in Niederfinow	-
Rind <i>Bos taurus</i>	Bovidae - Bovinae	GR	9	Rinderklinik, Freie Universität Berlin	-
Mensch <i>Homo sapiens sapiens</i>	Hominidae - Homininae		6	Feldstation des IZW in Niederfinow	-

endoskopischer Sichtkontrolle (Karl Storz GmbH & Co., Tuttlingen) wurden spezielle Katheter und Führungsdrähte (Vygon, Aachen) direkt in die Papille des Ductus parotideus eingeführt. Zur anschließenden Stimulation des Speichelflusses erfolgte die Injektion von beidseitig jeweils 3 mg Pilocarpin-Hydrochlorid (Parasympathomimetikum, Augentropfen 2%, Chauvin Ankerpharm GmbH, Rudolstadt) in das Ohrspeicheldrüsengewebe. Der Speichelfluss setzte 1-2 min nach Injektion ein. Durch die eingeführten Katheter wurde reiner, unkontaminierter Parotisspeichel gewonnen und in sterile Plastikröhrchen geleitet. Bei Versiegen des Speichelflusses, spätestens nach 55 min, wurde die Prozedur beendet. Die Narkose wurden durch intravenöse Gabe von Atipamezolhydrochlorid (0,1 mg/mg Xylazin; AntisedanTM, Pfizer GmbH, Karlsruhe) antagonisiert. Der entnommene Speichel wurde sofort auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Verlauf der Speichelgewinnung wurde aufgezeichnet. In Abbildung 2.1 ist die durchschnittliche Flussrate

des Speichels der 13 Rehe abgebildet. Sie nimmt nach anfänglicher relativ hoher Flussrate von 3,8 ml/min kontinuierlich ab (auf 1,6 ml/min).

Wie oben beschrieben wurde auch Parotisspeichel von drei Elchen des Kolmården Safari Parks, Schweden, gewonnen. Die Narkose erfolgte durch Gabe von 250 mg Xylazin-Hydrochlorid/Tier in Kombination mit 400 mg Ketamin-Hydrochlorid/Tier.

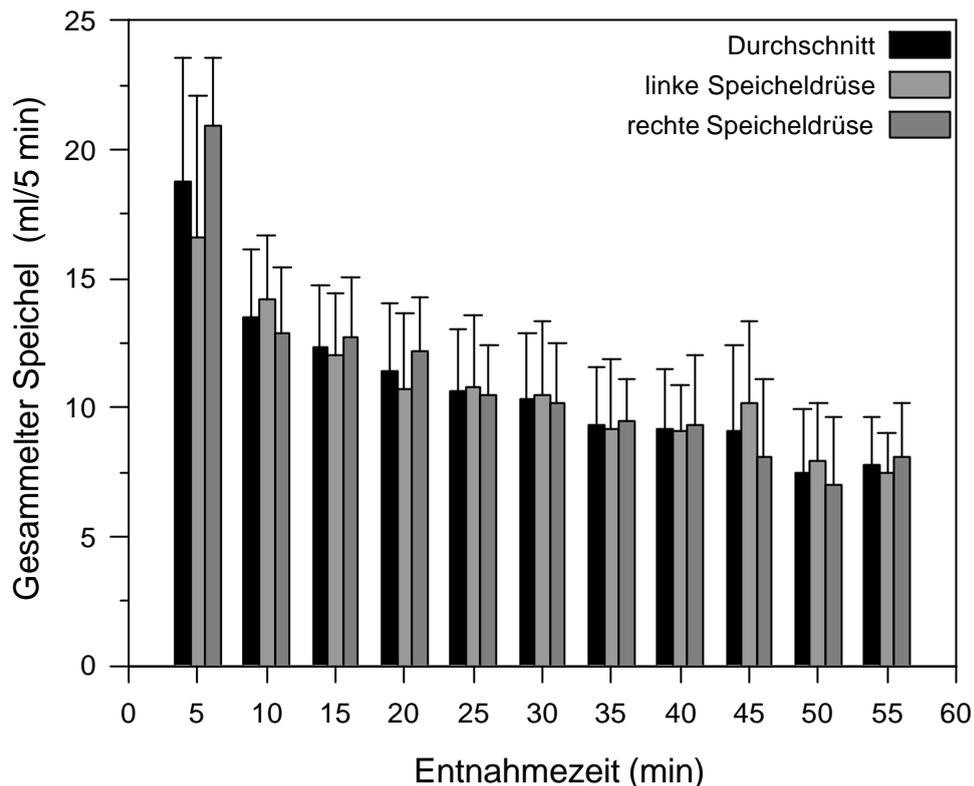


Abbildung 2.1 Pilocarpin-stimulierte Parotisspeichelentnahme bei 13 Rehen. Der Speichelfluss beider Ohrspeicheldrüsen (Parotis) wurde alle 5 min aufgezeichnet.

2.1.3 Mischspeichel

Als Mischspeichel wird im Weiteren der Speichel bezeichnet, der sich im Mundraum sammelte, während aus beiden glandulae parotis der Rehe Speichel gewonnen wurde (Kap. 2.1.2). Er besteht aus Speichel der übrigen Drüsen (glandulae sublingualis, mandibularis, labiales, buccales und linguales). Der Mischspeichel wurde in einer Schale aufgefangen und dann in 50 ml-Röhrchen bei -20 °C aufbewahrt. Gesamtspeichel ist demnach die Summe von Parotis- und Mischspeichel.

2.1.4 Gefriertrocknen des Parotisspeichels

Etwa 300 ml Parotisspeichel des Rehs wurden in 500 ml Rundkolben gegeben und in einem Methanol-Trockeneis-Bad an der Gefäßwand eingefroren. Der Kolben wurde an den Anschluss eines Lyophilisationsgerätes (Alpha 2-4, Christ, Osterode) angesetzt und das Vakuum der Bedienungsanleitung folgend angelegt. Die Proben wurden bis zum Erreichen der Trockenheit mindestens aber ü. N. am Gerät gelassen.

2.1.5 Entsalzen des Speichels

Die Proben wurden mit Centricons YM3 (Millipore, Eschborn) entsalzt, deren Filter eine Porengröße von 3000 Dalton (MWCO) hatten. Bis zu 500 µl des Speichels wurden in den Filtereinsatz des Centricons gegeben und bei 8 °C und 5450 x g bis zu einem Restvolumen von ca. 50 µl 20 - 40 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit Aqua dest. aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Dann wurde der Filtereinsatz umgedreht in ein neues Probenröhrchen gesteckt. Die entsalzten Proben wurden durch kurze (5 min, 8 °C) Zentrifugation bei 50 x g gewonnen.

2.2 **BCA-Methode zur Proteinbestimmung**

Bei der BCA-Methode nach Smith *et al.* (1985) wurden 10 µl des Standards bzw. der Probe in ein Mikrotiterplattenloch gegeben. Nach Zugabe von 150 µl BCA-Lösung wurde die Platte bei 37 °C 30 min inkubiert. Die Absorption wurde im Mikrotiterplattenreader (SLT Spectra, SLT Laborinstrumente, Crailsheim) bei 492 nm gemessen.

Die Bestimmung der Proteinmenge ist eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Bestimmung der Tanninbindungskapazität. Schwierigkeiten ergeben sich bei Methoden, die Rinderserumalbumin (BSA) als Eichprotein (Standard) heranziehen. Sie ergeben sich vor allem dann, wenn dessen Aminosäurezusammensetzung sehr stark von der der untersuchten Proteine abweicht. Viele kostengünstige und schnelle Labormethoden basieren auf der Messung der Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninmengen, die in prolinreichen Proteinen relativ selten sind. Die Anwendung anderer Messmethoden, die z.B. auf der Messung des Stickstoffanteils oder auf Absorptionsmessungen (bei Proteinen mit bekanntem Emissionskoeffizienten) beruhen, führt zu genaueren Ergebnissen. Solche Methoden sind oft teuer, langwierig oder wenig sensitiv. In dieser Arbeit wurde bei der Bearbeitung von Proteingemischen und für eine Abschätzung der Proteinmenge die BCA-Methode angewandt. Für die Messung der Tanninbindungskapazität der isolierten Proteine (Kap. 2.4.1) wurden die durch Aminosäuretotalanalyse (Kap. 2.5) ermittelten Proteinmengen verwendet.

BCA-Lösung	Lösung A : Lösung B = 50:1
Lösung A	1 % (w/v) 4,4'-Dicarboxy-2,2'-biquinolin-Na ₂ ; 2 % (w/v) Na ₂ CO ₃ ; 0,16 % (w/v) Na ₂ – Tartrat; 0,4 % (w/v) NaOH; 0,95 % (w/v) NaHCO ₃
Lösung B	4 % (w/v) CuSO ₄

2.3 Tanninbindungsassay

Der Tanninbindungsassay nach Fickel *et al.* (1999) stellt eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Tanninbindungskapazität eines Proteins dar. Im Gegensatz zum häufig verwendeten Proteinpräzipitationsassay (pH 4,8, Asquith und Butler 1985, Bacon und Rhodes 2000) erfolgt die Messung bei einem dem Speichel entsprechenden pH-Wert von 8,2. Der Assay beruht auf der Konkurrenz zwischen Testproteinen und Trypsin um die Bindung an Tannine. Trypsin spaltet das Substrat N α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid (BAPNA, Abb. 2.2) unter Bildung eines photometrisch messbaren Produktes. Diese Reaktion wird durch die Tannine gehemmt. In Anwesenheit von tanninbindenden Proteinen wird die Hemmung wieder aufgehoben. Der dadurch messbare Absorptionswert ist proportional zur Trypsinaktivität. Für die Bestimmung der Tanninbindungskapazität sind im wesentlichen drei Reaktionen nötig, die in Abbildung 2.3 dargestellt sind. Bei der Indikatorreaktion ergibt sich der höchstmögliche Wert durch die ungehemmte Messung der Trypsinaktivität in Abwesenheit von Tanninen oder Speichelproteinen. Den kleinstmöglichen Wert erhält man bei Zugabe der Tannine (Hintergrundreaktion). In einem dritten Ansatz in Gegenwart von tanninbindenden Speichelproteinen bildet sich ein löslicher Tannin-Protein-Komplex, der bewirkt, dass Trypsin freigesetzt wird (Probenreaktion). Die Menge des durch Substratspaltung entstehenden Farbprodukts ist proportional zum Bindungsvermögen der Proteine und kann photometrisch gemessen werden. Die Messungen der relativen Bindungskapazität kann sowohl mit hydrolysierbaren als auch mit kondensierten Tanninen erfolgen.

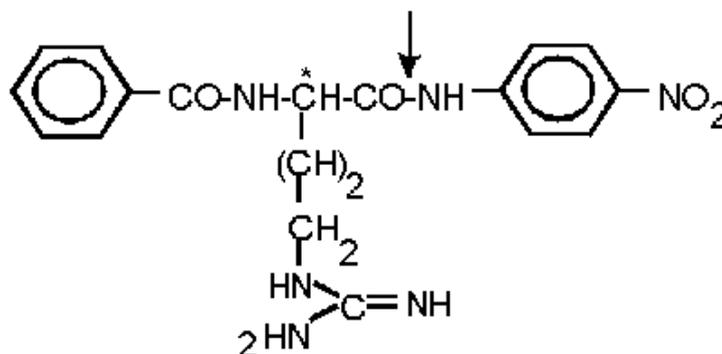


Abbildung 2.2 BAPNA, das Substrat im Tanninbindungsassay. Der Pfeil zeigt die Spaltungsstelle des Trypsins.

Zur Messung der Tanninbindungskapazität wurden zunächst 100 μl Vorinkubationsmix in jedes Loch der Mikrotiterplatte gegeben. Die Indikatorreaktion wurde ohne Tannine und Speichelproteine, die Hintergrundreaktion ohne Speichelproteine durchgeführt. Als hydrolysierbares Tannin wurde Tanninsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim) und als kondensierbares Tannin Quebracho eingesetzt. Quebracho wurde von Dr. McArthur (Hobart, Neuseeland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Als Vergleichsproteine wurden menschlicher Speichel und das unspezifisch bindende BSA eingesetzt.

Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 μl 1 mM N-Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid (BAPNA, Substrat) hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im PCR-Express (Hybaid Limited, GB) für 20 min und wurde nach 20 min mit 50 μl 3 % Essigsäure gestoppt. Die Speichelproteine wurden auf drei Platten mit je zwei Ansätzen vermessen. Die Absorptionmessung erfolgte im Mikrotiterplattenreader (SLT Spectra, SLT Laborinstrumente) bei 405 nm. Die Absorptionwerte wurden ins Verhältnis zum höchst- und kleinstmöglichen Wert gesetzt und die Tanninbindungskapazität wurden als Einheiten der Trypsinaktivität in % des Maximalwerts angegeben.

Vorinkubations- mix	90 mM Tris-HCl (pH 8,2); 18 μM CaCl_2 ; 100 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin; 50 $\mu\text{g/ml}$ Tannin; 10 $\mu\text{g/ml}$ entsalzter Speichel- oder Vergleichsproteine
--------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

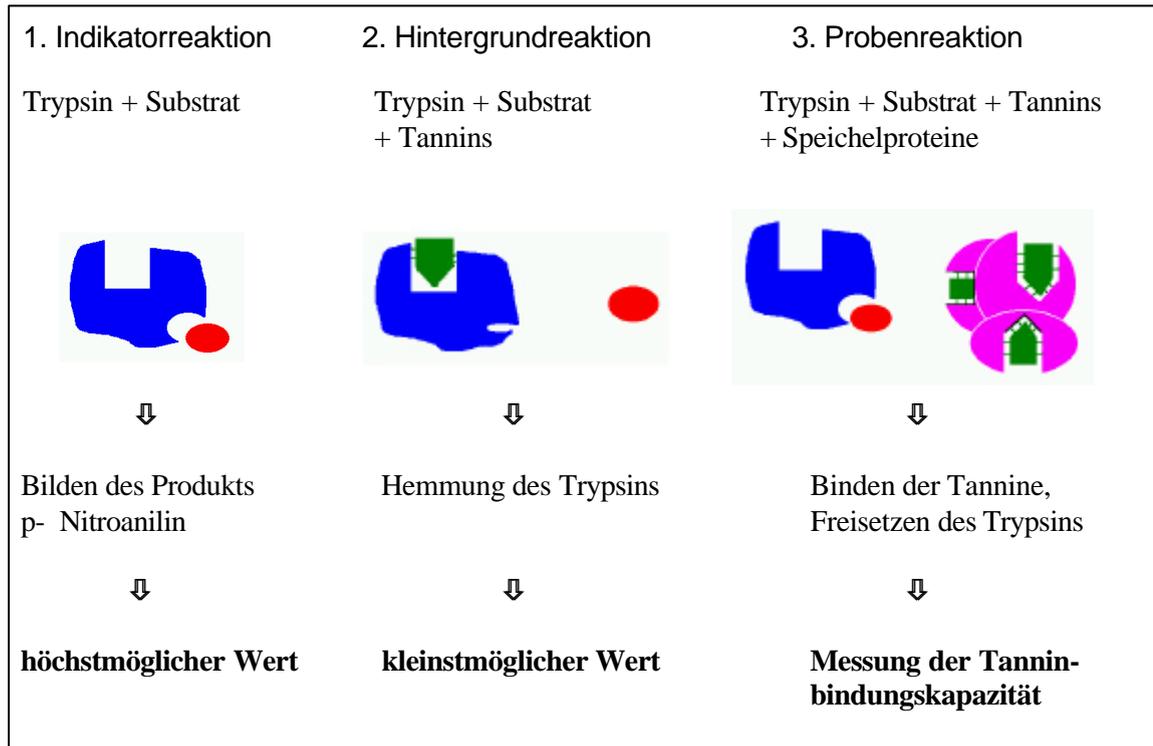


Abbildung 2.3 Schema des Tanninbindungsassays nach Fickel (1999).

Zur statistischen Auswertung des Tanninbindungsassays wurden die Programme SPSS 9 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und SYSTAT 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Unterschiede in den Bindungskapazitäten der einbezogenen Wiederkäuerspezies wurden für jedes Tannin mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Darüber hinaus wurden die Spezies paarweise verglichen (post-hoc-Tests). Für die post-hoc-tests werden keine p-Werte angegeben, sondern nur die Information über die Signifikanz. Ferner wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für jede Tierart geprüft, ob sich die Bindungskapazitäten der Speichel der Individuen an Tanninsäure und Quebracho unterschieden. Als Signifikanzniveau wurde generell $\alpha=0.05$ verwendet. Die hier analysierten Stichproben von Tieren konnten nicht zufällig aus Populationen gezogen werden. Insofern sind die Ergebnisse aller statistischen Analysen inklusive gefundener „Signifikanzen“ als explorative Resultate zu betrachten. Die statistischen Verfahren dienen zur Objektivierung der gefundenen Tatbestände, haben aber keine Beweiskraft für ganze Populationen.

2.4 Isolierung prolinreicher Speichelproteine

2.4.1 Fällung mit Trichloressigsäure

Die TCA-löslichen Proteine der verschiedenen Wiederkäuer wurden mit Hilfe der TCA-Fällung in Anlehnung an Austin *et al.* (1989) und Joest (1998) aus vereintem Speichel von jeweils drei Elchen, fünf Rehen, sechs Moschusochsen, acht Damhirschen und neun Rindern isoliert. 400 µl Speichel (1 g/l) wurde mit der gleichen Menge gekühlter 10%iger (w/v) TCA-Lösung versetzt und 20 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die TCA-unlöslichen Proteine durch 10minütige Zentrifugation bei 10000 x g und 8 °C abgetrennt.

Außerdem wurden TCA-lösliche Proteine aus dem Parotisspeichel von 13 Rehen isoliert. Ca. 5 g des gefriergetrockneten Parotisspeichels wurden in 100 ml eisgekühlter 5%iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) aufgenommen und 20 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurde bei 8 °C 20 min bei 5450 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den TCA-löslichen Proteinen wurde nach Einstellung des pH-Werts mit NaOH auf pH 8,2 in einer Ultrafiltrationszelle (Model 8200, Millipore) entsalzt und eingengt (MWCO des Filters 3000 Dalton).

2.4.2 Gelfiltration

Die Auftrennung der TCA-löslichen Proteine des Rehspeichels erfolgte mittels Gelfiltration am FPLC[®]-Basis-System (Pharmacia) mit einer HP-Superdex 75-Säule. Die Gelfiltration wurde mit PBS bei einer Flussrate von 0,8 ml/min durchgeführt. Die Chromatogramme wurden bei 280 nm oder 214 nm aufgezeichnet. Die Moleküle des Gelfiltrationspeaks Nr. 1 (GF1) und 2 (GF2) wurden entsprechend ihrer Retentionszeit gesammelt.

Die Kalibrierung der Säule erfolgte vor dem Probenauftrag mit dem Low-molecular-weight-Gelfiltrationskit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), der die Standardproteine Albumin (Rinderserum, 67 kd), Ovalbumin (Hühnerei, 43 kd), Chymotrypsinogen A (Rinderpankreas, 25 kd) und Ribonuklease A (Rinderpankreas, 13,7 kd) enthielt.

PBS (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ mit NaOH auf pH 8,2 einstellen
----------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.5 Analyse der Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäuretotalanalyse wurde mit verschiedenen Speichelsorten des Rehs, mit Parotisspeichel des Elchs und mit TCA-löslichen Proteinen der in Tabelle 2.4 aufgeführten Wiederkäuer durchgeführt. Sie erfolgte durch die Firma Keck Biotechnology an der Yale Universität in den U.S.A. Da Prolin und Cystein bei der Auftrennung koeluieren wurde die Probe (ca. 10 µg, BCA-Methode, Kap. 2.2) zunächst mit Peroxyformsäure oxidiert. Nach der hydrolytischen Spaltung mit 100 µl 0,2 % Phenol in 6 M HCl, wurden die Aminosäuren auf einem Ionenaustauscher (Ionenaustauscher Model 6300, Beckman) analysiert.

Mit Hilfe der Aminosäuretotalanalyse kann aus den Molekulargewichten der Aminosäuren und deren Anteil im Molekül die eingesetzte Proteinmenge bestimmt und daraus auf die Konzentration in der Ausgangslösung geschlossen werden.

Tabelle 2.4 Ursprung der TCA-löslichen Proteingemische für die Aminosäuretotalanalyse. P – Parotisspeichel; GS - Gesamtspeichel

<i>Wiederkäuer</i>	<i>P</i>	<i>GS</i>
Reh	X	X
Elch	X	
Damhirsch		X
Moschusochse		X
Rind		X

2.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurde ein 12,5%iges Trenngel in Kombination mit einem 4%igen Sammelgel verwendet. Die entsalzten Proben wurden 4:1 mit Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Die so denaturierten und reduzierten Proben wurden in die Taschen des Polyacrylamidgels geladen (bis zu 20 µl). Als Standard wurde der Silver Stain SDS-PAGE Standart, Low Range (14 - 97 kd, SSL, BioRad, München) verwendet. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in 1 x Elektrophoresepuffer in einer vertikalen Gel-Apparatur (Mini Protean II Cell, BioRad) bei 35 mA (Spannungslimit 150 V) für ca. 2 h bis der Farbstoff des Ladepuffers den unteren Rand des Gels erreicht hat.

Trenngel	12,5 % (w/v) Acrylamid; 0,66 % (w/v) Bisacrylamid; 0,375 M Tris pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS, 0,66 % (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,13 % TEMED
Sammelgel	4 % (w/v) Acrylamid; 0,2 % (w/v) Bisacrylamid; 0,125 M Tris pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS, 0,033 % (w/v) Ammoniumpersulfat; 0,1 % TEMED
Ladepuffer	Roti [®] -Load reduzierend, 4-fach konzentriert (Karl Roth GmbH, Karlsruhe)
Elektrophorese-puffer (10 x)	50 mM Tris; 384 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS pH 8.3

2.6.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte wie in Kapitel 2.6.1 jedoch ohne SDS. Um die nativen Bedingungen zu erhalten, wurde auf den Denaturierungsschritt verzichtet. Die Acrylamid-Konzentration (w/v) des Trenngels betrug 15 % (0,7 % (w/v) Bisacrylamid). Die Trennung erfolgte bei 35 mA/Gel (Spannungslimit 100 V) für 1,5 h. Es stand kein MW-Marker zur Verfügung.

Nativer Ladepuffer	50mM Tris; 384 mM Glycin; 50 % Glycerol
---------------------------	-----------------------------------------

2.6.3 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Die Färbung der Proteinbanden im SDS-Gel erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250. Die Gele wurden für 1 h in Färbelösung geschwenkt und anschließend in der Entfärbelösung unter mehrfachem Wechsel der Flüssigkeit bis zum gewünschten Farbkontrast entfärbt. Nach der Dokumentation wurde das Gel auf einem Gelrahmen getrocknet.

Färbelösung	0,2 % (w/v) CBB R250; 30 % Methanol; 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	40 % Methanol; 10 % Essigsäure

2.6.4 Coomassie Brilliant Blue Färbung für prolinreiche Proteine

Prolinreiche Proteine können weder durch Silberfärbung noch durch herkömmliche Coomassie-Färbung dargestellt werden (Muenzer *et al.* 1979, Osset *et al.* 1989). Bei einer modifizierten Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250 wird durch ein geringeren Anteil an organischem Lösungsmittel im Entfärber eine Farbverschiebung (Metachromasie) hervorgerufen, die prolinreiche Proteine pink-violett erscheinen lässt (Beeley *et al.* 1991,

Humphreys-Beher und Wells 1984, Marshall *et al.* 1989). Andere Proteine bleiben durch blaue Banden identifizierbar.

Die Färbung erfolgte für 1 h in 60 °C warmer Färbelösung. Danach wurde mit 10 % Essigsäure bis zum Erscheinen der Proteinbanden entfärbt (meist ü.N.). Das Gel wurde nach Dokumentation entweder getrocknet oder für die Silberfärbung weiter entfärbt.

Färbelösung	0,1 % (w/v) CBB R250, 50 % Methanol und 10 % Essigsäure
--------------------	---------------------------------------------------------

2.6.5 Silberfärbung

Die Färbung erfolgte nach Heukeshoven *et al.* (1986) und Westermeier (1990). Nach der Fixierung (30 min) wurden die Gele weitere 30 min oder ü.N. in Inkubierungslösung geschüttelt. Anschließend wurden die Gele 3 x 5 min (bei ü.N. Inkubierung 4 x 5 min) mit Aqua dest. gewaschen und 20 min in Silberlösung inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in Aqua dest. (1 min) wurden die Gele bis zum Erscheinen der Proteine (3-7 min) entwickelt, wobei der Entwickler bei Bedarf nach 2-3 min ausgetauscht wurde. Die Entwicklung wurde mit 1 % (w/v) Glycinlösung gestoppt (10 min). Dann wurden die Gele für 1 h in Präservierungslösung geschwenkt, dokumentiert und getrocknet.

Fixierungslösung	30 % Ethanol und 10 % Essigsäure
Inkubierungslösung	30 % Ethanol; 6,8 % (w/v) Na-Acetat (anhyd.); 0,13 % (w/v) Glutaraldehyd; 0,2 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
Silberlösung	0,2 % (w/v) AgNO ₃ ; 0,02 % Formaldehyd (37 %)
Entwickler	2,4 % (w/v) Na ₂ CO ₃ ; 0,02 % Formaldehyd (37 %)
Präservierungs-lösung	0,5 % Glycerol; 40 % Ethanol

2.7 Qualitativer Nachweis der Tanninbindung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

Der Nachweis der Tanninbindung erfolgte durch elektrophoretisches Auftrennen der isolierten TCA-löslichen Proteine aus dem Parotisspeichel des Rehs (Kap. 2.4.1) in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen Tannin. Die Trennung der Tannin-Protein-Komplexe erfolgte sowohl in einem SDS-PAGE (Kap 2.6.1) als auch im nativen Polyacrylamidgel (Kap. 2.6.2). Jeweils 50 µl TCA-lösliche Parotisspeichelproteine des Rehs (ca. 0,04 g/l, Proteinbestimmung

mit BCA-Methode) wurden mit 25 µl Tanninsäure bzw. Quebracho (0 - 1 % (w/v) Tannin in 50 % Methanol) ü. N. bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 9170 x g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden je 15 µl des Überstandes (Tannin-Protein-Lösung) zu 5 µl Ladepuffer (SDS-PAGE) bzw. nativen Ladepuffer (natives Polyacrylamidgel) gegeben. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie Brilliant Blue- (Kap. 2.6.3) und nachfolgend durch Silberfärbung (Kap. 2.6.5) sichtbar gemacht. Die Tannin-Protein-Komplexe im nativen Gel wurden mit der Coomassie Brilliant Blue-Methode für PRPs (Kap. 2.6.4) gefärbt.

2.8 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2DE) trennt ein Substanzgemisch nach zwei verschiedenen Parametern. Bei den hier erfolgten Untersuchungen wurde eine isoelektrische Fokussierung mit einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese kombiniert.

2.8.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Bei diesem Verfahren werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem IPGphor System (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt (Bjellqvist *et al.* 1982, Görg *et al.* 1988). Auf getrockneten Polyacrylamidgelstreifen (Dry Strips) immobilisierte pH-Gradienten ermöglichten eine hohe Reproduzierbarkeit und verhindern Kathodendrift (Görg *et al.* 1988).

Die entsalzte und pelletierte Proteinprobe (ca. 50 µg, Proteinbestimmung mit BCA-Methode) wurde mit 250 µl Probenpuffer 5-30 min bei RT resuspendiert. Das Probenpuffer-Protein-Gemisch wurde mittig auf die mit Aqua bidest. gründlich gereinigten und getrockneten Streifenhalter aufgetragen. Die aufgetauten 13 cm langen Dry Strips (Amersham Pharmacia Biotech) mit immobilisierten pH-Gradienten von 3-10 wurden luftblasenfrei auf das Puffer-Protein-Gemisch gelegt und anschließend zur Verdunstungsvermeidung vollständig mit Mineralöl (ca. 1,5 ml) bedeckt. Das nachfolgend ausgeführte Fokussierungsprogramm lief bei einer konstanten Temperatur von 20 °C ab:

Rehydrierung	16 h	
Fokussierung (17500 Vh)	1 h	500 V
	1 h	1000 V
	1 h	2000 V
	1 h 45 min	8000 V

Nach der Fokussierung werden die Strips entweder für eine spätere Verwendung bei -20 °C maximal eine Woche gelagert oder 15 min in 10 ml Equilibrierungspuffer unter leichtem Schütteln inkubiert um sie für die zweite Dimension vorzubereiten.

2.8.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Für die zweite Dimension wurde das Elektrophoresesystem Hoefer SE600 (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Nach der Equilibrierung wurden die Strips auf das 12,5%ige SDS-PAGE-Gel (Kap. 2.7.1) gelegt, das saure Ende zur späteren Identifizierbarkeit markiert und in Agaroselösung eingebettet um einen luftblasenfreien Übergang zwischen beiden Gelen zu gewährleisten. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (Kap. 2.6.1) bei 20 °C (Thermostat) für 15 min bei 10 mA/Gel und 3,5 – 4 h bei 45 mA/Gel. Gefärbt wurde durch die Coomassie Brilliant Blue-Methode für PRPs (Kap. 2.6.3) bzw. Silberfärbung (Kap. 2.6.5).

Die Gelbilder wurden mit Hilfe der Software ImageMaster 2D Version 3.1 (Amersham Pharmacia Biotech) ausgewertet.

Probenpuffer	8 M Harnstoff; 2 % CHAPS; 0,5 % IPG-Puffer pH 3 – 10; eine Spatelspitze Bromphenolblau; bei -20 °C lagern
Equilibrierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol; 2 % (w/v) SDS; eine Spatelspitze Bromphenolblau
Agaroselösung	0,5 % (w/v) Agarose in Elektrophoresepuffer; eine Spatelspitze Bromphenolblau

2.9 Qualitativer Glykoproteinnachweis

Die TCA-löslichen Proteine des Parotisspeichels von Reh und Elch wurden mit einer abgewandelten Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung nach McManus (1946) auf Anwesenheit von Glykoproteinen getestet. Dabei werden durch Perjodat zu Aldehyden oxidierte Kohlenhydratreste mit Hilfe von Schiff's Reagenz sichtbar gemacht. Ca. $5\text{ }\mu\text{g}$ gelöster entsalzter Speichelproteine in wässriger Lösung wurden mit einer Pipette auf eine HybondTM-C extra-Nitrozellulosemembran für Proteine (Amersham Life Science, Little Chalfont, England) gegeben. Als Kontrollen wurden Chymotrypsinogen A (Negativkontrolle) und Ovalbumin (Positivkontrolle) aus dem Low-molecular-weight-Gelfiltrationskit (Amersham Pharmacia Biotech, Kap. 2.4.2) verwendet.

Der Erfolg des Auftrags wurde mit der reversiblen Ponceau-Rot Färbung geprüft. Dazu wurde die Membran 5 min in Ponceau-Rot-Färbelösung inkubiert. Nach dem Dokumentieren

wurden die Banden mit Aqua dest. (ca. 10 min) wieder entfärbt.

Die entfärbte Membran wurde 5 min in 1 % (w/v) Periodsäurelösung inkubiert und anschließend 3 x 5 min in Aqua bidest. gewaschen. Dann erfolgt eine 15minütige Inkubation mit Schiff's Reagenz (Sigma) im Dunkeln. Nach dem Schütteln (5 min) in 0,5 % (w/v) Natriumdisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) wurden die Glykoproteine durch Spülen in Leitungswasser sichtbar.

Ponceau-Rot-Färbelösung	0,5 % (w/v) Ponceau-Rot; 1 % Essigsäure
--------------------------------	-----------------------------------------

2.10 Aminosäuresequenzbestimmung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

2.10.1 Umkehrphasenchromatographie und N-terminale Sequenzierung

Die Umkehrphasenchromatographie (RPC) und die anschließende N-terminale Aminosäuresequenzanalyse wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. Kraft am Institut für Proteinchemie am Max-Delbrück-Zentrum (MDC) in Berlin-Buch durchgeführt. Die Auftrennung der Gelfiltrationspeaks 1 und 2 (Kap. 2.4.2) erfolgte mit Hilfe der RPC an einem SMART-System für mikropräparative Reinigung (Amersham Pharmacia Biotech). Es wurden 20 µl Probevolumen mit einer geschätzten Proteinmenge von 10 µg/ml (Proteinbestimmung mit BCA-Methode) auf eine µRPC C2/C18-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) gegeben. Als mobile Phase diente ein Gradient mit steigender Konzentration an Acetonitril (0,5 %/min). Die Flussrate betrug 100 µl/min. Die Peptide wurden durch automatische Sequenzanalyse an einem ABI Procise Protein Microsequencer (Applied Biosystems, Forster City, USA) identifiziert. Proteindatenbanken wurden nach Übereinstimmungen mit den Peptidsequenzen mit Hilfe des Programms FASTA 3.2 durchsucht (Pearson und Lipman 1988).

Eluent A	0,1 % TFA in H_2O
Eluent B	0,1 % TFA in Acetonitril

2.10.2 Anionenaustauschchromatographie

Proteinfractionen, die nicht durch PRC aufgetrennt werden konnten, wurden einer Anionenaustauschchromatographie (IEC) unterzogen. Die Trennung erfolgte durch eine 1 ml Recource Q-Säule am FPLC[®]-Basis-System (beides Amersham Pharmacia Biotech). Funktionelle Gruppe dieses stark anionischen Austauschers ist die quaternäre Ammoniumverbindung Trimethylaminoethyl. Als mobile Phase diente ein Gradient aus Start- und Elutionspuffer über 20 ml mit einer Flussrate von 1 ml/min. Es wurden 50 µl Proteinlösung über eine Probeschleife aufgetragen. Die Detektion der eluierten Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die erhaltenen Fraktionen wurden wiederum durch RPC (Kap. 2.10.1) aufgetrennt und sequenziert.

Startpuffer	20 mM Tris-HCl; pH 8,0
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,0

2.10.3 Trypsin-Verdau

Es wurde versucht, die isolierten Proteine durch einen Trypsin-Verdau in Peptide aufzutrennen um mehrere Fragmente pro Protein N-terminal sequenzieren zu können. Der Versuch wurde am Institut für Proteinchemie am Max-Delbrück-Zentrum (MDC) in Berlin-Buch nach dem dort üblichen Protokoll durchgeführt. Ca. 7 µg der TCA-löslichen Proteine des Rehspeichels wurden mit 1 µg Trypsin (Promega, Madison, U.S.A.) in 60 µl Tris-ACN-Puffer 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 6 µl 10 % Trifluoressigsäure (TFA) gestoppt. Anschließend wurden sowohl mit den unverdauten TCA-löslichen Proteinen als auch mit dem Verdauansatz eine RPC (Kap. 2.10.1) durchgeführt.

Tris-ACN-Puffer	0,1 M Tris-HCl; 1 mM CaCl ₂ ; 10 % Acetonitril; pH 8,5
------------------------	-------------------------------------------------------------------

2.11 Nukleotidsequenzbestimmung mittels RT – PCR

Durch die Analyse der Aminosäuresequenz kann eine N-terminale Teilsequenz der PRPs des Rehs aufgeklärt werden. Um eine vollständigere Sequenz eines oder mehrerer PRPs zu erhalten, wurde polyadenylierte RNA (polyA RNA) aus der Ohrspeicheldrüse des Rehs untersucht. Durch die Reaktion mit reverser Transkriptase wird die polyA-RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Anschließend werden PRP-spezifische Abschnitte

mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Dafür werden aus den N-terminalen Proteinsequenzen der Fraktion G1-17 degenerierte DNA-Sequenzen abgeleitet, die als spezifische Primer dienen. Sie können am 5'-Ende der gesuchten Sequenz ansetzen. Da das C-terminale Ende der Proteinsequenz nicht bekannt ist, werden statt der spezifischen Primer am 3'-Ende der Nukleotidsequenz die bereits für die Reverse Transkription verwendeten OligodT₍₁₅₎-Primer eingesetzt.

2.11.1 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von TriZol[®] (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK) aus Parotisspeicheldrüsengewebe eines Rehs isoliert. Das bei -80 °C gelagerte Parotisspeicheldrüsengewebe wurde in 20 µl TriZol-Reagenz pro mg Gewebe gegeben und mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax T25, IKA[®]-Labortechnik, Stauffen) zerkleinert. Die homogene Lösung wurde 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 0,2 ml Chloroform/ml TriZol-Reagenz zugegeben, 15 s stark geschüttelt und weitere 2-3 min inkubiert. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g (4 °C) getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro ml TriZol-Reagenz und Inkubation von 10 min bei RT gefällt. Die RNA wurde dann pelletiert (10 min Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C). Nach einem Waschschrift mit 75%igem tiefgekühltem (-20 °C) Ethanol (1 ml/ml TriZol-Reagenz) wurde nochmals zentrifugiert (5 min, 7.500 x g, 4 °C), der Ethanolüberstand entfernt und die RNA bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf) getrocknet. Die RNA wurde danach in RNase-freiem Wasser 10 min bei 58 °C gelöst. Ihre Konzentration wurde photometrisch ($\lambda = 260$ nm) mit dem GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt.

Aus der Gesamt-RNA wurde PolyA-RNA mittels des PolyATtract[®] mRNA Isolationssystems (Promega) gewonnen. Zum Anlagern der Sonde wurden 2,43 ml DEPC-Wasser mit 1-5 mg Gesamt-RNA zunächst auf 65 °C erhitzt. Nach 10 min wurden 10 µl der biotinylierten OligodT-Sonde und 60 µl 20x SSC (beides Promega) zur RNA gegeben und bis zur vollständigen Abkühlung bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde zu 3 x mit 0,5 x SSC gewaschenen Streptavidin-markierten Paramagnetischen Partikeln (SA-PMPs, Promega) gegeben und unter mehrmaligem Schütteln für 10 min inkubiert. Das Fangen der SA-PMPs erfolgte mit einem Magneten. Ungebundene Moleküle wurden durch vier Waschschriffe mit 0,1x SSC und wiederholtem Fangen der Partikel entfernt. Danach wurde die polyA-RNA in 1 ml Aqua dest. (RNase-frei) eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wiederum photometrisch.

2.11.2 Reverse Transkription

40 µl Reaktionsansatz enthielten 6 µg PolyA-RNA, 400 U M-MLV Reverse Transkriptase, 40 U RNasin® Ribonukleaseinhibitor, 8 µl 5x MMLV Reaktionspuffer (alles Promega), 4 mM dNTPs (Perkin Elmer) und 130 pmol OligodT₍₁₅₎-Primer. Der Ansatz wurde bei 37 °C 60 min lang inkubiert. Es folgte eine 10minütige Inaktivierungsphase bei 70 °C.

M-MLV 5x Reaktionspuffer	250 mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT; pH 8,3
OligodT₍₁₅₎	5' – TTT TTT TTT TTT TTT - 3'

2.11.3 PRP-spezifische PCR

Der Reaktionsansatz der PCR (25 µl) enthielt 1 µl cDNA, 0,3 U PanScript-Polymerase, 2,5 µl 10 x PanScript-NH₄-Reaktionspuffer (beide von PAN Biotech GmbH, Aidenbach), 37,5 nmol MgCl₂, 10 pmol dNTPs, 10 pmol der Primer und 2 µg BSA. In zwei verschiedenen Ansätzen wurde entweder Primer ProA1, ProA2 oder ProA3 mit OligodT₍₁₅₎ kombiniert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im PCR-Gerät GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt: Denaturierungsphase bei 94 °C für 3 min, 37 Zyklen bei 94 °C, 51 °C und 72 °C für jeweils 30s und Elongationsphase 72 °C für 10 min.

PanScript NH₄-Reaktionspuffer	160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 500 mM Tris-HCl; 0,1 5 Tween 20; pH 8,8
ProA1	5' - CCY CCY GAG GAG CAG C - 3'
ProA2	5' - CCY CCY GAC GAG CAC C - 3'
ProA3	5' - CCY CCY GAC GAC CAC C - 3'

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (1,5 % (w/v) Agarose [Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen] in TAE-Puffer) geprüft. 10 µl der PCR-Reaktion wurden mit 3 µl Ladebuffer vermischt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Nach der Elektrophorese in der Apparatur G100 (60 min bei 4V/cm) wurde die DNA im Ethidiumbromidbad (10 µl Ethidiumbromidlösung/100 ml Aqua dest.) gefärbt.

TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl; 20 mM Essigsäure; 1,8 mM EDTA
Ladepuffer	50 % Glycerol in TAE-Puffer; eine Spatelspitze Bromphenolblau
Ethidiumbromid-lösung	1 mg/ml Ethidiumbromid

2.11.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Aus dem nach Beendigung der PCR-Reaktion vorliegenden Reaktionsgemisch müssen vor weiteren Klonierungs- und Sequenzierungsschritten Salze, überschüssige Oligonukleotide (Primer) und Nukleotide entfernt werden. Die Aufreinigungen erfolgten mit dem E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH) nach Protokoll des Herstellers. Die im Rahmen der Hybridisierungsanreicherung (Kap. 2.12) hergestellten DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick[™] PCR-Purification-Kit 250 (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt.

2.11.6 Klonierung

Ligation: Die PCR-Produkte wurden mittels pGEM[®]-T Vector-System II (Promega) nach Herstellerprotokoll kloniert. Jeweils 3 µl der gereinigten PCR-Fragmente wurden mit 1 µl Vektor, 1 µl (3 U) T₄-Ligase und 5 µl des 2 x Ligasepuffers gemischt. Die Ligation erfolgte ü.N. bei 4 °C.

Transformation: 50 µl kompetente Zellen (*Escherichia coli* JM109, Promega) wurden nach Hinzufügen von 5 µl Ligationsansatz 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 45 s bei 42 °C (Wasserbad) ein Hitzeschock mit nachfolgendem Abkühlen (5 min auf Eis). Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C 90 min geschüttelt. Danach wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C ü.N. bebrütet.

Die Identifizierung von Bakterienkolonien, welche ein Insert-tragendes Plasmid enthielten, erfolgte durch Ausnutzung der α-Komplementation. Kolonien, die ein Plasmid mit Insert enthielten, waren durch den ausbleibenden Abbau des im Agar enthaltenen X-Gal zum blauen Indigoderivat weiß. Diese positiven Kolonien wurden ausgewählt und mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 20 µl Aqua bidest. (steril) überführt. Nach Inkubation bei 95 °C (5min) und anschließender Zentrifugation bei 17.000 x g (RT) für 10 min konnte das die DNA enthaltende Plasmid (Überstand) in ein steriles Reaktionsgefäß überführt werden.

LB-Agar	4 % (w/v) Luria-Bertoni Agar (Sigma), 100 µg/ml Ampicillin; 0,2 mM IPTG; 0,008 % X-Gal
----------------	----------------------------------------------------------------------------------------

2.11.7 Sequenzierung

Mit Hilfe einer PCR wurden die Inserts spezifisch vermehrt. Der Ansatz (25 µl) enthielt 2 µl DNA, 2 mM MgCl₂, 0,5 U AmpliTaq DNA-Polymerase, 2,5 µl 10x AmpliTaq - Reaktionspuffer (beides Perkin Elmer, Foster City, USA), 200 µM dNTPs und je 10 pmol der Vektorprimer T7 und M13rev. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im PCR-Gerät GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt: Denaturierungsphase bei 94 °C für 3 min, 35 Zyklen bei 94 °C (15 s), 51 °C (20 s), 72 °C (30 s) und Elongationsphase 72 °C für 30 min.

Die Sequenzierung wurde mit der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Dazu wurde der BigDye Fluorescence Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) eingesetzt. Der Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR (10 µl) enthielt 3 µl gereinigte DNA, 2 µl des BigDye Terminator-Mix (enthielt DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs) und 1 µl Vektorprimer (T7 oder M13rev). Die Sequenzierungs-PCR wurde über 35 Zyklen (96 °C, 10s; 50 °C, 5 s; 60 °C 4 min) durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit 53 µl 100 % Ethanol gefällt und 2 h 30 min bei 1.100 x g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet 30 min bei RT getrocknet. Die PCR-Produkte wurden in 20 µl Formamid (Perkin Elmer) aufgenommen und mit dem automatischen Sequenzierer ABI 310 C Genetic Analyser (Applied Biosystems) aufgetrennt und analysiert.

10 x AmpliTaq - Reaktionspuffer	100 mM Tris-HCL (pH 8,3); 500 mM KCl
T7-Primer	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
M13rev-Primer	5' - TGT CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'

2.12 Nukleotidsequenzbestimmung mittels Hybridanreicherung

Die Hybridanreicherung wurde gewählt, um längere Sequenzabschnitte PRP kodierender RNA zu erhalten, als es mittels PRP-spezifischer PCR möglich war. Zunächst erfolgt eine Ligation von PCR-fähigen Adaptoren an die cDNA (Edwards *et al.* 1996, Nyakaana und Arctander 1998). Aus den angereicherten cDNA-Abschnitten wird dann durch Hybridisierung PRP-cDNA isoliert (Ciofi und Bruford 1998). Die Hybridisierungssonden werden von den Sequenzen der durch die PRP-spezifische PCR erhaltenen Fragmente (Kap. 2.11) abgeleitet.

2.12.1 Anreicherung der cDNA nach Adaptoren-Ligation

Total-RNA und PolyA-RNA wurde aus Parotisspeicheldrüsengewebe des Rehs wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben isoliert. Zur Herstellung von cDNA wurde in weiteren Ansätzen neben dem OligodT₍₁₅₎-Primern auch Zufallshexamere (77 pmol/μg RNA, random hexamers, Perkin Elmer) und der aus der Sequenz der Klone der RT-PCR abgeleitete Primer Pinthy (97 pmol/μg RNA) eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte wie in Kapitel 2.11.2 beschrieben.

Die Ligation der Adaptoren an die cDNA und deren Vermehrung (PCR) erfolgte mit Teilen des pGEM[®]-T Vector-Systems II (Promega) nach Edwards *et al.* (1996). 8 μl der gereinigten cDNA-Fragmente wurden mit je 2 μl der Adaptoren Mlu21 und Mlu25 (100 pmol/μl), 2 μl T₄-Ligase (3 U/μl) und 10 μl des 2 x Ligasepuffers gemischt und ü.N. bei 4 °C ligiert. Der PCR-Ansatz (50 μl) enthielt 10 μl DNA der Ligationsreaktion, 50 pmol Mlu21, 2 mM MgCl₂, 0,5 U AmpliTaq DNA-Polymerase, 5 μl 10x AmpliTaq - Reaktionspuffer (beides Perkin Elmer), 200 μM dNTPs und 8 μg BSA. Es erfolgte zunächst ein Extensionsschritt bei 72 °C für 5 min, um ungebundene Enden zwischen Adaptoren und DNA zu ligieren. Einer darauffolgenden Denaturierungsphase bei 94 °C (3 min) folgten 35 Zyklen bei 94 °C (30 s), 60 °C (30 s) und 72 °C (120 s) und eine abschließende Elongationsphase 72 °C für 7 min.

Pinthy	5' - TTG CTC CTC TGG TGG G - 3'
Mlu21-Adaptor	5' - CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA - 3'
Mlu25-Adaptor	5' - TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A - 3'

2.12.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte mit Hilfe von Streptavidin-markierten paramagnetischen Partikeln (SA-PMPs, Promega) nach einer von Lieckfeldt *et al.* (2001) abgewandelten Methode von Nyakaana und Arctander (1998). Der Hybridisierungsansatz (20 μl) bestand aus 5 μl des PCR-Ansatzes, 2 μl der jeweiligen biotinylierten Hybridsonde BIO-Hrev oder BIO-Pinthy (50 pmol/μl) und 2 μl des 10x AmpliTaq - Reaktionspuffer (Perkin Elmer). Nach einem Denaturierungsschritt (94 °C, 3 min) erfolgte die Hybridisierung bei 72 °C für 4 min. Die Isolierung der hybridisierten DNA-Abschnitte wurde der Hybridisierungsansatz zu gewaschenen SA-PMPs (Kap. 2.11.1) gegeben und unter mehrmaligem Schütteln 10 min inkubiert. Ungebundene Moleküle wurden durch vier Waschschrte mit 0,1x SSC und wiederholtem Fangen der Partikel an einem Magneten entfernt. Danach wurden die SA-PMPs

in 100 µl Wasser resuspendiert. Durch Denaturierung (95 °C, 5 min) wurden die hybridisierten Moleküle gelöst und in einen steriles Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Anreicherungsschritt (PCR, Kap. 2.12.1) mit 10 µl der hybridisierten Moleküle (Elongationsphase bei 72 °C für 30 min) wurde die gereinigten PCR-Produkte wie in Kapitel 2.11.6 beschrieben kloniert. Die der Sequenzierungsreaktion vorrausgehende PCR wurde mit drei verschiedenen Kombinationen von Primern unter bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt (Kap. 2.11.7). Die DNA aller ausgewählten Klone wurde mit beiden Vektorprimern (T7 und M13rev) oder dem der Hybridisierungssonde entsprechenden nicht-biotinylierten Primer (Hrev oder Pinthy) und jeweils einem der Vektorprimer vermehrt. So konnten Klone identifiziert werden, die ein der Hybridisierungssonde entsprechendes Insert enthielten. Die Sequenzierung der mit Vektorprimern erhaltenden PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 2.11.7 beschrieben.

BIO-Hrev	5' - Biotin - TGG TAA ACT GAA AAC AGA CTG CCT TCC AAT GCC ATG GCT TCC TGA AGG ACT GCT GTC - 3'
BIO-Pinthy	5' - Biotin - CTC CTC TGG TGG GGG TGG CC - 3'
Hrev	5' - TGG TAA ACT GAA AAC AGA CT - 3'

2.12.3 Auswertung der Sequenzen

Die Nukleotidsequenzen wurden mit den Einträgen in der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) verglichen (Altschul *et al.* 1997).

Aus den durch RT-PCR und Hybridanreicherung ermittelten Sequenzen wurde in einem Neighbour-Joining-Tree mit Hilfe des Softwareprogramm MEGA, Version 2.1 phylogenetisch zusammengefasst (Kumar *et al.* 2001). Dessen Robustheit wurde mit 1000 Bootstrap-Wiederholungen geprüft (Saitou und Nei 1987).

Die Primärstrukturen und mögliche post-translationale Modifizierungen der ermittelten Proteine wurden mit Hilfe des Expert Protein Analyse Systems (ExpASy) des Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB) analysiert (<http://www.expasy.ch/tools/>).

3 Ergebnisse

3.1 Tanninbindungskapazitäten des Speichels des Rehs im Vergleich zu anderen Wiederkäuern

Mit einem Tanninbindungsassay wurden die Tanninbindungskapazitäten des Gesamtspeichels des Rehs untersucht und mit anderen Ernährungstypen verglichen. Untersucht wurden Speichel von drei Intermediärtypen (Rentier, Damhirsch, Moschusochse) und zwei Gras- und Rauhfutterfressern (Mufflon, Rind). Es wurden die relativen Bindungskapazitäten an ein hydrolysierbares (Tanninsäure) und ein kondensiertes Tannin (Quebracho) gemessen. In Abbildung 3.1 sind die jeweiligen Tanninbindungskapazitäten der Speichel der einzelnen Wiederkäuerarten dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht der durchschnittlichen Tanninbindungskapazität des Speichels eines Individuums.

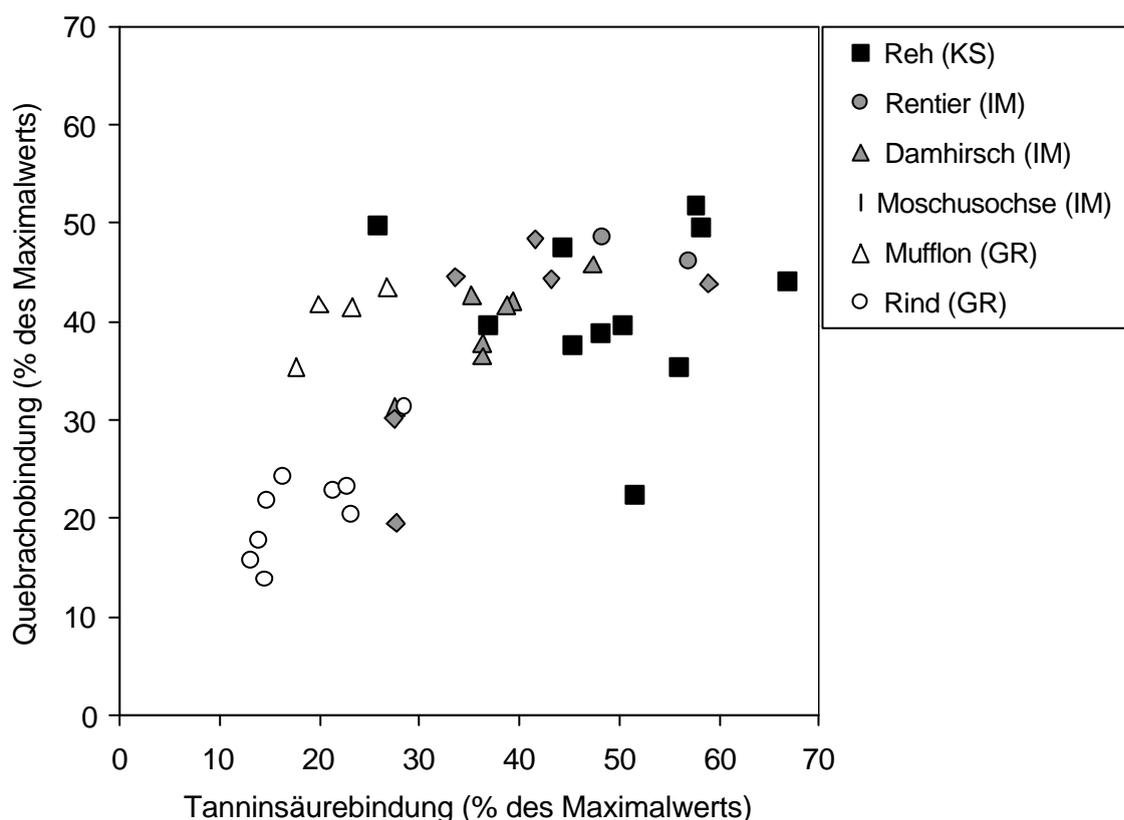


Abbildung 3.1 Relative Tanninbindungskapazitäten des Gesamtspeichels verschiedener Wiederkäuer an Tanninsäure und Quebracho. In den Tanninbindungsassay wurden 50 µg/ml Tannin und 10 µg/ml Protein eingesetzt. Jeder Datenpunkt entspricht der durchschnittlichen relativen Tanninbindungskapazität des Speichels eines Individuums.

Die Speichelproteine des Rehs und der meisten der untersuchten Intermediärtypen weisen Tanninbindungskapazitäten in hohen Bereichen (40 - 60 % des Maximalwerts) auf. Rinderspeichel dagegen band mit niedrigen Bindungskapazitäten im Bereich um 20 % an Tannine. Die Speichelproteine des Mufflons haben niedrige Tanninsäure-Bindungskapazitäten aber hohe Quebracho-Bindungskapazitäten.

Tabelle 3.1 Durchschnittliche relative Tanninbindungskapazitäten des Gesamtspeichel verschiedener Wiederkäuer an Tanninsäure und Quebracho (Angaben in % des Maximalwerts \pm SD). Zum Vergleich wurden die Tanninbindungskapazitäten von menschlichem Speichel und von BSA (unspezifische Bindung) gemessen. In den Tanninbindungsassay wurden 50 μ g/ml Tannin und 10 μ g/ml Protein eingesetzt. (n - Anzahl der untersuchten Tiere/Personen)

<i>Art</i>	<i>Typ</i>	<i>n</i>	<i>Tanninsäure</i>	<i>Quebracho</i>
<i>Reh</i>	KS	11	49,2 \pm 11,2	41,5 \pm 8,4
<i>Rentier</i>	IM	2	52,7 \pm 6,1	47,4 \pm 1,7
<i>Damhirsch</i>	IM	7	37,3 \pm 5,9	39,7 \pm 4,8
<i>Moschusochse</i>	IM	6	38,8 \pm 11,9	38,5 \pm 11,2
<i>Mufflon</i>	GR	4	22,0 \pm 4,0	40,6 \pm 3,5
<i>Rind</i>	GR	9	18,8 \pm 5,4	21,3 \pm 5,2
<i>Mensch</i>		5	35,4 \pm 16,5	47,2 \pm 16,5
<i>BSA</i>			29,5 \pm 12,2	21,8 \pm 8,4

Die durchschnittlichen Tanninbindungskapazitäten der Wiederkäuerarten sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tanninsäure: Die Tanninsäure-Bindungskapazitäten der Speichelproteine unterschieden sich signifikant zwischen den Wiederkäuerspezies (ANOVA, $p < 0,001$, $n = 39$). Sie waren beim Reh (49,2 %) und Rentier (52,7 %) sehr hoch. Die Speichel der Damhirsche (37,3 %) und Moschusochsen (38,8 %) zeigten etwas geringere mit menschlichem Speichel (35,4 %) vergleichbare Bindungskapazitäten. Die Tanninsäure-Bindungskapazitäten der Speichelproteine des Rehs, Rentiers, Damhirsches und Moschusochsen unterschieden sich signifikant von der des Rindes und des Mufflons (post hoc Tests). Für letztere konnten niedrige

durchschnittliche relative Bindungskapazitäten an Tanninsäure ermittelt werden (18,8 bzw. 22,0 %). Sie lagen unter der von BSA (29,5 %), das als unspezifisch bindendes Vergleichsprotein herangezogen wurde. Außerdem unterschieden sich Reh- und Damhirschspeichel in ihren durchschnittlichen relativen Bindungskapazitäten für Tanninsäure (post hoc Tests). Anhand der relativen Tanninsäure-Bindungskapazitäten zeichnete sich ab, dass die hier untersuchten Vertreter der Konzentratselktierer (Reh) und Intermediärtypen (Rentier, Damhirsch, Moschusochse) zu einer Gruppe zusammengefasst werden können, die sich von den untersuchten Gras- und Rauhfutterfressern (Mufflon, Rind) unterscheidet.

Quebracho: Mit Ausnahme des Rindes banden die Speichelproteine aller Ernährungstypen mit vergleichbar hoher Kapazität an Quebracho. Auch hier unterschieden sich die Bindungskapazitäten zwischen den Spezies signifikant (ANOVA, $p < 0,001$, $n = 39$). Die relativen Bindungskapazitäten von Rinderspeichel für Quebracho waren ähnlich niedrig wie für Tanninsäure (21,3 %). Mufflonspeichel band jedoch Quebracho viel stärker (40,6 %) als Tanninsäure. Die Quebracho-Bindungskapazität von Rinderspeichel war mit BSA (21,8 %) vergleichbar. Sie unterschied sich signifikant von denen aller anderen Wiederkäuerspeichel, einschließlich Mufflonspeichel (post hoc Tests). Die Bindungskapazitäten von Reh- (41,5 %), Rentier- (47,4 %), Damhirsch- (39,7 %), Moschusochsen- (38,5 %) und Mufflonspeichel an Quebracho zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede. Sie waren annähernd so hoch wie die des Menschenspeichels (47,2 %).

Es wurde für jede Wiederkäuerspezies getestet, ob sich die mittleren Bindungskapazitäten für Tanninsäure von denen für Quebracho unterschieden (Wilcoxon-Test). Aufgrund der geringen Anzahl an Individuen wurden die Ergebnisse des Rentier- und des Mufflonspeichels nicht in die Tests einbezogen. Die Daten zeigen, dass die Speichelproteine des Mufflons unterschiedlich stark an Tanninsäure bzw. Quebracho banden. Für alle anderen untersuchten Wiederkäuer konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Tanninsäure- und der Quebrachobindungskapazität festgestellt werden (Wilcoxon-Test, $p > 0,05$).

Die relativen Tanninbindungskapazitäten des Rehspeichels sind mit denen der Intermediärtypen (Rentier, Damhirsch, Moschusochse) vergleichbar. Das lässt auf das Vorhandensein tanninbindender Proteine schließen. Die Tanninbindungskapazität des Speichels vom Rind (GR) deutet auf das Fehlen von tanninbindenden Proteinen hin. Mufflonspeichel enthält möglicherweise Proteine, die spezifisch an Quebracho binden.

3.2 Tanninbindende Proteine im Speichel des Rehs und anderer Wiederkäuer

Anlass der Untersuchungen: Tanninbindende Proteine der Ratte, der Maus und des Menschen sind prolinreich (Lu und Bennick 1998, Mehansho *et al.* 1987b, Mehansho 1992). Auch im Speichel des Maultierhirsches wurden Proteine mit einem erhöhten Prolinanteil nachgewiesen (Austin *et al.* 1989). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch tanninbindende Proteine anderer Arten einen relativ hohen Prolingehalt haben.

Konzentratsselektierer: Ein entsprechender Nachweis für die tanninbindenden Proteine der Rehe ist bisher nicht erfolgt (Joest 1998). Die Produktion prolinreicher Speichelproteine (PRPs) vieler Arten findet vorrangig in der Ohrspeicheldrüse (glandula parotis) statt (Beeley *et al.* 1991, Ferreira *et al.* 1992). Dies konnte durch den Vergleich der Tanninbindungskapazität von Parotis- und Mischspeichel für das Reh bestätigt werden (Fickel *et al.* 1998, Joest 1998). Da prolinreiche Proteine in TCA löslich sind, können sie durch TCA-Fällung der anderen Speichelproteine erfolgreich aus Speichel angereichert werden (Austin *et al.* 1989, Makkar und Becker 1998). Bei der Isolierung der tanninbindenden Proteine aus Parotisspeichel des Rehs wurde diese Methode angewendet. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung, der Tanninbindungskapazität und der Nukleotidsequenz der so isolierten Proteine war Gegenstand der Untersuchungen des Parotisspeichels von 13 Rehen aus dem Nationalreservat in Chizé in Frankreich. Mit dem Elch wurden neben dem Reh die Speichelproteine eines weiteren Konzentratsselektierers untersucht. Juntheikki (1996) konnte tanninbindende Proteine im Speichel des Elches nachweisen, ihr Prolingehalt wurde aber nicht festgestellt. Mit Hilfe der im Kapitel 2.1.2 beschriebenen Kathedertechnik konnte von zwei Elchen eine für die Bestimmung des Prolingehalts ausreichende Menge Parotisspeichel gewonnen werden.

Intermediärtypen: Der Speichel von Intermediärtypen wurden bisher noch nicht auf das Vorhandensein tanninbindender Proteine und deren Prolingehalt hin untersucht. Wie im Kapitel 3.1 beschrieben wurden im Speichel der untersuchten IM sehr hohe relative Tanninbindungskapazitäten gefunden, die zu entsprechenden Untersuchungen ermutigten. Es wurde Gesamtspeichel von acht Damhirschen und sechs Moschusochsen verwendet.

Gras- und Rauhfutterfresser: Im Speichel von Rindern, den typischen Vertretern der Grasfresser, wiesen Mole *et al.* (1990) prolinreiche Proteine mit einem Prolinanteil von 57 % nach, die allerdings keine Tanninbindungskapazität besaßen. Makkar und Becker (1998) fanden im Rinderspeichel dagegen tanninbindende Eigenschaften, stellten aber nur einen Prolingehalt von 6,4 % fest. Dieser Widerspruch sollte hier durch Untersuchungen des Gesamtspeichels von neun Rindern gelöst werden.

3.2.1 Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine

3.2.1.1 Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

Die TCA-Fällung des Parotisspeichels ergab eine lösliche und eine unlösliche Proteinfraction. Die TCA-löslichen Proteine des Rehs wurden mit Hilfe einer Gelfiltration in zwei Fraktionen (Gelfiltrationspeaks GF1 und GF2, Abb. 3.5) aufgetrennt. Die so entstandenen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung untersucht und mit Parotis- und Mischspeichel verglichen. In Tabelle 3.2 sind neben Prolin die Anteile von Glutamin bzw. Glutamat und Glycin am Gesamtprotein aufgeführt, da diese Aminosäuren in prolinreichen Proteinen zu einem Gesamtanteil von 70 - 88 % auftreten (Bennick 1982).

Tabelle 3.2 Aminosäurezusammensetzung von Reh-Parotisspeichel. Anteil der für prolinreiche Proteine charakteristischen Aminosäuren Prolin (Pro), Glutamat bzw. Glutamin (Glx) und Glycin (Gly) (Angaben in % an Gesamtaminosäuregehalt).

<i>Fraktion des Rehspeichels</i>	<i>Pro</i>	<i>Glx</i>	<i>Gly</i>
Parotisspeichel	8,3	16,4	6,9
Mischspeichel	7,0	14,1	8,8
<i>TCA-Fällung des Parotisspeichel</i>			
TCA-lösliche Proteine	39,8	19,1	11,0
TCA-unlösliche Proteine	2,9	17,3	5,2
<i>Gelfiltration der TCA-löslichen Proteine</i>			
GF 1	36,9	22,1	11,7
GF 2	49,6	7,3	10,0

Der Prolingehalt der Parotisspeichelproteine der Rehe (8,3 %) war nur geringfügig höher als der von Mischspeichel (7,0 %). Aus diesem Vergleich der Analyseergebnisse konnten daher keine Schlussfolgerungen auf das Vorhandensein prolinreicher Proteine im Parotisspeichel gezogen werden. Die aus Parotisspeichel isolierten TCA-löslichen Proteine hatten einen Prolingehalt von 39,8 %. In der TCA-unlöslichen Fraktion wurden dagegen keine prolinreichen Proteine gefunden (2,9 % Pro). Damit konnte nachgewiesen werden, dass im Speichel von Rehen prolinreiche Proteine vorkommen. Die Analyse der Proteine des Gelfiltrationspeaks zeigte, dass die prolinreichen Proteine des Rehspeichels unterschiedlich

groß waren. Sowohl GF1 als auch GF2 hatten einen hohen Prolingehalt (GF1 36,9 %; GF2 49,0 %). Der Gesamtanteil der Aminosäuren Glutamin bzw. Glutamat, Glycin und Prolin der TCA-löslichen Fraktion (69,9 %) sowie in den Gelfiltrationspeaks (GF1 70,7 %; GF2 66,9 %) machte annähernd 70 % aus.

3.2.1.2 Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine des Elchs

Analog zum Rehspeichel wurden TCA-lösliche Proteine aus dem Parotisspeichel der Elche isoliert und einer Aminosäuretotalanalyse unterzogen (Tab. 3.3). Der Prolingehalt des Parotisspeichel des Elchs (13,6 %) ist höher als der des Reh-Parotisspeichel (8,3 %, Tab. 3.2). Dies deutet bereits auf das Vorhandensein prolinreicher Proteine hin. Mit Hilfe der TCA-Fällung konnten Proteine mit einem den PRPs des Rehs vergleichbarem Prolingehalt von 35,2 % isoliert werden. Der Gesamtanteil der Aminosäuren Glutamin bzw. Glutamat, Glycin und Prolin betrug 61,3 % und lag damit unter dem von Bennick (1982) angegebenen Wert von 70 - 88 %.

Tabelle 3.3 Aminosäurezusammensetzung von Elch-Parotisspeichel. (Angaben in % an Gesamtaminosäuregehalt)

<i>Fraktion des Elchspeichels</i>	<i>Pro</i>	<i>Glx</i>	<i>Gly</i>
Parotisspeichel	13,6	16,1	6,1
TCA-lösliche Proteine	35,2	17,8	8,3

3.2.1.3 Prolingehalt der TCA-löslichen Speichelproteine anderer Wiederkäuer

Die ermittelten Prolingehalte der Gesamtspeichel von Reh (KS) und Rind (GR) und der aus Gesamtspeichel isolierten TCA-löslichen Proteine von Reh, Moschusochse (IM), Damhirsch (IM) und Rind sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Rinderspeichel hatte einen Prolingehalt von 8,2 %, der mit dem Gesamtspeichel (9,9 %) und dem Parotisspeichel des Rehs (8,3 %, Tab. 3.2) vergleichbar war.

Die aus Gesamtspeichel des Rehs isolierten TCA-löslichen Proteine enthielten etwas weniger Prolin als die TCA-löslichen Proteine des Parotisspeichels (39,8 %; Tab. 3.2). Das liegt möglicherweise daran, dass im Gesamtspeichel mehr TCA-lösliche Proteine mit geringem

Prolingehalt vorkommen als im Parotisspeichel. Im Gegensatz zum Rehspeichel hatten die Proteine des Rinderspeichels nur einen Prolingehalt von 10,6 % und gehörten demnach nicht der Familie der prolinreichen Proteine an. Die TCA-löslichen Speichelproteine des Moschusochsen enthielten 29,3 % Prolin und konnten der Gruppe der prolinreichen Proteine zugeordnet werden. Der Prolingehalt der TCA-löslichen Proteine aus Damhirschspeichel war mit 13,0 % dem Prolingehalt des Parotisspeichels des Elchs (13,6 %; Tab. 3.3) vergleichbar. Er entsprach außerdem dem Prolinanteil der TCA-löslichen Speichelproteine des Kaninchens (Rajan und Bennick 1983, Spielman und Bennick 1989; vergl. Tab 1.2). Eine Zuordnung zu den PRPs konnte nicht eindeutig erfolgen.

Tabelle 3.4 Aminosäurezusammensetzung von Gesamtspeichel verschiedener Wiederkäuer.
(Angaben in % an Gesamtaminosäuregehalt)

<i>Speichelfraktion</i>	<i>Typ</i>	<i>Pro</i>	<i>Glx</i>	<i>Gly</i>
<i>Gesamtspeichel</i>				
	Reh (KS)	9,9	14,8	7,2
	Rind (GR)	8,2	10,0	13,3
<i>TCA-lösliche Proteine</i>				
	Reh (KS)	34,5	16,4	9,6
	Moschusochse (IM)	29,3	13,0	10,3
	Damhirsch (IM)	13,0	9,3	13,0
	Rind (GR)	10,6	6,1	18,8

Zusammenfassung: In Reh-, Elch- und Moschusochsenspeichel wurden Proteine nachgewiesen, die mit einem Prolingehalt von über 16 % der Familie der prolinreichen Proteine zugeordnet werden können (Kap. 1.5.2).

3.2.2 Tanninbindungseigenschaften der TCA-löslichen Speichelproteine

3.2.2.1 Qualitativer Nachweis der Tanninbindungsfähigkeit der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

Für die TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs erfolgte der Nachweis der Tanninbindung zunächst qualitativ mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). In Abbildung 3.2 und 3.3 ist der Einfluss der steigenden Tanninsäure- bzw. Quebrachokonzentration auf die prolinreichen Proteine des Rehs dargestellt. Die Speichelproteine wurden mit unterschiedlichen Mengen Tannin inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE bzw. nativer PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen Methoden gefärbt. Ohne Tannin war sowohl nach der Coomassie Brilliant Blue (CBB)-Färbung, als auch nach der Silberfärbung nur eine kleinere Proteinfraction (MW ca. 22 kd) zu erkennen. Diese entsprachen GF2 (Abb. 3.5), was durch Analyse der durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE bestimmt wurde (nicht abgebildet). Bei höheren Tanninkonzentrationen (ab 0,5 % Tannin) erschien eine größere Proteinfraction mit dem MW von ca. 28 kd. Sie entsprach GF1. Außerdem konnte bei Quebracho eine leichte Größenverschiebung der Proteine der kleineren Fraktion im SDS-PAGE (CBB-Färbung) beobachtet werden (Abb. 3.3). Möglicherweise wird das Molekulargewicht der Proteine durch Anlagerung der Tannine vergrößert. Nach Anwendung der CBB-Färbung für PRPs nach Marshall *et al.* (1989) bei den nativen Polyacrylamidgelen waren beide Proteinfractionen auch in Abwesenheit der Tannine als pink-violette Banden sichtbar. Bei höheren Tanninkonzentrationen (ab 0,5 % Tannin) erschienen die Proteine wahrscheinlich durch Anlagerung der Tannine als dunkelblaue Banden. Die beobachteten Färbungen dienen als qualitativer Nachweis der Tanninbindungsfähigkeiten der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs.

3.2.2.2 Die relativen Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs und anderer Wiederkäuer

Die Isolierung der TCA-löslichen Proteine erfolgte aus Gesamtspeichel der verschiedenen Wiederkäuer, da dessen Gewinnung mit einem erheblich geringeren Aufwand als die Gewinnung von Parotisspeichel möglich war. Um die Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine vergleichen zu können, erfolgte der Tanninbindungsassay auch beim Reh mit Proteinen aus Gesamtspeichel. Die in den Assay eingesetzte Proteinmenge wurde durch Aminosäuretotalanalyse bestimmt. In Abbildung 3.4 sind die relativen

Tanninbindungskapazitäten an Tanninsäure (TA) und Quebracho (Q) der TCA-löslichen Speichelproteine von Reh, Moschusochse, Damhirsch und Rind dargestellt. Die aus Rehspichel isolierten Proteine hatten die höchste Tanninbindungskapazität (TA 85,5 %; Q 48,7 %). Sie banden 24 mal stärker an Tanninsäure und 30 mal stärker an Quebracho als aus Rinderspichel isolierte Proteine (TA 3,5 % bzw. Q 1,6 %). Isolierte Speichelproteine des Moschusochsen hatten eine hohe Affinität zu Tanninsäure (53,6 %), aber eine niedrigere zu Quebracho (14,8 %). Die TCA-löslichen Speichelproteine des Damhirsches lagen mit Tanninbindungskapazitäten von 25,5 % (TA) bzw. 31,1 % (Q) zwischen denen der anderen Wiederkäuer.

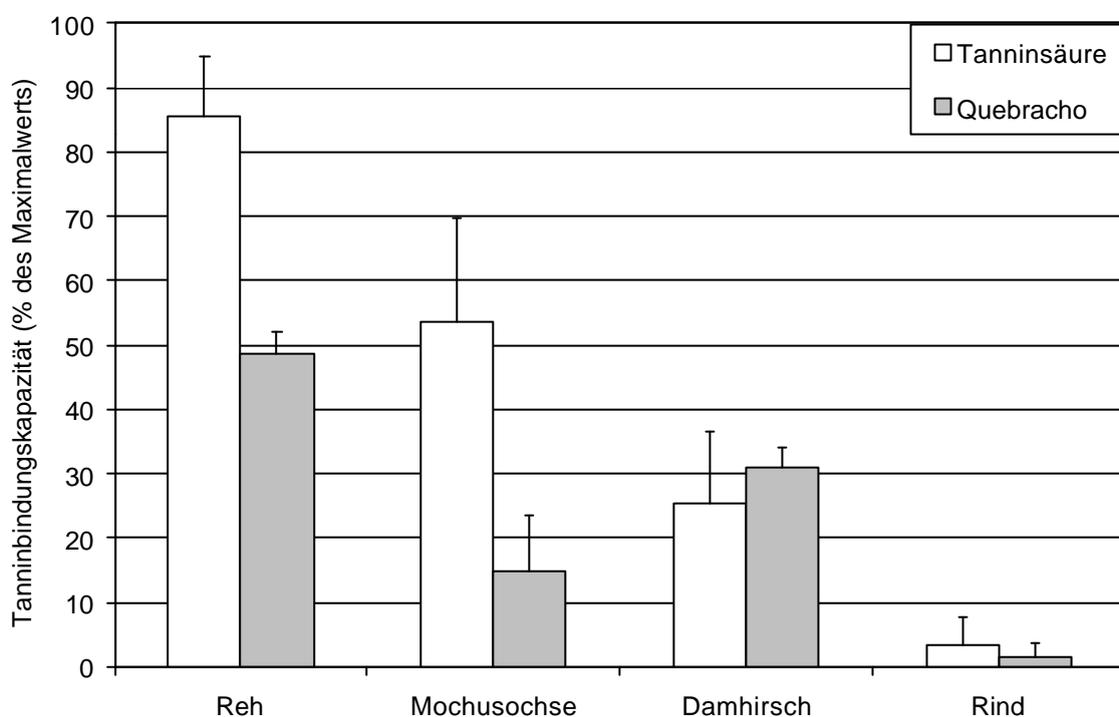
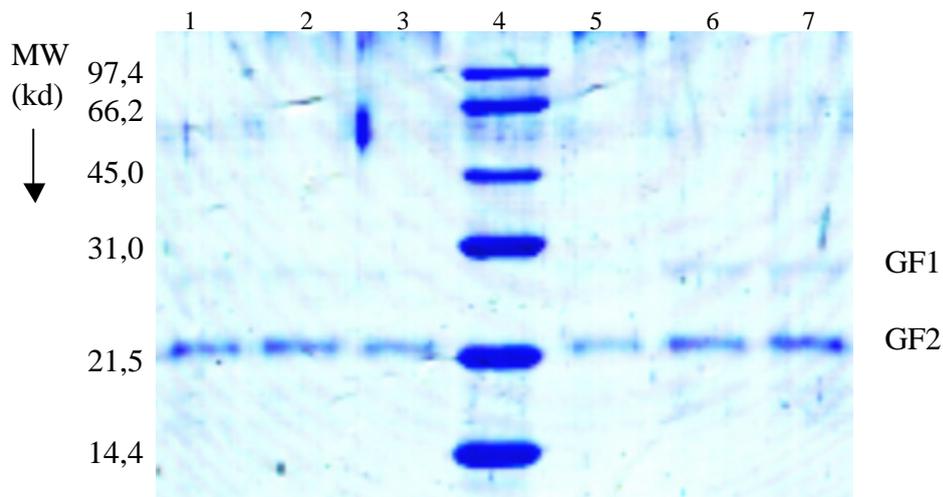
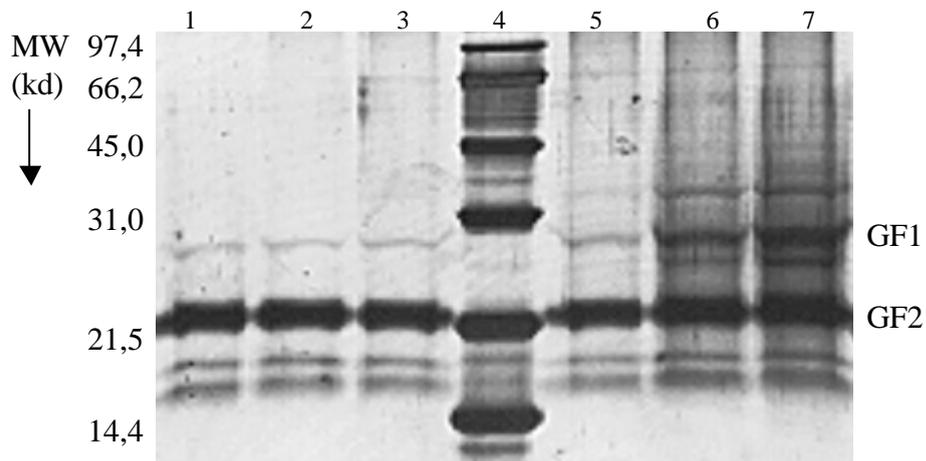


Abbildung 3.4 Relative Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine aus Gesamtspeichel von Reh, Moschusochse, Damhirsch und Rind. In den Tanninbindungssassay wurden je 50 µg/ml Tannin und 10 µg/ml Protein eingesetzt. Die Proteinmengen wurden von den Ergebnissen der Aminosäuretotalanalyse abgeleitet.

SDS-PAGE, CBB-Färbung



SDS-PAGE, Silberfärbung in Anschluss an CBB-Färbung



natives PAGE mit anschließender CBB-Färbung für PRPs nach Marshall 1989

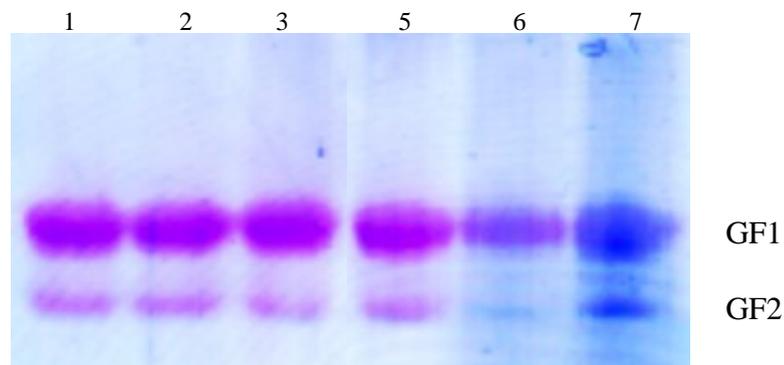
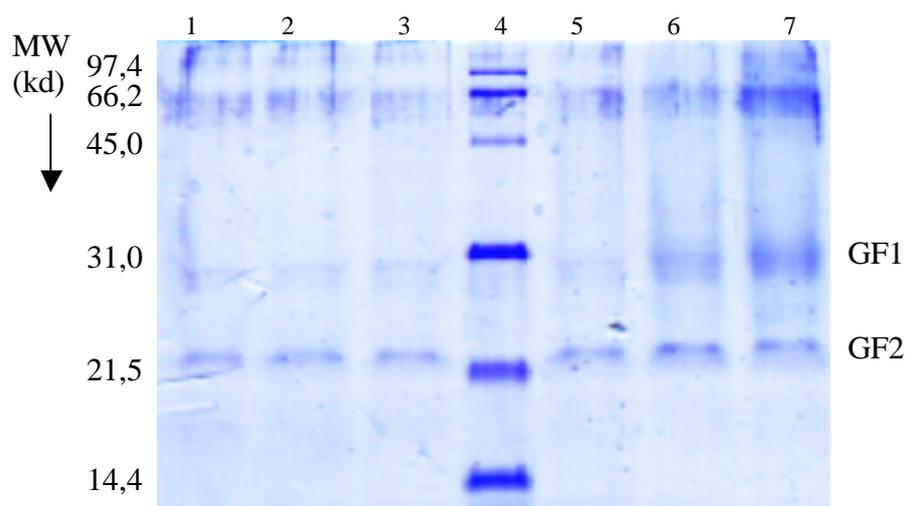
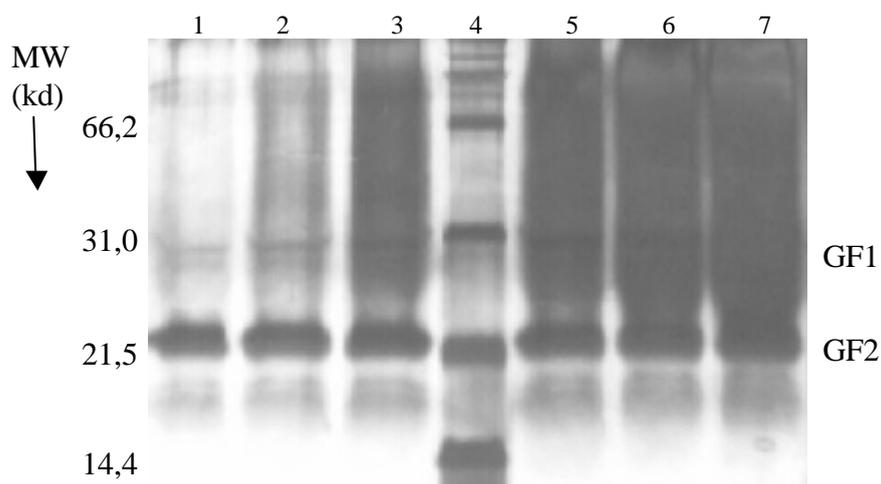


Abbildung 3.2 Qualitativer Nachweis der Bindungsfähigkeit der PRPs des Rehs an Tanninsäure. Prolinreiche Proteine wurden mit 0 - 1 % Tanninsäure (T.A.) inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. **1:** 0% T.A., **2:** 0,01 % T.A., **3:** 0,05 % T.A., **4:** MW-Standard SSL, **5:** 0,1 % T.A., **6:** 0,5 % T.A., **7:** 1% T.A.

SDS-PAGE, CBB-Färbung



SDS-PAGE, Silberfärbung in Anschluss an CBB-Färbung



natives PAGE mit anschließender CBB-Färbung für PRPs nach Marshall 1989

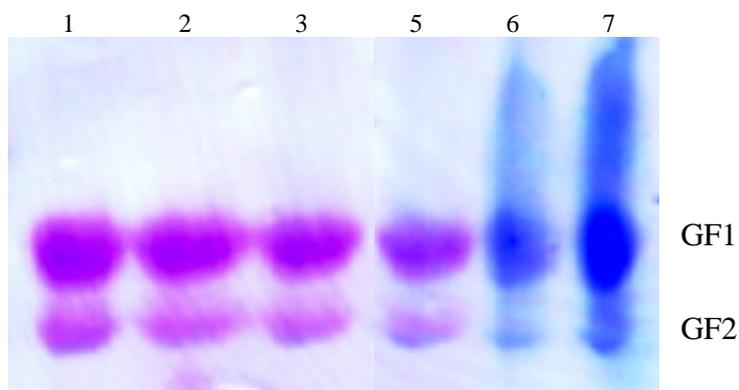


Abbildung 3.3 Qualitativer Nachweis der Bindungsfähigkeit der PRPs des Rehs an Quebracho. Prolinreiche Proteine wurden mit 0 - 1 % Quebracho (Q) inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. **1:** 0% Q, **2:** 0,01 % Q, **3:** 0,05 % Q, **4:** MW-Standard SSL, **5:** 0,1 % Q, **6:** 0,5 % Q, **7:** 1% Q,

3.3 Charakteristika der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

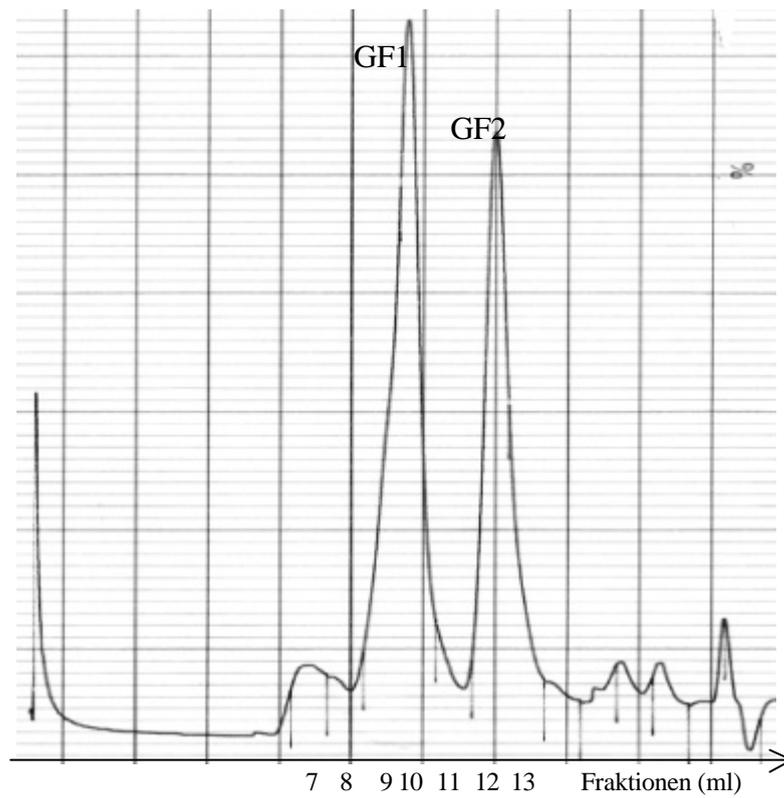
3.3.1 Molekulargewichte und isoelektrische Punkte

Die Zusammensetzung des Parotisspeichels des Rehs wurde mit Hilfe der Gelfiltration und der ein- und zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt.

Da der geringe Anteil an aromatischen Aminosäuren bei prolinreichen Proteinen zu einer geringeren Absorption bei 280 nm führte, wurden die eluierten Proteine zusätzlich bei 214 nm detektiert. In Abbildung 3.5 sind die Gelfiltrationschromatogramme der detektierten Proteinedargestellt. Bei der Detektion bei 280 nm konnten zwei große Proteinfractionen (GF1 und 2) erkannt werden, die auch durch eindimensionale SDS-PAGE mit nachfolgender CBB-PRP-Färbung ermittelt wurden (Kap. 3.2.2.1). Die ermittelten Molekulargewichte (MW) der Proteine betragen ca. 51 kd (GF1) und ca. 21 kd (GF2). Im Vergleich dazu war die Detektion bei 214 nm sensitiver. Es wurden vier Proteinfractionen mit Molekulargewichten bei 51 kd (GF1), 40 kd (GF1b), 20 kd (GF2) und 15 kd (GF3) detektiert. Das durch SDS-PAGE bestimmte Molekulargewicht von GF1 (28 kd) wich von dem durch Gelfiltration ermittelten (40 - 51 kd) stark ab. Das ist vermutlich auf die breit verteilten MW dieser Proteingruppe zurückzuführen. Außerdem ist es möglich, dass einige dieser PRPs aufgrund ihres geringen Anteils an adsorbierenden Strukturen durch die Gelfiltration sowohl bei 280 nm als auch bei 214 nm nicht detektiert werden konnten. Die mittels Gelelektrophorese ermittelten Proteine mit dem Molekulargewicht von 22 kd waren mit GF2 (21 bzw. 20 kd) vergleichbar.

Eine weitere Auftrennung der TCA-löslichen Speichelproteine nach ihrem isoelektrischen Punkt konnte durch die isoelektrische Fokussierung erzielt werden. Diese wurde als erster Schritt der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) angewandt (Abb. 3.6). Die durch Gelfiltration und -elektrophorese ermittelten Eigenschaften der fünf Proteingruppen sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Detektion bei 280 nm



Detektion bei 214 nm

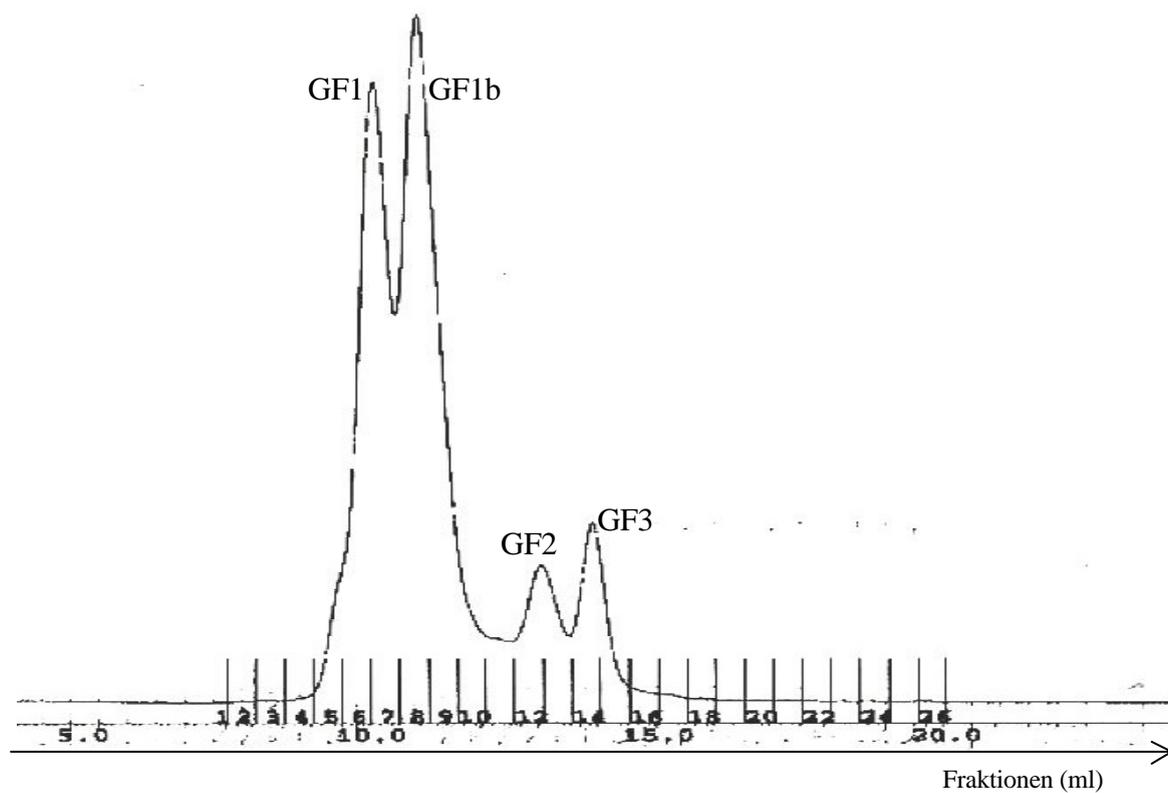


Abbildung 3.5 Gelfiltrationschromatogramme der TCA-löslichen Parotisspeichelproteine des Rehs.

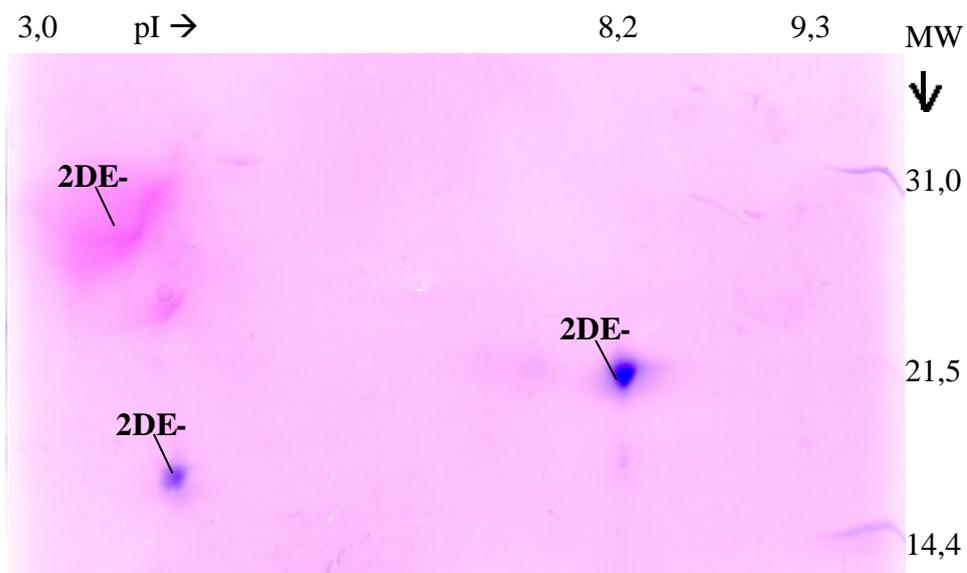
Die prolinreichen Proteine wurden durch die CBB-Färbung für prolinreiche Proteine nach Beeley *et al.* (1991) sichtbar gemacht. Im 2DE-Bild konnten nach dieser Färbung drei Proteingruppen unterschieden werden. Die PRPs (pink-violett) erschienen als nicht weiter auftrennbare Gruppe (2DE-1) mit Molekulargewichten von 25 - 31 kd und isoelektrischen Punkten (pI) bei pH 3,5 - 4,5. Des Weiteren waren sowohl Proteingruppen (2DE-2 und 2DE-3) bei einem MW von 22 kd und einem basischen pI (pH 8,2) als auch bei einem MW von ca. 16 kd und saurem pI (pH 4,0) zu erkennen.

Durch Silberfärbung wurde die Präsenz von zwei weiteren Proteingruppen nachgewiesen (2DE-4 und 2DE-5). Es handelte sich um ca. 22 kd große Proteine mit neutralen pI (pH 7,5) bzw. basische Proteine (pH 8,2) mit einem MW von ca. 18 kd. Die prolinreichen Proteine (2DE-1) konnten trotz höher Sensitivität der Silberfärbung mit dieser Methode nicht auf dem Gel sichtbar gemacht werden.

Tabelle 3.5 Molekulargewichte (MW) und isoelektrische Punkte (pI) der TCA-löslichen Proteine aus Reh-Parotisspeichel. Die Daten wurden durch Gelfiltration und ein- bzw. zweidimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 2DE) ermittelt. Die prolinreichen Proteine (PRP) wurden durch pink-violette Färbung in der 2DE nachgewiesen.

<i>Gel-filtration</i>	<i>MW (kd) 280 nm</i>	<i>MW (kd) 214 nm</i>	<i>Gel-elektrophorese</i>	<i>MW (kd) SDS-PAGE</i>	<i>MW (kd) 2DE</i>	<i>pI (pH)</i>
GF1	51	51	2DE-1 (PRP)	28	25-31	3,5-4,5
GF1b		40				
GF2	21	20	2DE-2	22	22	8,2
			2DE-4		22	7,5
			2DE-5		18	8,2
GF3		15	2DE-3		16	4,0

CBB-Färbung für PRPs



Silberfärbung

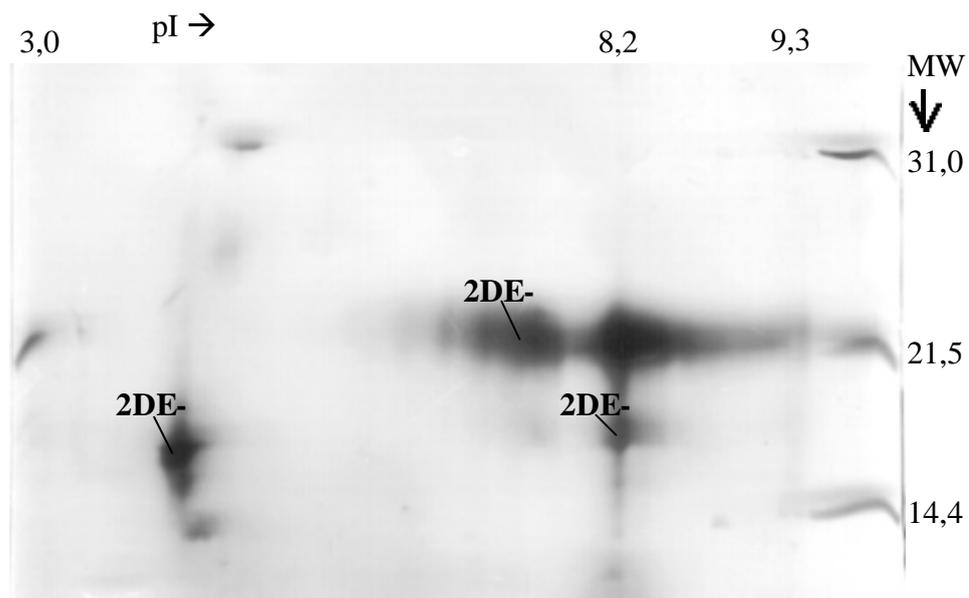


Abbildung 3.6 Proteinzusammensetzung der TCA-löslichen Parotisspeichelproteine des Rehs. Die Proteine (50 µg) wurden mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt (IEF pH-Gradient 3-10; 12,5 %ige SDS-PAGE).

3.3.2 Glykosylierung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

Da sekretorische Proteine oft glykosyliert sind, wurde geprüft, ob die TCA-löslichen Speichelproteine von Reh und Elch Kohlenhydratreste besitzen. Ein hoher Glykosylierungsgrad kann Sequenzierungsversuche dann beeinträchtigen, wenn Kohlenhydratreste am N-Terminus des Proteins gebunden sind. Sie wurden einem Glykoproteintest (PAS-Färbung) unterzogen. In Abbildung 3.7 ist der Nachweis der Glykosylierung der TCA-löslichen Speichelproteine dargestellt. Sowohl die TCA-löslichen Fraktion des Rehspiegels als auch die des Elchspiegels enthalten Glykoproteine.

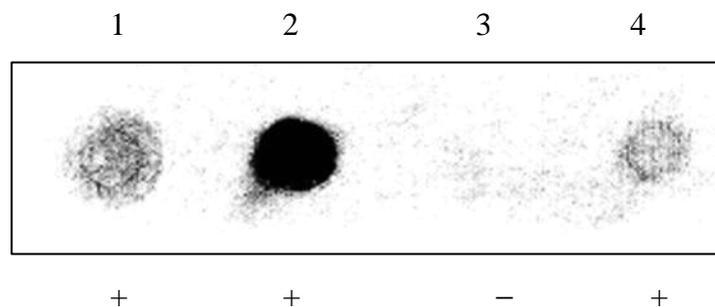


Abbildung 3.7 Glykoproteintest der TCA-löslichen Speichelproteine von Reh und Elch mit PAS-Färbung. 1: Reh, TCA-lösliche Parotisspeichelproteine 2: Elch, TCA-lösliche Parotisspeichelproteine, 3: Negativkontrolle, 4: Positivkontrolle

3.3.3 Sequenzen der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs

3.3.3.1 N-terminale Aminosäuresequenzen der TCA-löslichen Speichelproteine

Es wurde zunächst versucht, die durch Umkehrphasenchromatographie (RPC) getrennten TCA-löslichen Speichelproteine mit Hilfe der matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) zu sequenzieren. Dabei wurde bei den am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin durchgeführten Versuchen eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber Fragmentierungsversuchen durch Ionisation festgestellt. Daher erfolgte eine N-terminale Proteinsequenzierung der Proteine mittels Edmann-Abbau.

Von den aus dem Gelfiltrationspeaks 1 und 2 gewonnenen Proteinen konnten 15 N-terminal sequenziert werden (Abb. 3.8). Dabei konnten acht verschiedene N-terminale Aminosäuresequenzen unterschieden werden. Es fielen prolinreiche Sequenzmotive (fünf Muster 1 - 5) auf:

1. Die Peptide GF1-13, GF2-20 und das aus Ionenaustauschchromatographie hervorgegangene Peptid IEC24-11 enthielten die Sequenz DEPQNPPPP.
2. Die Sequenz GPPPP des GF1-16 wiederholt sich in GF1-17 (LGPPPPGPPPPPEEQP). Sie ist außerdem ein sich teilweise wiederholendes Motiv in mehreren PRPs des Menschen (Genbank-Zugangs-Nummern O00600, P04281, P02811, P81489, Q15214, Q15215) der Ratte (A30496, A39066, A42817, B39066, NP_036764, Q04103, Q04117, Q64371, P10164), der Maus (A29149, A38203, Q62107, Q62106) und des Makaken (JH0481).
3. Proteinen mit dem Muster 1 bzw. 2 ist die Sequenz PPPPEEQ gemeinsam.
4. QPEQSPDE wurde in zwei Peptiden des GF2 gefunden (GF2-14 und -15).
5. QPEESPD kam in GF2-16 und GF2-17 vor.

Zusätzlich kamen drei weitere Sequenzen ohne Prolinanhäufung vor. Die Peptide mit den Sequenzen DLPK (GF1-10), DESQP (GF1-16a) und TVLDLSDNDFPKPP (GF2-32) traten nur einmal auf. Das Muster DESQP wurde in der Sequenz der Aspartataminotransferase der Maus gefunden (P05201). Die folgenden nicht sicher analysierten Aminosäuren GPPPP entsprachen aber nicht mehr dieser Sequenz.

Die Sequenzen der Peptide GF2-37 (KESAAAKFERQHMDP) und IEC24-20 (KESAAAKFE?Q?MDP) kommen in der pankreatischen Ribonuclease A des Rehs (P00664) und anderer Cerviden (P00665, P00666, P00667, P87351) vor. Weitere sinnvolle Übereinstimmungen der analysierten Sequenzabschnitte mit Sequenzdaten der Genbank wurden nicht gefunden.

GF1-13	DEPQNPPPPPEE-----
GF2-20	DEPQNPPPPPEEQ-----
GF1-RPC24-11	DEPQNPPPPPEEQ-----
GF1-RPC24-13	?EPQ??PPP-----
GF1-16a	DESQPGPPP-----
GF1-17	LGPPPPGPPPPPEEQP-----
GF1-16	GPPPPRPPP-----
GF2-14	QPEQSPDE-----
GF2-15	EQPEQSPDE-----
GF2-16	QPEESPDEESP--
GF2-17	EQPEESPD-----
GF2-32	TVLDLSDNDFPKPP-----
GF1-10	DLPKPPP-----
GF2-37	KESAAAKFERQHMDP-----
GF1-RPC24-20	KESAAAKFE?Q?MDP-----

Abbildung 3.8 N-terminale Aminosäuresequenzen von TCA-löslichen Speichelproteinen des Rehs. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe von Gelfiltration und darauffolgender RPC. Die RPC mit Gelfiltrationspeak 1 (GF1) ergab zwei Hauptpeaks RP1 und RP2, von denen RP1 durch IEC aufgetrennt wurde. Die dadurch entstandene Fraktion 24 wurde wiederum durch RPC getrennt und sequenziert. Die kursiv gedruckten Aminosäuren konnten nicht sicher bestimmt werden.

Mit Hilfe eines Verdauers mit Trypsin bzw. LysC sollten die isolierten Proteine fragmentiert werden. Die Zusammensetzung der resultierenden internen Proteinsequenzen sollte Aufschluss über die Gesamtsequenz der PRPs geben. Die Proteine konnten mit diesen Verdaumethoden nicht wie erwartet fragmentiert werden. In Abbildung 3.9 sind zwei Chromatogramme der vor und nach Trypsin-Verdau durchgeführten RPC dargestellt. Beim Vergleich der Elutionsprofile war kein Unterschied zwischen unverdauten Proteinen und mit Trypsin behandelten zu erkennen. Die weitere Sequenzanalyse erfolgte daher an zu mRNA komplementärer DNA (cDNA).

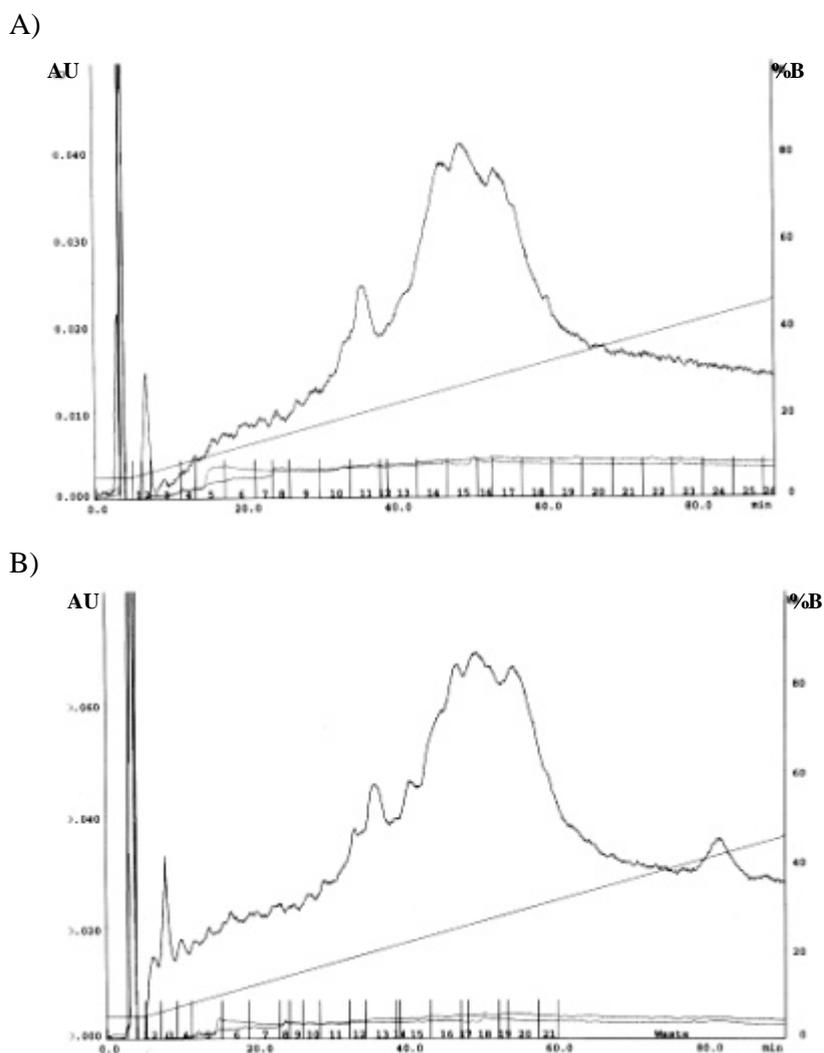


Abbildung 3.9 Trypsin-Verdau der prolinreichen Proteine des Rehs. Mit den TCA-löslichen Proteinen des Parotisspeichels wurde (A) vor und (B) nach dem Verdau eine RPC durchgeführt. AU-Adsorption bei 214 nm; % B - Konzentration des Eluenten B

3.3.3.2 Nukleotidsequenzen von prolinreichen Proteinen des Rehs

Klonierung durch RT-PCR: Mit Hilfe von Primern, die aus der N-terminalen Sequenz des Peptids GF1-17 abgeleitet wurden, konnten die PRP kodierenden Abschnitte amplifiziert (PRP-spezifische RT-PCR), kloniert und sequenziert werden. Dadurch konnten sieben prolinreiche Sequenzen mit 123 – 274 Nukleotiden Länge in Parotis-mRNA ermittelt werden (Abb. 3.10). Diese Sequenzen zeigten untereinander viele Übereinstimmungen, es konnten aber die Klone H1 und A7 von Klon A12 unterschieden werden. Beiden Gruppen gemeinsam war eine 54 Nukleotide lange Sequenz kurz vor Ende des Leserahmens (TAA), mit denen auch die kürzeren Sequenzen (Klone A1, A3, B12 und C12) übereinstimmten.

Klonierung durch Hybridanreicherung: Weitere 18 Klone mit 11 unterschiedlichen prolinreichen Sequenzen (Länge 125 – 328 Nukleotide) wurden durch Hybridisierung ermittelt (Abb. 3.11). Die Bezeichnungen erfolgte durch kleine Buchstaben um sie von den durch RT-PCR ermittelten Klonen unterscheiden zu können. Einen Überblick über den Ursprung der abgebildeten Sequenzen ist im Anhang zu finden. Mit Ausnahme von Klon h23 und g11 enthielten auch sie eine gemeinsame Sequenz vor dem Ende des Leserahmens (65 Nukleotide), die mit der gemeinsamen Sequenz der RT-PCR-Klone identisch war.

Die Verwandtschaft unter den ermittelten PRPs des Rehs wurde als Stammbaum dargestellt (Abb. 3.12). Die Sequenzen der PRP von Ratte und Maus dienten dabei als Außengruppe. Mit der Neighbour-Joining-Methode konnten Klone mit den ähnlichsten Sequenzen zusammengefasst und so vier Gruppen ermittelt werden. Dazu gehörten A-PRPs, die der Sequenz A12 (A1, A3, B12, C12, c33, d33, e23, f63) und H-PRPs, die H1 ähnlich waren (A4, a15, a26, a69, h76); die Klone g11 und a33 bildeten jeweils eine eigene Gruppe.

```

H1      CTCCACCACAGCCACCACCACCAGGACCACCTCCATCAGGACCATTTCCACCAGGACCACCTCCA
A7      -TCCACCACAGCCACCACCACCAGGACCACCTCCATCAGGACCATCTCCACCAGGACCACCTCCA
A1      -----
C12     -----
A3      -----
B12     -----
A12     -----CCCACCAAGTGATGAACCTCAGCCAAGGCCACCCCCACCAACTGGTGAACCTCAGCCA
          *  *  *      *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

```

H1      CCAGAACCACCTGCATTAGGACCACCTCCACCAGGGCCACCCCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGA
A7      CCAGAACCACCTGCATTAGGACCACCTNCACCAGGGCCACCCCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGN
A1      -----CCGAGCA
C12     -----CTGAGCA
A3      -----CTGAGCA
B12     -----TGAGCA
A12     AGGCCACCCCCACCAAGTGATGAACCTCAGCCAAATCCACCCCCACCAGAGGAGCAACCTGAGCA
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

```

H1      GAGTCCAGATGAAGAATCCCCATCCGAGTAATTTGAGAGTCATTGACAGAGCATGAGTATTAAGA
A7      TANTTCAGATGAAGAATCACCATCCGAGTAATCTGAGAGTCATT-----
A1      GAGTCCAGATGAAGACTCACCATCCGAGTAATCTGAAAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAAGA
C12     GAGTCCAGATGAAGACTCACCNTCCGAGTAATCTGAAAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAANA
A3      GAGTCCAGATGAAGACTCACCATCCGAGTAATCTGAAAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAAGA
B12     GAGTCCAGATGAAGACTCACCATCCGAGTAATCTGAAAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAAGA
A12     GAGTCCAGATGAAGACTCACCATCCGAGTAATCTGAAAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAAGA
          *  *  *      *      *      *      *      *      *      *

```

```

H1      CAGCAGTCCTTCAGAAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTTTTCAGTTTACCAATAAAAT
A7      -----
A1      CAGCAGTCCTTCAGAAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTCTTCAGTTTGCCAATAAAAT
C12     CAGCAGTCCTTCAGAAAAGCCATGGNATTGGAGGAAGGCAGTCTGTCTTNANTTTGCCAATAAAAT
A3      CAGCAGTCCTTCAGAAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTCTTCAGTTTNCCAATAAAAT
B12     CAGCAGTCCTTCAGAAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTCTTCAGT-----
A12     CAGCAGTCCTTCAGAAAAGCCATGACATTGGAGGAAGGCAGTCTGTCTTCAGTTT-CCAATAAAAT
          *  *      *  *      *  *      *  *  *  *

```

```

H1      AATCAGCATCC-----
A7      -----
A1      AATCAGCATCC-----
C12     AATCAGCATCCCC-----
A3      AATCAGCATCCA-----
B12     -----
A12     AATTAGCATCCAGTAAAAAAAAA
          *      *  *

```

Abbildung 3.10 Nukleotidsequenz-Alignment der durch RT-PCR sequenzierten PRP des Rehs.
 * – Positionen, an denen sich die Klone unterscheiden; TAA (fett) - Ende des Leserahmens

```

h76 ' -----TTGATAACCTTTTCAGCCCCAGCAGGCCTGTAACAGAAACCTC
a15 -----
a69 -----
a26 -----
d33 ' ' AAGGTCTTTTATGTGTTAACACATAAGGTAACCTCAGTCCAGTTCAGACTCAAGCTCAGATGAGGACT
e23 -----TTTAA
c33 -----ACTCTTTGTCAACCCCA
f63 -----
a33 -----CT
g11 -----CTGGGCTATCTGTTTGGTGTCTCCAATAAATCCTGCATTCCCTTCACCACAAC
h23 -----TCAGGACCACCTCCACCAGGGCC

h76 ' CTCTCATGTCTCCCCACTAAAGCCCGAAATCCACTCTCTCCACCAGGACCACCTCCACCAGAACCA
a15 --AGTCACCACCACCAGGACCACCTCCATCAGGACCATCTCCACCAGGACCACCTCCACCAGAACCA
a69 -----CCGCCGAATCCTAACCA
a26 -----CAAGAGAACCA
d33 ' ' TTTTCATACGATTTTCGTGGAAAACACAGAGAACGCAGAGGACAACCACCTTCCCCTATTGATGAAAA
e23 TAATGGGCAGAAGACCTGAAAAGACATTTCTCCAAAGAGGACAACCACCTTCCCCTATTGATGAAAA
c33 TGGCCTGCAGCATGCCAGGCCTCCCTGTCCATCGCCAACCTCCAGAGCTTGATCAAACCTCATGTCCA
f63 -----TCACAACCTCCCTCTGC
a33 AGTGATTCTCTTGCTTACGCGTGGACCAAGGGCAGCCCAGCATAGTGCCTGACCTTCCCACAGCCA
g11 CCAGCGTCAGTAAACTGACTTCCACCACAGCCACCACCAGGACCACCTCCATCAGGACCATCTCC
h23 ACCTCAACCAGGACCACCTCCACCAAGACCACCCCAAGTGAACCTCAGCCAAGGCCACCC

h76 ' CCTGCATTAGGACCACCTCCACCAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
a15 CCTGCATTAGGACCACCTCCACCAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
a69 CCTGCATTAGGACCACCTCCACCAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
a26 CCTGCATTAGGACCACCTCCACCAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
d33 ' ' CGAAGATGAGGAAG--CTCCAACAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
e23 CGAAGATGAGGAAG--CTCCAACAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
c33 TCAAGTCAGTGATGCTATCCAACAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
f63 ATACATAATTCATTTAACACCAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGCAGAGTCCAGATG
a33 CCACCACCAGGACCACCTCCATCAGGGCCACCCACCAGAGGAGCAACCTGAGGAGAGTCCAGATG
g11 ACCAGAGGAGCAATAGTCCCCTGTAAGCAAGAGCACACGCGTAAGCAAGA-----
h23 CCACCAACTGGTGAACCTCAGCCAAGGCCACCC-----

h76 ' AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGGCAGAGCATGAGTATGAAGACAGCAGTCCTTCA
a15 AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAAGACAGCAGTCCTTCA
a69 AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGACAGAGCATGAGTATGAAGACAGCAGTCCTTCA
a26 AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGACAGAGCAT-----
d33 ' ' AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGACAGAGC-----
e23 AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGACAGAGC-----
c33 AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAG-----
f63 AAGACTCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTGACAGAG-----
a33 AAGAATCACCATCCGAGTAACTCTGAGAGTCATTG-----
g11 -----
h23 -----

h76 ' GAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTTTTTCAGTTTACCAATAAAATAATCAGCATCC
a15 GAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTTTTTCAGTTTACCAATAAAATAATCAGCA---
a69 GAAAGCCATGGCATTGGAGGAAGGCAGTCTGTTTTTCAGTTTACCAATAAAATAATCAGCAT--
a26 -----
d33 ' ' -----
e23 -----
c33 -----
f63 -----
a33 -----
g11 -----
h23 -----

```

Abbildung 3.11 Nukleotidsequenz-Alignment der Klone der Hybridisierungsanreicherung.

' - ebenso Klon h34, h86, c86, b66 und die kürzeren Klone f76, g33; ' ' - ebenso Klon b33

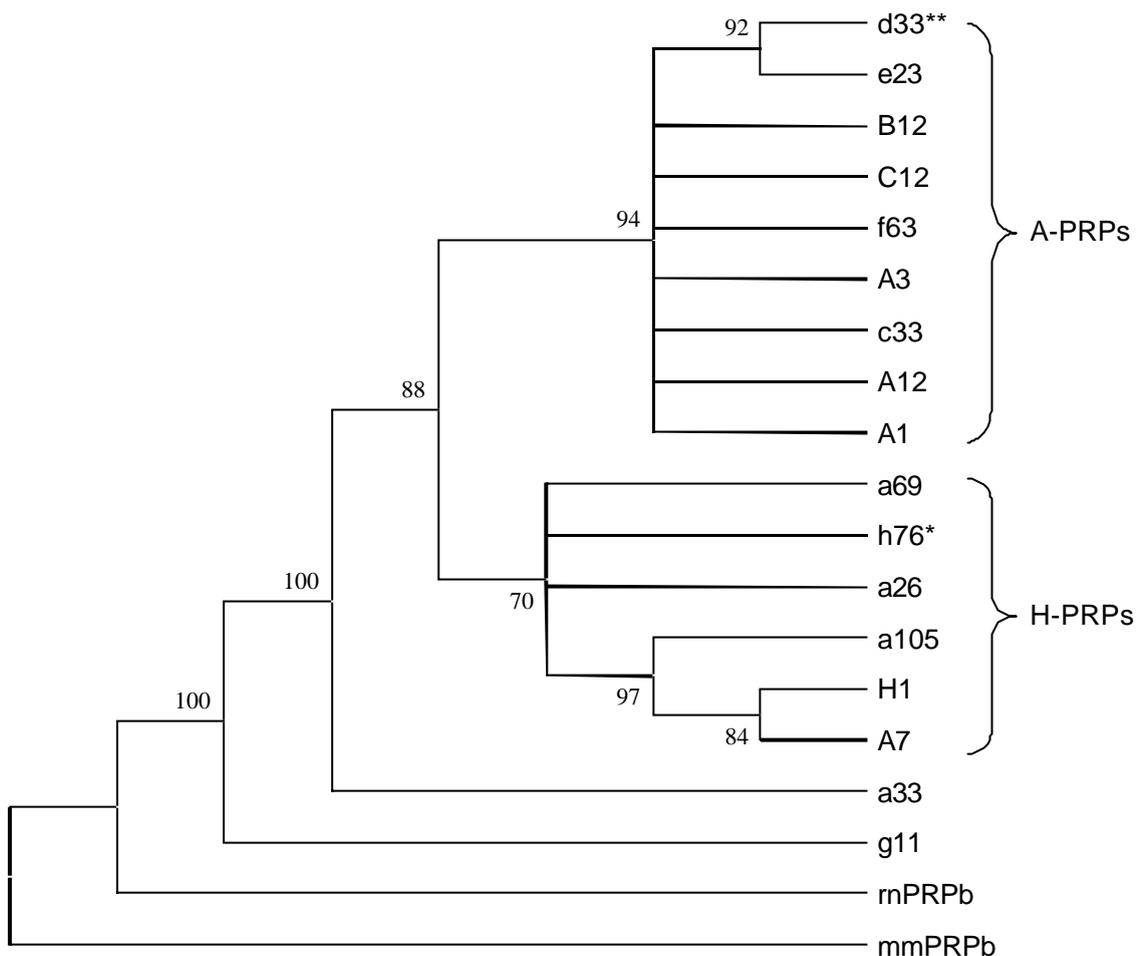


Abbildung 3.12 Stammbaumanalyse der PRP des Rehs. Durch die Neighbour-Joining-Methode (1000 Bootstrap-Wiederholungen) konnten sie in vier Gruppen unterteilt werden. PRPb der Ratte (rnPRPb) und Maus (mmPRPb) wurden als Vergleich herangezogen. * - Übereinstimmungen mit Klon h34, h86, c86, b66 und den kürzeren Klonen f76, g33; ** - Übereinstimmungen mit b33

Proteinsequenzen: Die Übersetzung der Nukleotid- in die Aminosäuresequenzen führte zu Fragmenten prolinreicher Proteine mit vollständigem C-Terminus. Die Klone mit unvollständigem C-Terminus konnten den anderen im Alignment zugeordnet werden (Abb. 3.13). Einige Klone (h76, a69, c33) zeigten Unstimmigkeiten im Leseraster, das durch Stop-Codons unterbrochen wurde. Sie wurden aber aufgrund ihrer Übereinstimmung mit den Sequenzen der anderen prolinreichen Proteinfragmente in das Alignment einbezogen.

Die durch Proteinsequenzierung ermittelten Teilsequenzen der prolinreichen Speichelproteine des Rehs (GF1-10 bis GF2-32; Kap. 3.2.4.1) konnten in den aus mRNA erhaltenen Sequenzen (A1 bis f63) wiedergefunden werden. Allerdings entsprachen sie nicht wie erwartet dem N-terminalen Ende, sondern stimmten mit C-terminalen Aminosäuren überein (Abb 3.13).

```

h76 ' -----*QKPSHVSP TKARNPLSPPGPPPEPPALGPPPPGPPPEEQPEESPDEESPSE
a26 -----REPPALGPPPPGPPPEEQPEESPDEESPSE
H1 -----PPQPPPGPPSGPFPFGPPPEPPALGPPPPGPPPEEQPEESPDEESPSE
A7 -----PQPPPGPPSGPSPPGPPPEPPALGPPXGPPPEEQPE-----
a15 -----SPPPGPPSGPSPPGPPPEPPALGPPPPGPPPEEQPEESPDEESPSE
a69 -----*PPALGPPPPGPPPEEQPEESPDEESPSE
GF1-17 -----LGPPPGPPPEEQP-----
GF1-16 -----GPPPP-----
GF2-16 -----QPEESPDEESP--
a33 -----LVILLLLTRGPRAARHSALTFPQPPPGPPSGPPPEEQPEESPDEESPSE
g11 -----PGLSVWCPPINPAFSPQPSVSKLTSPPQPPPGPPSGPSPPPEEQ-----
c33 -----*CYPTGPPPEEQPEESPDEESPSE
d33 '' KVFYVLTHKVTQSSSDSSSDEDFIRFRGKHKHERRGQPPSPIDENEDEEAPTGPPPEEQPEESPDEESPSE
e23 -----LIMGRRPEKTFLQRGQPPSPIDENEDEEAPTGPPPEEQPEESPDEESPSE
GF2-17 -----EQPEESPDE-----
A12 -----PPPSDEPQPRPPPTGEPQPRPPPSDEPQPNPPPEEQPEQSPDEESPSE
h23 -----SGPPPGPPQPGPPPRPPPSDEPQPRPPPTGEPQPRPP-----
GF2-15 -----EQPEQSPDE-----
GF2-20 -----DEPQPNPPPEEQ-----
GF1-16 -----DESQP-----
f63 -----TTPSAYIIPFNHQGHPPPEEQPEQSPDEESPSE
B12 -----PEQSPDEESPSE
A1 '' ' -----EQSPDEESPSE
GF2-32 -----TVLDLDSNDPKPP-----
GF1-10 -----DLPK-----

```

Abbildung 3.13 Proteinsequenz-Alignment der translatierten Sequenzen der mRNA-Klone (A1 bis f63) und der Proteinfragmente (GF1-10 bis GF2-32). ' - ebenso die Klone h34, h86, c86, b66, f76, g33; '' - ebenso b33; '' ' - ebenso A3, C12; * - STOP-Kodon

Die Eigenschaften einiger potentieller Proteinfragmente der hier analysierten Reh-PRPs wurden mit ExPASy hinsichtlich ihrer Primärstruktur und möglicher post-translationaler Modifizierungen ausgewertet (Tab. 3.6). Ihre MW lagen zwischen vier und acht kd (Expasy, ProtParam). Sie hatten Prolingehalte von 15 – 52 % und saure isoelektrische Punkte zwischen 3,5 - 4,5 (ProtParam). Mit Ausnahme von d33 und g11 sind die Fragmente aufgrund ihrer Aminosäurezusammensetzung bei 280 nm nicht sichtbar (ProtParam). Es wurden drei bis elf mögliche Phosphorylierungs- und drei bis neun Glykosylierungsstellen gefunden (NetPhos 2.0, NetOGlc 2.0, YinOYang). Die Ausbildung von Sekundärstrukturen wurde als unwahrscheinlich berechnet (SignalP 1.1; "MW, pI, titration curve"). Die Fragmente d33 und a33 zeigten Strukturen einer putativen Signalsequenz (SignalP 1.1).

Tabelle 3.6 Voraussage der Primärstruktur und möglicher post-translationaler Modifizierungen ausgewählter Fragmente der PRP des Rehs mit Hilfe von bioinformatischen Analyseprogrammen von ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>). * - Klon A12 und h23 wurden entsprechend ihren Übereinstimmungen zusammengeführt.

<i>Merkmal</i>	<i>h76</i>	<i>H1</i>	<i>A12*</i>	<i>d33</i>	<i>a33</i>	<i>g11</i>
Anzahl der Aminosäuren	54	58	69	72	51	45
MW (kd)	5,6	5,8	7,2	8,2	5,4	4,6
Prolingehalt (%)	41	52	52	15	31	40
pI	4,4	3,5	4,0	4,2	4,5	4,5
Phosphorylierungsstellen	6	3	5	11	4	3
Glykosylierungsstellen	3	5	6	3	5	7
O- β -GlcNAc-Stellen	7	6	7	9	4	6
Extinktions-koeffizient ($\epsilon_{280\text{nm}}$)	0	0	0	1280	0	5690
$A_{280\text{ nm}}$ (1g/l)	-	-	-	0,156	-	1,243
mögliche Signalsequenz (AS)	-	-	-	1-15	1-12	-
mögliche Sekundärstruktur	keine Sekundärstruktur vorausgesagt					

Charakteristisch für H-PRPs ist das repetitive Motiv GPPPP. Ein Prolin kann dabei durch Serin ersetzt sein. Es wurden bis zu fünf Wiederholungen dieses Abschnitts gefunden (Klon a15; Abb. 3.13). Der Klon A12 überlappte mit Klon h23. Beide Sequenzen konnten zu einem PRP-Fragment zusammengesetzt werden, in dem eine Wiederholungssequenz zu erkennen war (RPPPPSDEP), die sich mit einer weiteren überschnitt (EPQPRPPPP).

Die gemeinsame C-terminale Sequenz der meisten Klone war prolinreich und hatte die Aminosäurefolge PPPEEQPE^E/QSPDE^E/D_DSPSE.

Datenbank: Die Suche in der Datenbank ergab keine Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen von Säugetier-PRPs. Auch die Suche nach Übereinstimmungen der anderen analysierten Sequenzen ergaben wenig sinnvolle Ähnlichkeiten. In menschlichen lacrimalen PRPs (XM_046604.1, NM_007244.1) wurden Übereinstimmungen (22 Nukleotide) mit dem C-terminalen Bereich außerhalb des Leserahmens der meisten PRP-Klone des Rehs gefunden. Klon A12 hatte außerdem Übereinstimmungen in einem 14 Nukleotide langen prolinreichen Abschnitt auf dem menschlichen Chromosom 12p13 (AC006518), dessen Funktion nicht beschrieben ist.

Daraus wird geschlossen, dass die prolinreichen Proteine des Rehs eine von PRPs anderer Säugetiere verschiedene Sequenz aufweisen. Der in allen analysierten Klonen ähnliche C-terminale konservative Abschnitt ist möglicherweise typisch für Rehe und stellt einen Ausgangspunkt bei der Analyse der PRP anderer Wiederkäuer dar.

4 Diskussion

4.1 Tanninbindungskapazitäten des Rehspeichels im Vergleich zu anderen Wiederkäuern

4.1.1 Tanninbindungskapazitäten der verschiedenen Ernährungstypen

Tanninbindungskapazitäten von Gesamtspeichel der drei Wiederkäuer-Ernährungstypen wurden verglichen, um eine Aussage darüber zu erhalten, ob die entsprechenden Spezies fähig sind, Tannine zu tolerieren.

Konzentratsselektierer: Im Vergleich zum Rinderspeichel wurden höhere Tanninbindungskapazitäten gefunden. Rehspeichel band an Tanninsäure mit 2,6facher und an Quebracho mit doppelter Bindungskapazität (Tab. 3.1). Rehe nehmen Dikotyledonen auf, die einen hohen Tanningehalt haben können (Tixier und Duncan 1996). Im Speichel dieser Wiederkäuer und drei weiterer Konzentratsselektierer (Maultier- und Weißwedelhirsch, Elch) konnten tanninbindende Proteine bereits nachgewiesen werden (Fickel *et al.* 1998, Austin *et al.* 1989, Mole *et al.* 1990, Robbins *et al.* 1987, Juntheikki 1996).

Intermediärtypen: Die Speichel der untersuchten Rentiere, Moschusochsen und Damhirsche wiesen ähnlich hohe Tanninbindungskapazitäten wie Rehspeichel auf. Die Mischnahrung dieses Ernährungstyps kann Tannine enthalten, was auf das Vorhandensein entsprechender Abwehrmechanismen schließen ließ (McArthur *et al.* 1993, Owen-Smith 1996, Provenza und Malechek 1984). Mit den hier vorgelegten Ergebnissen konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Intermediärtyp-Speichel in der Lage ist, Tannine zu binden. Es unterschied sich lediglich die Tanninsäure-Bindungskapazität des Damhirschspeichels von der des Rehspeichels. Da Damhirschspeichel aber im gleichen Ausmaß wie der Speichel der anderen Intermediärtypen (Moschusochse, Rentier) an Tanninsäure band und das Bindungsverhalten an Quebracho keine Unterschiede zwischen den Ernährungstypen zeigte, wurde daraus keine physiologisch bedeutsame Eigenschaft abgeleitet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zusammenfassung dieser beiden Ernährungstypen (KS und IM) als Browser auch unter speichelphysiologischen Aspekten sinnvoll ist.

Gras- und Rauhfutterfresser: Rinder stehen auf einer Skala der Ernährungsgewohnheiten an einem weit von den Browsern entfernten Ende. Der hohe Grasanteil ihrer Nahrung und das bei ihnen beobachtete Vermeiden der Aufnahme tanninhaltiger Pflanzen führten zu der Annahme, dass die Bildung tanninbindender Proteine nicht erforderlich ist (Hofmann 1976, Owen-Smith 1996, Robbins *et al.* 1987). Es ist daher nicht verwunderlich, dass derartige Proteine nicht im Rinderspeichel nachgewiesen werden konnten. Für Mufflonspeichel wurden

allerdings Tanninbindungseigenschaften festgestellt, die nicht den Erwartungen an einen Grasfresser entsprachen. Mufflonspeichel wies zwar mit Rinderspeichel vergleichbare niedrige Tanninsäure-Bindungskapazitäten auf, band aber doppelt so viel Quebracho wie dieser. Dies deutet darauf hin, dass Mufflons Pflanzen, die kondensierte Tannine enthalten, detoxifizieren und als Nahrungspflanze verwerten können.

Die Tanninbindungskapazitäten der untersuchten Speichel bestätigen weitestgehend das Grazer - Browser - Konzept. Es ist aber nicht als physiologisches Merkmal für die Klassifizierung der Wiederkäuer in die drei von Hofmann (1972, 1976) definierten Ernährungstypen geeignet.

4.1.2 Spezifität der Wechselwirkung zwischen Tanninen und Speichelproteinen

Obwohl Tannine in ihrer Wechselwirkung mit tanninbindenden Speichelproteinen oft spezifisch sind (Asquith und Butler 1986), deutete ein Vergleich der Tanninsäure- und Quebrachobindungskapazitäten des Speichels der meisten untersuchten Wiederkäuerspezies nicht auf eine Spezialisierung für eine bestimmte Tanninsorte hin (Kap. 3.1). Mit Ausnahme von Mufflonspeichel konnten bei den untersuchten Wiederkäuerspeicheln keine Unterschiede in der Bindung an hydrolysierbare (Tanninsäure) bzw. kondensierte (Quebracho) Tannine festgestellt werden. Im untersuchten Gesamtspeichel lagen daher sowohl tanninsäure- als auch quebrachobindende Proteine vor, die zu ähnlichen Bindungskapazitäten für beide Tannine führten. Diese physiologische Adaptation ermöglicht es den Wiederkäuern, ein breites Spektrum an Pflanzen mit unterschiedlichsten Tanninsorten aufzunehmen, ohne die (energieaufwendige) Bildung spezifischer, an einzelne Tannine bindende Speichelproteine induzieren zu müssen.

Mufflonspeichel enthielt Proteine, die spezifisch an kondensierte Tannine banden. Die Bildung dieser Speichelproteine wurde vermutlich durch die entsprechende tanninhaltige Ernährung induziert. Für die untersuchten Mufflons wurde im Nachhinein die Futterzusammensetzung geprüft. Dabei wurde festgestellt, dass sie neben einem tanninlosen Futter zusätzlich Apfeltrester erhielten (M. Lechner-Doll, persönl. Mitteilung). Apfeltrester enthält die kondensierten Tannine der Äpfel in konzentrierter Form (Haslam 1989), womit die hohe Bindungsfähigkeit des Mufflonspeichels an Quebracho (CT) erklärt werden kann.

Eine derartige Affinitätsverschiebung von Speichelproteinen, weg von der generellen Tanninbindung zu erhöhter Bindung an bestimmte Tannine, wurde für den Elch und den Biber nachgewiesen (Hagerman und Robbins 1993). Sie ist physiologisch sinnvoll, wenn sich der das Tier vorrangig von tanninlosen Pflanzen ernährt, aber tanninhaltige Pflanzen als zusätzliche Nahrungsquelle nutzt.

4.1.3 Generelle Einschätzung des Tanninbindungsassays

Tannine: Für den Tanninbindungsassay wurde je ein Vertreter der hydrolysierbaren bzw. kondensierten Tannine gewählt. Sie dienen als Standards für die in der Natur vorkommenden Tannine, entsprechen daher nicht der Tanninzusammensetzung der Nahrungspflanzen der hier untersuchten Wiederkäuer. Tanninsäure ist ein kommerziell erhältliches hydrolysierbares Tannin, das auch in vielen anderen Laboren als Standard dient. Seine Effekte sind allerdings verschieden von den hydrolysierbaren Tanninen aus Naturprodukten (Hagerman *et al.* 1992). Quebracho ist ein kondensiertes Tannin aus dem südamerikanischen Quebracho-Baum. Bei der Einschätzung der ermittelten Tanninbindungskapazitäten muss in Betracht gezogen werden, dass die untersuchten europäischen Wiederkäuer sehr wahrscheinlich nicht an Quebracho adaptiert sind. Mit dem durchgeführten Tanninbindungsassay konnten daher nicht die physiologischen Muster erfasst werden, mit denen die Wiederkäuer auf einzelne Tannine in ihren Nahrungspflanzen reagieren. Vielmehr handelt es sich bei den ermittelten Tanninbindungskapazitäten um eine allgemeine Aussage über die Bindungsfähigkeiten der untersuchten Proteine an hydrolysierbare bzw. kondensiertes Tannin.

Allgemeingültigkeit: Da es sich bei den meisten der untersuchten Spezies um Wildtiere handelte, war die Auswahl und Anzahl der Proben von der Erreichbarkeit und Empfindlichkeit der Tiere abhängig. Es lag keine zufällige Stichprobe und Speichel nur weniger Individuen pro Spezies vor. Es kann daher kein Anspruch auf Allgemeingültigkeit erhoben werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse des Tanninbindungsassays muss beachtet werden, dass nur eine Annäherung an die Verhältnisse der Tanninbindungskapazitäten zwischen den untersuchten Vertretern der jeweiligen Spezies bzw. der Ernährungstypen erfolgte.

Vergleichbarkeit: Der Speichel wurde bei unterschiedlichem Zustand (Anästhesie, Wachzustand) der untersuchten Wiederkäuer entnommen. Von einem Einfluss der Entnahmemethode auf die Ergebnisse wurde aber nicht ausgegangen, da sich durch eine Anästhesie zwar die Konzentration der Proteine ändert, über eine veränderte Zusammensetzung der Proteine allerdings nichts bekannt ist (Young und Schneyer 1981). Der Speichel der Rehe, Rentiere, Moschusochsen und Mufflons wurde unter Anästhesie entnommen, die Speichelentnahme bei den Damhirschen und Rindern erfolgte dagegen ohne Narkose. Da die Tanninbindungskapazitäten mit gleichen Proteinmengen und nicht mit gleichen Speichelmengen (Volumina) gemessen wurden, wurde davon ausgegangen, dass die Messwerte zwischen den Spezies vergleichbar sind.

4.2 Tanninbindende Speichelproteine von Wiederkäuern

4.2.1 Prolingehalte der TCA-löslichen Speichelproteine

Reh, Elch, Moschusochse: Im Speichel von Reh, Elch und Moschusochsen konnten erstmals prolinreiche Proteine (PRPs) nachgewiesen werden. Sie hatten einen Prolingehalt von 29 - 49 % und ähnelten damit dem Prolingehalt der Speichelproteine anderer Spezies (Tab. 1.2). Ihr Prolingehalt lag jedoch deutlich über dem des tanninbindenden Speichelproteins des Maultierhirsches (19 % Prolin), dem bisher einzigen Wiederkäuer, bei dem PRPs nachgewiesen wurden (Austin *et al.* 1989).

Damhirsch: Aufgrund der hohen Tanninbindungskapazitäten ihres Speichels wurde das Vorhandensein von, prolinreichen und damit für die Tanninbindung verantwortlichen Proteinen angenommen, Die TCA-löslichen Speichelproteine des Damhirsches konnten aber nicht eindeutig der Familie der PRPs zugeordnet werden. Mit 13% war ihr Prolingehalt mit dem saurer, relativ prolinreicher Proteine aus Kaninchenspeichel vergleichbar (Rajan und Bennick 1983). Zusammen mit Glycin und Glutamat/Glutamin enthielten die TCA-löslichen Speichelproteine des Kaninchenspeichels aber einen für diese drei Aminosäuren typischen hohen Anteil von 79 - 87 % (Rajan und Bennick 1983, Bennick 1982). Proteinsequenzierungen zeigten außerdem eine Übereinstimmung der Proteine des Kaninchenspeichels mit Sequenzen von PRPs der Ratte, der Maus, des Affen und des Menschen (Spielman *et al.* 1991). In den hier untersuchten TCA-löslichen Speichelproteinen des Damhirsches machten Glycin, Glutamat/Glutamin und Prolin zusammen nur 35 % aus (Tab. 3.4), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass sie nicht der PRP-Familie angehören. Eine eindeutige Klärung dieser Frage, kann nur durch die Sequenzierung dieser Proteine erfolgen.

Rind: Den Erwartungen entsprechend wurden im Rinderspeichel keine prolinreichen Proteine nachgewiesen. Bereits die geringe Tanninbindungskapazität des Gesamtspeichels zeigte, dass keine oder nur sehr wenige tanninbindende Proteine vorhanden waren. Rinder benötigen PRPs wahrscheinlich nur für die orale Homeostase, wofür eine geringe Konzentration ausreicht (McArthur *et al.* 1995). Der Prolinanteil liegt mit 10 % über der in Proteinen durchschnittlichen Prolinfrequenz von 5 % (Creighton 1993). Das zeigt, dass eine geringe Menge an Proteinen mit erhöhtem Prolingehalt isoliert werden konnte. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnten Mole *et al.* (1990) aus der Ohrspeicheldrüse des Rindes Proteine mit einem sehr hohen Prolinanteil (57 %) isolieren. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass PRPs möglicherweise in der Speicheldrüse gespeichert werden. Da sie im Speichel aber nicht nachzuweisen waren, bleibt ihre Bedeutung unklar. Kritisch ist dabei jedoch anzumerken, dass die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung bei Mole *et al.* (1990) außerdem

ohne vorangegangenen Oxidationsschritt erfolgte. Dieser hätte verhindert, dass bei dem für die Analyse der hydrolysierten Aminosäuren notwendigen Auftrennungsschritt mittels HPLC Prolin gleichzeitig mit Glycin eluiert und den scheinbaren Anteil an Prolin erhöht.

Durch die Fällung in 5%iger TCA wurden neben den prolinreichen noch weitere meist kleine Proteine (z.B. aus dem Parotisspeichel des Rehs Ribonuklease A, Zugangsnummer P00664, Prolingehalt 4,8 %, Kap. 3.3.3.1) aus dem Speichel der Wiederkäuer isoliert. Diese Tatsache reflektiert, dass in der Aminosäuretotalanalyse der Prolingehalt von Proteingemischen bestimmt wurde, es ist daher anzunehmen, dass der durchschnittliche Prolingehalt der PRPs der untersuchten Wiederkäuer sogar noch höher ist, als in der Totalanalyse bestimmt wurde.

4.2.2 Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine

Reh: Die Tanninbindungseigenschaften der TCA-löslichen Speichelproteine von Reh und Rind verhielten sich analog zum Gesamtspeichel dieser beiden Spezies. Die aus dem Speichel des Rehs isolierten PRPs wiesen 10 - 26 x höhere Tanninbindungskapazitäten als die TCA-löslichen Speichelproteine des Rinds auf. Neben ihrer hohen Tanninbindungsfähigkeit konnte ihre Zugehörigkeit zur Familie der PRPs nachgewiesen werden.

Rind: Entsprechend den aus den Ernährungsgewohnheiten von Gras- und Rauhfutterfressern abgeleiteten Erwartungen konnten auch unter den TCA-löslichen Speichelproteinen der Rinder keine tanninbindenden Proteine identifiziert werden. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Robbins *et al.* (1987), die für TCA-lösliche Speichelproteine des Rindes eine 21 x niedrigere Bindungsaffinität an Tanninsäure gefunden haben als in entsprechenden Proteinen des Maultierhirsches. Andere Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse jedoch nicht (Makkar und Becker 1998). Dort wurden die tanninbindenden Eigenschaften der TCA-löslichen Proteine des Rinderspeichels mit den unspezifisch bindenden Proteinen BSA und Gelatin verglichen. Gegenüber BSA wurde eine sechsfach stärkere relative Affinität zu Tanninsäure festgestellt, woraus eine tanninbindende Funktion der untersuchten Proteine abgeleitet wurde. Gelatin und Rinderspeichel zeigte jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Tanninsäure-Affinität. Unter anderen Versuchsbedingungen, die denen des in dieser Arbeit verwendeten Tanninbindungsassays entsprachen, zeigte Gelatin eine geringere Tanninsäure-Bindungskapazität als BSA (Fickel *et al.* 1999). Der direkte Vergleich von Speichelproteinen verschiedener Ernährungstypen untereinander ist daher aussagekräftiger als ein Vergleich über den Umweg unspezifisch bindender Referenzproteine.

Moschusochse, Damhirsch: Die relativ hohen Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine der Intermediärtypen zeigten, dass es sich hier um tanninbindende Proteine

handelte. PRPs des Moschusochsen banden Tanninsäure doppelt so gut wie Quebracho. Interessanterweise war die Quebracho-Bindungskapazität der PRPs sogar geringer (2,4fach) als die der Proteine des Gesamtspeichels (Tab. 3.1). Durch die TCA-Fällung wurden möglicherweise vorrangig tanninsäurebindende Proteine isoliert, während einige quebrachobindende Proteine des Moschusochsenspeichels TCA-unlöslich sind. Die TCA-unlösliche Speichelfraktion wurde allerdings hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens nicht untersucht. Auch im Speichel der Damhirsche konnten tanninbindende Proteine nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den TCA-löslichen Speichelproteinen des Rindes banden sie mit dreifacher Tanninbindungskapazität an Tanninsäure und mit 16facher an Quebracho. Beim Damhirsch wiesen die Proteine des Gesamtspeichels etwas höhere Tanninbindungskapazitäten auf als die TCA-löslichen Speichelproteine (1,2 - 1,3fach), was zur Vermutung führte, dass nicht alle tanninbindenden Speichelproteine angereichert werden konnten.

Der Vergleich der TCA-löslichen Speichelproteine mit den Proteinen des Gesamtspeichels zeigt, dass durch den Anreicherungsschritt in 5%iger TCA nicht bei allen untersuchten Wiederkäuern eine Erhöhung der Tanninbindungskapazität erfolgte. Einige Proteine des Moschusochsen- und Damhirschspeichels, die im gewissen Grad tanninsäure- bzw. quebrachobindende Eigenschaften haben, wären demnach nicht TCA-löslich und daher wahrscheinlich auch nicht prolinreich (Muenzer 1979). Der Vergleich zwischen Gesamtspeichel- und isolierten Proteinen sollte allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da die in den Tanninbindungsassay eingesetzten Proteinmengen aufgrund der in Kapitel 2.2 erwähnten Besonderheiten der prolinreichen Proteine mit unterschiedlichen Methoden bestimmt wurden. Der Nachweis von tanninbindenden Proteinen unter den TCA-unlöslichen Speichelproteinen von Moschusochse und Damhirsch kann nur durch den Vergleich der TCA-löslichen mit der unlöslichen Fraktionen erfolgen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die tanninbindenden Proteine des Rehs zur Familie der PRPs gehören. Auch im Elchspeichel wurden prolinreiche Proteine gefunden. Deren Tanninbindungskapazität wurde nicht überprüft, tanninbindende Proteine wurden aber bereits im Elchspeichel nachgewiesen (Juntheikki 1996). Moschusochsen produzieren ebenfalls PRPs, die vor allem an Tanninsäure binden. Tanninbindende Proteine des Damhirsches sind zwar in TCA löslich, aber nicht sehr prolinreich.

4.2.3 Wirkungsweise der tanninbindenden Proteine

Rolle des Prolins: Bei der Betrachtung der Eigenschaften der TCA-löslichen Speichelproteine der verschiedenen Wiederkäuer konnte eine direkte Proportionalität zwischen der Höhe der Tanninsäure-Bindungskapazitäten und dem Prolingehalt nachgewiesen werden. Die tanninbindenden Proteine des Rehs hatten den größten durchschnittlichen Prolingehalt (34,5 %, Tab. 3.4) und wiesen die höchsten Tanninbindungskapazitäten auf (Abb. 3.4). Die Proteine aus Rinderspeichel hatten den geringsten Prolingehalt (10,6 %), der mit der geringsten Tanninbindungsfähigkeit verbunden war. Dies führt zu der Annahme, dass Prolin ausschlaggebend bei der Tanninbindung ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Feststellung, dass die Polyaminosäure Poly-L-Prolin eine höhere Bindung an Tannin als andere Polyaminosäuren ausübte (Oh *et al.* 1980). Außerdem konnte anhand von NMR-Untersuchungen die Rolle des Prolins als ein Schlüsselement bei der Wechselwirkung des Proteins mit dem Tannin aufgeklärt werden. Es sorgt für eine günstige offene, flache und hydrophobe Struktur und begünstigt durch die tertiäre Amidgruppe die Ausbildung der hydrophoben Bindungen (Murray *et al.* 1994). Die geringe Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen konnte durch die Auswertung der analysierten Sequenzen mit ExPASy gezeigt werden. Auch die Konformationsstudien an von PRPs der Maus abgeleiteten Peptiden konnten keine Helixstrukturen nachweisen (Murray und Williamson 1994). Wie die erfolglosen Verdauungsversuche mit Trypsin und Lys C (Kap. 3.2.4) zeigen, verursachte der hohe Prolinanteil durch sterische Hinderung zusätzlich eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen. So kann die Ausübung der biologischen Funktion im Verdauungstrakt ermöglicht werden.

Möglicher Wirkungsmechanismus: Der Wirkungsmechanismus der tanninbindenden Speichelproteine wird in der Literatur wie folgt beschrieben. Wasserstoffbrücken-Bindung mit den Hydroxylgruppen und hydrophobe Wechselwirkungen mit den Ringsystemen der Tannine und der Aminosäuren binden sehr hohe Mengen Tannin pro Proteineinheit (Mueller-Harvey und McAllan 1988, Oh *et al.* 1980, Silber *et al.* 1998). Die Bindung von Nahrungsproteinen oder Verdauungsenzymen durch die Tannine wird dadurch auf ein Minimum reduziert, wodurch die Fermentierungskapazität erhöht wird (Robbins *et al.* 1991). Die Stabilität der Tannin-Speichelprotein-Komplexe gegenüber Verdauungsprozessen sowie der langsame Verdau des Prolins durch Pansen-Bakterien ermöglichen ein Durchschleusen der intakten Tannin-Protein-Komplexe durch den Verdauungstrakt (Robbins *et al.* 1991, Yang und Russell 1992), was durch einen erhöhten Prolingehalt in Fäzes gezeigt wurde (Butler 1989a).

4.3 Charakteristika und Sequenz der prolinreichen Proteine des Rehs

Kenntnisse über die Eigenschaften der tanninbindenden Proteine von Wiederkäuern liegen nur begrenzt vor. Am Beispiel der Speichelproteine des Rehs wurden einige biochemische Eigenschaften und Teilsequenzen von prolinreichen Proteinen eines gut an den hohen Tanningehalt der Nahrung angepassten Wiederkäuers untersucht.

Molekulargewicht: Die Molekulargewichte der PRPs des Rehs betragen laut proteinchemischer Analyse (Gelfiltration und -elektrophorese, Tab. 3.5) zwischen 15 und 50 kd. Prolinreiche tanninbindende Proteine anderer Spezies hatten eine ähnliche Größe. So hatte das tanninbindende prolinreiche Glykoprotein des Maultierhirsches ein MW von 19 kd und das durch Tanningabe induzierbare PRP38 der Ratte 38 kd (Austin *et al.* 1989, Mehansho *et al.* 1983). Große PRPs mit MW über 100 kd, wie sie für verschiedene andere Spezies nachgewiesen sind (z.B. ratGP158, MW 158 kd, Mehansho und Carlson 1983), konnten im Parotisspeichel des Rehs nicht detektiert werden.

Die durch cDNA-Sequenzierung ermittelten MW der PRP-Fragmente waren sehr viel kleiner (5 - 8 kd, Tab. 3.7). Ein Vergleich mit den ermittelten MW der proteinchemischen Analyse ergab, dass wahrscheinlich 10 - 53 % der vollständigen Sequenzen der PRP des Rehs aufgeklärt werden konnten. Eine Überschätzung des MW ist wegen der von den helixbrechenden Prolinen hervorgerufenen entfalteten Struktur der PRPs möglich (Carlson *et al.* 1991). Der größere Radius kann eine verkürzte Retentionszeit in der Gelfiltrationssäule zur Folge haben. Aus dem gleichen Grund erscheinen die großen sauren PRPs (pinkviolett angefärbte Proteine 2DE-1, Abb. 3.6) wahrscheinlich nicht wie erwartet als Proteinspot, sondern als wenig klar definierte Fläche.

Glykosylierung: Auch durch post-translationale Modifikationen wie Glykosylierung kann das MW bei Gelfiltration und -elektrophorese höher erscheinen als aufgrund der Analyse der cDNA errechnet wurde. Eine Glykosylierung der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Die Auswertung der Sequenzen ergab bis zu sieben potentielle Glykosylierungsstellen pro Protein (Tab. 3.7). Eine Glykosylierung am Aminoende konnte bei den Proteinen, die durch N-terminale Sequenzierung analysiert wurden, ausgeschlossen werden. Im PGP200, einem sehr großen prolinreichen Glykoprotein (MW 200 kd) aus der Ohrspeicheldrüse der Ratte wurde ein Kohlenhydratanteil von 55 % nachgewiesen (Miao *et al.* 1995). Die Glykosylierung der Proteine kann bedeutsam für die Tanninbindung sein. Die Kohlenhydratreste erhöhen einerseits die Löslichkeit des Tannin-Protein-Komplexes und sorgen andererseits für eine offene Konformation, was eine effektive Tanninbindung ermöglicht (Asquith *et al.* 1987).

Isoelektrischer Punkt: Die TCA-löslichen Proteine des Reh-Parotisspeichels hatten eine hohe

Tanninbindungskapazität. Durch 2DE konnte gezeigt werden, dass es sich sowohl um basische (pI 7,5 - 8,2) als auch um saure Proteine (pI 3,5 - 4,5) handelte (Tab. 3.5). Während beim Menschen einerseits die basischen PRPs für die Tanninbindung verantwortlich gemacht werden (Lu und Bennick 1998), stellten andere Autoren für keine der menschlichen PRP-Klassen (sauer, basisch, glykosyliert) eine besonders gute Affinität zu einem der untersuchten Tannine fest (Bacon und Rhodes 2000). Wir nehmen an, dass mehrere PRP-Gruppen des Rehs für die Bindung an die Tannine verantwortlich sind. Die isoelektrischen Punkte der sequenzierten Proteinfragmente lagen im sauren Bereich (pI 3,5 - 4,5; Tab. 3.7). Da sie Teile der aus den TCA-löslichen prolinreichen Proteinen ermittelten N-terminalen Sequenzen enthalten (siehe Alignment in Abb. 3.12), liegt die Vermutung nahe, dass die entsprechenden PRPs für die Tanninbindung verantwortlich sind. Bindungsstudien mit den verschiedenen Gruppen der prolinreichen Speichelproteine des Rehs könnten im Rahmen eines zukünftigen Forschungsvorhabens weitere Eigenschaften der tanninbindenden Proteine des Rehs aufklären.

Sequenz: Die Sequenzanalyse zeigte, dass die PRPs des Rehs heterogen sind. Es konnten vier Gruppen unterschieden werden, die alle eine gemeinsame Sequenz im C-terminus hatten. Auch PRPs anderer Spezies zeigten hohe Heterogenität, können aber ebenfalls zu Gruppen zusammengefasst werden. Durch alternatives Splicing von Vorläuferproteinen können aus wenigen Genen eine Vielzahl Proteine entstehen. Ein Beispiel dafür sind die ca. 20 PRPs des Menschen (Azen *et al.* 1984, Kauffman *et al.* 1993, Kim *et al.* 1993, Lyons *et al.* 1988, Maeda *et al.* 1985).

Aus den sequenzierten cDNA-Abschnitten wurde ein hypothetischer Aufbau der PRPs des Rehs abgeleitet (Abb. 4.1).

Signalsequenz: In einigen der PRP-Fragmente konnte am N-Terminus ein Abschnitt gefunden werden, in dem Aminosäuren vorkamen, die im Rest der Fragmente nicht oder selten vorhanden waren. Für die Klone a33, d33 und e23 konnten dort mit ExPASy aufgrund der Hydrophobizität putative Signalsequenzen errechnet werden. Da es sich bei den prolinreichen Speichelproteinen um sekretorische Proteine handelt, ist die Ausbildung einer Signalsequenz notwendig. Ob es sich bei der Voraussage für die drei Fragmente um einen Teil der Signalsequenz handelt, ist allerdings fraglich, da die Größe des vollständigen Proteins nicht bekannt ist.

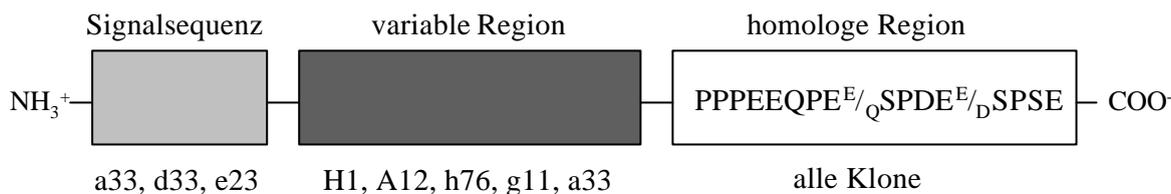


Abbildung 4.1 Möglicher Aufbau der PRP der Rehe (schematisch). In einigen der sequenzierten Klone kann eine putative Signalsequenz erkannt werden. Dieser folgt eine prolinreiche variable Region. Eine in allen Klonen gleiche homologe Region mit zwei möglichen Aminosäureaustauschen befand sich am Ende der Proteine.

Variable Region: Der Signalsequenz folgt eine prolinreiche variable Region, deren Funktion in der Tanninbindung liegen kann. Durch diesen variablen Abschnitt entstehen Proteine mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften, die wegen des heterogenen Aufbaus der Tannine von Bedeutung sein können (Hagerman und Butler 1991). Teilsequenzen dieses variablen prolinreichen Abschnitts (z.B. GPPPP und DES/PQP) wurden in den TCA-löslichen Parotisspeichelproteinen des Rehs gefunden, für die eine hohe Tanninbindungsfähigkeit nachgewiesen wurde. Andererseits ist auch eine Funktion der variablen Region bei der Speicherung in sekretorischen Vesikeln und dem intrazellulären Transport denkbar, da prolinreiche Abschnitte sekretorischer Proteine in den Membranen der sekretorischen Vesikel verankert sein können (Alberts *et al.* 1995, Bennick 1982, Stahl *et al.* 1996).

Die prolinreichen Abschnitte wiederholen sich in einigen Klonen (H-PRPs, A12 und h23) mehrmals (repetitiv; Abb. 3.11 und 3.12). Im Wiederholungselement der H-PRPs, GPPPP, kann jeweils ein Prolin durch ein Serin ersetzt sein. Auch in den PRPs des Menschen, der Ratte und der Maus wurden Wiederholungen mit einigen variablen Aminosäuren gefunden (Azen *et al.* 1984, Clements *et al.* 1985).

Homologe Region: Am C-Terminus befand sich eine homologe Sequenz, die bis auf zwei homologe Aminosäureaustausche in allen sequenzierten Klonen gleich war. Im Proteinsequenz-Alignment (Abb. 3.12) konnten in diesem Bereich Übereinstimmungen mit einigen der über ihre cDNA sequenzierten Speichelproteine gefunden werden, von denen angenommen wurde, dass sie N-terminale Sequenzen darstellten. Dieses Ergebnis kann durch den repetitiven Charakter der PRPs erklärt werden. Der aus GF1-17 abgeleitete Primer für die RT-PCR führte zu den Klonen H1 und A12. Diese Sequenz muss am Beginn dieser Klone daher noch einmal vorhanden sein. Die prolinreichen Strukturen der N-terminal sequenzierten Proteine kommen möglicherweise mehrmals in den PRP vor, sind aber nur teilweise erfasst

worden. Da PRPs sekretorische Proteine sind und wegen der oben erwähnten möglichen Aufgaben der variablen prolinreichen Sequenzen beim intrazellulären Transport, ist es andererseits aber auch möglich, dass die homologe C-terminale Region im Zuge des Transports abgespalten und dadurch aktiviert wird. Das aktive Peptid wäre allerdings trotz möglicher Glykosylierung sehr klein (18 Aminosäuren). Auch spricht der konservative Charakter dieses Abschnitts nicht für eine Funktion bei der Tanninbindung. Die sollte aufgrund der variablen Struktur der Tannine eher von mehreren Proteinen mit variablem Aufbau ausgeführt werden.

Ein Vergleich des hypothetischen Aufbaus der PRPs des Rehs (Abb. 4.1) mit dem von PRPs der Ratte und der Maus zeigt einige Übereinstimmungen. Letztere werden durch vier Regionen charakterisiert (vergl. Abb. 1.4): putatives Signalpeptid, Übergangsregion, Wiederholungsregion und carboxyterminales Ende (Clements *et al.* 1985). Auch für die PRPs des Rehs ist eine Aufteilung der 5'-terminalen Region in ein Signalpeptid, dem eine Übergangsregion folgt, denkbar. Analog zu dem von Clements (1985) postulierten Aufbau konnten auch in den PRPs des Rehs eine prolinreiche Wiederholungsregion (variable Region) und ein C-terminales Ende gefunden werden. Unterschiede lassen sich allerdings in den Eigenschaften dieser Region finden. So sind Signalpeptid und Wiederholungsregion der PRP der Ratte und der Maus hoch konserviert, während beim Reh vor allem in der Wiederholungsregion eine variable Zusammensetzung gefunden werden konnte. Die C-terminale Region ist beim Reh wiederum sehr konservativ, während sie bei den PRPs der Ratte und der Maus variabel ist.

Die PRPs des Rehs gehören einer Proteinfamilie an, die bisher nicht näher beschrieben wurde und von der in der Datenbank keine vergleichbaren Sequenzen vorhanden waren. Möglicherweise sind die PRPs des Rehs bzw. der Wiederkäuer unabhängig von denen anderer Spezies als Antwort auf die in der Ernährung der Wiederkäuer vorkommenden Pflanzeninhaltsstoffe evolviert. PRP-Sequenzen könnten aufgrund der hohen Variabilität in einigen Bereichen möglicherweise als evolutionäre Marker herangezogen werden.

5 Zusammenfassung

Am Beispiel der Wiederkäuer wurde unter Zuhilfenahme von biochemischen und molekularbiologischen Methoden die Adaptation von Pflanzenfressern (Herbivoren) an pflanzliche Sekundärmetabolite wie z.B. Tannine untersucht. Tannine können in nicht an ihren Verzehr adaptierten Spezies durch ihr Proteinbindungsvermögen die Nahrungsverwertung und damit Wachstum und Gesundheit des Pflanzenfressers beeinträchtigen (antinutritive Wirkung).

Einige Wiederkäuerarten wie z.B. das Reh (*Capreolus capreolus*) haben in ihrem Nahrungsspektrum viele stark tanninhaltige Pflanzen, leiden aber nicht unter den erwähnten postdigestiven Konsequenzen. Eine Möglichkeit, die antinutritive Wirkung von Tanninen zu neutralisieren, besteht in der Produktion tanninbindender Speichelproteine.

Der Speichel verschiedener Wiederkäuerarten wurde auf das Vorhandensein tanninbindender Proteine untersucht. Diese Arten wurden so ausgewählt, dass alle drei Ernährungstypen (*Konzentratsselektierer*, *Intermediärtyp*, *Gras- und Rauhfutterfresser*) in den Vergleich eingeschlossen werden konnten. Als Referenzspezies wurde der Konzentratsselektierer Reh herangezogen.

Die Speichelproteine des Rehs und die der Intermediärtypen (Rentier, *Rangifer tarandus*; Damhirsch, *Cervus dama*; Moschusochse, *Ovibos moschatus*) banden ungefähr doppelt so effektiv an hydrolysierbare Tannine (Tanninsäure), wie die der untersuchten Gras- und Rauhfutterfresser (Rind, *Bos taurus*; und Mufflon, *Ovis orientalis musimon*). Diese Abstufung zeigte sich auch bei der Untersuchung der Bindung an kondensierte Tannine (Quebracho). Eine Ausnahme stellte Mufflonspeichel dar, dieser band ebenso gut an Quebracho wie die Speichelproteine der anderen Ernährungstypen.

Über eine Aminosäuretotalanalyse konnte festgestellt werden, dass der Speichel einiger untersuchter Wiederkäuerarten prolinreiche Proteine (PRPs) enthielt. Unter Ausnutzung ihrer Trichloressigsäure (TCA)-Löslichkeit wurden diese angereichert und genauer untersucht. Die Analyse der TCA-löslichen Speichelproteine der Konzentratsselektierer (Reh, Elch) ergab einen relativen Prolingehalt von über 35 %, während beim Moschusochsen noch 29 % gemessen wurden. In Damhirsch- und Rinderspeichel wurden keine prolinreichen Proteine gefunden.

Für die TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs konnte eine hohe Tanninbindungskapazität nachgewiesen werden. Diese banden 24 - 30 x effektiver an Tannine als die TCA-löslichen Speichelproteine des Rindes. Die Tanninbindungskapazitäten der TCA-löslichen Speichelproteine von Moschusochse und Damhirsch waren ebenfalls höher als die des Rindes, aber niedriger als die des Rehs.

Die Kohlenhydrat-Analyse der TCA-löslichen Speichelproteine des Rehs erbrachte, dass es sich bei ihnen um Glykoproteine handelt. Mittels Gelfiltration und zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese konnten fünf Proteingruppen mit Molekulargewichten zwischen 15 und 50 kd sowie isoelektrischen Punkten zwischen 4,0 und 8,2 detektiert werden.

Von 15 dieser Proteine konnten die N-terminalen Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Ausgehend von diesen Informationen wurden Reh-PRP spezifische mRNAs isoliert und partiell sequenziert. Die meisten dieser Fragmente hatten eine gemeinsame 18 Aminosäuren lange C-terminale Sequenz PPPEEQPE^E/QSPDE^E/_DSPSE.

Die Suche nach Übereinstimmungen der analysierten Sequenzen mit anderen Säugetier-PRPs in der Genbank ergab keine sinnvollen Ähnlichkeiten. Die Ergebnisse können zu Informationen über tanninbindende Proteine anderer Wiederkäuer führen. Die Sequenzinformationen stellen einen Ausgangspunkt bei der Analyse der evolutiven Zusammenhänge der Cerviden dar.

6 Summary

Janin Gehrke, Thesis

Investigation of tannin binding salivary proteins of roe deer and other ruminants

University of Potsdam

December 2001

In this work the adaptation of herbivores to plant secondary metabolites was investigated with help of biochemical and molecular biological methods. In unadapted species plant secondary metabolites as tannins can reduce food digestibility and thus diminish growth rate and health status (antinutritive action). Tannins act through its astringency, that means the high capacity to bind proteins, other macromolecules and metal ions. Some ruminant species feed on tannin containing plant but do not suffer from the mentioned nutritive consequences. The production of tannin binding proteins is one possible adaptation mechanism to neutralize the effects of the tannins.

Saliva of six different ruminant species was investigated for the presence of tannin binding proteins. All three feeding types (*concentrate selector*, *intermediate type* and *grass and roughage eater*) were included in the comparison.

Salivary proteins from roe deer (*Capreolus capreolus*, concentrate selector) and from the intermediate feeding types (rein deer, *Rangifer tarandus*; fallow deer, *Cervus dama*; musk ox, *Ovibos moschatus*) bound twice as effective to hydrolysable tannins (tannic acid) as those from the investigated grass and roughage eaters (cattle, *Bos taurus*; moufflon, *Ovis orientalis*). This differentiation could also be observed investigating the binding capacities to condensed tannins (quebracho) except for moufflon. Moufflon salivary proteins bound with the same intensity to quebracho as the salivary proteins from the other feeding types.

Proline rich proteins (PRPs) could be accumulated from roe deer, moose and musk ox saliva by use of its solubility properties in 5 % trichloro acetic acid (TCA). Roe deer and moose TCA soluble salivary proteins contained more than 35 %, musk ox proteins 29 % proline. In fallow deer and cattle saliva PRPs could not be detected.

A tannin binding assay demonstrated for the TCA soluble salivary proteins from roe deer, musk ox and fallow deer but not from cattle, that they are able to bind tannins. Roe deer salivary proteins bound 24 to 30 more effectively to tannins as cattle proteins. Tannin binding capacity of the proteins from musk ox and fallow deer saliva was higher as those from cattle but lower as those from roe deer.

For further analysis of ruminant tannin binding proteins we chose roe deer as reference species. Carbohydrate analysis of TCA soluble proteins from roe deer saliva showed that they were glycoproteins. With help of gel filtration and two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis five proteins groups with molecular weights from 15 to 50 kd and isoelectric points from 4.0 to 8.2 could be detected.

N-terminal amino acid sequences of 15 of the roe deer salivary TCA soluble proteins were determined by Edmann degradation. This information led to partially sequenced roe deer PRP specific cDNA. An 18 amino acid long C-terminal sequence was common in most of the clones. The obtained roe deer PRP sequences did not match with known mammalian PRP sequences from data banks.

The finding in this work can lead to information about salivary tannin binding proteins in other ruminants. The sequence information represent a starting-point for the investigation of cervid evolution.

7 Anhang

7.1 Übersicht über die hergestellten Klone

Tabelle A.1 Ursprung und Genbank-Zugangsnummer der hergestellten Klone.

<i>Method</i>	<i>Klon</i>	<i>Original-name</i>	<i>Primer für cDNA-Synthese</i>	<i>Primer bzw. Sonde</i>	<i>Zugangsnummer</i>
RT-PCR	A1	A1	OligodT ₍₁₅₎	ProA1	
	A3	A3		ProA1	
	A7	A7		ProA2	AF453529
	A12	A12		ProA3	AF453530
	B1	B1		ProA3	
	B12	B12		ProA1	
	C12	C12		ProA1	
	H1	H1rev		ProA2	AF453531
Hybridanreicherung	h34	h034thr	Pint	BIO-Hrev	
	h76	h076dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	AF453533
	c86	c086dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	
	b66	b066dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	
	h86	h086dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	
	a69	a069dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	
	g33	g033dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	
	f76	f076dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	
	a15	a105hhr	OligodT ₍₁₅₎	BIO-Hrev	AF453532
	a26	a026dhr	Zufallshexamere	BIO-Hrev	
	a33	a033dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	AF453539
	b33	b033dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	
	e23	e023dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	AF453534
	d33	d033dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	AF453535
	c33	c033dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	
	f63	f063dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	AF453536
	g11	g011tpi	Pint	BIO-Pinthy	AF453538
h23	h023dpi	Zufallshexamere	BIO-Pinthy	AF453537	

7.2 Verzeichnis der wissenschaftlichen Tiernamen

Biber	<i>Castor canadensis</i>
Bison	<i>Bison bison</i>
Damhirsch	<i>Cervus dama</i>
Ducker	<i>Cephalophinae</i>
Elch	<i>Alces alces</i>
Elen-Antilope	<i>Tragelaphus (taurotragus) oryx</i>
Gemse	<i>Rupicapra rupicapra</i>
Giraffe	<i>Giraffa camelopardalis</i>
Gnu	<i>Connochaetes</i>
Großer Kudu	<i>Tragelaphus strepiceros</i>
Hamster	<i>Mesocricetus auratus</i>
Huhn	<i>Gallus domesticus</i>
Impala-Antilope	<i>Aepyceros melampus</i>
Kaninchen	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
Koala	<i>Phascolarctos cinereus</i>
Kudu	<i>Tragelaphus</i>
Kuhantilopen	<i>Alcelaphinae</i>
Makake	<i>Macaca fascicularis</i>
Maultierhirsch	<i>Odocoileus hemionus</i>
Maus	<i>Mus musculus</i>
Moschusochse	<i>Ovibos moschatus</i>
Mufflon	<i>Ovis orientalis musimon</i>
Opossum	<i>Pseudocheirus perigrinus</i>
Oryx	<i>Taurotragus oryx</i>
Pferdeantilopen	<i>Hippotraginae</i>
Ratte	<i>Rattus norvegicus</i>
Reh	<i>Capreolus capreolus</i>
Rentier	<i>Rangifer tarandus</i>
Rind	<i>Bos taurus</i>
Rotwild	<i>Cervus elaphus</i>
Schaf	<i>Ovis ammon</i>
Schneehase	<i>Lepus timidus</i>
Schwarzbär	<i>Ursus americanus</i>
Schwein	<i>Suss crofa domestica</i>
Thomsongazelle	<i>Gazella thomsoni</i>
Wasserböcke	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>
Weißwedelhirsch	<i>Odocoileus virginiana</i>
Wühlmaus	<i>Microtus oeconomus</i>
Wisent	<i>Bison bonasus</i>
Ziege	<i>Capra hircus</i>

7.3 *Abkürzungsverzeichnis*

2DE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AST	Aspartataminotransferase
BAPNA	N α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: bicinchinonic acid)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
CBB	Coomassie Brilliant Blau
cDNA	zu RNA komplementäre DNA
CT	kondensierte Tannine (engl.: condensed tannins)
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GR	Gras- und Rauhfutterfresser
HPLC	Hochdrucksflüssigkeitschromatographie (engl.: high pressure liquid chromatography)
HT	hydrolysierbare Tannine
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IM	Intermediärtyp
IZW	Institut für Zoo- und Wildtierforschung
kd	Kilodalton
KS	Konzentratsselektierer
MALDI-MS	matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (engl: molekular weight)
MWCO	Angabe für die Porengröße einer Membran (engl.: molecular weight cutt off)
NMR	kernmagnetische Resonanz (engl.: nuclear magnetic resonance)
PAS	Perjodsäure-Schiff (engl. Periodic-Acid-Schiff)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pI	isoelektrischer Punkt
PRPs	prolinreiche Speichelproteine
RPC	Umkehrphasenchromatographie (engl. reversed phase chromatography)
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription von RNA in cDNA
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyle sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSL	Standard für SDS-PAGE (Silver Stain SDS-PAGE Standards, low range)
TCA	Trichloressigsäure (engl. trichloroacetic acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
x	mal
ü.N.	über Nacht

8 Literaturverzeichnis

Abel HJ, Flackowsky G, Jeroch H, Molnar S (1995): Nutztierernährung: Teil II: Das Nutztierpotential, Tannine., 202-203

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson D (1995): *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402

Ann DK und Carlson DM (1985): The structure and organization of a proline-rich protein gene of a mouse multigene family. *Journal of Biological Chemistry* 260, 15863-15872

Ann DK und Lin HH (1993): Macaque salivary proline-rich protein: structure, evolution, and expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4, 545-551

Ann DK, Gadbois D, Carlson DM (1987): Structure, organization, and regulation of a hamster proline-rich protein gene. A multigene family. *Journal of Biological Chemistry* 262, 3958-3963

Aschfalk A, Muller W, Drochner W (2000): The impact of various browse feeds with different tannin content on the fecal shedding of *Clostridium perfringens* in West African dwarf sheep. *Berl Munch Tierärztl Wochenzeitschr* 113, 435-439

Asquith TN und Butler LG (1986): Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry* 25, 1591-1593

Asquith TN und Butler LG (1985): Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemical Ecology* 11, 1535-1544

Asquith TN und Butler LG (1986): Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry* 25, 1591-1593

Asquith TN, Mehansho H, Rogler J, Butler L, Carlson DM (1985): Induction of proline-rich protein biosynthesis in salivary glands by tannins. *Federation Proceedings* 44, 1097-1097

Asquith TN, Uhlig J, Mehansho H, Putman L, Carlson DM, Butler L (1987): Binding of condensed tannins to salivary proline-rich glycoproteins: the role of carbohydrate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 35, 331-334

Austin PJ, Suchar LA, Robbins CT, Hagerman AE (1989): Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *Journal of Chemical Ecology* 15, 1335-1347

Azen EA (1993): Genetics of salivary protein polymorphisms. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4, 479-485

Azen EA, Lyons KM, McGonical T, Barrett NL, Clements LS, Maeda N, Vanin EF, Carlson DM, Smithies O (1984): Clones from the human gene complex coding for the salivary proline-rich proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 81, 5561-5565

Bacon JR und Rhodes MJ (2000): Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 838-843

- Barry TN und McNabb WC (1999): The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81, 263-272
- Bate-Smith EC (1973): Hemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12, 907-912
- Beeley JA, Sweeney D, Lindsay JCB, Buchanan ML, Sarna L, Khoo KS (1991): Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins. *Electrophoresis* 12, 1032-1041
- Behrend A (1999): Kinetik des Ingestaflusses bei Rehen (*Capreolus capreaolus*) und Mufflons (*Ovis ammon musimon*) im saisonalen Verlauf. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, *Dissertation*
- Bennick A (1982): Salivary proline-rich proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* 45, 83-99
- Bennick A und Connell GE (1971): Purification and partial characterization of four proteins from human parotid saliva. *Biochemical Journal* 123, 455-464
- Bennick A, Chau G, Goodlin S, Abrams S, Tustian D, Madapallimattam G (1983): The Role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle *in vivo* and their fate after adsorption to the human enamel surface. *Archives of Oral Biology* 28, 19-27
- Bernays EA, Cooper Driver G, Bilgner M (1989): Herbivores and plant tannins. *Advances in Ecological Research* 19, 263-302
- Bhat TK, Makkar HPS, Singh B (1996): Isolation of a tannin-protein complex-degrading fungus from faeces of hill cattle. *Letters in Applied Microbiology* 22, 257-258
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W (1982): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemistry and Biophysics* 6, 317-339
- Brattsten LB (1992): Metabolic Defenses against Plant Allelochemicals. In *Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. ed. Rosenthal GA, Berenbaum MR, San Diego, 175-242
- Bravo L (1998): Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333
- Bryant JP, Reichardt PB, Clausen TP, Provenza FD, Kuropat PJ (1992): Woody Plant-Mammalian Interaction. In *Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. ed. Rosenthal GA, Berenbaum MR, San Diego, 343-370
- Butler LG (1989a): Effects of condensed tannin on animal nutrition. In *The Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, Plenum Press, New York, 2401-2412
- Butler LG (1989b): New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In *Food Proteins*, Kinsella JE, Soucie WG, American Oil Chemistry Society, Champaign, Illinois, 402-409
- Butler LG, Rogler JC, Mehansho H, Carlson DM (1986): Dietary effects of tannins. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*. Alan R. Liss, 141-157
- Carlson DM (1993): Salivary proline-rich proteins: biochemistry, molecular biology, and regulation of expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4, 495-502

- Carlson DM, Zhou J, Wright PS (1991): Molecular structure and transcriptional regulation of the salivary gland proline-rich protein multigene families. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 41, 1-22
- Carpenter GH und Proctor GB (1999): O-linked glycosylation occurs on basic parotid salivary proline-rich proteins. *Oral Microbiology and Immunology* 14, 5-309
- Cheeke PR und Palo RT (1995): Plant toxins and mammalian herbivores: co-evolutionary relationships and antinutritional effects. In *Recent developments in the nutrition of Herbivores*. ed. Journet M, Grenet E, Farce MH, Therier M, Demerquilly C, INRA Edition, Paris, 437-456
- Chung KT, Lu Z, Chou MW (1998a): Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 36, 1053-1060
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998b): Tannins and Human Health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 421-464
- Ciofi C und Bruford MW (1998): Isolation and characterization of microsatellite loci in the Komodo dragon *Varanus komodensis*. *Molecular Ecology* 7, 134-136
- Clauss M (1998): Feeding Giraffe. University of London, *Master-Arbeit*
- Clauss M (2002): Tannins in the nutrition of wild animals: a review. *Zoo Animal Nutrition*, eingereicht
- Clauss M, Lechner-Doll M, Behrend A, Lason K, Lang D, Streich WJ (2001): Particle retention in the forestomach of a browsing ruminant, the roe deer *Capreolus capreolus*. *Acta Theriologica* 46, 103-107
- Clements S, Mehansho H, Carlson DM (1985): Novel multigene families encoding highly repetitive peptide sequences: sequence analyses of rat and mouse proline-rich protein cDNA's. *Journal of Biological Chemistry* 260, 13471-13477
- Creighton TE (1993): *Proteins: Structures and molecular properties*. W. H. Freeman and Company, New York
- Deutsch A (1995): Aktivität cellulolytischer Enzyme im Vormagen- und Dickdarminhalt von Rehen (*Capreolus Capreolus*). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, *Diplomarbeit*
- Donnelly ED und Anthony WB (1969): Relationship of Tannin, Dry Matter Digestibility and Crude Protein in *Sericea lespedeza*. *Crop Science* 9, 361-362
- Duncan P, Tixier H, Hofmann RR, Lechner-Doll M (1998): Feeding strategies and the physiology of digestion in roe deer. In *The European Roe Deer: The Biology of Success*. ed. Andersen R, Duncan P, Linnell JDC, Oslo, 91-116
- Edwards KJ, Barker JH, Daly A, Jones C, Karp A (1996): Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* 20, 758-760
- Ferreira FD, Robinson R, Hand AR, Bennick A (1992): Differential expression of proline-rich proteins in rabbit salivary glands. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 40, 1393-1404
- Fickel J, Göritz F, Joest BA, Hildebrandt T, Hofmann RR, Breves G (1998): Analysis of parotid and mixed saliva in Roe deer (*capreolus capreolus* L.). *Journal of Comparative Physiology, Part B* 168, 257-264

Fickel J, Pitra C, Joest BA, Hofmann RR (1999): A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 122, 225-229

Fish BC und Thompson LU (1991): Lectin-tannin interactions and their influence on pancreatic amylase activity and starch digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 727-731

Foley WJ und McArthur C (1994): The effects and costs of allelochemicals for mammalian herbivores: an ecological perspective. In *The digestive system in mammals: Food, form and function*, Chivers DJ, Langer P, Cambridge University Press, Cambridge, 370-391

Freeland WJ und Janzen DH (1974): Strategies in herbivory by mammals: the role of plant secondary compounds. *The American Naturalist* 108, 269-289

Getachew G, Makkar HPS, Becker K (2000): Tannins in tropical browses: effect on in vitro microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3581-3588

Goldstein JL und Swain T (1965): The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4, 185-192

Gordon IJ und Illius AW (1994): The functional significance of the browser-grazer dichotomy in african ruminants. *Oecologia* 98, 167-175

Görg A, Postel W, Günther S (1988): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546

Görz F, Hildebrandt T, Hofmann RR, Pitra C (1994): Comparative salivary studies using a new technique yielding uncontaminated saliva from CS, IM and GR ruminant species. *Proc.Soc.Nutr.Physiol.* 3, 319

Hagerman AE und Butler LG (1991): Tannins and Lignins. In *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press, 355-388

Hagerman AE und Butler LG (1978): Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 809-812

Hagerman AE und Butler LG (1981): The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 4494-4497

Hagerman AE und Butler LG (1989): Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology* 15, 1795-1807

Hagerman AE und Butler LG (1991): Tannins and Lignins. In *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press, 355-388

Hagerman AE und Klucher KM (1986): Tannin-Protein-Interactions. In *Plant Flavonoids in Biology and medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss, Inc., 67-76

Hagerman AE und Robbins CT (1993): Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals. *Canadian Journal of Zoology* 71, 628-633

Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL (1998): High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1887-1892

- Hagerman AE, Robbins CT, Weerasuiya Y, Wilson TC, McArthur C (1992): Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management* 45, 57-62
- Harborne JB (1991): The chemical basis of plant defense. In *Plant defenses against mammalian herbivory*. ed. Palo RT, Robbins CT, CRC Press, Boca Raton u.a., 45-60
- Harborne JB (1995): *Ökologische Biochemie: eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Haslam E (1989): *Plant polyphenols - vegetable tannins revisited*. Cambridge University Press, Cambridge
- Hatton MN, Loomis RE, Levine MJ, Tabak LA (1985): Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochemical Journal* 230, 817
- Heukeshoven J, Dernick R, Radola BJ (1986): *Elektrophorese-Forum '86*.
- Hofmann RR (1976): Zur adaptativen Differenzierung der Wiederkäuer; Untersuchungsergebnisse auf der Basis der vergleichenden funktionellen Anatomie des Verdauungstrakts. *Der praktische Tierarzt* 6, 351-358
- Hofmann RR (1985): Digestive Physiology of the Deer - Their morphophysiological specialisation and adaptation. *Biology of Deer Production* 22, 393-407
- Hofmann RR (1988): Aspects of digestive physiology in ruminants. *Proceedings of a Satellite Symposium of the 30th International Congress of the International Union of Physiological Sciences*, 1-19
- Hofmann RR (1989): Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia* 78, 443-457
- Hofmann RR (1993): Die morphologische Anpassung des Verdauungsapparates des Rehs, seine evolutionäre Differenzierung und jahreszeitlichen Veränderungen. In *Rehwild-Symposium Gießen*,
- Hofmann RR und Stewart DRM (1972): Grazer or Browser: a classification based on the stomach structure and feeding habits of East African ruminants. *Mammalia* 36, 226-240
- Humphreys-Beher MG und Wells DJ (1984): Metachromatic staining patterns of basic proline-rich proteins from rat and human saliva in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Journal of Applied Biochemistry* 6, 353-360
- Iason GR und Van Wieren SE (1997): Digestive and ingestive adaptations of mammalian herbivores to low-quality forage. In *Herbivores: between plant and predators*. ed. Olf H, Brown VK, Drent RH, Blackwell Science, Wageningen, 337-369
- Ito S, Isemura S, Saitoh E, Sanada K, Suzuki T, Shibata A (1983): Immuno-histochemical demonstration of salivary proline-rich peptide P-C-like immunoreactivity in human pancreatic β -cells. *Acta Endocrinologia* 103, 544
- Janis C (1976): The evolutionary strategy of the equidae and the origins of rumen and cecal digestion. *Evolution* 30, 757-774
- Jansman AJM, Frohlich AA, Marquardt RR (1994): Production of proline-rich proteins by the parotid gland of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*Vicia faba* L.). *Journal of Nutrition* 124, 249-258

Joest BA (1998): Untersuchungen zum Vorkommen tanninbindender Proteine im Speichel des Rehs (*Capreaolus capreaolus*, Linnaeus, 1758). Freie Universität Berlin, *Dissertation*

Johnsson M, Levine MJ, Nancollas GH (1993): Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4, 371-378

Jones WT, Anerson LB, Ross MD (1973): Bloat in cattle, XXXIX. Detection of protein precipitants (flavons) in legumes. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 16, 441-446

Jung HJG (1977): Responses of Mammalian Herbivores to secondary plant compounds. *The Biologist* 59, 123-136

Juntheikki MR (1996): Comparison of tannin-binding proteins in saliva of Scandinavian and North American moose (*Alces alces*). *Biochemical Systematics and Ecology* 24, 595-601

Kabasa JD, Opuda-Asibo J, ter Meulen U (1999): Effect of polyethylene glycol drench on the erythron function and faecal helminth egg load of pregnant goats fed condensed tannin-containing browse in the Ankole rangeland of Uganda. *Proc.Soc.Nutr.Physiol.* 8, 148-148

Kaluzinski J (1982): Composition of the food of roe deer living in fields and the effect of their feeding on plant production. *Acta Theriologica* 27, 457-470

Kauffman DL und Keller PJ (1979): The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Archives of Oral Biology* 24, 249-256

Kauffman DL, Keller PJ, Bennick A, Blum M (1993): Alignment of amino acid and DNA sequences of human proline-rich proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4, 287-292

Kim HS, Lyons KM, Saitoh E (1993): The structure and evolution of the human salivary proline-rich protein gene family. *Mammalian Genome* 4, 3-14

Klötzli F (1965): Qualität und Quantität der Rehäsung in Wald- und Grünlandgesellschaften des nördlichen Schweizer Mittellandes. Zürich

Kumar R und Singh M (1984): Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32, 447-453

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001): MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* in press,

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

Laycock WA (1978): Coevolution of poisonous plants and large herbivores on rangelands. *Journal of Range Management* 31, 335-342

Lieckfeldt D, Schmidt A, Pitra C (2001): Isolation and characterization of microsatellite loci in the great bustard, *Otis tarda*. *Molecular Ecology Notes* 1, 133-134

Lin HH, Kousvelari EE, Ann DK (1991): Sequence and expression of the MnP4 gene encoding basic proline-rich protein in macaque salivary glands. *Gene* 104, 219-226

Lodovici M, Guglielmi F, Casalini C, Meoni M, Cheynier V, Dolara P (2001): Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extract from red wine. *European Journal of Nutrition* 40, 74-77

- Lu Y und Bennick A (1998): Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology* 43, 717-728
- Lyons KM, Stein JH, Smithies O (1988): Length polymorphism of human PRP generated by intragenetic unequal crossover. *Genetics* 120, 267-278
- Maeda M, Kim HS, Azen EA, Smithies O (1985): Differential RNA splicing and posttranslational cleavage in the human salivary proline-rich protein gene system. *Journal of Biological Chemistry* 260, 11123-11130
- Makkar HPS und Becker K (1998): Adaption of cattle to tannins: role of proline-rich proteins in oak-fed cattle. *Animal Science* 67, 227-281
- Marshall T, Lynass RC, Williams KM (1989): Electrophoresis of human salivary proteins: Response to natural stimulation. *Electrophoresis* 10, 269-271
- McArthur C, Robbins CT, Hagerman AE, Hanley TA (1993): Diet deflection by a ruminant generalist browser in relation to plant chemistry. *Canadian Journal of Zoology* 71, 2236-2243
- McArthur C, Sanson GD, Beal AM (1995): Salivary proline-rich proteins in mammals: roles in oral homeostasis and counteracting dietary tannin. *Journal of Chemical Ecology* 21, 663-691
- McManus JFA (1946): Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158, 202
- Mehansho H (1992): Tannin mediated induction of proline-rich protein synthesis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40, 93-97
- Mehansho H und Carlson DM (1983): Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 6616-6620
- Mehansho H, Ann DK, Butler LG, Rogler J, Carlson DM (1987b): Induction of proline-rich proteins in hamster salivary glands by isoproterenol treatment and an unusual growth inhibition by tannins. *Journal of Biological Chemistry* 262, 12344-12350
- Mehansho H, Butler LG, Carlson DM (1987a): Dietary Tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms. *Annual Reviews of Nutrition* 7, 423-440
- Mehansho H, Clements S, Sheares BT, Smith S, Carlson DM (1985): Induction of Proline-rich Glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannins. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 4418-4423
- Mehansho H, Hagerman A, Clements S, Butler L, Rogler J, Carlson DM (1983): Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 80, 3948-3952
- Miao YJ, Subramaniam N, Carlson DM (1995): cDNA cloning and characterization of rat salivary glycoproteins: novel members of the proline-rich-protein multigene families. *European Journal of Biochemistry* 228, 343-350
- Minaguchi K und Bennick A (1997): Genetics of human salivary proteins. *Journal of Dental Research* 68, 2-15
- Mitaru BN, Reichert RD, Blair R (1984): The binding of dietary protein by sorghum tannins in the digestive tract of pig. *Journal of Nutrition* 114, 1787-1796

Mole S und Waterman PG (1987): Tannins as antifeedants to mammalian herbivores - still an open question? In *Allelochemicals in Agriculture, Forestry and Ecology*. ed. Waller GR, Washington DC, 572-587

Mole S, Butler LG, Iason GR (1990): Defense against dietary tannin in herbivores: a survey for proline rich salivary proteins in mammals. *Biochemical Systematics and Ecology* 18, 287-293

Moreno EC, Varughese K, Hay DI (1979): Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcified tissue international* 28, 7-16

Morton JF (1972): Further associations of plant tannins and human cancer. *Q J Crude Drug Research* 12, 1829-1841

Mueller-Harvey I, McAllan AB (1988): Tannins - Their Biochemistry and Nutritional Properties. JAI Press Ltd. 1-75. 1988. London, I.Morrison (ed).

Muenzer J, Bildstein C, Gleason M, Carlson DM (1979): Purification of Proline-rich Proteins from Parotid Glands of Isoproterenol-treated Rats. *The Journal of Biological Chemistry* 254, 5623-5628

Murray NJ und Williamson MP (1994): Conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence. *European Journal of Biochemistry* 219, 915-921

Murray NJ, Williamson MP, Lilley TH, Haslam E (1994): Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* 219, 923-935

Niezen JH, Waghorn GC, Charleston WAG (1998): Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*lolium perenne*). *Veterinary Parasitology* 78, 13-21

Nyakaana S und Arctander P (1998): Isolation and characterization of microsatellite loci in the African elephant, *Loxodonta Africana*. *Molecular Ecology* 7, 1436-1437

Nygren K und Hofmann RR (1990): Seasonal variation of food particle size in moose. *Alces* 26, 44-50

Odenyo AA und Osuji PO (1998): Tannin-tolerant ruminal bacteria from East African ruminants. *Canadian Journal of Microbiology* 1998, 905-909

Oh HI, Hoff JE, Armstrong GS, Haff LA (1980): Hydrophobic Interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 394-398

Oh HI, Hoff JE, Haff LA (1985): Immobilized condensed tannins and their interactions with proteins. *Journal of Food Science* 50, 1652-1654

Okuda T, Yoshida T, Hatano T (1992): Polyphenols from asian plants - structural diversity and antitumor and antiviral activities. In *Phenolic compounds in food and their effect on health.*, 160-183

Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF (1985): Amino acid sequence of a proline-rich phosphoglycoprotein from parotid secretion of the subhuman primate *Macaca fascicularis*. *Journal of Biological Chemistry* 260, 10671

Osawa R (1992): Tannin-protein complex-degrading enterobacteria isolated from the alimentary tracts of koalas and a selective medium for their enumeration. *Applied Environmental Microbiology* 58, 1754-1749

Osset, Pinol M, de Llorens R, Cuchillo CM (1989): Interference of the carbohydrate moiety in Coomassie Brilliant Blue R-250 protein staining. *Electrophoresis* 10, 271-273

- Owen-Smith N (1996): Distinctive features of the nutritional ecology of browsing versus grazing ruminants. *Proceedings of the 1st International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals* Suppl. II, 176-191
- Owen-Smith N, Robbins CT, Hagerman AE (1993): Browse and Browsers: Interaction Between woody plants and Mammalian Herbivores. *Tree* 8, 158-160
- Pearson WR und Lipman DJ (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 85, 2444-2448
- Provenza FD und Malechek JC (1984): Diet selection by domestic goats in relation to blackbrush twig chemistry. *Journal of Applied Ecology* 21, 831-841
- Rajan AI und Bennick A (1983): Demonstration of proline-rich proteins in rabbit parotid saliva and partial characterization of some of the proteins. *Archives of Oral Biology* 28, 431-439
- Ramisch W (1978): Topographie und funktionelle Anatomie der Kaumuskeln und der Speicheldrüsen des Rehes, *Capreolus capreolus* (Linné 1758). Justus Liebig-Universität Gießen-Lahn, *Dissertation*
- Reid CSW, Ulyatt MJ, Wilson JM (1974): Plant tannins, bloat, and nutritive values. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 34, 82
- Robbins CT (1983): *Wildlife feeding and nutrition*. Academic Press, Orlando, Florida
- Robbins CT, Hagerman AE, Austin PJ, McArthur C, Hanley TA (1991): Variation in mammalian physiological responses to a condensed tannin and its ecological implications. *Journal of Mammalogy* 72, 480-486
- Robbins CT, Mole S, Hagemann TA, Hanley TA (1987): Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in dry matter digestion? *Ecology* 68, 1606-1615
- Robbins CT, Spalinger DE, Van Hoven W (1995): Adaptation of ruminants to browse and grass diets: are anatomical-based browser-grazer interpretations valid? *Oecologia* 103, 208-213
- Saitou N und Nei M (1987): The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425
- Salawu MB, Acamovic T, Stewart CS, Hovell FDD (1997): Quebracho tannins with α without Browse Plus (a commercial preparation of polyethylene glycol) in sheep diets: effect on digestibility of nutrients in vivo and degradation of grass hay in sacco and in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 69, 67-78
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 74, 5463-5467
- Scehovic J (1990): Tanins et autres polymeres phenoliques dans les plantes de prairies: determination de leur teneur et de leur activite biologique. *Revue suisse d'Agriculture* 22, 179-184
- Schupbach P, Oppenheim FG, Lendenmann U, Lamkin MS, Yao Y, Guggenheim B (2001): Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *European Journal of Oral Science* 109, 60-68
- Silber ML, Davitt BB, Kjaerutdinov RF, Hurst JK (1998): A mathematical model describing tannin-protein association. *Analytical Biochemistry* 263, 46-50

Smith PK, Krohn RI, Mallia AK, Gartner FH, Provencano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76-85

Spielman AI und Bennick A (1989): Isolation and characterization of six proteins from rabbit parotid saliva belonging to a unique family of protein-rich proteins. *Archives of Oral Biology* 34, 117-130

Spielman AI, Bernstein A, Hay DI, Blum M, Bennick A (1991): Purification and characterization of a rabbit salivary protein, a potent inhibitor of crystal growth of calcium phosphate salts. *Archives of Oral Biology* 36, 55-63

Stahl LE, Wright RL, Castle JD, Castle AM (1996): The unique proline-rich domain of parotid proline-rich proteins functions in secretory sorting. *Journal of Cell Science* 109, 1637-1645

Stubbe C (1997): *Rehwild: Biologie, Ökologie, Bewirtschaftung*. Parey, Berlin

Stubbs M, Chan J, Kwan A, So J, Barchynsky U, Rassouli-Rahsti M, Robinson R, Bennick A (1998): Encoding of human basic and glycosylated proline-rich proteins by the PRB gene complex and proteolytic processing of their precursor proteins. *Archives of Oral Biology* 43, 753-770

Terrill TH, Douglas GB, Foote AG, Purchas RW, Wilson GF, Barry TN (1992): Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *Journal of Agricultural Science* 119, 265-273

Tixier H (1996): Détermination et ontogénèse du comportement alimentaire du chevreuil (*Capreolus capreolus*). Université de Paris, *Dissertation*

Tixier H und Duncan P (1996): Are European Roe deer Browsers? A review of variation in the composition of their diets. *Revue d'Ecologie la Terre et la Vie* 51, 3-17

Tixier H, Duncan P, Scehovic J, Yani A, Gleizes M, Lila M (1997): Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry, and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology London* 242, 229-245

Van Soest PJ (1988): A comparison of grazing and browsing ruminants in the use of feed resources. In *Increasing small ruminant productivity in semi-arid areas*. ed. Thomson EF, Thomson FS, ICARDA, Netherlands, 67-79

Van Soest PJ (1994): *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press, Ithaca

Van Wieren SE (1996): Browsers and Grazers: Foraging strategies in ruminants. In *Digestive strategies in ruminants and nonruminants*. ed. Van Wieren SE, Thesis Landbouw Universiteit Wageningen, Wageningen, 119-146

Verheyden-Tixier H und Duncan P (2000): Selection for small amounts of hydrolysable tannins by a concentrate-selecting mammalian herbivore. *Journal of Chemical Ecology* 26, 351-358

Verheyden-Tixier H, Duncan P, Guillon N (1999): Roe deer choose to include small amounts of tannins in their diet. *Entretiens de Chizé en Ecologie*, 147-152

Waghorn GC, Ulyatt MJ, John A, Fisher MT (1987): The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition* 57, 115-126

Warner TF und Azen EA (1984): Proline-rich proteins are present in serous cells of submucosal glands in the respiratory tract. *American Review of Respiratory Disease* 130, 115-118

Westermeier R (1990): *Elektrophorese-Praktikum*. VCH, Weinheim

Wong RSC und Bennick A (1980): The primary structure of a salivary calcium-binding proline-rich phosphoprotein (protein C), a possible precursor of a related protein A. *The Journal of Biological Chemistry* 255, 5943-5948

Yang CMJ und Russell JB (1992): Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3954-3958

Young JA und Schneyer CA (1981): Composition of saliva in mammalia. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 59, 1-5

Zhu J und Filippich LJ (1992): Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Research in Veterinary Science* 53, 280-292

Ziener MA, Swain WF, Rutter WJ, Clements S, Ann DK, Carlson DM (1984): Nucleotide sequence analysis of a proline-rich protein cDNA and peptide homologies of rat and human proline-rich proteins. *Journal of Biological Chemistry* 259, 10475-10480

Danksagung

Ich danke den Direktoren des IZW Prof. Dr. Reinhold R. Hofmann und Prof. Dr. Heribert Hofer für die Bereitstellung bzw. Übernahme des Themas und die Möglichkeit, die Promotion am IZW durchzuführen.

Prof. Dr. Florian J. Schweigert danke ich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung und die Möglichkeit, am Institut für Ernährungswissenschaft methodische Erfahrungen zu sammeln.

Besonderer Dank gilt Dr. Jörns Fickel, der mir als Betreuer und Lehrer jederzeit hilfreich zur Seite stand.

Ich danke allen Mitarbeitern des IZW, die mir durch ihre stete Einsatzbereitschaft die Durchführung der Promotion ermöglichten. Besonders gedankt sei Anke Schmidt für die unermüdliche Hilfe bei den Sequenzierungen. Dr. Jürgen Streich sei für die Beratung bei der statistischen Auswertung gedankt. Dr. Frank Göritz, Dr. Robert Hermes, Dr. Matthias Lechner-Doll, Dr. Marcus Clauss und Karin Lason danke ich für ihren Einsatz bei der Beschaffung des Probenmaterials. Dem Forschungsgruppenleiter Prof. Dr. Christian Pitra danke ich für die Vertretung meiner Angelegenheiten.

Für die Beschaffung von Probenmaterial danke ich Dr. Ansgar Aschfalk und Dr. Jon Arnemo (Institut für Arktische Tiermedizin der Norwegischen Hochschule für Veterinärwissenschaften), Hartmut Staar (Gut Hirschau in Bergholz, Brandenburg) und Dr. Patrick Duncan (CNRS Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, Frankreich).

Dr. Regine Kraft und Gerlinde Grelle (Institut für Proteinchemie) gilt großer Dank für die Durchführung der Proteinsequenzierungen.

Elisabeth Pilz aus dem Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam sei für die Hilfe während der Etablierung der Zweidimensionalen Elektrophorese in dortigen Labor gedankt.

Außerdem möchte ich Dr. Jens Furkert (FMP Berlin) für die Unterstützung bei der Gefriertrocknung des Speichels und Dr. Eberhard Krause (FMP Berlin) und Dr. Udo Hartmann (Abteilung Elementarchemie, Humboldt-Universität) für die Durchführung der Massenspektrometrie und Proteinbestimmung danken.

Die Anfertigung der Dissertationsschrift wurde durch ein Promotionsstipendium der FAZIT-Stiftung finanziell unterstützt, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Raumerstr. 29

10437 Berlin

Geburtsdatum: 24. Mai 1974 in Berlin

BILDUNGSWEG UND BERUFSPRAXIS

September 1990 -
September 1992

Abitur am Käthe-Kollwitz-Gymnasium Berlin Prenzlauer Berg

Oktober 1992 -
Dezember 1997

Biochemiestudium an der Universität Potsdam

Februar 1997 -
September 1997

Diplomarbeit am European Institute of Science (EURIS) in Lund, Schweden, zum Thema 'Development of a Magneto Binding Assay for the Detection of Concanavalin A'

März 1998 -
Dezember 2001

Doktorarbeit am IZW Berlin zum Thema 'Untersuchungen tanninbindender Speichelproteine des Rehs und anderer Wiederkäuer' am Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) in Berlin

PRAKTIKA UND STIPENDIEN

Januar 1995 –
Juni 1995

studentische Hilfskraft am Institut für Ökologie und Naturschutz der Universität Potsdam

Februar 1996 -
März 1996

Praktikum am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin

Februar 1997 -
September 1997

Stipendium des EU-Programms Leonardo da Vinci für ein Praktikum am European Institute of Science in Lund, Schweden

Juni 2001 -
November 2001

Promotionsstipendium der Fazit-Stiftung

Dezember 2001