

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Klinische, biochemische und immunologische Aspekte des C-reaktiven Proteins des Hundes

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Anne-Katherine Jasensky  
Tierärztin  
aus Siegburg

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3697

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopfleisch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

dogs, acute phase proteins, c-reactive protein, diagnostic techniques, ELISA,  
protein analysis, recombinant proteins, species differences

Tag der Promotion: 13.05.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-519-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

## INHALTSVERZEICHNIS:

1	Einleitung .....	1
1.1	Unspezifisches Immunsystem und die Akute-Phase-Reaktion .....	1
1.2	Struktur und Eigenschaften des C-reaktiven Proteins.....	4
1.2.1	Humanes CRP .....	4
1.2.2	Canines CRP .....	4
1.3	Akute-Phase-Proteine anderer Tierarten .....	5
1.4	Klinischer Kontext .....	6
1.4.1	cCRP bei Erkrankungen.....	6
1.4.2	Testmethoden und -geräte zur cCRP-Messung.....	7
1.5	Zielsetzungen.....	7
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Klinische Studie.....	9
2.1.1	Hunde .....	9
2.1.2	Schnelltestgeräte .....	9
2.1.3	Durchführung der Messungen.....	10
2.1.4	Statistik .....	11
2.1.5	Verlaufsstudie .....	13
2.2	Proteincharakterisierung .....	14
2.2.1	Probennahme.....	14
2.2.2	Proteinquantifizierung.....	15
2.2.3	cCRP-Reinigung aus Serum .....	15
2.2.4	Gelelektrophorese.....	16
2.2.5	Proteinnachweis nach Gelelektrophorese .....	17
2.2.6	Proteinsequenzierung .....	19
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	20
2.3.1	Molekularbiologische Standard-Techniken.....	21
2.3.2	cDNA-Synthese.....	22
2.3.3	Rekombinantes cCRPs .....	22
2.4	Immunologischer Speziesvergleich .....	26
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Klinische Studie zur Evaluierung .....	27
3.1.1	Allgemeines .....	27
3.1.2	Methodenvergleiche .....	27

3.1.3	Verlaufsstudie .....	33
3.2	Isolierung, Nachweis und Charakterisierung des cCRP .....	35
3.2.1	cCRP-Isolierung aus Hundeserum .....	35
3.2.2	cCRP-Proteinnachweis .....	38
3.2.3	Charakterisierung der Proteinglykosylierung .....	39
3.2.4	Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese .....	41
3.2.5	Partielle Sequenzierung des nativen Proteins .....	44
3.2.6	Vollständige cDNA-Sequenzierung .....	45
3.3	Rekombinantes cCRP .....	45
3.3.1	Untersuchungen der Expression des rekombinanten cCRP .....	45
3.3.2	Reinigungsversuche des rekombinanten cCRP .....	48
3.4	Erster immunologischer cCRP-Vergleich verschiedener Spezies .....	50
4	Diskussion.....	52
4.1	Klinische Studie zur Evaluierung der Messgeräte.....	52
4.2	Charakterisierung des nativen cCRP-Proteins und der mRNA .....	55
4.3	Immunreaktives CRP in verschiedenen Tierarten.....	58
4.4	Ausblick.....	59
5	Zusammenfassung.....	60
6	Summary.....	61
7	Literaturverzeichnis .....	62
8	Anhang.....	70
9	Publikationsliste.....	91
9.1	Publikationen.....	91
9.2	Posterbeiträge.....	91
10	Danksagung .....	92
11	Selbstständigkeitserklärung.....	93

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Aktivierung des Komplementsystems durch CRP.....	3
Abb. 2 Graphische Darstellung der Ergebnisse von TECOmedical.....	30
Abb. 3 Graphische Darstellung der Ergebnisse von EUROLyser.....	31
Abb. 4 Graphische Darstellung der Ergebnisse von LifeAssays. ....	32
Abb. 5 Verlaufskontrolle über 14 Tage. ....	33
Abb. 6 Verlaufskontrolle über 125 Tage. ....	34
Abb. 7 Verlauf einer PCh-Affinitätschromatographie und EDTA-eluierte cCRP-Fraktionen...35	
Abb. 8 Erstellung einer Standardkurve für die Gelfiltration.....	36
Abb. 9 Verlauf der Gelfiltration.....	36
Abb. 10 Vergleich von Einzelerum und gereinigtem cCRP.....	37
Abb. 11 Untersuchung von Einzeleren verschiedener Hunde nach SDS-PAGE und Western Blot.....	39
Abb. 12 Vergleich von Proteinbanden nach Glykosylierungs- und Coomassie-Blau-Färbung. ....	40
Abb. 13 Vergleich von PNGase F behandeltem und unbehandeltem Protein. ....	41
Abb. 14 2D-Gel einer Probe des gereinigten Serum-cCRP nach Proteinfärbung.....	42
Abb. 15 Western Blot einer gereinigten cCRP-Fraktion nach 2D-Gelelektrophorese. ....	43
Abb. 16 Glykosylierungsnachweis nach 2D-Gelelektrophorese von gereinigtem Serum-cCRP.....	43
Abb. 17 Darstellung der nachgewiesenen cCRP-AS-Sequenzen der beiden 22 kDa bzw. 24 kDa Banden.....	44
Abb. 18 cCRP-spezifische PCR nach Klonierung des cCRP-Gens in das Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO®.....	45
Abb. 19 Western Blot-Vergleich von zellfrei produziertem rcCRP-Protein und gereinigtem Serum-cCRP.....	46
Abb. 20 Western Blot-Vergleich von E. coli BL21(DE3)pLysS rcCRP-Protein mit gereinigtem Serum-cCRP.....	46
Abb. 21 Western Blot-Vergleich verschiedener Inkubationszeiten von E. coli BL21(DE3)pLysS mit IPTG. ....	47
Abb. 22 Vergleich der verschiedenen Proteinproduktionen des rcCRP im Western Blot.....	48
Abb. 23 Western Blot von Proteinproben der zellfreien Expression vor und nach IMAC-Reinigung.....	49
Abb. 24 Western Blot von Proteinproben aus BL21(DE3)pLysS Kulturen vor und nach IMAC-Reinigung.....	49

Abb. 25 Vergleich von Serumproben verschiedener Spezies in SDS-PAGE (a) und Western Blot (b). .....51

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Übersicht der Pufferzusammensetzung für die Proteinanalysen.....	14
Tab. 2 Rezept der verwendeten Tricin-Polyacrylamidgele .....	16
Tab. 3 Elektrische Lauf-Bedingungen der SDS-PAGE.....	16
Tab. 4 Zur Immundetektion eingesetzte Antikörper (AK) .....	18
Tab. 5 Übersicht der Puffer und Lösungen für die RNA/DNA-Analysen.....	20
Tab. 6 Verwendete Primer für PCR und DNA-Sequenzierungen .....	20
Tab. 7 Verwendeten Enzyme für die molekularbiologischen Methoden .....	20
Tab. 8 Verwendete Reagenzien für die molekularbiologischen Methoden.....	21
Tab. 9 Auflistung der Bedingungen der durchgeführten PCR-Schritte. ....	21
Tab. 10 Übersicht der untersuchten Tierarten und ihre Bezugsquellen.....	26
Tab. 11 Vergleich der Messwerte zwischen den Schnelltestgeräten und dem ELISA anhand des Grenzwertes 10 mg/l.....	28
Tab. 12 Übersicht der berechneten Werte für die Qualitätsanforderungen. ....	29

## **ANHANGSVERZEICHNIS**

Anhang I.....	70
Anhang II.....	71
Anhang III.....	75
Anhang IV .....	77
Anhang V. ....	80
Anhang VI. ....	80
Anhang VII. ....	80
Anhang VIII .....	81
Anhang IX. ....	82
Anhang X. ....	87
Anhang XI. ....	88
Anhang XII. ....	89
Anhang XIII. ....	90
Anhang XIV.....	90



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>A</b>	Abb.	Abbildung
	Acc. Nr.	Accession Nummer (Zugriffsschlüssel von NCBI)
	AGP	saures alpha1-Glykoprotein
	AK	Antikörper
	APP	Akute Phase Protein
	APR	Akute Phase Reaktion
	AS	Aminosäure
	ASVCP	American Society for Veterinary Clinical Pathology
<b>B</b>	B	Bias (Verzerrung)
	bp	Basenpaare
	BSA	Bovines Serumalbumin
<b>C</b>	Ca <sup>2+</sup>	Calciumion(en)
	cCRP	Canines C-reaktives Protein
	cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
	CNI	Chronische Niereninsuffizienz
	CRP	C-reaktives Protein
	CV	Variationskoeffizient / Inter-Assay-Varianz
<b>D</b>	DAS	<i>Datura stramonium</i> Agglutinin
	DNA	Deoxyribonucleic acid
<b>E</b>	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>F</b>	fw	forward
<b>G</b>	g	Gramm
	GNA	<i>Galanthus nivalis</i> Agglutinin
<b>H</b>	H <sub>2</sub> O	Wasser
	HCl	Salzsäure
	hCRP	Humanes C-reaktives Protein
	HisTag	Poly(6x)-Histidin-Tag
	Hp	Haptoglobin
	HRP	Horseradish Peroxidase
<b>I</b>	IEF	Isoelektrische Fokussierung
	IHA	Immnhämolytische Anämie
	IL	Interleukin
	IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
	ITP	Immunbedingte Thrombozytopenie
<b>K</b>	kb	Kilobasenpaare
	kDa	Kilo-Dalton
<b>L</b>	l	Liter
	LB	Luria/Miller-Medium
	LPS	Lipopolysaccharid
<b>M</b>	m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
	mA	Milliampere
	MAA	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin
	MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight-mass spectrometry
	maAPP	Major acute phase protein
	μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
	Min.	Minute
	miAPP	Minor acute phase protein
	ml	Milliliter
	mM	Millimolar
	moAPP	Moderate acute phase protein
	mol	Mol (Stoffmenge)
	mRNA	messenger RNA

<b>N</b>	n	Nano ( $10^{-9}$ )
	NCBI	National Center for Biotechnology Information
	ng	Nanogramm
	Ni <sup>2+</sup>	Nickelion(en)
<b>O</b>	OD	optische Dichte
<b>P</b>	p	Piko ( $10^{-12}$ )
	PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
	PCh	Phosphorylcholin
	PCR	Polymerase Kettenreaktion
	PNA	<i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin
<b>R</b>	rcCRP	rekombinantes canines C-reaktives Protein
	resp.	respektive
	rev	reverse
	rpm	Revolutions per minute
	RT	Raumtemperatur
	RNA	Ribonucleic acid
	<b>S</b>	SAA
SDS		Sodiumdodecylsulfat
SNA		<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
SOC		Super Optimal broth with Catabolite repression
<b>T</b>	Tab.	Tabelle
	TE	Totaler Fehler
	TNF	Tumor Nekrose Faktor
<b>U</b>	UV	Ultraviolett
<b>V</b>	V	Volt
<b>W</b>	W	Watt

# Chemikalienverzeichnis

	Chemikalie	Bezugsquelle
<b>A</b>	Ampicillin	Biomol
	Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth
<b>B</b>	Bromphenolblau	Merck
	Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich
<b>C</b>	Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
	Chloramphenicol	Carl Roth
	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Carl Roth
	Coomassie Blau G 250	Merck
<b>D</b>	DeStreaktlösung	GE Healthcare
	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) ≥ 99,5 %	Carl Roth
	deoxynucleoside triphosphates (dNTP) Mix, 10 mM	Bioline
	1,4-Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Mannheim
<b>E</b>	Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 50 mM	Fermentas
	Essigsäure	Carl Roth
	Ethanol Rotisolv HPLC Gradient Grade	Carl Roth
	Ethanol, konzentriert	Carl Roth
	Ethidiumbromidlösung 1% 10 mg/ml	Carl Roth
<b>G</b>	Glycerin Rotipuran ≥ 99,5%	Carl Roth
	Glycin ≥ 99 % zur Synthese	Carl Roth
<b>H</b>	Salzsäure (HCl) 1 mol/l	Carl Roth
	HCl 32%	Merck
<b>I</b>	Iminodiessigsäure (IDA)-high	Knauer
	Imidazol	Carl Roth
	Iodacetamid	Appllichem
	Immobiline DryStrip gels (IPG) Puffer pH 3-10 NL (non-linear)	GE Healthcare Bioscience AB
	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Bioline
<b>K</b>	Kaliumchlorid (KCl, max. 0,005% Br)	Merck
<b>L</b>	Luria/Miller-Medium (LB) Medium	Carl Roth
	LE Agarose	Biozym
<b>M</b>	Methanol	Carl Roth
<b>N</b>	N,N-Dimethylformamid Rotipuran ≥ 99,8%	Carl Roth
	Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
	Natronlauge (NaOH)	Carl Roth
	Nickel	Alfa Aesar GmbH
<b>P</b>	p-Aminophenyl-Phosphoryl Choline Gel	Thermo Fisher Scientific
	Plus One Dry Strip Cover Fluid	Amersham Bioscience
	Ponceau	Carl Roth
	2-Propanol	Carl Roth
	Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
<b>R</b>	Random Hexamer Primer 0,2 µg/ µl	Fermentas
	Reaktionspuffer für DNase I mit MgCL <sub>2</sub>	Fermentas
	RotiLoad II 4x konz. nicht reduzierend	Carl Roth
	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
<b>S</b>	Sodiumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth
<b>T</b>	Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer 50x Rotiphorese	Carl Roth
	Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Merck
	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Pufferan <sup>®</sup> ≥ 99,9%	Carl Roth
	Tween 20	Carl Roth
<b>U</b>	Urea	Merck



# 1 EINLEITUNG

“In the mean time I shall myself continue to prosecute this inquiry, encouraged by the hope of its becoming essentially beneficial to mankind.” (Jenner 1798)

Mit diesem Satz schloss Edward Jenner, der „Vater der Immunologie“, die erste Publikation über seine Beobachtungen zur Variola-Vakzination, die er 1798 veröffentlichte. Diese Impfung war die weltweit erste Möglichkeit, Menschen im Vorfeld vor Krankheiten zu schützen. Er sollte mit seiner Aussage über die Nützlichkeit seiner Beobachtungen Recht behalten, denn mit der Entdeckung und flächendeckenden Einführung der Impfung gegen das Pockenvirus (*Variola*) wurde die Erforschung der körpereigenen Abwehrmechanismen - heute als Immunsystem bezeichnet - eingeleitet.

In den darauffolgenden Jahrzehnten erweiterte sich das Feld der Forschung zur Immunität und seinen Faktoren. Ein wichtiger Faktor bei der direkten Antwort des Körpers auf einen u.a. bakteriell ausgelösten, inflammatorischen Stimulus, der so genannten Akute-Phase-Reaktion (APR), ist das C-reaktive Protein (CRP) (Abernethy und Avery 1941; Ebersole und Cappelli 2000).

Das CRP wurde erstmals 1930 von Tillett und Francis bei humanen Patienten mit Pneumokokkeninfektionen beschrieben und nach seiner Fähigkeit, das C-Peptid von *Pneumococcus* spp. zu binden, benannt (Tillett und Francis 1930). Die erste Beschreibung des CRP in Serumfraktionen des Hundes erfolgte 1966 durch Dillman und Coles.

Bis zum heutigen Tag wurden zahlreiche Studien über das C-reaktive Protein sowohl des Menschen als auch bei verschiedensten Tierspezies durchgeführt (Pepys 1981; Pepys und Hirschfield 2003; Petersen et al. 2004; Ceron et al. 2005). Heute wird die Serum-CRP-Konzentration in der Humanmedizin als Standardparameter bei diagnostischen Fragestellungen bestimmt (Pepys und Hirschfield 2003). Auch in der Veterinärmedizin erlangt dieser Entzündungsfaktor immer mehr klinische Bedeutung (Petersen et al. 2004).

## 1.1 Unspezifisches Immunsystem und die Akute-Phase-Reaktion

Die Akute-Phase-Reaktion ist Teil der unspezifischen Immunabwehr, deren Ziel es ist eine Noxe zu eliminieren und die Homöostase wieder herzustellen. Das unspezifische Immunsystem wird durch verschiedenste Einflüsse wie traumatische, infektiöse, toxische oder thermische Noxen stimuliert (Kushner 1982; Ebersole und Cappelli 2000). Diese Veränderungen in der physiologischen Konstitution stimulieren die Zellen der angeborenen Immunantwort Zytokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu bilden. Die wichtigsten Zellen für die direkte Reaktion und Zytokinbildung sind gewebständige Makrophagen. Die verschiedenen Zytokine wiederum stimulieren u.a. die Bildung von Akute-Phase-Proteinen (APPs) in Hepatozyten (Hurlimann et al. 1966). Hierbei werden APPs vom Typ I und Typ II unterschieden: Die Bildung von Typ I APPs, zu denen auch das CRP zählt, wird von IL-1 ähnlichen Zytokinen (IL-1 und TNF) und zusätzlich von IL-6 induziert, während die Bildung der Typ II APPs ausschließlich durch IL-6 stimuliert wird (Mackiewicz 1997; Ebersole und Cappelli 2000). Die APPs umfassen eine Gruppe von Proteinen, deren Serumspiegel sich während der APR typischerweise um bis zu 25% verändert. Anhand ihrer Reaktion auf einen entzündlichen Stimulus werden sie in positive APPs, deren Konzentration ansteigt, sowie negative APPs, deren Konzentration abfällt, eingeteilt (Kushner 1982; Eckersall und Bell 2010). Die positiven APPs unterscheiden sich in der Stärke ihrer Reaktion auf einen Stimulus und lassen sich daher in drei Gruppen einteilen. Ein „major acute phase protein“ (maAPP) liegt bei einem gesunden Tier in einer Serumkonzentration von  $< 1\mu\text{g/l}$  vor und reagiert auf einen entzündlichen Stimulus mit einem schnellen und starken Anstieg der Plasmakonzentration um das 100 bis 1000-fache (Shine et al. 1981; Kushner und Feldmann 1978). Sein Hauptpeak liegt ca. 24 bis 48 Stunden nach dem Stimulus vor und zeigt einen wiederum schnellen Abfall der Konzentration, sobald

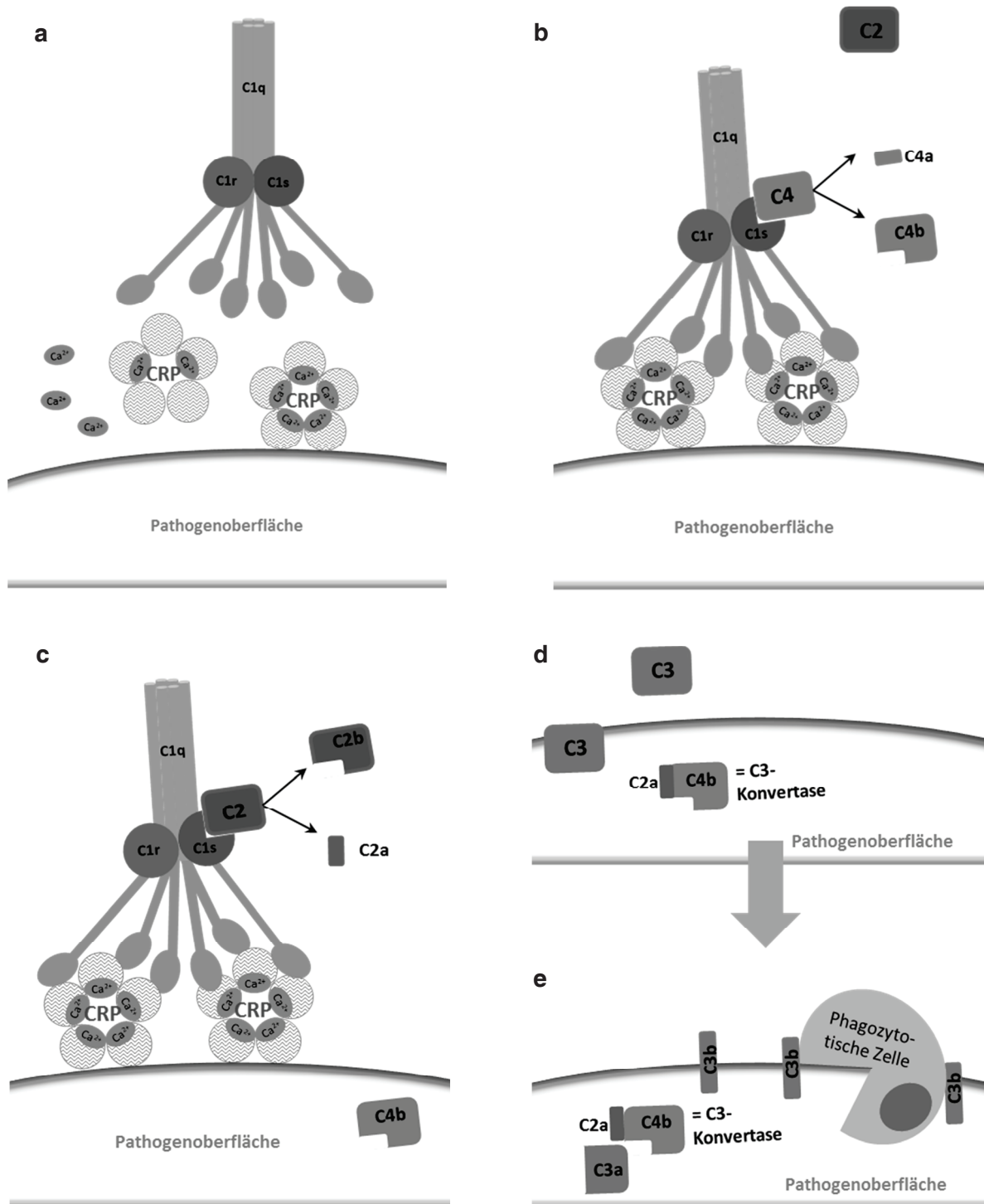
dieser Stimulus nicht mehr vorhanden ist. Im Gegensatz dazu stehen die „minor acute phase proteins“ (miAPP). Diese Proteine steigen nur um das ein- bis zweifache ihres normalen Serumspiegels an. Die „moderate acute phase proteins“ (moAPP) sind durch einen fünf- bis zehnfachen Serumspiegelanstieg mit der höchsten Konzentration nach 2 bis 3 Tagen und einem langsameren Abfall als der der maAPPs gekennzeichnet. Beim Hund zählen CRP und Serumamyloid A (SAA) zu den maAPPs und Haptoglobin (Hp) sowie alpha-Glykoproteinsäure (AGP) zu den moAPPs (Eckersall und Bell 2010). Darüber hinaus wird Ceruloplasmin ebenfalls zu den moAPPs gezählt (Ceron et al. 2005).

Nach Freisetzung des CRP aus Hepatozyten bindet dieses an verschiedene Strukturen und unterstützt durch Markierung die immunologische Reaktion auf die Noxe. Außerdem bindet CRP über spezifische CRP-Rezeptoren an Monozyten und Makrophagen und bewirkt deren Modulation sowie die Stimulierung weiterer Zytokin-Produktion. Außerdem verhindert CRP die Gewebemigration von neutrophilen Granulozyten (Zouki et al. 1997).

Die bereits von Tillett und Francis beschriebene Bindungsfähigkeit des CRP an die verschiedenen Strukturen beruht auf der Affinität zu Phosphorylcholinmolekülen (PCh) und erfolgt Calcium-abhängig (Tillett und Francis 1930; Abernethy und Avery 1941). Das PCh ist Bestandteil biologischer Membranen und Baustein der Teichonsäuren in Bakterienwänden, v.a. grampositiver Bakterien. Es ist aber auch in Kapselkohlenhydraten und Lipopolysacchariden (LPS) verschiedener Mikroorganismen zu finden. Darüber hinaus ist CRP auch befähigt, freiliegendes Chromatin und Nukleosomkernpartikel zu binden (Robey et al. 1984). In biologischen Membranen ist PCh hauptsächlich als polare Kopfgruppe von Lecithin und Sphingomyelin in der äußeren Membranschicht zu finden. Bei einem Zellschaden erfolgt ein Austausch von Phospholipiden zwischen innerer und äußerer Membranschicht und dadurch eine Anreicherung von Phosphatidylserinen und -ethanolaminen in der äußeren Membranschicht (Zachowski 1993). Diese Phospholipide werden durch die (humane) sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) in Lysphosphatidylcholin hydrolysiert, welches die Bindung von CRP erlaubt (Hack et al. 1997). Es kommt zur Aktivierung des klassischen Komplementweges.

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Teil der angeborenen Immunität und seine Aktivierung hat zum einen die Mobilisierung von inflammatorischen Zellen sowie die erleichterte Aufnahme von Pathogenen in Phagozyten durch ihre Opsonierung zur Folge und führt zum anderen zur Zerstörung von Pathogenen durch die Bildung eines Membran-Angriffskomplexes (Du Clos 2000). Es besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die aufgrund enzymatischer Reaktionskaskaden in verschiedene aktivierte Proteine gespalten werden. Das Komplementsystem kann über drei verschiedene Mechanismen aktiviert werden: den klassischen Weg, den Lektinweg oder den alternativen Weg. Alle drei Wege interagieren mit unterschiedlichen Teilen der Pathogenoberfläche und enden gemeinsam in der Aktivierung der C3-Konvertase. Im Weiteren wird nur der klassische Weg der Komplementaktivierung beschrieben, da nur dieser durch das CRP angesprochen wird (Kaplan und Volanakis 1974).

Der klassische Komplementweg verbindet die angeborene mit der spezifischen, humoralen Immunantwort. Eine Untereinheit des ersten Komplementfaktors C1, das C1q, bindet entweder das CRP resp. die Fc-Region von Antikörpern (AK), die in einem Immunkomplex mit dem Pathogen vorliegen oder die Oberfläche eines Pathogens selbst. Die Bindung führt zur Autokatalyse und der Bildung einer aktiven Serinprotease, die im Folgenden eine Enzymkaskade einleitet. Das von C1 dissoziierte C1s wiederum spaltet die Komplementfaktoren C2 und C4, woraus die Bildung der C3 (C4bC2a)-Konvertase resultiert. Diese liegt gebunden an der Oberfläche des Krankheitserregers vor und spaltet C3 in ein kleineres C3a und ein größeres C3b Molekül (Abb. 1) (Volanakis 1982).



**Abb. 1 Aktivierung des Komplementsystems durch CRP.** Das C-reaktive Protein (CRP) bindet Calcium-abhängig an die Pathogenoberfläche (a). Durch die Bindung an das Pathogen wird wiederum die Bindung der Untereinheit C1q des Komplementfaktors C1 an das CRP initiiert. Die C1s-Untereinheit wird daraufhin zu einer Serinprotease aktiviert und kann im weiteren Verlauf verschiedene Komplementfaktoren spalten. Zunächst erfolgt die Spaltung des Komplementfaktors C4 in C4a und C4b durch die Serinprotease C1s (b). Das C4b bindet nach erfolgter Spaltung an die Pathogenoberfläche und die Serinprotease C1s spaltet den Komplementfaktor C2, ebenfalls in die aktiven Produkte C2a und C2b (c). Das Spaltprodukt C2a lagert sich an das bereits gebundene C4b auf der Pathogenoberfläche an und bilden dort einen Komplex mit katalytischer Aktivität, die C3-Konvertase (d). Diese spaltet den Komplementfaktor C3, wobei sich die C3b-Spaltprodukte an die Pathogenoberfläche anlagern und so die Phagozytose erleichtern (e).

Eine Vielzahl von C3b Molekülen bindet über Thioesterbindungen an die Pathogenoberfläche und bildet dadurch eine Hülle um das Pathogen, welche die Aufnahme durch Phagozyten erleichtert. Die an Pathogene gebundenen Komplementkomponenten werden von Komplementrezeptoren auf Phagozyten erkannt, die ihre Reaktion z.T. G-Protein-gekoppelt vermitteln. Außerdem bindet das C3b an die C3-Konvertase und bildet dadurch die C5 (C4bC2aC3b)-Konvertase. Diese spaltet wiederum den Komplementfaktor C5, wodurch die Bildung des Membran-Angriffkomplexes (bestehend aus den Komplementfaktoren C5b und C6 bis C9) eingeleitet wird, der final die Lyse von Bakterien mittels Ionen, Lysozym und Wasser ermöglicht (Mayer et al. 1979).

## **1.2 Struktur und Eigenschaften des C-reaktiven Proteins**

### **1.2.1 Humanes CRP**

Im gesunden Organismus, unter physiologischen Bedingungen wird humanes CRP (hCRP) nur in geringen Mengen von wenigen µg/ml produziert (Shine et al. 1981). Die Synthese des CRP in Hepatozyten wird durch IL-1, TNF und IL-6 stimuliert, aber auch durch Glukokortikoide sowie weitere andere Stoffklassen bei der inflammatorischen Stimulierung unterstützt (Toniatti et al. 1990; Mackiewicz 1997). Die Bildung beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Leber: Jabs und Kollegen haben gezeigt, dass CRP beim Menschen zum Teil auch in der Niere produziert wird (Jabs et al. 2003) und Dong und Wright wiesen seine Produktion in Alveolarmakrophagen nach (Dong und Wright 1996).

Die Struktur des humanen CRPs wurde durch verschiedene Studien hinreichend geklärt (Osmand et al. 1977; Shrive et al. 1996; Thompson et al. 1999). Das Protein ist ein 115 kDa großes, nicht kovalent verbundenes Homopentamer aus fünf, je 206 Aminosäuren langen und 23 kDa schweren Untereinheiten (UEs) und besitzt eine PCh-bindende Seite mit den Calcium-Bindungsstellen sowie eine Effektorseite, welche die Reaktion mit den effektorischen Teilen des Immunsystems wie Phagozyten oder Komplementkomponenten vermittelt (Volanakis 2001). Das hCRP ist auf dem Chromosom 1 (zwischen 1q21 und 1q23) codiert (Whitehead et al. 1983). Seine Gensequenz enthält 2263 Nukleotide und ein Intron (Woo et al. 1985). Die Expression des Proteins bei einem inflammatorischen Stimulus wird hauptsächlich transkriptional reguliert. Das Transkript des hCRP ist sehr groß, wobei eine 1,2 kb große 3'-untranslatierte Region für den schnellen Abbau des Proteins verantwortlich zu sein scheint (Volanakis 2001). Die fünf UEs des Proteins werden im endoplasmatischen Retikulum zusammengesetzt und durch zwei Carboxylesterasen zurückgehalten, bis seine Ausschüttung erforderlich wird (Macintyre et al. 1994).

Posttranslationale Modifikationen sind für einen Teil der APPs, insbesondere AGP und Haptoglobin, bereits beschrieben. Eine Glykosylierung des hCRP ist seit 2003 bekannt, wobei ein spezifisches Glykosylierungsmuster des hCRP wohl mit verschiedenen Erkrankungen korreliert ist (Das et al. 2003).

### **1.2.2 Canines CRP**

Eine erste, genauere Charakterisierung des caninen CRP (cCRP) erfolgte 1984 durch Caspi und Mitarbeiter: Das Protein hat ein Gesamtmolekulargewicht von ca. 100 kDa und besteht aus fünf gleichen Untereinheiten (Homopentamer), von denen zwei glykosyliert und drei nicht-glykosyliert sind. Diese weisen unterschiedliche Molekulargewichte von 20 und 25 kDa auf (Caspi et al. 1984). Bei der Untersuchung des isoelektrischen Punktes zeigten sich 12 eng nebeneinander liegende Banden in einem pH-Bereich zwischen 5,60 und 6,65 und eine weitere Einzelbande bei einem pH von 5,3. Diese Auftrennung in der Elektrophorese zum einen nach Molekülgröße als Doppelbande und zum anderen nach elektrischer Ladung als multiple Banden an verschiedenen pH Punkten wurde von Caspi et al. (1984) auf eine nicht näher bestimmte Glykosylierung zurückgeführt.



Nicht nur in der Human-, auch in der Veterinärmedizin sind posttranslationale Modifikationen einiger APPs beschrieben: In einer Studie wurden erkrankungsspezifische Verschiebungen im Glykosylierungsmuster des Haptoglobins bei Hunden mit verschiedenen Leberdysfunktionen gefunden (Andersson et al. 1998). Ob diese Modifikationsmuster einen Einfluss auf die Erkrankungsschwere oder den –verlauf haben oder ob sie einen Hinweis auf die Art der immunologischen Reaktionen geben, ist bisher nicht bekannt.

Aufgrund von *in silico* Studien wird das Chromosom 38 als Genlocus für das cCRP angenommen. Sein daraus theoretisch abgeleitetes Transkript besteht demnach aus 1.388 Nukleotiden, wobei nur 672 davon für die translatierte Region codieren und die Nukleotide zwischen Position 22.396.857 und 22.397.572 ein 716 bp langes Intron bilden. Über die Regulation der Transkription beim Hund ist bisher noch nichts bekannt.

### 1.3 Akute-Phase-Proteine anderer Tierarten

Die angeborene Immunantwort ist ein phylogenetisch weit zurückreichendes System zum Schutz vor äußeren Umweltbedingungen. Das CRP gehört zu den Pentraxinen, eine Molekülgruppe, die in der tierischen Evolution schon früh zu finden ist (Baltz et al. 1982; Gewurz et al. 1995). Die Pentraxine konnten bereits bei den relativ primitiven *Limulus polyphemus* (Pfeilschwanzkrebs) aus dem Unterstamm der *Chelicerata* (Kieferklauenträger), aber auch in höheren Organismen wie den Vertebraten *Xenopus laevis* (Krallenfrosch), *Pleuronectes platessa* (Scholle) und dem Huhn nachgewiesen werden (Robey und Liu 1981; Lin und Liu 1993; Baldo und Fletcher 1973; Pepys et al. 1978). Sie sind also keine Spezifität der *Mammalia*.

Innerhalb der Gruppe der Säugetiere haben sich speziesspezifische Reaktionsmuster auf inflammatorische Stimuli entwickelt. Die einzige Gemeinsamkeit aller *Mammalia* ist das Absinken der Albuminkonzentration um 10% bis 30% bei einem Entzündungsgeschehen (Mackiewicz 1997). Bei den meisten nicht-hundeartigen Spezies tritt die Bedeutung des CRP hinter der anderer APPs zurück. Auch sind bei vielen Tierarten noch keine ausführlichen Informationen zu den APPs im Allgemeinen und dem CRP im Speziellen bekannt.

Bei der Katze, dem nächsten Verwandten in der Gruppe der *Carnivora*, spielt das CRP keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Dagegen sind AGP und Hp wichtige APPs in der felines Immunabwehr. Auch SAA scheint bei der Katze im Entzündungsgeschehen eine Rolle zu spielen (Harvey 1978; Ceron et al. 2005; Paltrinieri 2008).

Bei Nutztieren sind APPs besonders für das Management der Herdengesundheit interessant (Petersen et al. 2004). Bei Wiederkäuern spielen besonders Hp und SAA als maAPP eine Rolle, das CRP hingegen hat nur eine geringe Bedeutung, obwohl es von Lee et al. nachgewiesen werden konnte (Lee et al. 2003). Besonders das SAA scheint beim Rind einige Besonderheiten aufzuweisen: eine unterschiedliche Reaktion der Untereinheiten bei entzündlichen Prozessen (Yamamoto et al. 1998), mögliches Entscheidungsmerkmal zwischen akuten und chronischen Geschehen (Horadagoda et al. 1999) sowie die Produktion dieses APP nicht nur in der Leber, sondern auch im Euter (McDonald et al. 2001).

Für das Schaf sind wesentlich weniger Forschungsergebnisse vorhanden, jedoch scheint das Verhalten der APPs dem beim Rind sehr ähnlich zu sein (Pépin et al. 1991). Allerdings zeigten Eckersall und Mitarbeiter 2007, dass zusätzlich bei chronischen Entzündungsprozessen das AGP eine Rolle spielt (Eckersall et al. 2007).

Auch über das Schwein ist hinsichtlich der APPs wenig bekannt. CRP und Hp konnten u.a. bei einer experimentell ausgelösten Infektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Heegaard et al. 1998) sowie bei induzierten aseptischen Entzündungsprozessen in erhöhten Konzentrationen gemessen werden (Lampreave et al. 1994).

Beim Pferd ist bekannt, dass die Hp-Konzentration bei verschiedenen Erkrankungen erhöht ist. Aber auch für CRP und SAA wurden erhöhte Konzentrationen bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie Pneumonie, Enteritis oder Arthritis gemessen (Takiguchi et al. 1990).

Außer für den Hund wurde bisher noch nichts über das CRP anderer Spezies aus der Überfamilie der *Caniformia* beschrieben. Die Unterfamilien der *Caniformia* sind sehr heterogen: Zu ihnen zählen unter anderem Bären (*Ursidae*), Kleinbären (*Procyonidae*), Ohrenrobben (*Otariidae*), Hundсроbben (*Phocidae*) und Marder (*Mustelidae*). Aufgrund der nahen Verwandtschaft dieser Tierspezies mit dem Haushund (*Canis lupus familiaris*) stellt sich die Frage, ob auch im Bereich der APR Ähnlichkeiten im APP-Muster, insbesondere des CRPs, bestehen. Ein genauer Überblick über die evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Unterklasse der höheren Säugetiere (*Eutheria*) ist im Anhang I. im Detail dargestellt.

## 1.4 Klinischer Kontext

### 1.4.1 cCRP bei Erkrankungen

Die Messung der CRP Konzentration in Serumproben wird in der Humanmedizin seit über 30 Jahren im Rahmen der Diagnostik verschiedener Krankheitsbilder eingesetzt (z.B. Sepsis, Pneumonien, kardiovaskuläre Erkrankungen) (Pepys und Hirschfield 2003; Hengst 2003; van Vugt et al. 2013; Wilson et al. 2006). Auch beim Hund ist die Möglichkeit des klinischen Einsatzes dieses Biomarkers durch aktuelle Studien bestätigt worden (Eckersall und Bell 2010).

Unter physiologischen Bedingungen ist beim Hund die Serumkonzentration des CRP, wie auch beim Menschen, gering. Mehrere Studien wiesen im ELISA eine erhebliche Schwankungsbreite der cCRP-Konzentrationen von 0 bis 13 mg/l in gesunden Hunden wie folgt nach: 0 bis 8,9 mg/l (Griebsch et al. 2009),  $5,06 \pm 3,6$  mg/l (Otabe et al. 1998),  $8,4 \pm 4,6$  mg/l (Yamamoto et al. 1994), 0,22 bis 4,04 mg/l (Martínez-Subiela et al. 2004).

In verschiedenen Studien wurden Entzündungen durch unterschiedliche Infektionserreger (Paim et al. 2012; Rikihisa et al. 1994; Schetters et al. 2009; Seo et al. 2012), medikamentös (Otabe et al. 2000; Bayramli und Ulutas 2008) oder mittels anderer Noxen (Caspi et al. 1987; Yamashita et al. 1994) experimentell ausgelöst und die dabei auftretende Veränderung der cCRP-Konzentration ermittelt. Diese zeigte bei den untersuchten Tieren einen deutlichen Anstieg durch den Entzündungsreiz.

Auch in natürlich auftretenden Erkrankungen konnte eine Erhöhung des Serum-cCRP nachgewiesen werden: Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis der cCRP-Konzentration nicht nur bei infektiösen Erkrankungen (Gebhardt et al. 2009; Mylonakis et al. 2011; Rikihisa et al. 1994), bei denen eine Erhöhung des Proteins erwartet wird, sondern auch bei immunologischen (Griebsch et al. 2009; Mitchell et al. 2009; Kjelgaard-Hansen et al. 2006), neurologischen (Lowrie et al. 2009a) und onkologischen (Mischke et al. 2007; Chase et al. 2012) Erkrankungen von diagnostischem Wert sein kann. Obwohl sich die kardiologischen Erkrankungen caniner Patienten von denen in der Humanmedizin deutlich unterscheiden, konnten Veröffentlichungen zeigen, dass das cCRP-Protein mit diesen Dysfunktionen ebenfalls im Zusammenhang steht (Rush et al. 2006; Ljungvall et al. 2010). Eine Übersicht über die bisher durchgeführten Studien zur cCRP-Konzentration bei den verschiedenen natürlich aufgetretenen Erkrankungen findet sich in Anhang II.

Diese Studien zeigen, dass cCRP bei vielen Erkrankungen erhöht ist. Eine Bestimmung bietet sich insbesondere bei Therapie mit Glukokortikoiden an, da die Ausschüttung des Proteins nicht im Sinne einer Immunsuppression unterdrückt wird, sondern erst aufgrund der abklingenden Entzündung abfällt (Pepys 1981; Thompson et al. 1999). Darüber hinaus ist der Anstieg des CRPs weitgehend unabhängig von Stressreaktionen, wodurch eine höhere Sensitivität für Entzündungsprozesse, im Vergleich zu Blutbildveränderungen, gegeben ist (Ceron et al. 2005). Wird die cCRP-Konzentration eines Patienten initial bestimmt, bietet die weitere Messung des CRPs eine gute Möglichkeit, die Schwere von Erkrankungen sowie im weiteren Messverlauf auch den Therapieerfolg abzuschätzen (Eckersall und Bell 2010). Jedoch erlaubt die Höhe der anfänglichen cCRP-Konzentration keine prognostische Aussage über den Verlauf der Erkrankung (Gebhardt et al. 2009) oder darüber, welche

Ursache der Entzündung zugrunde liegt resp. welche Form der Entzündung das klinische Erscheinungsbild bedingt (Castelli et al. 2004).

## 1.4.2 Testmethoden und -geräte zur cCRP-Messung

Um die Messung des caninen CRP zu ermöglichen, wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe verschiedener Methoden und Testgeräte entwickelt und evaluiert. Dazu zählen verschiedene humane wie auch zwei canine ELISA (Kjelgaard-Hansen et al. 2003b; Yamamoto et al. 1994), immunoturbidometrische Messgeräte (Eckersall et al. 1991; Kjelgaard-Hansen et al. 2004), Latexagglutinationstests (Fransson et al. 2007; Tagata et al. 1996) sowie immunfluorimetrische Messmethoden (Martínez-Subiela et al. 2011; Parra et al. 2006) und ein radialer Immunodiffusionstest (Conner et al. 1988). Eine Übersicht über die Publikationen zur Entwicklung und/oder Validierung der verschiedenen Methoden und Geräte für die Bestimmung der cCRP-Konzentration in Hunden findet sich in Anhang III.

In einer Studie von Yamamoto und Kollegen von 1993 konnte gezeigt werden, dass die Antigenität des humanen und caninen CRP nicht homolog ist (Yamamoto et al. 1993a). Zwar reagierte der in der Studie verwendete anti-hCRP-AK auch mit cCRP, aber umgekehrt konnte weder im Western Blot noch in der Immunelektrophorese eine Reaktion eines anti-cCRP-AK mit hCRP nachgewiesen werden. Außerdem war die Reaktion des anti-hCRP-AK mit cCRP nur vergleichsweise schwach, was auf die schlechte Spezifität zurückzuführen ist. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum viele humane Testsysteme keine ausreichende Sensitivität für den Nachweis des cCRP besitzen. Daher ist die Verwendung eines spezifischen anti-cCRP-AK für die Entwicklung von Messgeräten zum Nachweis des Entzündungsproteins in caninem Serum eine wichtige Grundvoraussetzung.

In einer Studie von (Plickert et al. 2011) wurde gezeigt, dass eine qualitative Nachweismethode mittels eines Schnelltestes (Lateralfow Immunoassay, TECOmedical AG, Schweiz) für den Hund möglich ist. Ein weiteres qualitatives Testsystem (CRP Rapid Assay Pack, EVL, Niederlande) wurde von (McGrotty et al. 2004) evaluiert. Im Weiteren kann die quantitative Messung des cCRPs mittels bereits verfügbarer Schnelltestverfahren (z.B. LifeAssay<sup>®</sup> Canine CRP Test, LifeAssay AB, Lund, Schweden) in Zukunft routinemäßig den Nachweis und die Kontrolle von inflammatorischen Prozessen erleichtern. Dazu ist ihre ausreichende Validierung notwendig.

## 1.5 Zielsetzungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Erkenntnisse zu den strukturellen Eigenschaften und diagnostischen Möglichkeiten des CRP des Hundes zu generieren. Dabei fokussierte sich die Arbeit im Wesentlichen auf drei Punkte:

1. Evaluierung der Qualität von Schnelltestgeräten für die cCRP-Messung,
2. Gewinn von weiteren Detail-Strukturkenntnissen (Proteinsequenz, Glykosylierungsmuster) über das cCRP,
3. Versuch der Nachweisbarkeit des CRP bei anderen verwandten Spezies mittels eines neuen anti-cCRP-AK.

Im ersten Teil erfolgte die Evaluierung verschiedener quantitativer Schnelltestgeräte für die Messung der cCRP-Konzentration in Proben von Patienten der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin. Hierbei sollte die Möglichkeit des Einsatzes dieser Geräte, ihre Genauigkeit und Praktikabilität im klinischen Alltag geprüft werden, ebenso wie die Anwendbarkeit für Verlaufskontrollen.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Testung der Qualität eines neu entwickelten anti-cCRP-Antikörpers, welcher in einem der Schnelltestsysteme (TECOmedical) verwendet wird, durchgeführt. Dieser Antikörper wurde auch für alle in dieser Studie durchgeführten immunologischen Nachweisverfahren verwendet.

In einem zweiten Teil sollte die Struktur des caninen Entzündungsproteins mittels verschiedener biochemischer Analysen weiter untersucht werden. Es sind zwar bisher viele klinische Studien zu cCRP an Hunden durchgeführt worden, jedoch fehlen detaillierte Strukturkenntnisse über das Protein selbst. Sowohl für die mRNA- als auch die Aminosäure-Sequenz existierte bisher nur ein theoretisches *in silico* Modell (Acc. No XM\_545746). In der vorliegenden Studie sollten die Protein- und mRNA-Sequenz anhand von biologischen Proben nativ bestimmt und darüber hinaus spezifische Proteinmodifikationen wie Glykosylierungen analysiert werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollen die Möglichkeit eröffnen weitere diagnostische Systeme zu etablieren und einzusetzen. Aufgrund zahlreicher Parallelen zum hCRP wäre der Hund insbesondere auch als Tiermodell für weitere wissenschaftliche Studien zu verschiedenen humanmedizinischen Erkrankungen denkbar.

Zusätzlich zur Analyse des CRP von Hunden sollten Spezies-Vergleiche mit verschiedenen direkten Verwandten des Hundes durchgeführt werden. Diese sollten zum Erkenntnisgewinn des Stellenwertes des CRP im Entzündungsgeschehen anderer *Caniformia*-Spezies (z.B. bei Zoo- und Wildtieren) beitragen, da über diese Tiere bisher keine Daten vorliegen. Außerdem wurden Serumproben von anderen, domestizierten Spezies der Unterfamilie der *Eutheria* gewonnen und auf eine heterologe Reaktion des anti-cCRP-AK untersucht und verglichen, da diese Tiergruppe häufig vorgestellte Patienten in der veterinärmedizinischen Praxis darstellen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Klinische Studie

#### 2.1.1 Hunde

In der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, wurden in der Zeit zwischen November 2011 und März 2012 Serumproben von Hunden, die wegen unterschiedlicher Erkrankungen vorgestellt wurden, gesammelt. Die Proben wurden zu diagnostischen Zwecken entnommen, daher war eine Tierversuchsanzeige nicht notwendig. Bei allen Hunden wurde eine Allgemeinuntersuchung sowie Analysen des Blutbildes (SYSMEX XT-2000iV, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) und der Blutchemie (Konelab 60i, Thermo Fisher Scientific, Clinical Diagnostics Finland) durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena cephalica dexter/sinister*, der *Vena saphena lateralis dexter/sinister* oder der *Vena jugularis dexter/sinister*. Außerdem wurden Röntgenbilder, sonographische Untersuchungen, Liquor-Untersuchungen sowie mikrobielle und/oder histologische Untersuchungen je nach Notwendigkeit in durchgeführt.

Die cCRP-Konzentration der Proben wurde innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme mit verschiedenen Schnelltestgeräten (s. Absatz 2.1.2) gemessen und das Serum anschließend aliquotiert. Die Proben wurden bis zur Messung der cCRP-Konzentration mittels Referenzmethode in einem externen Labor (TECOmedical AG, Rheinbach, Deutschland) für maximal drei Monate bei -20 °C gelagert.

#### 2.1.2 Schnelltestgeräte

Die Proben wurden vergleichend mit drei verschiedenen Schnelltestgeräten (TECOmedical AG; EUROLyser Diagnostica; LifeAssays) entsprechend der Herstellerangaben gemessen. Als Referenzmethode wurde ein validierter Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (TECOmedical Group, Sissach, Schweiz) verwendet.

Um sich mit der Benutzung der Geräte vertraut zu machen und Fehler durch die Nutzung zu vermeiden, wurden im Vorfeld der Evaluierung einige Proben mit den jeweiligen Schnelltestgeräten gemessen. Diese Messwerte wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

##### 2.1.2.1 TECO<sup>®</sup>dogCRP-quant (TECOmedical, Sissach, Schweiz)

Dieses Messgerät basiert auf der „Lateralflow Immunoassay“-Technik mit einem polyklonalen Antikörper und hat einen Messbereich von 5 mg/l bis 200 mg/l. Für die Evaluierung dieses Testgerätes wurden 5 µl Serum pro Messung verwendet. Das definierte Probenvolumen wurde in das Testfeld aufgetragen und im Anschluss zwei Tropfen antikörperhaltige Pufferlösung dazugegeben. Während einer 5-minütigen Reaktionszeit wurden im Reaktionsfeld eine farbige Kontrolllinie sowie eine unterschiedlich stark farbige Testlinie sichtbar. Die Intensität der Testlinie wurde mit einem optischen Messgerät (TECOmedical) bestimmt und daraus der cCRP-Gehalt reziprok zur Farbintensität errechnet.

##### 2.1.2.2 EUROLyser solo cCRP (EUROLyser, Salzburg, Österreich)

Der Schnelltest von EUROLyser nutzt ein immunoturbidometrisches Messverfahren, dessen Messbereich zwischen 10 mg/l und 200 mg/l liegt. Dazu wurde in eine mit Pufferlösung gefüllte Messküvette 20 µl Serum pipettiert und die antikörperhaltige Verschlusskappe auf die Küvette gesetzt. Die verschlossene Küvette wurde in das Analysegerät eingesetzt, zunächst die probenhaltige Pufferlösung durchmischt und dann ein Leerwert bei 340 nm gemessen. Anschließend wurde durch das Analysegerät das Antikörperreagenz in der

Verschlusskappe zu der Pufferlösung im unteren Teil der Küvette zugemischt und fünf Minuten lang inkubiert. Währenddessen bildete sich ein Antigen-Antikörper-Komplex und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Trübung des Puffers (Antigen-Antikörper-Komplex) gemessen. Aus dem Differenzwert zwischen dem Leerwert und dem zweiten Messwert wurde der Gehalt an cCRP über eine Kalibrationskurve ermittelt.

#### 2.1.2.3 LifeAssays® canine CRP (LifeAssays, Lund, Schweden)

Das dritte Schnelltestgerät arbeitet mit gekoppelten magnetischen Nanopartikeln sowie ebenfalls mit anti-cCRP-AK beschichteten Silikatpartikel nach dem „Magnetic-Immunoassay“ (MIA) Prinzip. Zunächst wurde der Leerwert als magnetisches Signal über eine Spule (LifeAssays® VetReader) erfasst. Mit einer Kapillare wurden 5 µl Serum aufgezogen, die gefüllte Kapillare in das Reaktionsgefäß gegeben und 30 Sekunden lang mit dem Inhalt des Reaktionsgefäßes durchmischt. Der gebildete Immunkomplex aus den oben beschriebenen Nanopartikeln, dem cCRP-Protein und den antikörpergebundenen Silikatpartikeln setzte sich während einer Wartezeit von 11 Minuten als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Die Veränderung des magnetischen Signals im Überstand wurde im Vergleich zum Leerwert gemessen und daraus der cCRP-Gehalt auf dem internen Chip berechnet. Der Messbereich dieses Gerätes liegt zwischen 10 mg/l und 210 mg/l.

#### 2.1.2.4 Referenzmethode

Als Referenzmethode wurde der canine CRP ELISA (TECOmedical AG, Sissach, Schweiz) eingesetzt, welcher in einem Bereich zwischen 5 mg/l und 50 mg/l linear misst. Für höhere cCRP-Konzentrationen in den Serumproben wurden diese stärker verdünnt. Die Messung der cCRP-Konzentration erfolgte in einem externen Labor (TECOmedical AG, Rheinbach) aus bei -20 °C gelagerten Serumproben.

Die mit den drei Schnelltestgeräten ermittelten cCRP-Konzentrationen der Serumproben wurden anschließend mit den cCRP-Gehalten des Referenz-ELISA verglichen und die Unterschiede statistisch ausgewertet.

### **2.1.3 Durchführung der Messungen**

Alle 125 Proben wurden direkt nach der Blutentnahme aufbereitet und innerhalb von vier Stunden die Serum-cCRP-Konzentration mit Hilfe der drei Messgeräte bestimmt.

Zur Bestimmung der Genauigkeit der Messmethode wird grundsätzlich zwischen zwei Arten von Wiederholungsmessungen unterschieden:

- Messungen zur Bestimmung der „Inter-Assay Varianz“: Dazu wird dieselbe Probe auf verschiedenes Testmaterial desselben Testsystems aufgebracht und in verschiedenen Durchgängen gemessen.
- Messungen zur Bestimmung der „Intra-Assay Varianz“: Hierfür wird dieselbe Probe auf dasselbe Testmaterial aufgebracht und im selben Durchgang gemessen.

Bei den untersuchten Geräten war es aus technischen Gründen (Einzelpunkt-Messverfahren) lediglich möglich, die Inter-Assay Varianz zu bestimmen. In den Testsystemen von EUROLyser und LifeAssays findet die Antikörper-Antigen-Reaktion innerhalb der Geräte statt und ist nur einmal messbar. Beim TECOmedical Testsystem verstärkt sich die Farbintensität mit der Zeit, so dass bei Messungen > 5 Min. falsch-niedrige Werte gemessen würden. Daher ist die Wiederholung der Messung technisch zwar möglich, jedoch nicht sinnvoll, da falsche Werte entstehen.

Zur Feststellung der Inter-Assay Varianz der drei Messgeräte wurden insgesamt neun Serumproben verwendet, von denen jeweils drei Proben einen cCRP-Gehalt von < 20 mg/l, 50-100 mg/l oder > 130 mg/l (auf Basis der ELISA-Messungen) aufwiesen. Alle Proben wurden sechsmal gemessen.

Zur Prüfung der Probenstabilität wurden Serumproben unter verschiedenen Bedingungen gelagert und zu festgelegten Zeitpunkten gemessen. Die Stabilitätsmessungen wurden nur

für die Testsysteme von TECOmedical und EUROLyser über 24 Stunden evaluiert. Die Stabilitätsmessung war für das LifeAssays Schnelltestgerät nicht möglich, da hier eine zu geringe Anzahl an Teströhrchen zur Verfügung stand. Insgesamt wurden Serumproben von sechs Hunden für den Versuch verwendet. Drei Proben wiesen einen Serum-cCRP-Gehalt von 20 mg/l, zwei Proben einen cCRP-Gehalt von ca. 100 mg/l (101 mg/l, 105 mg/l) und eine Probe einen cCRP-Gehalt von 140 mg/l (ELISA-Bestimmung) auf. Zum Stabilitätsvergleich wurde die entsprechende Probe in zwei Aliquots aufgeteilt, von denen eines bei Raumtemperatur (RT) und das zweite bei 4 °C gelagert wurde. Die Messungen wurden direkt nach der Probenentnahme, nach 4 und 24 Stunden durchgeführt.

Ein Phänomen, welches häufig bei immunoturbidometrischen Tests auftreten kann, ist der so genannte „high dose hook-effect“. Darunter versteht man falsch-negative oder falsch-niedrige Messungen, die bei besonders hoher Analytkonzentration auftreten (Jury et al. 1990). Um diesen Effekt auszuschließen, wurden zusätzlich einige Proben in Verdünnungen von 1:2, 1:3 und 1:4 im EUROLyser Schnelltestgerät gemessen. Die Proben wurden mit einem Serum verdünnt, welches einen cCRP-Gehalt von 0,1 mg/l aufwies. Im Anschluss erfolgte der Vergleich abweichender Proben hinsichtlich überschneidender Eigenschaften (verabreichte Medikamente, Probenbeschaffenheit).

Die Beurteilung der Messwerte hinsichtlich der Vergleichbarkeit zu der Referenzmethode erfolgte anhand bestimmter Parameter, die angelehnt an die Publikationen von Jensen und Kjelgaard-Hansen sowie Flatland *et al.* ermittelt wurden (s. Absatz 2.1.4) (Jensen und Kjelgaard-Hansen 2006; Flatland et al. 2010). Dazu zählt unter anderem die Fähigkeit der Testgeräte, zwischen niedrigen und hohen cCRP-Gehalten unterscheiden zu können. Da 10 mg/l die niedrigste Konzentration war, die von allen Geräten erfasst werden konnte, wurde dieser Wert als unterster Grenzwert für die vorliegende Bewertung verwendet.

#### 2.1.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der IBM® SPSS® Statistics 20 (IBM Corporation®) und RStudio (RStudio Inc.) Software. Im Vorfeld der statistischen Auswertung ergab sich das Problem unterschiedlicher Messgrenzwerte der Schnelltestgeräte:

- Die untere Messgrenze liegt bei 5 mg/l für das TECOmedical Messgerät und bei jeweils 10 mg/l für das EUROLyser und das LifeAssays Messgerät.
- Der obere Messgrenzwert des TECOmedical und des EUROLyser Messgerätes ist 200 mg/l, die des LifeAssays Gerätes 210 mg/l.

Der ELISA dagegen kann auch Konzentrationen unterhalb von 5 bzw. 10 mg/l und oberhalb von 200 bzw. 210 mg/l messen. Für den direkten Vergleich der Schnelltestergebnisse mit den ELISA Ergebnissen waren daher die unterschiedlichen Messgrenzwerte problematisch. Deshalb wurden die ELISA-Werte für die statistische Auswertung im Nachhinein folgendermaßen an die jeweiligen Messgerät-Grenzwerte angepasst:

- Für den Vergleich der Ergebnisse des TECOmedical Systems mit denen des ELISA wurden alle Werte unterhalb von 5 mg/l dem Wert 4.99 mg/l gleichgesetzt. Entsprechend erfolgten für das EUROLyser und LifeAssays Schnelltestgerät mit dem Grenzwert 10 mg/L die Anpassung der Werte auf 9.99 mg/l.
- Für Konzentrationen über 200 mg/l wurde in allen Schnelltestsystemen der Wert 201 mg/l angenommen, da im LifeAssays Gerät kein Wert über 200 mg/l gemessen wurde.

Alle Auswertungen, die Vergleiche zwischen den Schnelltestgeräten und dem Referenz-ELISA beinhalteten, erfolgten getrennt nach den Grenzwerten.

Die deskriptive Statistik der gemessenen cCRP-Werte schloss die Berechnung von Häufigkeiten, Median, Anteilswerten und Standardabweichungen ein. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Da die Werte des ELISA im Nachhinein an die Messgrenzwerte angepasst wurden und daher nicht mehr alle Daten metrisch waren sondern teilweise lediglich ordinal, wurde die Korrelation zwischen den Schnelltestsystemen und dem ELISA mit dem Korrelationskoeffizient nach Spearman

(Spearman's rho) anstatt dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt. Die Korrelation wurde zusätzlich über ein einfaches Streudiagramm graphisch dargestellt.

Unter der Annahme, dass nicht nur die neuen Messmethoden sondern auch der ELISA eine gewisse Fehlerquote aufweist, wurde zusätzlich zu der einfachen linearen Regression die Deming Regression bestimmt. Die hierbei ermittelte Steigung gibt Auskunft über den proportionalen Fehler und der Schnittpunkt mit der y-Achse ermittelt einen möglichen konstanten Fehler. Die hierfür berechneten Signifikanzen als Quotient des Koeffizienten durch seinen Standardfehler ergeben sich als t-Werte mit einer Signifikanz bei einem  $t > 2$ . Zur graphischen Darstellung des direkten Vergleichs der jeweiligen Messgeräte mit dem ELISA wurde das Bland-Altman Diagramm verwendet. Hierfür wurden die absoluten Differenzen zwischen den cCRP-Messwerten (ELISA minus Schnelltest) berechnet und an der vertikalen Achse (y-Achse) aufgetragen. Für die horizontale Achse (x-Achse) wurden die Mittelwerte dieser Differenzen berechnet und aufgetragen. Zusätzlich wurden die oberen resp. unteren Übereinstimmungsgrenzen berechnet:

$$\text{Oberer / Unterer Grenzwert} = \text{Mittelwert der Differenzen} \pm 1,96 * \text{SD der Differenzen.}$$

Zur Beurteilung der Qualität der Schnelltestgeräte wurden die Qualitätskriterien von (Jensen und Kjelgaard-Hansen 2006) berechnet und mit den dort bzw. in den offiziellen Vorgaben der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) angegebenen zulässigen Höchstwerten (s. Anhang IV) verglichen:

- Der Variationskoeffizient (CV) zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Mehrfachmessung einer Probe (CV); dieser entspricht der Inter-Assay Varianz. Hierzu wurde zunächst der Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (SD) aus der Summe der Messwerte eines Hundes (n=6) berechnet

$$\bar{x}_{\text{Einzeltier}} = \sum_{1}^{6} (\text{Messungen eines Hundes})$$

$$SD_{\text{Einzeltier}} = \sqrt{\frac{\sum_{1}^{6} (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

und daraus folgend

$$CV_{\text{Einzeltier}} = \frac{SD_{\text{Einzeltier}}}{\bar{x}_{\text{Einzeltier}}} * 100$$

Der  $CV_{\text{Einzeltier}}$  aller neun Hunde wurde addiert und durch die Anzahl der Hunde geteilt, woraus sich der Gesamt-CV ergab. Der laut ASVCP Leitlinien zulässige CV ( $CV_{\text{Des}}$ ) zur Akzeptanz einer neuen Testmethode beträgt 12,2 %.

- Die Verzerrung (Bias) als Maß des systematischen Fehlers wurde aus den relativen Differenzen aller 125 bzw. 51 Paarmessungen ermittelt. Der in den ASVCP Leitlinien beschriebene benötigte Bias ( $B_{\text{Des}}$ ), um die getestete Methode als geeignet einzustufen, liegt bei 9,5 %.
- Die Kombination der beiden genannten Parameter (CV, Bias) beschreibt den totalen Fehler (TE). Dieser wurde wie folgt berechnet:

$$TE = \text{Bias} + 2 * CV$$

Als Grenzwert für den maximalen totalen Fehler ( $TE_{\text{Des}}$ ) wurde der, in den ASVCP Leitlinien angegebene Wert von 29,6 % angesetzt.

Die Fähigkeit der Testgeräte, zwischen Proben mit niedrigen und hohen cCRP-Werten zu differenzieren, wurde mittels Mann-Whitney-U Test ausgewertet.

Die Stabilität des cCRP unter verschiedenen Lagerungsbedingungen wurde mittels eines gepaarten t-Tests untersucht, sowohl mit als auch ohne Bonferroni-Korrektur.



### 2.1.5 Verlaufsstudie

Zusätzlich wurden im Rahmen der Evaluierung der Schnelltestgeräte von mehreren Hunden (n=9) Serumproben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und daraus der cCRP-Gehalt bestimmt. Die Probenentnahme erfolgte, wie auch bei der Evaluierung der Geräte, ausschließlich zu diagnostischen Zwecken und für die Messung des cCRP wurden ausschließlich die Reste der Blutproben verwendet. In diesem Teil der Studie wurden Patienten eingeschlossen, von denen zur Überwachung des Krankheitsverlaufes regelmäßig Blutproben entnommen wurden. Je nach Dauer der Beprobung wurden die Hunde in zwei Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe umfasste Hunde mit mehreren Blutentnahmen innerhalb der ersten beiden Wochen nach Erstvorstellung, in denen der Verlauf der cCRP-Ausschüttung während der akuten Krankheitsphase und das Ansprechen auf die Therapie untersucht werden sollte. Die Beprobung der Hunde in der zweiten Gruppe wurde über eine Dauer von etwa drei bis fünf Monaten durchgeführt. Die Blutprobenentnahmen erfolgten aufgrund der individuellen Behandlung und Betreuung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Die Blutproben wurden an vier bis elf unterschiedlichen Zeitpunkten, abhängig vom jeweiligen Patienten entnommen und ihre Messung erfolgte im canine CRP ELISA (TECOmedical AG, Sissach, Schweiz), der bereits in den Evaluierungsmesskontrollen verwendet wurde, durch ein externes Labor (TECOmedical AG, Schweiz). Zusätzlich wurde bei einem Teil der Proben die cCRP-Konzentration direkt nach der Blutprobenentnahme mit dem Schnelltestgerät von TECOmedical gemessen.

Die verwendeten Serumproben dienten der Überprüfung des Konzentrationsverlaufes von cCRP vor und während der Therapie der beprobten Hunde und wurden daher bei der Evaluierung der Schnelltestgeräte nicht berücksichtigt.

## Proteincharakterisierung

Tab. 1 Übersicht der Pufferzusammensetzung für die Proteinanalysen

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9
Ammoniumpersulfat (APS)	10% in ddH <sub>2</sub> O
Bindungspuffer	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8.0
Blockierlösung	0,25% Fischgelatine in TBST
	2,5% BSA in TBST
2D-DIGE-Puffer	8 M Urea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8,5
Elektrophoresepuffer (2 D) (10-fach)	250 mM Tris, 1,9 M Glycin, 35 mM SDS, pH 8,3
Elutionspuffer	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA
Equilibrierungspuffer	6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 50 mM Tris/HCl, 0,02% Bromphenolblau, pH 8,8
Kathodenpuffer	100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25
Mild stripping buffer	200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 1% Tween 20, pH 2,2
Gelfiltrationspuffer	10 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8
Ponceaufärbung	0,5% Ponceau in 0,01%iger Essigsäure
Polyacrylamidgel Entfärbelösung	10% Essigsäure, 1% Ethanol
Polyacrylamidgel Färbelösung	0,1% Coomassie-Blau G250
Polyacrylamidgel Fixierlösung	40% Isopropanol, 10% Essigsäure
Protein-SDS-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8
Stripping Buffer	6 mM Tris/HCl, 7 mM SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol, pH 6,8
SDS–Elektrodenpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3
Tris-Buffered-Saline (TBS)	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5
TBS-T	1x TBS, 0,1% Tween 20 pH 7,5
Towbin Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% MeOH, pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8
TRIS-HCl-SDS Puffer	36,4 g Tris, 0,3 g SDS in 100 ml ddH <sub>2</sub> O; pH 8,45

### 2.1.6 Probennahme

Zur Untersuchung des Serum-cCRP von Hunden sowie den anderen in dieser Studie verwendeten verwandten und nicht-verwandten Spezies wurden Blutproben entweder von Patienten aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin oder anderen Instituten (s. Tab. 10) entnommen. Die Probennahme erfolgte je nach Tier an der *Venae cephalica*, *Vena saphena lateralis* oder *Vena jugularis dexter/sinister*. An Tieren *post mortem* erfolgte die Blutgewinnung zusätzlich aus dem *Ventriculus cordis*.

Für die Reinigung des Serum-cCRP wurden größere Mengen Blut benötigt. Die Blutproben wurden daher nur von erkrankten Hunden *post mortem* entweder aus dem *Ventriculus cordis* oder aus der *Vena jugularis dexter/sinister* entnommen. Aus den Vollblutproben wurde durch Zentrifugation in Kunststoffröhrchen mit Kunststoffkugeln (Sarstedt) zunächst Serum hergestellt, das je nach Verwendung für einen Zeitraum zwischen wenigen Tagen und 24 Monaten bei -20 °C gelagert wurde.

## 2.1.7 Proteinquantifizierung

Für Serumproben, die für proteinbiochemische Versuche verwendet wurden, wurde der Proteingehalt mittels Bio-Rad Protein Assay (BioRad Laboratories GmbH) nach Angaben des Herstellerprotokolls ermittelt. Alle Proben sowie die Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) wurden als Duplikat bestimmt.

## 2.1.8 cCRP-Reinigung aus Serum

Für die Reinigung von Proteinen werden häufig Chromatographie-Verfahren angewendet. Dabei trennen sich die verschiedenen Proteine in einer mobilen Phase interagierend mit einer stationären Phase auf. Es gibt verschiedene Arten von Chromatographie-Verfahren, im Folgenden werden Affinitätschromatographie (s. Absatz 2.1.8.1) und die Gelfiltration beschrieben (s. Absatz 2.1.8.2), die als Chromatographie-Verfahren für die Reinigung des nativen cCRP verwendet wurden. Die Effektivität der Reinigungsverfahren wurden im Anschluss mittels Densitometrie im Bio 1D-Programm (Vilbert Lourmat) der angefertigten SDS-PAGE-Gele ausgewertet. Die Etablierung der Protokolle und die praktische Durchführung wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Einspanier durchgeführt.

### 2.1.8.1 Affinitätschromatographie

Da CRP eine hohe Bindungsaffinität zu Phosphorylcholin (PCh)-Molekülen besitzt, wurde das Protein aus dem gewonnenen Serum mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Das Prinzip wurde bereits (Volanakis und Clements 1978) beschrieben: Agarose-gekoppelte PCh bildet die stationäre Phase, an die cCRP-Moleküle aus dem Serum calciumabhängig binden. In einem zweiten Schritt werden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Verwendung des Chelatbildners EDTA zusammen mit dem cCRP-Protein von der Säule eluiert.

Für die Affinitätschromatographie wurde eine PCh-Säule (Thermo Fisher Scientific), angelehnt an beschriebene Reinigungen (Kuwajima und Okuda 1987), verwendet. Bei einem Teil der Reinigungen wurde zunächst das Serum verschiedener Hunde vereinigt. Die Serumproben wurden dann jeweils mit dem gleichen Anteil des calciumreichen Bindungspuffers vermischt. Die PCh-Säule wurde mit Bindungspuffer equilibriert und das Serum-Bindungspuffer-Gemisch auf die Säule aufgetragen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurde die Säule zunächst mit Bindungspuffer gewaschen, um andere Proteine und Serumbestandteile zu entfernen. Die Elution des cCRP von der PCh-Säule erfolgte mit einem EDTA-haltigen Elutionspuffer. Sowohl die Waschung als auch die Elution erfolgten unter UV-Kontrolle (äktaprime, GE Healthcare) bei 280 nm, da die aromatischen Reste der Aminosäuren (insbesondere Tyrosin und Tryptophan) bei dieser Wellenlänge absorbieren. Dazu wurde an die Säule eine UV-Zelle gekoppelt und die Veränderung der Extinktion während der verschiedenen Schritte der Reinigung überprüft. Die Aufzeichnung und Visualisierung der UV-Messung erfolgte zeitgleich mittels der Software primeview (GE Healthcare).

### 2.1.8.2 Gelfiltration

Im Anschluss an die Reinigung des cCRP mittels Affinitätschromatographie wurden bei einem Teil der Proben verbliebene Verunreinigungen zusätzlich über eine Größenfraktionierung mittels Gelfiltration beseitigt. Bei der Gelfiltration werden Proteine über ein porenhaltiges Gel gepumpt. Je nach Molekülgröße benötigen die Proteine unterschiedlich lange Zeit, da sich kleinere Moleküle stärker in den Poren verfangen und ihr Lauf dadurch abgebremst wird. Die Gelfiltration wurde in der HiPrep™ 16/60 (GE Healthcare) mit 120 ml Sepharyl™ S-300 HR (GE Healthcare) durchgeführt.

Für die Erstellung der Standardgeraden wurden die Proteine BSA (67 kDa) und Aldolase (158 kDa) in einer Endkonzentration von 250 µg/ml verwendet. Zur Durchführung der Gelfiltration wurde das äktaprime-Gerät (GE Healthcare) mit entsprechender Gerätesoftware verwendet. Die Säule mit dem Gelmaterial wurde zur Vorbereitung ausreichend mit

Gelfiltrationspuffer gespült, die Standardproteine auf die Säule aufgegeben und die Säule damit kalibriert.

Die Proben aus der Affinitätschromatographie wurden unter Verwendung eines Spinfalcons (Vivaspin 20, GE Healthcare) auf 500 µl konzentriert (3.000 g, 15 Min.) und dann auf die Gelfiltrations-Säule gegeben und mit Gelfiltrationspuffer gespült. Deutliche Extinktions-Peaks wurden in 1ml-Fractionen gesammelt, die enthaltene Proteinmenge quantifiziert und die Proben bei -20 ° gelagert.

## 2.1.9 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Untersuchung der Molekülgröße eingesetzt und 2D-Gelelektrophorese wurde zur Erfassung sowohl des isoelektrischen Punkts als auch der Molekülgröße angewendet.

### 2.1.9.1 Sodiumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung nach Molekülgröße (SDS-PAGE) erfolgte in Tricin-Polyacrylamidgelen mittels der SE 250-Apparatur (GE Amersham) unter Kühlung auf 10 °C.

**Tab. 2 Rezept der verwendeten Tricin-Polyacrylamidgele**

Lösungen (ml)	Tricin-Trenngel	Sammelgel
Acrylamid 37,5:1; 30%	2,5	0,243
Tris/HCl-SDS-Puffer	1,67	0,47
ddH <sub>2</sub> O	0,3	1,17
Glycerol 100%	0,53	-
APS 10%	0,025	0,01
TEMED	0,023	0,011

Die verwendeten Proben wurden auf 1 µg/µl Gesamtprotein-Konzentration mit SDS-PAGE Puffer eingestellt und mit nicht reduzierendem Ladepuffer (Roti-Load II, Roth) vermischt. Dieser wurde vor der Zugabe auf 60 °C erhitzt und ein Volumen von 3 µl Roti-Load II pro 10 µl Probenvolumen zu der Proteinprobe appliziert (10 µg Gesamtprotein). Für die SDS-PAGE mit Tricin-Polyacrylamidgelen war die Verwendung eines Zweipuffersystems mit einem Anoden- und einem Kathodenpuffer notwendig (Tab. 1). Als Größenstandard diente der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Die Elektrophorese erfolgte in zwei Stufen (s. Tab. 3) mittels der Electrophoresis Power Supply-EPS 3500 XL (Pharmacia).

**Tab. 3 Elektrische Lauf-Bedingungen der SDS-PAGE** Die Bedingungen der zweiten Stufe wurden so lange beibehalten, bis die Lauffront am Ende des Gels angekommen war (\*).

	Zeit (Min.)	Stromspannung (V)	Stromstärke (mA)/Gel	Leistung (W)
<b>Stufe 1</b>	20	50	75	10
<b>Stufe 2</b>	ca. 150*	150	75	10

Die Gesamtlauzeit für die Tricingele betrug etwa 3 h. Nach Abschluss der SDS-PAGE wurden je nach Fragestellung eine Färbung mit Coomassie-Blau, ein Western Blot oder eine Glykoproteinuntersuchung angeschlossen.

### 2.1.9.2 2D-Gelelektrophorese

Für die Untersuchung der Untereinheiten des cCRP-Proteins nach isoelektrischem Punkt und Größenunterschieden wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür war zunächst die Umpufferung der Proteinlösung notwendig, wofür pro 2D-Gel 20 mg Gesamtprotein aus der Affinitätschromatographie gefriergetrocknet eingesetzt wurde. Die Proteinmenge wurde zuvor wie unter 2.1.7 beschrieben, quantifiziert. Das entsprechende Probenvolumen wurde in ein Reaktionsröhrchen gegeben und für 90 Min. bis 180 Min. in der Lyovac GT 2 (Finn-Aqua Santasalo-Sohlberg GmbH, München, Deutschland) mithilfe der Trivac B Vakuum Pumpe (Leybold Vakuum GmbH, Köln, Deutschland) lyophilisiert.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurde die lyophilisierte Probe initial in 100 µl 2D-Differential-Gelelektrophoresis (2D-DIGE)-Puffer resuspendiert. Die Probe wurde zusätzlich mit Immobilisierter-pH-Gradienten-Puffer (IPG Puffer; GE Healthcare) und DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) versetzt und gemischt. Anschließend erfolgte die isoelektrische Fokussierung (IEF) in der Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH). Dazu wurde der ReadyStrip™ IPG Strip pH 3-10 non-linear (Bio-Rad Laboratories GmbH) aufgelegt, die Probe aufgetragen und beides mit 3 ml PlusOne Dry Strip Cover Fluid (GE Healthcare) überschichtet. Der fertig entwickelte Streifen mit aufgetrenntem Protein wurde bei -20 °C gelagert. Die Equilibrierung des IEF-Streifens im Anschluss an die IEF erfolgte mit einem Puffer in zwei Stufen. Zehn ml des Equilibrierungspuffer wurden entweder mit 0,1 g 1,4-Dithiothreitol (DTT) oder mit 0,25 g Iodacetamid versetzt und der IEF-Streifen jeweils 15 Min. lang zunächst im DTT-haltigen und anschließend in Iodacetamid-haltigem Puffer equilibriert. Nach einem Waschschrift mit Elektrodenpuffer wurde der IEF-Streifen auf der oberen Kante eines Polyacrylamidgels (Acrylamid, 1,5 M Tris pH 8,8 + 0,4% SDS, ddH<sub>2</sub>O, TEMED, APS) aufgelegt und mit 0,5%-iger Agarose überschichtet. Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese erfolgte im Proteomics-Labor (Dr. A. Bondzio) des Instituts für Veterinär-Biochemie.

Nach Abschluss der 2D-Gelelektrophorese wurden die Gele wahlweise mit Flamingo™ Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad Laboratories GmbH), Coomassie-Blau oder Glykoproteinfärbung angefärbt. In den Versuchen, in denen die Gele nicht direkt gefärbt wurden, erfolgte ein Western Blot mit anschließender Immundetektion oder spezifischem Glykoprotein-Nachweis.

## 2.1.10 **Proteinnachweis nach Gelelektrophorese**

Im Anschluss an die elektrophoretischen Verfahren wurden die Proteine wie folgt detektiert.

### 2.1.10.1 Coomassie-Blau-Färbung

Für die Färbung mit Coomassie-Blau wurden die Polyacrylamidgele zunächst zehn Minuten lang in der Fixierlösung inkubiert, im Anschluss eine Minute lang in Coomassie-Blau Lösung erhitzt und zuletzt mittels 10%-iger Essigsäure mit Ethanolzusatz entfärbt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

### 2.1.10.2 Fluoreszenz-Färbung

Zum Nachweis von gereinigtem cCRP in der 2D-Gelelektrophorese wurde Flamingo™ Fluoreszenz Farbstoff (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet. Dazu wurden die Proteine initial für 2 Stunden mittels Fixierlösung im Proteingel fixiert. Anschließend wurde die Färbelösung zu einer Arbeitslösung 1:60 verdünnt und das Gel darin über Nacht inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch Detektion des grünen Fluoreszenz-Signals (532 nm) im Laserscanner Typhoon 9400 (Amersham Bioscience).

### 2.1.10.3 Western Blot

Der Western Blot erfolgte sowohl im Anschluss an die SDS-PAGE als auch an die 2D-Gelelektrophorese. Für das Blotten wurden Amersham Hybond™-ECL Nitrocellulosemembranen (0,2 µm; GE Healthcare) in ddH<sub>2</sub>O und Towbinpuffer sowie Blotpapier (1,5 mm; Whatman) in Towbinpuffer jeweils bei 4 °C equilibriert, verwendet. Nach 40-minütigem Blotten bei 1,25 mA / cm<sup>2</sup> Gel im TE 77 Semi-dry Transfersystem (Amersham Bioscience) wurden die Nitrocellulosemembranen in Blockierlösung, 0,25%ige Fischgelatine (anti-cCRP-Antikörper) oder 2,5%igem Milchpulver (6xHis-Epitope-Tag-Antikörper), über Nacht bei 4 °C oder eine Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tab. 4) entweder über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei RT.

Da die Polyacrylamidgele, die für die 2D-Gelelektrophorese verwendet wurden, dicker waren als die SDS-PAGE-Gele, wurde die Blottingzeit für 2D-Gele auf 60 Min. ausgedehnt. Die sonstigen Bedingungen wurden beibehalten, lediglich das Volumen der verwendeten Lösungen auf die Größe der Membran angepasst.

**Tab. 4 Zur Immundetektion eingesetzte Antikörper (AK)**

Primärantikörper			Gekoppeltes Detektionssystem/Sekundärantikörper	
Bezeichnung	Markierung	Verdünnung	Bezeichnung	Verdünnung
Anti-cCRP-AK (TECOmedical)	Biotin	1:5.000	Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP) (Calbiochem)	1:100.000
6xHis Epitope Tag (anti-HisTag) Antibody (Pierce Biotechnology)	-	1:2.000	ECL Mouse IgG, HRP (GE Healthcare)	1:3.000

Nach der Primärantikörper-Inkubation und anschließendem Waschen in TBST (1x 15 Min., 3x 5 Min.) wurde die Membran für eine halbe Stunde mit dem Sekundärantikörper oder dem Streptavidin/HRP inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde eine erneute Waschung wie im Schritt davor durchgeführt. Zuletzt wurde das Chemilumineszenz-Reagenz Amersham ECL Select™ Western Blotting Detektion Reagent (GE Healthcare), das durch die HRP umgesetzt wird, für 5 Min. auf die Membran aufgegeben. Die während dieser Zeit gebildeten Lumineszenz-Signale wurden im Chemilumineszenzimager SL4 -4000 (Vilber Lourmat) detektiert.

Wenn auf einem Western Blot der Proteinnachweis mit einem zweiten Antikörper (AK) erfolgen sollte, wurden die Membranen so behandelt, dass der Ursprungszustand nach dem Blotten wieder hergestellt wurde. Dazu wurde die Membran nach der Bildaufnahme in TBST gewaschen (4x 5 Min.). Anschließend wurde die Membran für 30 Min. bei 50 °C in „Stripping-Buffer“ inkubiert und wiederum 3x 5 Min. in TBST gewaschen. Nach dieser Behandlung konnte die Membran wieder für nachfolgende Experimente verwendet werden.

### 2.1.10.4 Glykoproteinnachweis

Der Nachweis der Glykosylierung der Proteine und die spezifische Untersuchung der Glykosylierungsmuster wurden mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt. Bei beiden Untersuchungen wurden sowohl die Methode der SDS-PAGE als auch die 2D-Gelelektrophorese als Trennverfahren angewendet.

Zunächst erfolgte der Nachweis einer vorhandenen Glykosylierung durch das Pierce Glykoprotein Staining Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA, Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Herstellerangaben. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine im Gel fixiert, mit 3%-iger Essigsäure gewaschen und den entsprechenden Oxidations-, Färbe- und Reduktionslösungen inkubiert. Die Glykosylierung der Proteine wurde durch Waschen mit 3% Essigsäure und ddH<sub>2</sub>O sichtbar.

Der Nachweis spezifischer Glykosylierungsmuster durch Lektine wurde mit dem DIG Glykan Differentiation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim,

Deutschland) nach dem Blotten auf Nitrocellulosemembranen (s. Absatz 2.1.10.3), durchgeführt. Das Kit umfasst fünf verschiedene Lektine (GNA, *Galanthus nivalis* Agglutinin; SNA, *Sambucus nigra* Agglutinin; MAA, *Maackia amurensis* Agglutinin; PNA, *Arachis hypogaea* Agglutinin; DAS, *Datura stramonium* Agglutinin) sowie entsprechende Positivkontrollen. Die Membran wurde nach Blockierung und den verschiedenen Waschschritten jeweils eine Stunde mit dem entsprechenden Lektin inkubiert. Die gebundenen Lektine wurden aufgrund der Bildung von Nitroblau-Tetrazoliumsalz durch die konjugierte Alkalische Phosphatase sichtbar gemacht.

Der Nachweis der Bindungsaffinität eines bestimmten Lektins ermöglicht einen Hinweis auf den terminalen Zuckerrest und seine Verknüpfung zum davorliegenden Monosaccharid. Häufig sind hierbei verschiedene Verknüpfungsvarianten möglich. In dem DIG Glykan Differentiation Kit sind die Nachweise von Mannose, Sialinsäure,  $\beta$ -Galactose und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) als terminale Struktureinheiten möglich. Als Verknüpfungspartner können Mannose,  $\beta$ -Galactose, N-Acetylgalactosamin (GalNAc) sowie die direkte Verknüpfung mit einer Aminosäure nachgewiesen werden, wobei nicht zwischen einer N- oder O-glykosidischen Verknüpfung des Zuckerrestes mit dem Peptid differenziert werden kann. Um diese spezifische Verknüpfung zwischen dem Kohlehydrat und dem Protein zu identifizieren, ist die Abspaltung des Zuckerrestes mittels einer Endoglykosidase, die spezifisch entweder N- oder O-glykosidische Verknüpfungen spaltet. Anschließend wird das behandelte Protein erneuten mit dem entsprechenden Lektin inkubiert. Ist zuvor die Abspaltung des Zuckerrestes durch die Endoglykosidase erfolgt, ist der Nachweis mit dem spezifischen Lektin nicht mehr möglich. Die Überprüfung der Art der glykosidischen Bindung erfolgt daher über das Vorhandensein oder Fehlen einer Lektinbindung nach der Behandlung mit einer Endoglykosidase.

Im Anschluss an den spezifischen Glykosylierungsnachweis wurde das Protein daher mit der Endoglykosidase PNGase F (New England Biolabs Inc.) nach dem Herstellerprotokoll behandelt. Dazu wurde das Protein zunächst mit dem Denaturierungspuffer versetzt und unter Erhitzen (100 °C für 10 Min.) denaturiert. Anschließend wurde der Reaktionspuffer, NP40 und das Enzym PNGase F zugegeben und während der einstündigen Inkubationszeit das Protein deglykosyliert.

### 2.1.11 Proteinsequenzierung

Die im „National Center for Biotechnological Information“ (NCBI) bisher publizierte cCRP-Proteinsequenz beruht auf der *in silico* Deduktion der mRNA und enthält folgende Aminosäuresequenz (Accession Nummer (Acc. Nr.) XP\_545746):

```
MEKLWPCLLVLMNLPGAFLQIDLDEKAFVFPRESENSYVILFPQLQKPMKAFTVCLQVYTDL  
TRPHSLFSYATKAQSNEILLFKERPGLFSVSVGGSDAFINFPQKFYAPQHFCVTWESVTGLT  
ELWVDGKPMVRASLRRGYTVGSGASIVLGQEQDSFGGGFDKNQSLVGDIEDVNMWDFVL  
SPSQILTLYTTRALSPNVLNWRNLRYETRGEVFLKKELWS
```

Diese Sequenz besteht aus 223 Aminosäuren. Zur Überprüfung der Proteinsequenz wurde eine Teilsequenzierung von nativem cCRP aus Serumfraktionen mittels Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Die Analyse erfolgte zunächst mittels „Matrix-Associated-Laser-Desorption Time-of-Flight“ (MALDI-TOF)-MS und in einer später durchgeführten Sequenzierung mittels Orbitrap. Dazu wurde gereinigtes cCRP-Protein (s. Absatz 2.1.8.1) initial elektrophoretisch aufgetrennt (s. Absatz 2.1.9.1) und mit Coomassie-Blau angefärbt (s. Absatz 2.1.10.1). Das Peptid-Mapping wurde von Dr. Jayaseelan Murugaiyan im Institut für Tierhygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin durchgeführt.

Zusätzlich wurde die N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) in Auftrag gegeben (Proteome factory, Berlin). Dazu wurde gereinigtes cCRP nach SDS-PAGE aufgetrennt (s. Absatz 2.1.9.1), auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (s. Absatz 2.1.10.3) und diese mit 0,5%-iger Ponceaulösung angefärbt. Die beiden einzelnen sichtbaren Banden

wurden ausgeschnitten und separat in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß verschickt. Beide Banden wurden der N-terminalen Sequenzierung unterzogen.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

**Tab. 5 Übersicht der Puffer und Lösungen für die RNA/DNA-Analysen**

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Agarose Gel (1.5%):	6 g Agarose + 400 ml 1x TAE
Calciumlösung	0,1 M CaCl <sub>2</sub> , pH 7,6
Magnesiumlösung	0,1 M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,6
Nukleinsäure-Ladepuffer	25 mg Orange G, 5 ml 100% Glycerin, 40 µl EDTA (0,5 M), 1 ml 10x TAE, 3,96 ml ddH <sub>2</sub> O
Puffer für Primer (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0; Primer Stammlösung: 100 pmol; working solution: 10 pmol
Lysispuffer IMAC	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl
Waschpuffer IMAC	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer IMAC	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

**Tab. 6 Verwendete Primer für PCR und DNA-Sequenzierungen**

Primer	Firma	Primersequenz	Tm (°C)
1	pEX-A_fw	5' gtcggggctggcctaactat 3'	58,0
	pEX-A_rev	5' attaggcaccccaggcttta 3'	58,0
2	cCRP-For+	5' ggagtcatggagaagctgtggc 3'	60,0
	cCRP-Rev+	5' acgggcctcaggaccac 3'	60,0
3	cCRP-For_ORF	5' atggagaagctgtggccttg 3'	60,0
	cCRP-Rev_ORF	5' tcaggaccacagctccttcttg 3'	60,0
4	cCRP-RE.for	5' atggagaaactgtggcctgttta 3'	60,0
	cCRP1-RE.rev	5' agaccacagtctttctcaggaa 3'	60,0
5	cCRP_middle_rev	5' gcgcgtaagtcctataga 3'	60,0

Die lyophilisierten Primer wurden nach Erhalt in Tris-EDTA-Puffer gelöst und aus der Stammlösung (100 pmol/µl) durch zehnfache Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O eine Arbeitslösung (10 pmol/µl) hergestellt. Die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

**Tab. 7 Verwendeten Enzyme für die molekularbiologischen Methoden**

Methode	Produktname	Hersteller
DNA-Verdau	DNase I RNase free 1 U/µl	Fermentas
PCR	Immolase <sup>TM</sup> DNA Polymerase	Bioline
	Platinum <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Reverse Transkription	Revert Aid <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 200 U/µl	Fermentas
Restriktionsenzymverdau	FastDigest <sup>®</sup> NcoI	Fermentas
	FastDigest <sup>®</sup> EagI	Fermentas



**Tab. 8 Verwendete Reagenzien für die molekularbiologischen Methoden**

Methoden	Reagenzien	Bezugsquelle
PCR	10x ImmoBuffer	Bioline
	10x PCR Buffer	
	MgCl <sub>2</sub> (50mM)	
	dNTP Mix (10 mM)	
Restriktionsverdau	10x FastDigest Buffer	Fermentas
Reverse Transkription	random hexamer Primer	Fermentas
	dNTPs	Fermentas

## 2.2.1 Molekularbiologische Standard-Techniken

Die Molekularbiologischen Basis-Techniken wurden nach den Protokollen von (Green und Sambrook op. 2012) durchgeführt. Die verwendeten Kits und Enzyme wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls angewendet.

### 2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der cCRP-cDNA erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung verschiedener Primerpaare (Tab. 6) und Enzyme (Tab. 7). Die Platinum® Taq DNA Polymerase wurde aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion für alle Proben, die zur Sequenzierung verschickt wurden, eingesetzt. Die Immolase™ DNA Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion und wurde für die Standard PCR-Analytik eingesetzt. Alle PCRs wurden im T-Gradient Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Die Aktivierung der Polymerase, Denaturierung der DNA, Primeranlagerung und Elongation des PCR Produktes erfolgten abhängig von Enzym und Primerpaar (Tab. 9) dargestellt.

**Tab. 9 Auflistung der Bedingungen der durchgeführten PCR-Schritte.** Die benötigten Bedingungen der beiden eingesetzten DNA-Polymerasen unterschieden sich geringgradig voneinander und sind entsprechend aufgelistet. Die Anlagerungstemperatur (\*) der Primerpaare unterschied sich voneinander und ist daher gesondert in der Tab. 6 aufgeführt.

Polymerase	Aktivierung	Denaturierung	Anlagerung*	Verlängerung
Platinum® Taq DNA Polymerase	94 °C für 2 Min.	94 °C für 30 Sek.	30 Sek	72 °C für 1 Min.
Immolase™ DNA Polymerase	95 °C für 10 Min.	95 °C für 20 Sek.	30 Sek.	72 °C für 5 Min.

Die Zyklenzahl (Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung) betrug je nach Fragestellung, Art der Primer und der DNA Menge 25 bis 30. Zum Abschluss erfolgte eine Elongationsphase für 10 Min. bei 70 °C (Platinum® Taq DNA Polymerase) oder 5 Min bei 72 °C (Immolase™ DNA Polymerase).

### 2.2.1.2 DNA-Auftrennung und Gelextraktion

Die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese erfolgte in 1,5%-igen Agarosegelen mit 0,1%-igem Ethidiumbromidzusatz bei 80 V (Power Pack P25; Biometra) in Mini-Plus Horizontal HU10 Gelelektrophoresekammern (Carl Roth). Pro 50 µl PCR Ansatz wurde 10 µl Nukleinsäure-Ladepuffer zugegeben und die Fragmentgröße mittels dem Größenstandard O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, ready-to-use, 0,1 µg/µl) überprüft. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht (GeneGenius Bio Imaging System, Syngene) und je nach Fragestellung aus dem Agarosegel ausgeschnitten, um daraus die DNA mit dem Invisorb® Spin DNA Extraction Kit and Invisorb® Fragment Clean-Up

zu gewinnen. Die DNA-Extraktion erfolgte abweichend vom Standardprotokoll mit 20 µl Elutionspuffer. Der DNA-Gehalt jeder Probe wurde im NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (NanoDrop Technologies) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption der Proteine bei 280 nm gemessen und aus dem Quotient (260/280) die Reinheit der DNA bestimmt. Das Ergebnis des Quotienten sollte <1,8 sein.

### 2.2.1.3 Sequenzierung

Die PCR-Produkte (s. Absatz 2.2.1.1) bzw. Plasmid DNA (s. Absatz 2.2.3.1) wurden zur Überprüfung der korrekten Gensequenzen kommerziell sequenziert (Firma GATC (Konstanz), Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* 1977). Es wurden je nach Produkt 10-50 ng/µl PCR Produkt oder 30-100 ng/µl Plasmid DNA mit 10 pmol/µl des spezifischen Primers eingesetzt.

## 2.2.2 cDNA-Synthese

Zur Gewinnung der cCRP-mRNA wurde eine Lebergewebeprobe (5 cm x 5 cm) einer acht Jahre alten Boxermischlingshündin mit einem vaginalen Karzinom innerhalb einer Stunde *post mortem* entnommen. Die Probe wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die mRNA-Isolierung wurde eine geringe Menge Leberprobe (ca. 10 mg) mit Puffer aus dem InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit (Invitek GmbH) homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mittels Spin-Säule nach Angabe des Herstellers gereinigt. Gebundene RNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und der Gehalt und die Reinheit wurden im NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (260/280 nm) bestimmt. Im Anschluss wurde 1 µg der gewonnenen RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Alle Inkubationsschritte der reversen Transkription wurden im Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt.

Vor der reversen Transkription wurde zunächst verbliebene genomische DNA in einem initialen Schritt durch die RNase freie DNase (1 U Enzym / µg Gesamt-RNA) in 10x Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub> (Endvolumen 10 µl) für 30 Min. bei 37 °C verdaut. Der DNA-Verdau wurde durch den Zusatz von 1 µl 25 mM EDTA (Endkonzentration 2,5 nmol/µl) und anschließender Inkubation bei 65 °C für 10 Min. gestoppt.

Für die reverse Transkription wurden der DNase behandelten RNA im ersten Schritt 0,2 µg random hexamer Primer (5 µM) zugefügt und das Gemisch für 5 Min. bei 70 °C inkubiert.

Anschließend wurden 200 U RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas), 10 mM dNTPs (Fermentas) und 4 µl 5x Reaktionspuffer zugegeben. Die Gesamtreaktion erfolgte stufenweise zunächst für 10 Min. bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 42 °C und 10 Min. bei 70 °C. Zur Kontrolle auf residuale genomische DNA wurden zusätzlich zu den Probenansätzen Negativkontrollen mitgeführt, in denen keine RevertAid Reverse Transcriptase zugesetzt wurde. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Sequenzierung durch GATC (Konstanz) bei -20 °C gelagert.

## 2.2.3 Rekombinantes cCRPs

Zur Produktion größerer Mengen cCRP für weitere Forschungsprojekte sollte die Produktion von rekombinanten cCRP (rcCRP) alternativ in verschiedenen Hostsystemen von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgen, da die Gewinnung von nativem cCRP aus Hundeserum aufwendig ist. Initial wurde cCRP-genhaltiges Vektorplasmid in ein zellfreies Expressionssystem (Invitrogen) transformiert um zu prüfen, ob rcCRP-Protein vom Vektorplasmid transkribiert und translatiert wurde. In einem zweiten Schritt wurde das cCRP-genhaltige Plasmid in einen bakteriellen Produktionsstamm (*E. coli* BL21(DE3)pLysS) transformiert, induziert und gereinigt.

### 2.2.3.1 Herstellung eines rekombinanten cCRP-Gens

Die in der Datenbank des NCBI (Acc. Nr. XM\_545746) angegebene, 669 bp lange Sequenz der cCRP-mRNA aus *in silico* Studien wurde als Grundlage für die Klonierungen verwendet (Anhang V.). Die Basensequenz wurde mithilfe des GENEius light (Eurofins MWG Operon) spezifisch an die bakterielle Gencodierung angepasst (Anhang VI.).

Zusätzlich wurde am 5'-Terminus der cCRP-Gensequenz ein Poly(6x)-Histidin-Tag (HisTag), durch Einfügen der sechsmaligen Basenabfolge „CAT“ (Codon für Histidin), eingefügt. Anhand dieser HisTags sollte die spätere Affinitäts-Reinigung des Proteins vereinfacht werden. Die Gesamtsequenz wurde kommerziell durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) in das Plasmid pEX-A synthetisiert. Das Plasmid wurde nach Erhalt in Tris-EDTA-Puffer aufgenommen (Konzentration 0,1 µg/µl) und aus dieser Stammlösung durch zehnfache Verdünnung die Arbeitslösung (Endkonzentration 0,01 µg/µl) hergestellt.

### 2.2.3.2 Herstellung hitzekompetenter Bakterien

Um für die Hitzetransformation stabile Bakterien zu erhalten, wurde das Protokoll nach Hanahan (1983) mit geringen Modifikationen verwendet. Im initialen Schritt wurde LB-Flüssignährmedium mit *E. coli* BL21(DE3)pLyS (Agilent Technologies) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD 580 nm) von 0,4 - 0,5 wachsen gelassen. Nach erreichter OD wurde die Flüssigkultur sofort auf Eis abgekühlt und dann 10 Min. bei 6.700 g zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst in 50 ml kalter Magnesiumlösung (0,1 M) resuspendiert, der Zentrifugationsschritt wiederholt und das Pellet wiederum in 25 ml kalter Calciumlösung (0,1 M) resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden 20 Min. auf Eis ruhen gelassen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt das Pellet in 8,6 ml kalter Calciumlösung mit 1,6 ml Glycerol (87%) vermischt, resuspendiert und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.3 Subklonierung der cCRP-Sequenz

Aus dem rcCRP-enthaltenden pEX-A Plasmid wurde entsprechend der Herstellerangaben die cCRP-Gensequenz durch die Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (s. Absatz 2.2.1.1) in einer PCR vervielfältigt. Diese Polymerase besitzt terminale Transferaseaktivität und addiert am 3'-Ende der PCR-Produkte einzelne Adeninnukleotide. Das entsprechende Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) hat, auf die Adenin-Überhänge abgestimmt, am 3'-Ende einzelne, zusätzliche Thyminnukleotide. Am terminalen Thyminnukleotid zerschneidet eine Topoisomerase diese DNA, blockiert durch die Bindung mit seinem Tyrosin (Tyr-274) das 3'-Ende des Stranges und fügt ein vorhandenes PCR-Produkt mit Adenin-Überhang ein. Die vollständige Sequenz des Vektorplasmides mit cCRP ist im Anhang VII. dargestellt. Das Plasmid besitzt darüber hinaus den Bakteriophagen-Promotor T7, wodurch eine verstärkte Transkription durch die T7-RNA-Polymerase bewirkt wird.

### 2.2.3.4 Transformation in Bakterien

Das PCR-Produkt des cCRP-Gens wurde mit dem Vektorplasmid in einem Molaritätsverhältnis von 3:1 vermischt (100 ng Vektorplasmid : 80 ng PCR Produkt) und bis zur Hitzetransformation in die One Shot<sup>®</sup> TOP10 chemically competent *E. coli* (Invitrogen) auf Eis gelagert.

Das Gemisch aus cCRP-PCR Produkt und Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO<sup>®</sup> wurde durch Hitzeschocktransformation (30-45 Sek bei 42 °C) in 100 µl One Shot<sup>®</sup> TOP10 chemically competent *E. coli* (Invitrogen) eingebracht. Die Transformation in selbst kompetent gemachte *E. coli* BL21(DE3)pLyS erfolgte äquivalent. Dieser Stamm wurde aufgrund der vorhandenen T7-RNA-Polymerase-Aktivität ausgewählt.

Nach der Transformation wurden sofort 900 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation und der späteren Proteinproduktion wurden sowohl Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO<sup>®</sup> ohne die cCRP

Sequenz (Negativkontrolle) als auch das Plasmid pUC19 (Invitrogen) (Positivkontrolle) in 100 µl One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli* (Invitrogen) transformiert.

Aus jedem Ansatz der transformierten *E. coli* Bakterien wurden jeweils 20 µl und 50 µl (One Shot® TOP10 chemically competent *E. coli*) resp. 20 µl, 50 µl und 200 µl (*E. coli* BL21(DE3)pLyS) gleichmäßig auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (Ampicillin 100 µg/µl; Chloramphenicol 50 µg/µl) verteilt und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

Am darauffolgenden Tag wurden die Kolonien ausgewertet und ggf. vereinzelt. Es erfolgten das Ausstreichen von Einzelkulturen auf neuen antibiotikahaltigen LB-Agarplatten, eine Direkt-PCR des Koloniematerials zur Überprüfung der Gensequenz und der Ansatz von Einzelkolonien in 5 ml flüssigem LB-Nährmedium.

Die Plasmidisolierung aus den Flüssigkulturen erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey&Nagel) nach Herstellerangaben mit anschließender DNA-Bestimmung im NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (260/280 nm).

#### 2.2.3.5 Restriktionsenzymverdau

Zur Bestätigung der Klonierung des cCRP-Gens in das Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO® wurde ein Restriktionsenzymverdau mit den Restriktionsenzymen FastDigest® NcoI (Fermentas) und FastDigest® EagI (Fermentas) durchgeführt. Dabei schneidet das FastDigest® NcoI in der „multiple cloning site“ des Plasmides vor der eingefügten cCRP-Sequenz (5' C'CATGG 3') und das FastDigest® EagI hinter der eingefügte cCRP-Sequenz (5' C'GGCCG 3'), ebenfalls in der „multiple cloning site“. Für die Reaktion wurde eine Vektorplasmidmenge von 600 ng verwendet, alle Reagenten für 90 Min. bei 37 °C inkubiert und nach Abschluss des Restriktionsenzymverdaus eine elektrophoretische Auftrennung im 1,5%-igem Agarosegel angeschlossen. Die Analyse des Restriktionsmusters erfolgte unter UV-Kontrolle.

#### 2.2.3.6 Proteinproduktion im zellfreien Expressionssystem

Für die rekombinante Proteinsynthese wurden zunächst Vorversuche in einem zellfreien Expressionssystem (Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System; Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurde das cCRP-genhaltige Plasmid pEXP5-CT/TOPO®, welches zuvor durch Sequenzierung (s. Absatz 2.2.1.3) verifiziert worden war, verwendet. Das Plasmid wurde mit dem *E. coli* slyD-Extrakt (Invitrogen) vermischt, initial bei 30 °C für eine halbe Stunde und anschließend bei 37 °C für 4 – 6 Stunden inkubiert. Der Extrakt wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit Aceton gefällt und abzentrifugiert (5 Min., 12.000 rpm). Das Proteinpellet wurde in SDS-haltigem Proteinpuffer aufgenommen und in der SDS-PAGE (s. Absatz 2.1.9.1) und im Western Blot (s. Absatz 2.1.10.3) auf das Vorhandensein von rcCRP untersucht.

#### 2.2.3.7 Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3)pLyS

Das bereits in der zellfreien Proteinexpression (s. Absatz 2.2.3.6) verwendete Plasmid pEXP5-CT/TOPO® wurde nach erfolgreicher zellfreier Proteinsynthese in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLyS wie beschrieben transformiert (s. Absatz 2.2.3.4). Dieser Bakterienstamm ist in der Lage durch eine Plasmid-kodierte T7-RNA-Polymerase die Expression des cCRP-Gens zu kontrollieren. Das Gen der T7-RNA-Polymerase wiederum steht unter Kontrolle eines *lacZ*-Operon. Dieses wird durch den *lac*-Repressor inhibiert und die Zugabe von IPTG führt zur Dissoziation des Repressors von der Plasmid-DNA und damit der Aktivierung des Operons. Die Proteinproduktion unterliegt dadurch zwei Kontrollmechanismen.

Die cCRP-genhaltigen Bakterien wurden im antibiotikahaltigen LB-Flüssignährmedium angezogen, mit IPTG (1 mM) stimuliert und die Produktion von rcCRP-Protein über mehrere Stunden induziert. Im Anschluss an die Proteinsynthese wurde das Bakterienmedium bei 6.000 g für 15 Min. zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.8 Reinigung des rekombinanten cCRPs

Die Reinigung des rcCRP-Proteins sollte anhand des in das Gen eingefügten HisTags durchgeführt werden. Es wurde daher zunächst die Immobilisierte-Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) für die Aufreinigung ausgewählt. Das Prinzip dieses Reinigungsverfahrens beruht auf der Bindung von Proteine über die Polyhistidine (HisTags) an  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen die mit Iminodiessigsäure (IDA) als Chelatkomplex vorliegen. Die gebundenen Proteine werden durch Imidazol kompetitiv verdrängt und die Proteine dadurch von der  $\text{Ni}^{2+}$ -Säule eluiert.

Im Vorfeld der IMAC-Reinigung wurde das IPTG-induzierte Bakterienpellet in 500  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (Tab. 5) resuspendiert. Zusätzlich wurde das resuspendierte Material 30 - 60 Sekunden mit Ultraschall lysiert bis die Lösung klar wurde (Analog Sonifire<sup>®</sup> 250 Cell Disruptor, Branson) und im Anschluss zentrifugiert (10.000 g, 10 Min.). Das Säulenmaterial Biofox 40  $\mu\text{m}$  IDAhigh-Gelmaterial (Knauer GmbH, Berlin) wurde durch jeweils zweimaliges Waschen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und Lysispuffer und einmaliger Inkubation mit Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ -) -Lösung (50 mM) equilibriert. Nach einer erneuten Waschung mit Lysispuffer zur Entfernung nicht gebundener  $\text{Ni}^{2+}$ -Teilchen, wurde das lysierte Bakterienmaterial aufgebracht und 30 Min. bei 4 °C auf der Säule inkubiert. Nicht-gebundenes Material wurde durch Waschen mit Lysispuffer entfernt und das rcCRP-Protein dann mit Elutionspuffer (Tab. 5) von der Säule gespült. Die Proben wurden für die anschließenden Analysen durch Fällung mit Aceton (4 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$  Probe), Zentrifugation (5 Min., 12.000 rpm) und anschließender Resuspension der Pellets in Protein-SDS-Puffer resuspendiert. Danach wurden die gewonnenen Proben mittels SDS-PAGE (s. Absatz 2.1.9.1) und Western Blot (s. Absatz 2.1.10.3) untersucht.

## 2.3 Immunologischer Speziesvergleich

Außer dem caninen CRP wurde das Entzündungsprotein auch in Proben von anderen Tierarten untersucht. Der Hund diente hierbei in allen Untersuchungen als Referenzspezies. Für den Vergleich wurden sowohl Herbi-, Omni- als auch verschiedenste, evolutionär näherstehende Carnivoren berücksichtigt (Anhang I). Für die Untersuchung von CRP-Protein aus der Gruppe der *Caniformia* (Hundeartigen) wurden Serumproben des Haushundes (*Canis lupus familiaris*) mit Proben eines Braunbären (*Ursus arctos*), eines Waschbären (*Procyon lotor*), eines Steinmarders (*Martes foina*) und eines Seehundes (*Phoca vitulina*) verglichen.

Als nächste Verwandte aus der Ordnung der *Carnivora* wurde aus der Überfamilie der Katzenartigen (*Feloidea*) die Serumproben einer Hauskatze (*Felis silvestris catus*) untersucht. Außerdem wurden verschiedene weniger verwandte, domestizierte Tierarten untersucht, da diese häufige Patienten der Veterinärmedizinischen Praxis darstellen. Als Vertreter der Ordnung Unpaarhufer (*Perissodactyla*) wurde das Serum eines Pferdes (*Equus caballus*) untersucht. Aus der Ordnung der Paarhufer (*Artiodactyla*) wurden Individuen zweier Spezies untersucht: aus der Unterordnung der Wiederkäuer (*Ruminantia*) Serum eines Rindes (*Bos primigenius taurus*) sowie aus der Unterordnung der Schweineartigen (*Suina*) das eines Hausschweins (*Sus scrofa domestica*). Als Vertreter der Familie der Hasenartigen (*Leporidae*) wurde eine Serumprobe eines Hauskaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) gewonnen.

Die Tiere wiesen einen unterschiedlichen klinischen Status auf. Eine Übersicht der Tierarten, ihrer Erkrankungen und der Bezugsquellen ist in Tab. 10 dargestellt. Die Probenentnahme erfolgte entweder zur klinischen Diagnostik (s. Absatz 2.1.6), zum Teil unter Anästhesie oder *post mortem*.

**Tab. 10 Übersicht der untersuchten Tierarten und ihre Bezugsquellen**

Tierart	Erkrankung	Bezugsquelle
Katze ( <i>Felis silvestris catus</i> )	Trauma	Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
Steinmarder ( <i>Martes foina</i> )	unbekannt	
Waschbär ( <i>Procyon lotor</i> )	Trauma	
Pferd ( <i>Equus caballus</i> )	Myopathie	Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
Schwein ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Phlegmone	Klinik für Klauentiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
Rind ( <i>Bos primigenius taurus</i> )	Mastitis	Teterower Fleisch GmbH, Teterow
Braunbär ( <i>Ursus arctos</i> )	Arthritis	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW) im Forschungsverband Berlin e.V.
Seehund ( <i>Phoca vitulina</i> )	Pneumonie	Institut für aquatische Wildtierforschung, Stiftung Tierärztliche Hochschule (TiHo) Hannover
Kaninchen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Eitrige Entzündung	Tierarztpraxis Dr. Thomas Göbel, Berlin

Die Seren wurden nach Gewinnung gefroren und bei -20 °C gelagert.

Wie für die Serumproben der Hunde erfolgte auch bei den Proben der verschiedenen Tierspezies vor der Analyse eine Proteinquantifizierung mittels Bradford-Methode (s. Absatz 2.1.7). Auf Basis der bestimmten Proteingehalte wurde eine SDS-PAGE (s. Absatz 2.1.9.1) durchgeführt und diese im Anschluss mit Coomassie-Blau (s. Absatz 2.1.10.1), unspezifischer Glykosylierungsfärbung und im Western Blot (s. Absatz 2.1.10.3) mittels dem anti-cCRP-AK untersucht.

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Klinische Studie zur Evaluierung**

#### **3.1.1 Allgemeines**

Es wurden insgesamt 125 Hunde mit heterogener Verteilung hinsichtlich Alter, Rasse, Geschlecht und Gesundheitsstatus in die Studie eingeschlossen. Die Auswertung der Rasseverteilung ergab 81 Hunde verschiedener Rassen und 44 Mischlingshunde. Das Geschlecht verteilte sich auf 44 männliche, 22 männlich-kastrierte, 34 weibliche und 27 weiblich-kastrierte Tiere. Das Alter der untersuchten Hunde lag zwischen sechs Monaten und 16 Jahren (median 7,38 Jahre). Die untersuchten Hunde teilten sich in 102 Tiere mit verschiedenen Erkrankungen und 23 klinisch unauffällige Tiere.

Die Gruppe der erkrankten Tiere umfasste 40 Tiere mit unterschiedlichen entzündlichen oder infektiösen Erkrankungen (u.a. Pyometra, Pneumonie, Magendrehung, Gastroenteritis), neun Patienten mit heterogenen Traumata (Unfälle, Bissverletzung), 14 mit immun-pathologischen Erkrankungen, 13 Hunde mit neoplastischen Veränderungen und 25 Tiere mit verschiedenen nicht-entzündliche Erkrankungen (Endokrinopathien, Neuropathien oder orthopädische Störungen).

Die 23 gesunden Tiere waren größtenteils Blutspender oder Tiere mit Voruntersuchung vor operativen Routineeingriffen (Kastration) und zeigten keine Veränderungen des Blutbildes bzw. der Blutchemie. Eine vollständige Auflistung aller Tiere findet sich im Anhang IX.

Mit den Testgeräten von TECOmedical und EUROLyser wurden alle 125 Proben gemessen, jedoch aufgrund fehlenden Materials nur 51 der 125 Tiere mit dem LifeAssays Testgerät. Die Auswahl der 51 Proben erfolgte randomisiert. Der Median der mittels ELISA bestimmten cCRP-Konzentrationen lag bei den gesunden Hunden zwischen 0,1 mg/l und 4,7 mg/l (median  $1,3 \pm 1,35$  mg/l) und bei den kranken Hunden zwischen 0 mg/l und 282 mg/l (median  $17,3 \pm 56,11$  mg/l).

Die Berechnung der Datenverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test ergab nicht normalverteilte Werte bezüglich der gemessenen cCRP-Konzentrationen.

Die verschiedenen Lagerungsbedingungen (4 °C und RT) der Serumproben zeigten keinen Einfluss auf die Höhe der cCRP-Konzentration bei zwei getesteten Geräten (TECOmedical, EUROLyser). Im t-Test konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den gelagerten Proben der getesteten Hunde zwischen der initialen cCRP-Konzentration (Mittelwert 110,1 mg/l  $\pm$  73,2 TECOmedical; 65,7 mg/l  $\pm$  47,3 EUROLyser) und der cCRP-Konzentration nach 4 Stunden (Mittelwert 104,1 mg/l  $\pm$  70,9 TECOmedical) resp. 24 Stunden (Mittelwert 108,6 mg/l  $\pm$  62,5 TECOmedical; 66,0 mg/l  $\pm$  47,0 EUROLyser) ermittelt werden. Die cCRP-Konzentration des untersuchten gesunden Hundes lag zu allen Zeitpunkten unterhalb von 5 mg/l (TECOmedical) resp. 10 mg/l (EUROLyser). Die Berechnung der Bonferroni Korrektur ermittelte ein zu erreichendes Signifikanzniveau von 0,0167. Da die Signifikanz aber bereits oberhalb von 0,05 lag, hatte dieser Parameter keinen Einfluss auf das Ergebnis.

#### **3.1.2 Methodenvergleiche**

Für die Beurteilung, ob die Testgeräte die festgelegten Qualitätsanforderungen erreichen, wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt. Der Vergleich zwischen Seren mit einer cCRP-Konzentration < 10 mg/l und > 10 mg/l mittels Mann-Whitney-U Test ergab hoch signifikante Werte ( $p < 0,001$ ). Dieser Grenzwert (10 mg/l) wurde gewählt, da dies der niedrigste Wert war, den alle Schnelltestgeräte messen konnten. Die Gruppengröße der anhand der ELISA-Messung eingeteilten Proben verteilte sich auf 62 Serumproben mit einer cCRP-Konzentration < 10 mg/l und 63 Serumproben mit einer cCRP-Konzentration > 10 mg/l (Tab. 11).

**Tab. 11 Vergleich der Messwerte zwischen den Schnelltestgeräten und dem ELISA anhand des Grenzwertes 10 mg/l.** Die 125 Serumproben der Studie wurden anhand der ELISA-Ergebnisse in zwei Gruppen, < 10 mg/l und > 10 mg/l cCRP-Gehalt, eingeteilt. Die grauen Zeilen geben die Anzahl der Proben an, die aufgrund der ELISA Werte in die beiden Gruppen eingeteilt wurden. Die Zeile „alle Proben“ gibt jeweils die Anzahl der Proben an, die aufgrund der Ergebnisse der Schnelltestgeräte in die Gruppe < 10 mg/l und > 10 mg/l fiel. Die dritte Zeile gibt Auskunft über die Anzahl der übereinstimmenden Ergebnisse zwischen ELISA und den Schnelltestgeräten.

		< 10 mg/l	> 10 mg/l
		n=125	
<b>ELISA (TECOmedical)</b>		62	63
<b>TECOmedical</b>	Alle Proben	51	74
	Übereinstimmung zwischen Schnelltest und ELISA Werten	50	62
<b>EUROLyser</b>	Alle Proben	80	45
	Übereinstimmung zwischen Schnelltest und ELISA Werten	62	45
		n = 51	
<b>ELISA (TECOmedical)</b>		23	28
<b>LifeAssays</b>	Alle Proben	24	27
	Übereinstimmung zwischen Schnelltest und ELISA Werten	22	27

Das TECOmedical Schnelltestgerät stimmte in 50 von 62 (80,6%) Serumproben, in denen der mit ELISA bestimmte Wert < 10 mg/l lag, überein. In einer Probe mit einem ELISA Wert von 12,57 mg/l wurde von dem TECOmedical Test ein Wert < 10 mg/l gemessen. Dagegen wurden bei zwölf Hunden leicht erhöhte Werte (zwischen 10,1 mg/l und 14,73 mg/l) und bei weiteren sieben Hunden erhöhte Werte (zwischen 15,03 und 36,55 mg/l) gemessen, obwohl die ELISA Werte dieser Proben < 10 mg/l cCRP enthielten.

Bei den Messungen mit dem EUROLyser Schnelltestgerät wurden bei allen 62 Hunden mit cCRP-Konzentrationen < 10 mg/l diese Werte korrekt bestimmt. Allerdings wurden bei 18 von 63 Serumproben (29%) mit ELISA Werten > 10 mg/l mit diesem Testgerät Werte unterhalb des Grenzwertes (10 mg/l) gemessen: Die Hälfte (n=9) der niedrig gemessenen Proben hatte ELISA Werte von maximal 15 mg/l und in weiteren fünf Serumproben lagen die ELISA Werte zwischen 15 und 28 mg/l. Vier der 18 Hunde zeigten im EUROLyser System cCRP-Konzentrationen < 10 mg/l, obwohl der ELISA deutlich hohe cCRP Werte > 78 mg/l ermittelte.

Im LifeAssays Schnelltestgerät wurden lediglich Proben von 51 Hunde analysiert, von denen 23 eine cCRP-Konzentration < 10 mg/l und 28 Hunde einen cCRP-Gehalt > 10 mg/l im ELISA aufwiesen. Das Schnelltestgerät von LifeAssays ermittelte bei einem Hund eine zu hohe cCRP-Konzentration von 11 mg/l, obwohl das ELISA Ergebnis 4,16 mg/l betrug. Bei einem anderen Hund dagegen, mit einem mittels ELISA ermittelten Wert von 20,8 mg/l, eine zu geringe cCRP Konzentration < 10 mg/l.

Alle Schnelltestgeräte waren unterschiedlich gut in der Lage, niedrige cCRP-Konzentrationen von hohen Konzentrationen (bei einem Grenzwert von 10 mg/l) zu unterscheiden. Zusätzlich zu dieser Differenzierungsfähigkeit wurden verschiedene Parameter zur Qualitätsbeurteilung berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 im Vergleich zu den in der Publikation von Jensen und Kjelgaard-Hansen (2006) angegebenen zulässigen Werten dargestellt.



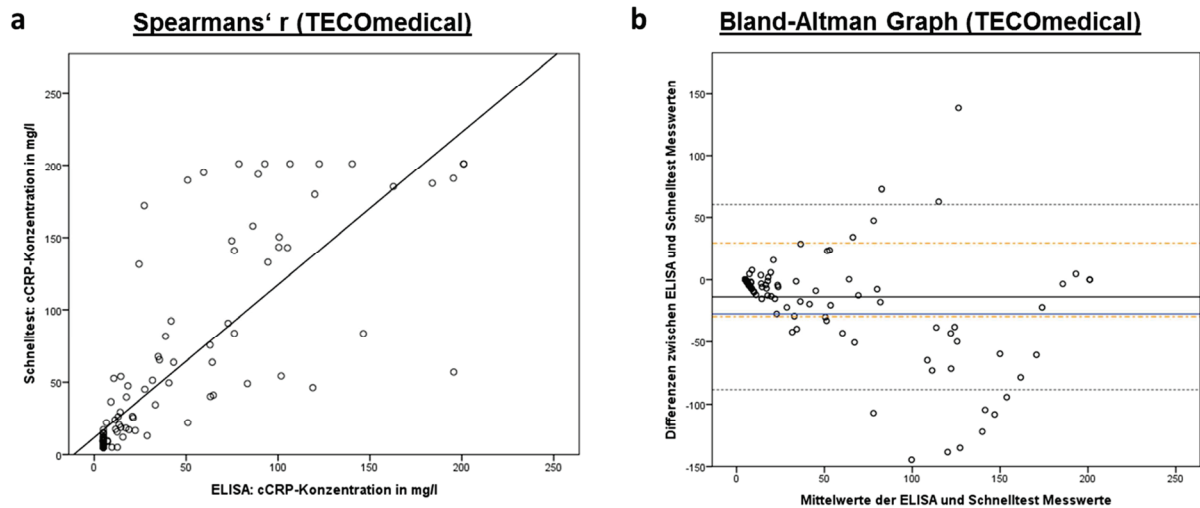
**Tab. 12 Übersicht der berechneten Werte für die Qualitätsanforderungen.** Die Tabelle fasst die berechneten Werte für die Variationskoeffizienten (CV), die Verzerrung (Bias) und den absoluten Fehler (TE) der einzelnen Schnelltestgeräte im Vergleich zu den zulässigen Werten zusammen. Die letzte, grau hinterlegte Zeile gibt den jeweils zulässigen Wert basierend auf der Publikation von Jensen und Kjelgaard-Hansen (2006) an.

	<b>CV(%)</b>	<b>Bias (%)</b>	<b>TE (%)</b>
<b>TECOmedical</b>	20,7	27,6	69,0
<b>EUROlyser</b>	7	-14,2	28,2
<b>LifeAssays</b>	7,4	-15,7	30,3
<b>Zulässiger Wert (max.)</b>	12,2	9,5	29,6

Der CV lag bei dem EUROlyser (7%) und LifeAssays (7,4%) Gerät nah beieinander und beide lagen unterhalb der maximal zulässigen Inter-assay Varianz (12,2%). Das TECOmedical Gerät erzielte jedoch einen deutlich höheren Wert von 20,7%. Der maximal erlaubte Bias (9,5%) wurde von allen Testgeräten überschritten (TECOmedical 27,6%, EUROlyser -14,2%, LifeAssays -15,7%). Der TE lag beim EUROlyser Gerät (28,2%) knapp unterhalb des zulässigen Wertes (29,6%), bei LifeAssays dagegen knapp darüber (30,3%) und das TECOmedical Gerät deutlich darüber (69%).

### 3.1.2.1 TECOmedical Schnelltestgerät

Der Vergleich der gemessenen Werte des ELISA und des Schnelltests von TECOmedical ermittelte einen Korrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,89. Der korrigierte Korrelationskoeffizient nach Berechnung der Deming Regression betrug 0,81. Die Steigung betrug  $1,39 \pm 0,09$  und war statistisch signifikant ( $t = 15,4$ ). Der Schnittpunkt mit der y-Achse dagegen lag bei  $-0,32 \pm 5,59$  und wies keine Signifikanz ( $t = -0,06$ ) auf. Der Verlauf der Regressionsgerade und die Verteilung der Werte im einfachen Streudiagramm ist in Abb. 2a dargestellt.



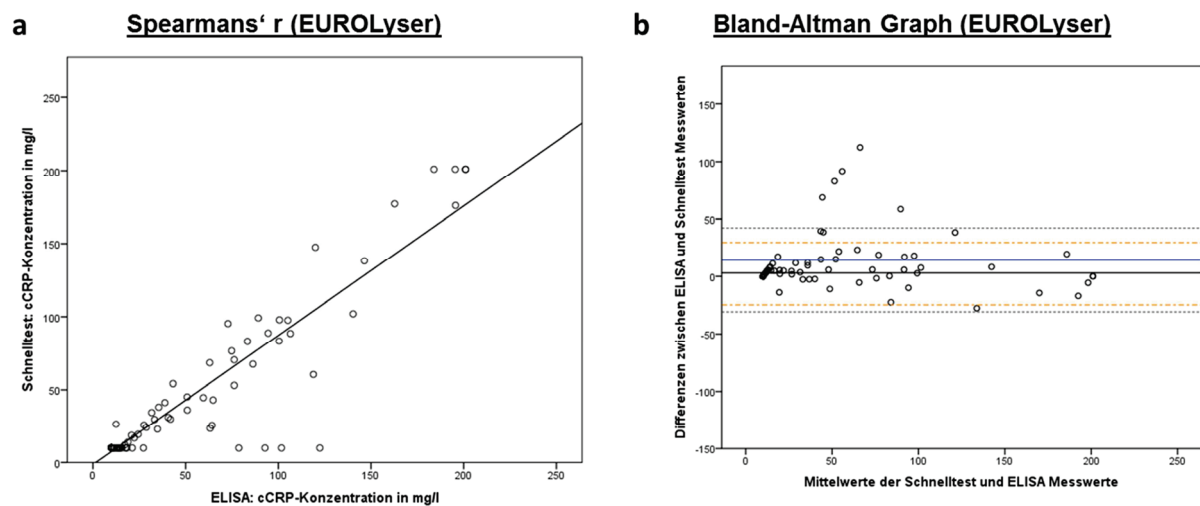
**Abb. 2 Graphische Darstellung der Ergebnisse von TECOmedical.** Das einfache Streudiagramm in der Abb. 2a stellt die Korrelation zwischen dem Schnelltestgerät von TECOmedical und dem ELISA dar. Der Verlauf der Regressionsgerade spiegelt den Korrelationskoeffizienten nach Spearman wieder. Der Graph der Abb. 2b zeigte den direkten Methodenvergleich zwischen dem Schnelltestgerät (TECOmedical) und der Referenzmethode ELISA in einem Bland-Altman Diagramm mit dem Mittelwert der Differenzen als durchgezogene schwarze Linie und den Übereinstimmungsgrenzen als gestrichelte graue Linien. Zusätzlich ist der Bias des Gerätes als blaue Linie und der erlaubte Fehler ( $TE_{Des}$ ) von 29,6 % mit zwei orangen gestrichelten Linien eingezeichnet. Beide Diagramme sind in Vergrößerung im Anhang X dargestellt.

Zusätzlich zu dem einfachen Streudiagramm wurden die Werte auch in einem Bland-Altman Diagramm dargestellt (Abb. 2b). Der Mittelwert der Differenzen zwischen dem Schnelltestgerät von TECOmedical und der Referenzmethode ELISA betrug -13,84. Die Übereinstimmungsgrenzen lagen entsprechend bei -88,5 und 60,9. Bei niedrigen cCRP-Konzentrationen unterschieden sich Werte der verschiedenen Methoden weniger voneinander, die Punkte waren um den Mittelwert der Differenzen herum verteilt. Je höher die cCRP-Konzentration war, desto größer wurde die Streuung über der y-Achse. Oberhalb einer Konzentration von 75 mg/l lagen einige Werte außerhalb der oberen und unteren Übereinstimmungsgrenzen. Außerdem zeigte die Verteilung der Werte eine leicht negative Korrelation, was darauf hindeutete, dass das Schnelltestgerät von TECOmedical höhere Werte als die Referenzmethode misst. Diese sichtbare Tendenz war statistisch nicht signifikant. Etwa ein Drittel der Wertepunkte lag außerhalb der erlaubten Fehlergrenzen und der Bias befand sich mit -27,6 % nah an der unteren  $TE_{Des}$  Grenze.

### 3.1.2.2 EUROLyser Schnelltestgerät

Für das EUROLyser Schnelltestgerät war der Korrelationskoeffizienten nach Spearman 0,85 und nach Korrektur durch Berechnung der Deming Regression 0,92. Der Wert für die Steigung betrug  $0,96 \pm 0,04$  und war statistisch signifikant ( $t = 24$ ). Der Achsenschnittpunkt lag bei  $-4,06 \pm 2,22$  und wies keine Signifikanz ( $t = -1,83$ ) auf. Die Abb. 3 zeigt den Verlauf der Regressionsgerade, die Verteilung der Werte im einfachen Streudiagramm (a) sowie den direkten Methodenvergleich im Bland-Altman Diagramm (b).

Der Mittelwert der Differenzen zwischen dem ELISA und dem Schnelltestgerät betrug für das Schnelltestgerät von EUROLyser 5,75. Die Übereinstimmungsgrenzen hierzu lagen bei -30,2 und 42,2. Der Verlauf der Werte konzentrierte sich größtenteils um den Mittelwert der Differenzen, jedoch fanden sich auch einige Ausreißer oberhalb der oberen Übereinstimmungsgrenze. Drei weitere Werte lagen zusätzlich oberhalb resp. ein Wert unterhalb der  $TE_{Des}$  Grenzen und der Bias betrug 14,2 %. Der positive Mittelwert der Differenzen deutete darauf hin, dass das Schnelltestgerät in der Regel geringgradig niedrigere Werte als die Referenzmethode misst. Jedoch ergab sich keine Tendenz für Veränderungen bei hohen oder niedrigen Konzentrationen, was durch den relativ horizontalen Verlauf des Wertevergleichs sichtbar war. Die Messung niedrigerer Werte war statistisch nicht signifikant.



**Abb. 3 Graphische Darstellung der Ergebnisse von EUROLyser.** Der Graph der Abb. 3a zeigt die Korrelation zwischen dem Schnelltestgerät (EUROLyser) und der Referenzmethode ELISA im einfachen Streudiagramm. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman, wird durch die Regressionsgerade repräsentiert. Das Bland-Altman Diagramm der Abb. 3b zeigt den Mittelwert der Differenzen zwischen dem Schnelltestgerät und dem ELISA als durchgezogene schwarze Linie und die Übereinstimmungsgrenzen als gestrichelte graue Linien. Der Bias des Gerätes ist als blaue Linie und der erlaubte Fehler ( $TE_{Des}$ ) von 29,6 % mit zwei orangen gestrichelten Linien dargestellt. Beide Diagramme sind in Vergrößerung im Anhang XI dargestellt.

Beim EUROLyser Testgerät fiel auf, dass in vier Serumproben mit cCRP-Konzentrationen von 78 mg/l, 92,8 mg/l, 101 mg/l und 122 mg/l (ELISA) durch das Gerät nur Werte  $< 10$  mg/l ermittelt wurden. Dies änderte sich weder in Wiederholungsmessungen noch durch verschiedene Verdünnungen. Nur bei der Probe mit 101 mg/l cCRP-Gehalt zeigte die 1:3 Verdünnung einen Effekt, hier wurde ein Wert 20,1 mg/l gemessen.

Die Probe mit einem cCRP-Gehalt von 92,8 mg/l stellte sich im Bland-Altman-Diagramm (Abb. 3b) als der Punkt dar, der am weitesten über der oberen Übereinstimmungsgrenze lag. Die übrigen vier Punkte, die über der oberen Übereinstimmungsgrenze lagen, konnten nicht mit den Falsch-negativ Messungen korreliert werden.

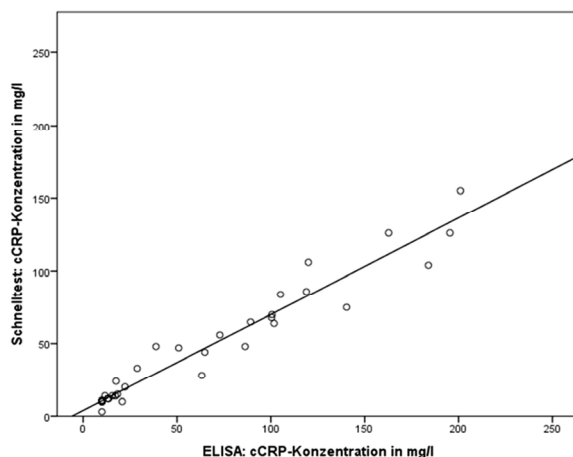
Bei retrospektiver Betrachtung der Proben der Tiere, von denen die Proben entnommen wurden sowie der Probenbehandlung gab es keine abweichenden Gemeinsamkeiten von

den anderen in dieser Studie gemessenen Serumproben. Drei der vier Proben hatten eine normale Serumfarbe (hell, klar) und eine Probe wies durch die zugrunde liegende Erkrankung eine starke Hämolyse auf. Die Tiere hatten im Vorfeld der Probenentnahme alle eine medikamentöse Behandlung erhalten, wobei sich diese jedoch in der Zusammensetzung unterschied. Das einzige Medikament, das alle vier Hunde erhalten hatten, war Amoxicillin-Clavulansäure, jedoch ist dies ein häufig verwendetes Antibiotikum mit dem auch viele andere der in die Studie eingeschlossenen Tiere vorbehandelt waren. Auch die Behandlung der Proben unterschied sich nicht von der Behandlung der anderen Proben. Alle wurden unmittelbar nach Entnahme aufbereitet und innerhalb von vier Stunden nach Entnahme gemessen (s. 2.1.3).

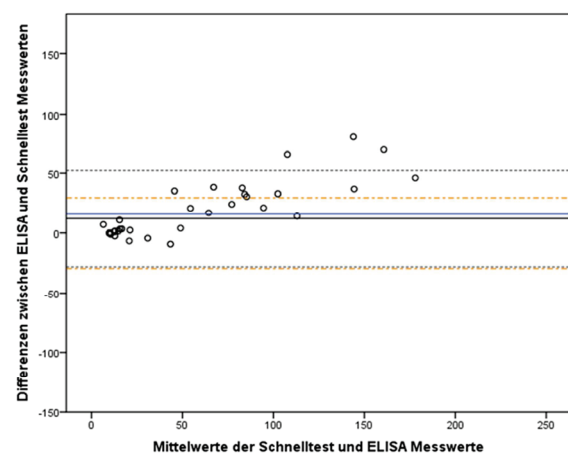
### 3.1.2.3 LifeAssays Schnelltestgerät

Mit diesem Gerät wurden nur 51 der 125 Hunde gemessen. Der Ergebnisvergleich von ELISA und dem Schnelltest von LifeAssays ergab einen Korrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,97 (Abb. 4a) und einen mittels Deming Regression korrigierten Wert von 0,98. Die Steigung betrug  $0,67 \pm 0,02$  und der Achsenschnittpunkt lag bei  $3,43 \pm 1,58$ . Beide Werte waren statistisch signifikant ( $t = 33,5$ ;  $t = 2,17$ ). Damit war das LifeAssays System das einzige, bei dem durch Berechnung der Deming Regression ein verbesserter Korrelationskoeffizient erzielt wurde.

**a** Spearman's r (LifeAssays)



**b** Bland-Altman Graph (LifeAssays)



**Abb. 4 Graphische Darstellung der Ergebnisse von LifeAssays.** Das in der Abb. 4a dargestellte einfache Streudiagramm der Korrelation zwischen dem Schnelltestgerät (EUROlyser) und der Referenzmethode ELISA zeigt den Korrelationskoeffizienten nach Spearman als Regressionsgerade. Die Abb. 4b zeigte im Bland-Altman Diagramm den direkten Methodenvergleich zwischen dem Schnelltestgerät von EUROlyser und dem ELISA mit dem Mittelwert der Differenzen als durchgezogene Linie dargestellt. Die Übereinstimmungsgrenzen sind als gestrichelte graue Begrenzungslinien, der Bias des Gerätes als blaue durchgezogene Linie und der erlaubte Fehler ( $TE_{Des}$ ) von 29,6 % mit zwei orangen gestrichelten Linien angegeben. Beide Diagramme sind in Vergrößerung im Anhang XII dargestellt.

Das Bland-Altman Diagramm für das LifeAssays Schnelltestgerät ist in Abb. 4b dargestellt. Für den Vergleich dieses Gerätes mit der Referenzmethode betrug der Mittelwert der Differenzen 12,02 und die Übereinstimmungsgrenzen lagen bei -28,2 und 52,2. Auch in diesem Messgerät lagen drei Werte über der oberen Grenze der Übereinstimmungsgrenzen sowie acht weitere Werte oberhalb des  $TE_{Des}$  von 29,6 %. Der Bias lag bei 14, 2 % und befand sich nur wenig entfernt vom Mittelwert der Differenzen. Es zeigt sich im Gesamten eine deutlich positive Korrelation der Werte, die darauf hindeutet, dass das Gerät niedrigere Werte als der ELISA misst und sich dieser Fehler mit steigender cCRP-Konzentration zu erhöhen scheint. Obwohl sich hier die Fehlertendenz am deutlichsten darstellt, konnte keine statistische Signifikanz berechnet werden.

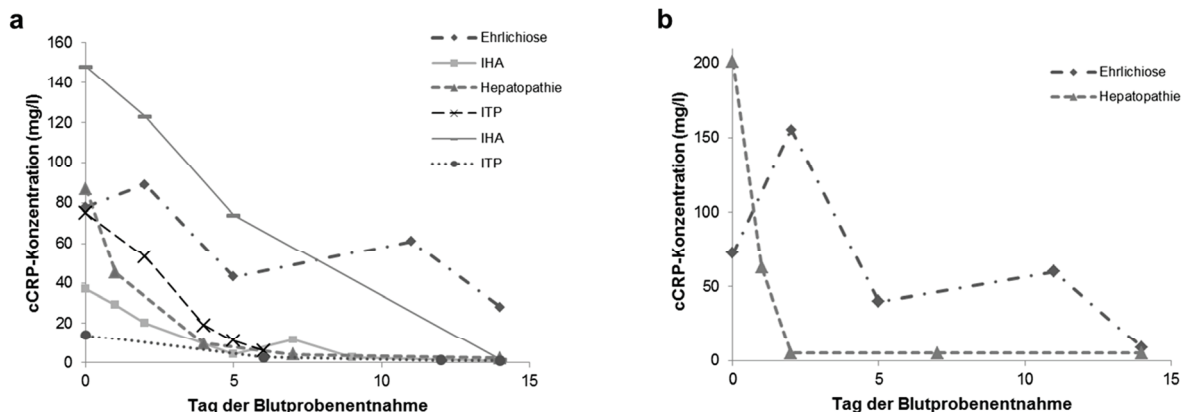
### 3.1.2.4 Beurteilung der Handhabung der Geräte

Zusätzlich zur Auswertung der Messwerte wurde auch die Handhabung aller drei Testgeräte beurteilt. Bei allen Testgeräten muss das Material, welches nach Herstellerangaben im Kühlschrank gelagert wurde, im Vorfeld der Messungen auf RT aufgewärmt werden. Die Zeit für diesen Aufwärmprozess beträgt 10-15 Min. bei den Pufferröhrchen des EUROLyser und LifeAssays Gerätes und 30 Min. bei den Kassetten von TECOmedical. Die notwendige Serummenge beträgt 5 µl für die Messung mit den Schnelltestgeräten von TECOmedical und LifeAssays sowie 20 µl für die Messung mit dem EUROLyser Gerät. Die benötigte Zeit zur Erfassung der cCRP-Konzentration unterscheidet sich ebenfalls zwischen 5 Min. (TECOmedical und EUROLyser) und 10 Min. (LifeAssays). Bei allen Geräten gibt es die Möglichkeit, die ermittelten Daten vom internen Datenspeicher der Geräte auf einen angeschlossenen Computer zu übertragen.

### 3.1.3 Verlaufsstudie

Die erste Tiergruppe (cCRP-Messung über 14-Tage) umfasste zwei Tiere mit immunhämolytischer Anämie (IHA), zwei Tiere mit immunbedingter Thrombozytopenie (ITP) sowie jeweils ein Tier mit Ehrlichiose und eines mit Hepatopathie (Anhang XIII). Die Messung des cCRP-Serumgehaltes im ELISA zeigte bei allen untersuchten Hunden einen deutlichen Konzentrationsabfall unter Therapie. Außer bei dem Tier mit Ehrlichiose betrug der cCRP-Serumspiegel nach 14 Tagen zwischen 1 mg/l und 2,2 mg/l. Dieses Tier zeigte darüber hinaus keinen kontinuierlichen Abfall der cCRP-Konzentration (Abb. 5a). Eines der Tiere mit IHA zeigte zwar zunächst einen Abfall der cCRP-Konzentration, diese stieg jedoch im weiteren Verlauf kurzzeitig wieder an. Die übrigen drei Tiere (ITP, ITP, Hepatopathie) hatten einen flacheren, jedoch beständigen Abfall der cCRP-Konzentration. Den stärksten Konzentrationsabfall von 148 mg/l zu Beginn und 1,5 mg/l nach 14 Tagen wurde bei dem zweiten Hund mit IHA gemessen.

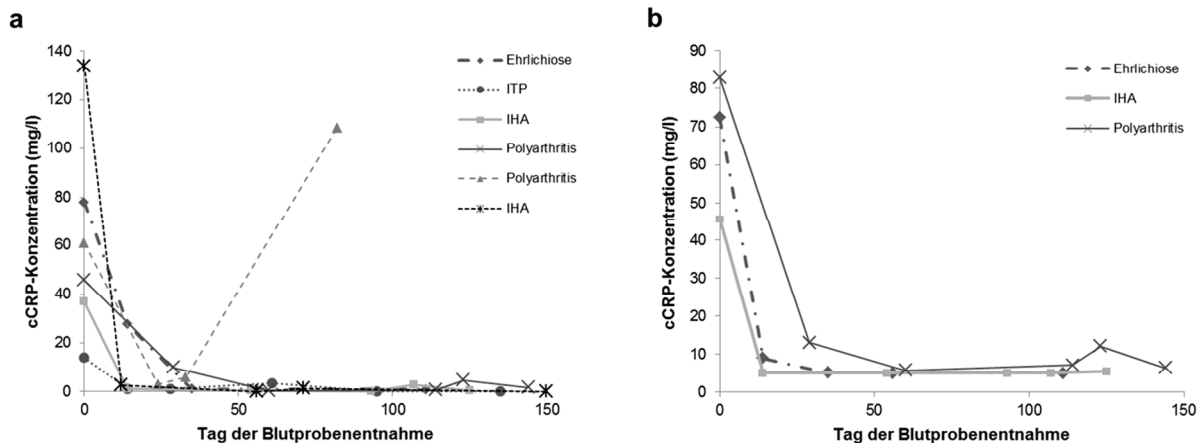
Von zwei Hunden (Ehrlichiose, Hepatopathie) wurden die cCRP-Konzentrationen auch im Schnelltestgerät (TECOmedical) bestimmt. Auch hier konnte bei beiden Einzeltieren ein Abfall der cCRP-Konzentration bei variierenden Verläufen beobachtet werden (Abb. 5b). Im Vergleich zum ELISA (27,7 mg/l) lag die cCRP-Konzentration des an Ehrlichiose erkrankten Hundes jedoch in derselben Probe bei <5 mg/l.



**Abb. 5 Verlaufskontrolle über 14 Tage.** Die Graphen zeigen den Verlauf der cCRP Konzentrationen in Serumproben, die über 14 Tage gemessen wurden. Die Abb. 5a gibt die Messergebnisse aus dem ELISA (TECOmedical) wieder und in der Abb. 5b sind vergleichend die Messergebnisse des Schnelltestgerätes (TECOmedical) von zwei der Hunde dargestellt.

Bei einer zweiten Tiergruppe, die ebenfalls sechs Hunde umfasste, wurde die cCRP-Konzentration regelmäßig, über einen Zeitraum von bis zu 150 Tagen gemessen. Für diese Messungen wurden Serumproben von drei Tieren aus der ersten Tiergruppe (IHA, Ehrlichiose, ITP) sowie von einem weiteren Tier mit IHA und zwei Tieren mit immunbedingter Polyarthrit verwendet. In dieser Tiergruppe wurden hauptsächlich niedrige cCRP-Konzentrationen gemessen (Abb. 6a). Der Verlauf zu Beginn der Messungen zeigte, wie auch bei der Tiergruppe 1, bei allen Hunden einen deutlichen Abfall des cCRP innerhalb der ersten 14 Tage. Im weiteren Verlauf lagen die Werte für die cCRP-Konzentration bei vier der sechs untersuchten Hunde unterhalb von 3 mg/l, bei einem der Hunde mit Polyarthrit stieg der cCRP-Gehalt nach 114 Tagen geringgradig auf 4,75 mg/l an. Der zweite Patient mit immunbedingter Polyarthrit zeigte im Verlauf der Messungen eine Verschlechterung seines Gesundheitszustandes mit einem Anstieg der cCRP-Konzentration auf 108,6 mg/l am Tag 82 nach Erstbeprobung. Aufgrund der dramatischen Verschlechterung des Allgemeinzustandes musste das Tier euthanasiert werden, weshalb keine weiteren Messungen durchgeführt werden konnten.

Von dieser zweiten Tiergruppe konnten die Proben dreier Hunde auch im Schnelltestgerät (TECOmedical) gemessen werden. Der Verlauf ist ähnlich zu dem der im ELISA gemessenen Werte, jedoch liegen einige Werte höher. Dies ist darin begründet, dass das Schnelltestgerät nicht in der Lage ist, niedrige Werte < 5 mg/l zu messen. Daher wurden die Konzentrationswerte für die Auswertung in den Wert 4,99 mg/l transformiert (Abb. 6b).



**Abb. 6 Verlaufskontrolle über 125 Tage.** Beide Graphen der Abb. 6 geben die Messung der cCRP-Gehalte über einen Zeitraum von 125 Tagen wieder. Der ELISA (TECOmedical) zeigt der Verlauf des cCRP-Gehaltes bei sechs verschiedenen Tieren (a). Im Schnelltestgerät (TECOmedical) wurde die cCRP-Konzentration in den Proben von drei der Hunde gemessen (b).

## 3.2 Isolierung, Nachweis und Charakterisierung des cCRP

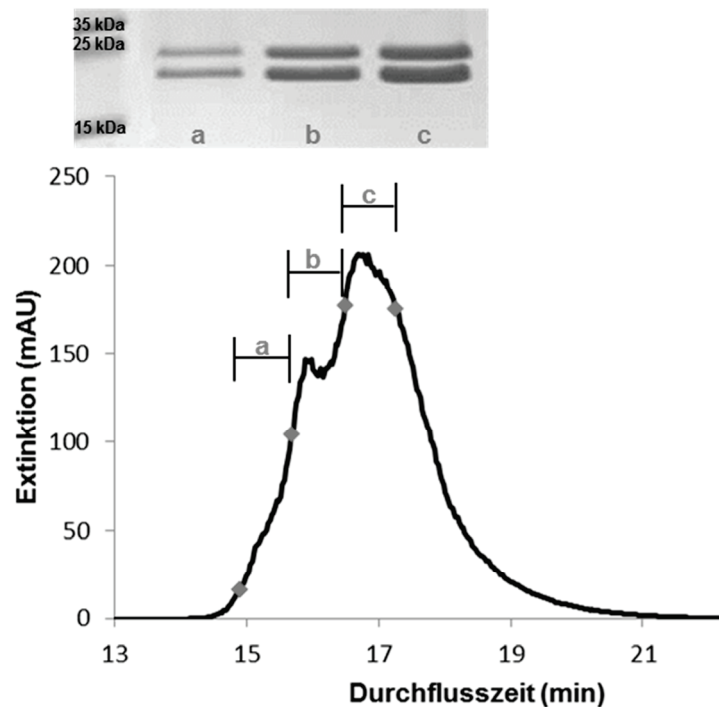
### 3.2.1 cCRP-Isolierung aus Hundeserum

Für die Isolierung des nativen Proteins wurde eine Kombination aus verschiedenen Reinigungsschritten (Affinitätschromatographie und Gelfiltration) verwendet.

#### 3.2.1.1 Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von nativem cCRP aus Hundeserum wurden *post mortem* insgesamt etwa 1,5 l Blut von 7 Hunden mit unterschiedlichen entzündlichen und nicht entzündlichen Erkrankungen entnommen, aus denen im Weiteren ca. 700 ml Serum durch Zentrifugation erhalten wurden. Es wurden für die Affinitätschromatographie nur Seren, die nicht oder nur geringgradig hämolytisch waren, verwendet. Die cCRP-Konzentration der Seren (mittels Schnelltestgerät; TECOMedical bestimmt) variierten von 25 mg/l bis >200 mg/l. Für die Isolierung wurde zunächst 20 ml und bei späteren Reinigungen jeweils 70-75 ml gemischtes Serum verwendet. Daraus wurden, abhängig von der cCRP-Konzentration im Serum der entsprechenden Hunde, 160 µg bis 5,9 mg cCRP pro Reinigung gewonnen (Anhang XIV). Eine typische Kurve der PCh-Affinitätschromatographie ist in Abb. 7 dargestellt. Die zu den verschiedenen Zeitpunkten der Elution entnommenen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung auf die Reinheit untersucht (Abb. 7). Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Bandenintensität (Fraktionen a-c) und der unterschiedliche Proteingehalt spiegelt sich auch in den gemessenen, absoluten Proteinmengen wieder:

- Fraktion a = 0,33 mg/ml
- Fraktion b = 0,39 mg/ml
- Fraktion c = 0,45 mg/ml



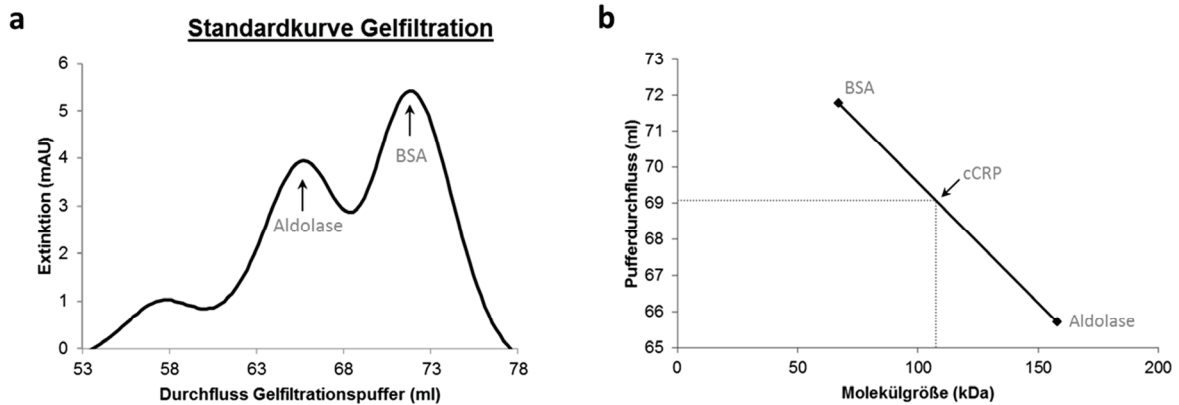
**Abb. 7 Verlauf einer PCh-Affinitätschromatographie und EDTA-eluierte cCRP-Fraktionen.** Für die Reinigung des cCRP wurden 70 ml gemischtes Serum eingesetzt und daraus ca. 1 mg Protein gewonnen. Der Durchfluss der Proteine wurde mittels UV-Licht (280 nm) erfasst und die Proteinfractionen (a-c) zwischen 15 und 17,3 Min. gesammelt. Das in der Affinitätschromatographie gewonnene Material wurde elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Insgesamt konnten durch die Affinitätschromatographie in 11 verschiedenen Reinigungsdurchläufen etwa 16 mg natives cCRP gewonnen werden. Im Anschluss an die Reinigung lag das cCRP-Protein > 5-fach konzentrierter vor (> 65%) als vor der Reinigung (13%). Die einzelnen Reinigungsdurchläufe sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

### 3.2.1.2 Gelfiltration

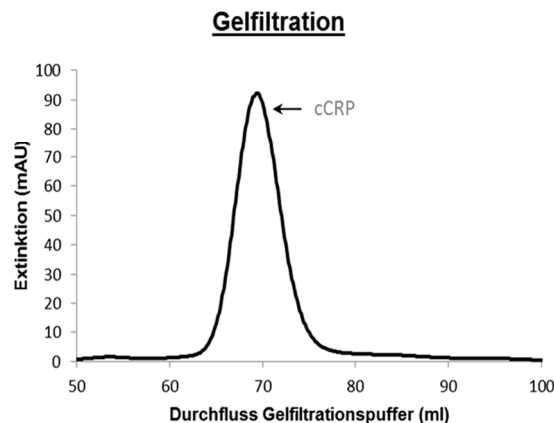
Die Gelfiltration wurde im Anschluss an die Affinitätschromatographie zunächst mit einem Teil der Proben durchgeführt. Mittels der Größenstandards Aldolase (Extinktionsmaximum nach 65,7 ml Pufferdurchfluss) und BSA (71,8 ml Pufferdurchfluss) konnte die verwendete Säule kalibriert werden (Abb. 8a).

Die spezifische Standardkurve der Gelfiltrationssäule wurde für die Berechnung des zu erwartenden Durchflussvolumens bei der cCRP-Reinigung als Graph des Volumens (y-Achse) gegen das Molekulargewicht (x-Achse) aufgetragen (Abb. 8b).



**Abb. 8 Erstellung einer Standardkurve für die Gelfiltration.** Die Kurve (a) gibt die Extinktionsmaxima der beiden Standards Aldolase und BSA während der Gelfiltration wieder. Aus diesen beiden Punkten wurde das zu erwartende Durchflussvolumen an Puffer für cCRP berechnet (b).

Das zu erwartende Durchflussvolumen betrug demnach ca. 70 ml bei einem angenommenen nativ-cCRP-Molekulargewicht (Pentamer) von 110 kDa. Für die Gelfiltration wurden insgesamt 15 ml der zuvor mittels Affinitätschromatographie gereinigten Proteinfractionen verwendet und das erwartete Elutionsvolumen für cCRP von 70 ml konnte bestätigt werden (Extinktionsmaximum nach 69,85 ml) (Abb. 9).



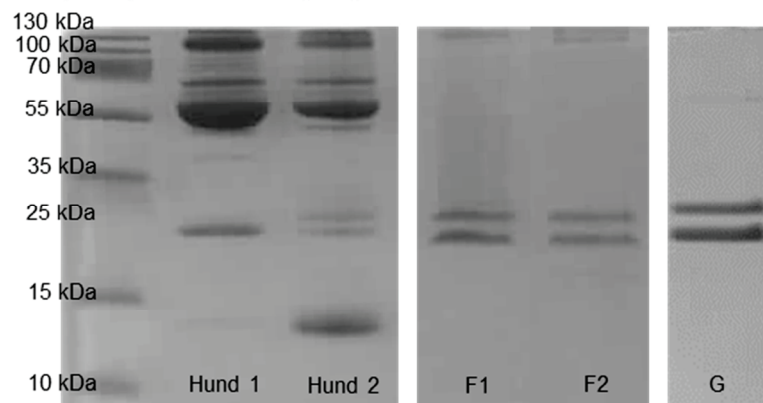
**Abb. 9 Verlauf der Gelfiltration.** In der Abbildung ist die Gelfiltration des Serums, mit dem Extinktionsmaximum nach 69,85 ml Pufferdurchfluss, dargestellt.

Da für die Gelfiltration nicht-denaturiertes Protein verwendet wurde, ist die Elution des cCRP-Proteins bei 69,85 ml gleichzeitig ein Nachweis für das Molekulargewicht des nativen cCRPs von 110 kDa. Die cCRP-Konzentration war nach der Gelfiltration im Vergleich zum Serum 5,8-fach höher und im Vergleich zu der Affinitätschromatographie 0,8-fach höher.



Die nach Durchführung dieses Verfahrens vorhandenen Verunreinigungen wurden aus der Abb. 9 berechnet. Danach betrug die Reinheit des cCRP aus der Gelfiltration ca. 85%.

Zur vergleichenden Darstellung der Reinigungseffektivität wurden mit verschiedenen gereinigten Fraktionen Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE-Gele angefertigt. Bei dem Vergleich von Serumproben einzelner Hunde mit gereinigten cCRP-Fractionen (Affinitätschromatographie und Gelfiltration) sind deutlich weniger Proteinbanden in den gereinigten Fraktionen erkennbar (Abb. 10). Die nativen Serumproben weisen besonders im höher molekularen Bereich eine Vielzahl unterschiedlich stark ausgeprägter Proteinbanden auf. Die mittels Affinitätschromatographie gereinigten cCRP-Fractionen (F1, F2) zeigten eine deutliche Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und 24 kDa (cCRP-Monomere). Dabei gab es keinen deutlichen Unterschied in der Bandenintensität. In beiden Fraktionen finden sich darüber hinaus schwächere Proteinbanden bei ca. 150 kDa, wobei es sich vermutlich um Verunreinigungen handelt. In den untersuchten Fraktionen aus der Gelfiltrations-Größentrennung (G) war ebenfalls eine Doppelbande mit den o.g. Molekulargewichten deutlich sichtbar. Bei dieser Reinigungsmethode fanden sich im Polyacrylamidgel nur geringe Verunreinigungen auf der Höhe von etwa 60 kDa.



**Abb. 10 Vergleich von Einzelserum und gereinigtem cCRP.** In einer SDS-PAGE wurden mittels Affinitätschromatographie (F1, F2) sowie Gelfiltration (G) gereinigte cCRP-Fractionen vergleichend mit unbehandelten Seren von zwei Einzeltieren (Hund 1, Hund 2) untersucht.

Die Proben aus beiden Reinigungsverfahren (Affinitätschromatographie und Gelfiltration) wurden mittels Densitometrie von SDS-PAGE-Gele nochmals auf Reinigungseffektivität analysiert. Dabei zeigten sich noch geringe, verbliebene Verunreinigungen mit anderen Proteinen. Da sich der Reinheitsgrad von Affinitätschromatographie (5-fache Konzentration) und Gelfiltration (5,8-fache Konzentration) nicht deutlich unterschied, wurde im Weiteren auf den letzteren Reinigungsvorgang verzichtet und weitere Analysen des cCRP-Proteins lediglich mit Affinitätschromatographie-gereinigten Proteinfractionen durchgeführt.

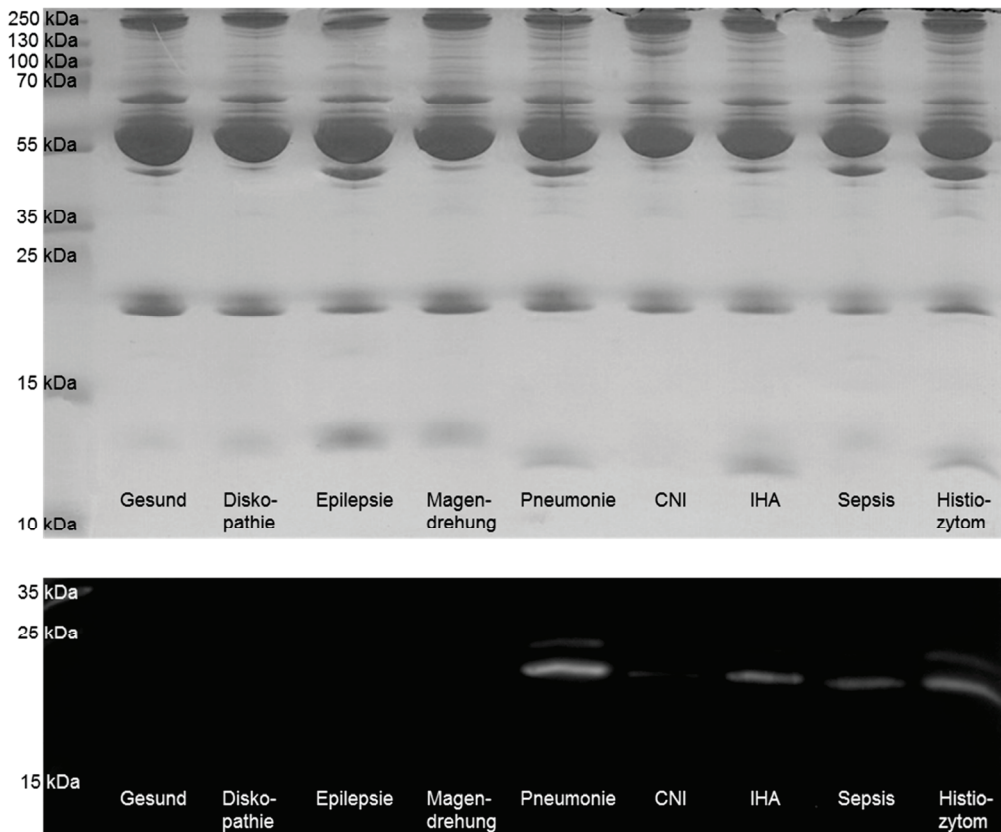
### 3.2.2 cCRP-Proteinnachweis

Eine SDS-PAGE wurde sowohl mit einzelnen Hundeseren als auch mit Affinitätschromatographie-gereinigten Proben durchgeführt. Die Proteine wurden im Anschluss entweder mit einer einfachen Proteinfärbung (Coomassie-Blau) oder mittels Immundetektion (Western Blot) nachgewiesen. Darüber hinaus wurden vorhandene Proteinmodifikationen, in Form von Glykosylierungen, analysiert.

Das durch Affinitätschromatographie gereinigte cCRP stellte sich in allen untersuchten Fraktionen nach elektrophoretischer Auftrennung und spezifischem immunologischem Nachweis als Proteindoppelbande mit einem Molekulargewicht von 22 kDa resp. 24 kDa dar, wie unter 3.2.1 dargestellt. Im Vergleich dazu wurden Seren verschiedener Einzeltiere untersucht. Die Analyse umfasste Tiere mit unterschiedlichem Gesundheitsstatus: In der Abb. 11 sind beispielhaft ein gesunder Hund, Hunde mit nicht-entzündlichen Erkrankungen (Diskopathie, Epilepsie, chronische Niereninsuffizienz (CNI)), verschiedene systemische Entzündungsreaktionen (Magendrehung, Pneumonie, Immunhämolytische Anämie (IHA), Septikämie) und ein Hund mit einem Histiozytom vergleichend dargestellt. Von allen untersuchten Hundeseren wurde die gleiche Gesamtproteinmenge eingesetzt.

Die Anfärbung des Proteingels mit Coomassie-Blau zeigte einheitliche Proteinmengen pro Spur, wobei es leichte Variationen im Bandenmuster der verschiedenen Einzeltiere gab (Abb. 11). Die deutlichste Proteinbande fand sich bei einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa. Hierbei handelte es sich vermutlich um das physiologisch in großen Mengen vorhandene Serumalbumin.

Bei der Analyse von Proben mittels Western Blot wurde eine Proteindoppelbande mit den Molekulargewichten von 22 kDa und 24 kDa, vergleichbar mit der Untersuchung von gereinigtem cCRP, durch den anti-cCRP-Antikörper detektiert. Dabei zeigte sich, dass in einigen Seren eine Proteindoppelbande (mit den o.g. Molekulargewichten), in anderen dagegen nur eine Einzelbande (mit einem Molekulargewicht von 22 kDa) nachgewiesen werden konnte. Es wurden Unterschiede sowohl zwischen den verschiedenen Hunden hinsichtlich der cCRP-Konzentration als auch innerhalb der Banden der untersuchten Einzeltiere deutlich (Abb. 11). Es konnte kein cCRP-Protein bei dem gesunden Tier sowie den Hunden mit Diskopathie und Epilepsie detektiert werden. Bei Hunden mit entzündlichen Erkrankungen (Magendrehung, Pneumonie, Immunhämolytische Anämie (IHA), Septikämie) hingegen zeigten sich unterschiedliche Bandenintensitäten. Die deutlichste Doppelbande zeigte sich in der Probe des Tieres mit Pneumonie, der Nachweis von cCRP im Serum des Hundes mit Magendrehung war nur undeutlich erkennbar und zeigte lediglich die untere 22 kDa große Proteinbande. Auch in den Serumproben der Tiere mit CNI und Histiozytom wurden Proteinbanden detektiert, bei dem Hund mit CNI eine Einzelbande (22 kDa) und bei demjenigen mit Histiozytom eine Doppelbande. Bei allen Tieren, bei denen Doppelbanden nachgewiesen wurden, war die leichtere, 22 kDa Untereinheit stärker ausgeprägt als die 24 kDa Proteinbande.



**Abb. 11 Untersuchung von Einzelseren verschiedener Hunde nach SDS-PAGE und Western Blot.** Die Untersuchung von Einzelseren ist hier beispielhaft an neun Hunden mit unterschiedlichem Gesundheitsstatus (Gesund, Diskopathie, Epilepsie, Magendrehung, Pneumonie, chronische Niereninsuffizienz (CNI), immunhämolytische Anämie (IHA), Septikämie (Sepsis), Histiozytom) dargestellt. Im oberen Bereich der Abbildung ist das Ergebnis der Färbung eines Proteingels mit Coomassie-Blau und im unteren Teil die cCRP-Detektion durch den anti-cCRP-AK im Western Blot dargestellt.

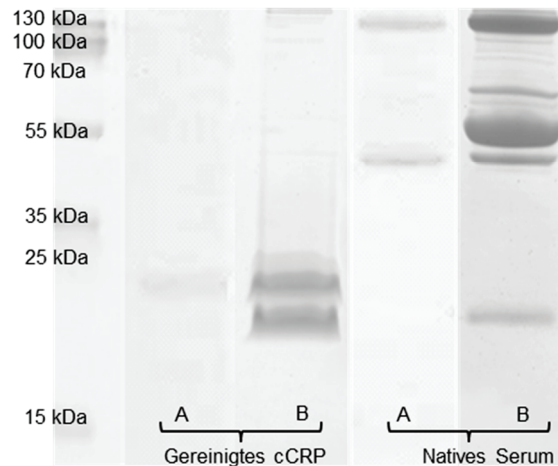
Die Unterschiede zwischen den Proteinbanden bei Untersuchung mittels Western Blot ließen sich in den untersuchten Proben nicht mit einer bestimmten Erkrankungsart oder –schwere korrelieren.

### 3.2.3 Charakterisierung der Proteinglykosylierung

Die Glykosylierungsnachweise erfolgten entweder im Anschluss an eine SDS-PAGE direkt im Gel (unspezifischer Nachweis) oder nach dem Blotten auf Nitrocellulosemembranen (spezifischer Nachweis durch Lektine).

#### 3.2.3.1 Unspezifischer Glykosylierungsnachweis

Mit der unspezifischen Glykosylierungsfärbung konnte in einer gereinigten cCRP-Fraktion eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachgewiesen werden, diese stellte sich jedoch nur undeutlich dar (Abb. 12A). In keinem untersuchten Serum eines der Einzeltiere war der Nachweis einer glykosylierten Proteinbande mit diesem Molekulargewicht (24 kDa) möglich. In einer anschließenden Färbung desselben Proteingels mit Coomassie-Blau war bei der gereinigten cCRP-Probe eine Proteindoppelbande und bei dem untersuchten Einzelserum das typische Bandenmuster von Hundeserum zu erkennen (Abb. 12B).



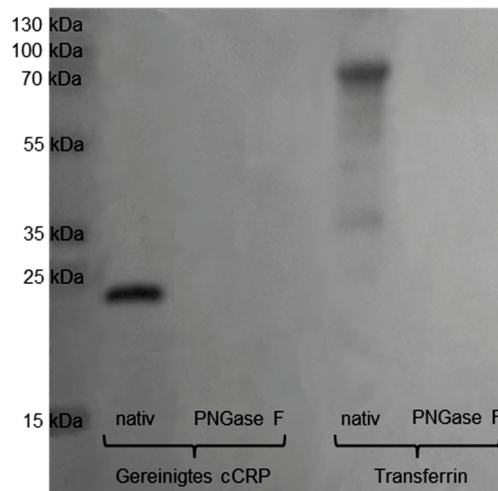
**Abb. 12 Vergleich von Proteinbanden nach Glykosylierungs- und Coomassie-Blau-Färbung.** Zum Nachweis einer Glykosylierung wurden vergleichend eine Probe des aufgereinigten cCRPs und die Serumprobe eines Tieres mit Sepsis nach SDS-PAGE untersucht. Das Proteingel wurde zunächst mit einer unspezifischen Glykosylierungsfärbung (A) behandelt. Im Anschluss wurde dasselbe Proteingel mit Coomassie-Blau (B) nachgefärbt, um alle Proteinbanden sichtbar zu machen.

Bei der Untersuchung von Einzeleren wurden bei allen Seren glykosylierte Proteinbanden bei der Höhe von etwa 50 kDa und 130 kDa angefärbt. Hierbei handelte es sich vermutlich um die Serum-Immunglobuline.

### 3.2.3.2 Spezifischer Nachweis der Glykosylierungsstrukturen

Aufgrund der unspezifischen Nachweisbarkeit von Zuckerstrukturen in der 24 kDa-Bande des gereinigten Serum-cCRP erfolgte der Nachweis der spezifischen Glykosylierungsmuster mittels verschiedener Lektine (GNA, SNA, MAA, PNA, DAS). Hierbei konnte ein positives Signal nur bei der Reaktion mit dem Lektin SNA nachgewiesen werden (Abb. 13). Dieses Lektin detektiert terminale Sialinsäure, die über eine 2-6-glykosidische Bindung sowohl mit Galactose als auch mit GlcNAc verknüpft sein kann. Es kann mit dieser Färbung jedoch nicht unterschieden werden, ob eine O- oder N-glykosidische Verknüpfung des Zuckerrestes mit dem Protein vorliegt.

Zur spezifischen Unterscheidung der glykosidischen Verknüpfung wurde das Protein mit der Endoglykosidase PNGase F behandelt. Dieses Enzym entfernt Zuckerreste, die N-glykosidisch mit dem Protein verknüpft sind. Nachdem die gereinigte cCRP-Proteinfraction mit der PNGase F behandelt worden war, zeigte sich keine Färbung nach der Inkubation mit dem Lektin SNA mehr. Auch die Behandlung der Positivkontrolle für SNA (Transferrin) mit PNGase F ergab das gleiche Ergebnis (Abb. 13), was die Funktionalität des Verfahrens bestätigte.



**Abb. 13 Vergleich von PNGase F behandeltem und unbehandeltem Protein.** Zur Überprüfung der glykosidischen Verknüpfung wurde eine Probe des gereinigten cCRPs sowie Transferrin als Positivkontrolle mit der Endoglykosidase PNGase F behandelt. Anschließend wurden beide unbehandelten (nativ) und behandelten (PNGase F) Proteine mit dem Lektin SNA untersucht.

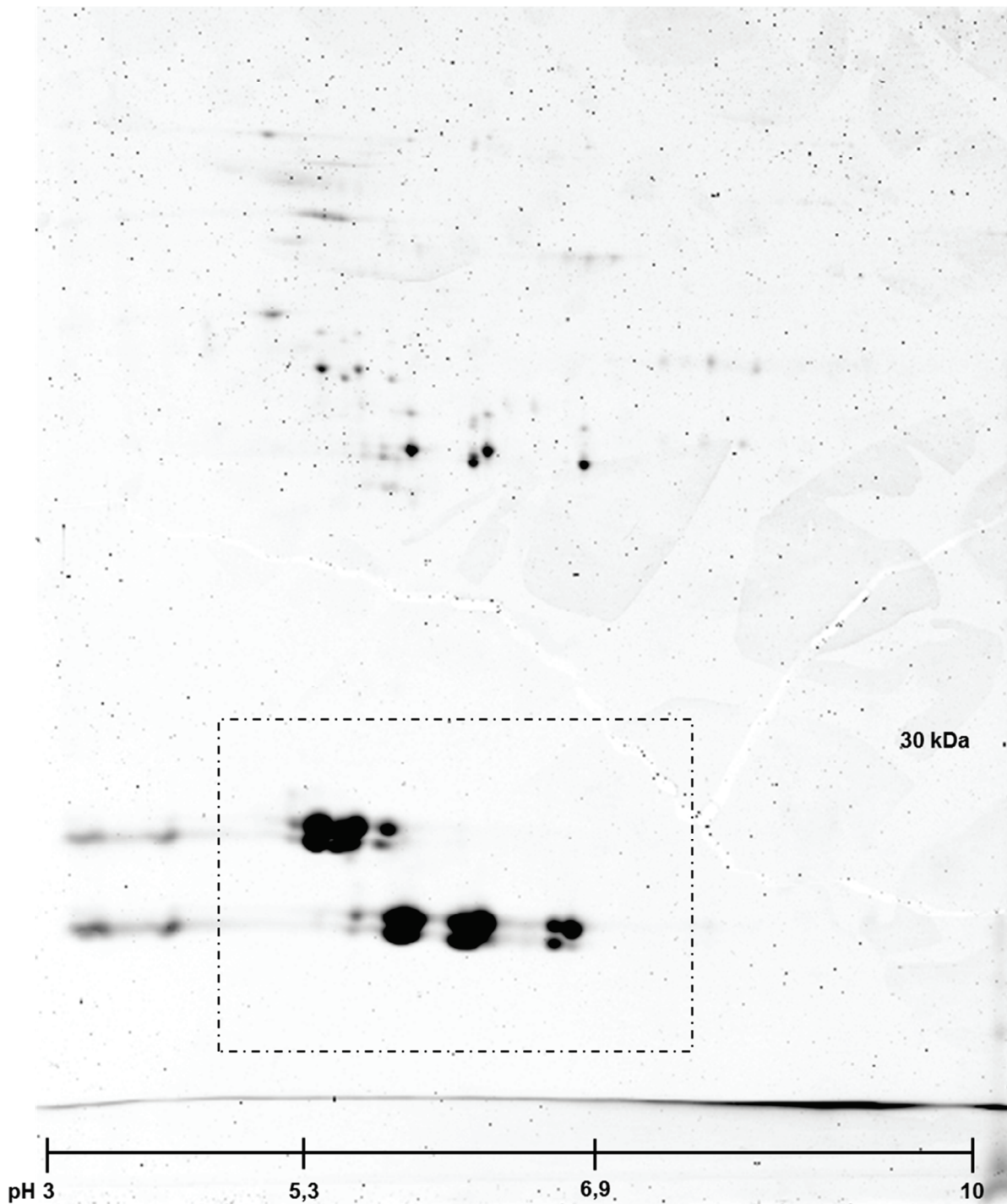
Da es sich bei dem Kontrollprotein Transferrin um ein N-glykosidisch verknüpftes Protein handelt, zeigt der Unterschied zwischen dem nativen und PNGase F behandelten Transferrin, dass die Entfernung des Zuckerrestes durch das Enzym erfolgt ist. Dieses Ergebnis bestätigt die N-glykosidisch an das cCRP-Protein verknüpften Zuckerreste.

### 3.2.4 Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese wurde zur differenzierten Betrachtung (Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt (pI)) der Untereinheiten durchgeführt. In Abb. 14 ist die 2D-Auftrennung von gereinigtem cCRP nach Proteinfärbung (Fluoreszenz) dargestellt. Insgesamt stellten sich sechs Spots mit einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 5,3 und 6,9 dar, jeweils drei bei einem Molekulargewicht von 22 kDa sowie 24 kDa. Dabei liegen alle Spots mit dem höheren Molekulargewicht in einem nach sauer verschobenem Bereich verglichen mit den Spots auf Höhe von 22 kDa (Abb. 14).

Bei dem Molekulargewicht von 22 kDa liegen die beiden größeren Spots eng beieinander oberhalb von einem pH-Wert 5,3 und der dritte, kleinere Spot weiter im basischen Bereich. Die Spots mit Molekulargewicht von 24 kDa erscheinen mit deutlich größerem pH-Abstand zueinander als die höhermolekularen. Die beiden großen Spots lagen etwa im mittleren pH-Bereich (ca. pH 6) und der dritte kleinere Spot wiederum mit etwas Abstand im basischeren Bereich kurz vor pH 6,9. Alle Punkte, mit Ausnahme des am basischsten gelegenen, kleinen Spots mit 22 kDa Molekulargewicht, erscheinen gedoppelt.

Außerdem zeigten sich auf der Höhe dieser Molekulargewichte (22 kDa, 24 kDa) jedoch im saureren Bereich (pH 5) nicht klar abgrenzbare Proteinspuren. Diese sind, wie auch weitere Spots bei deutlich höheren Molekulargewichten und verschiedenen pH-Werten, vermutlich noch Verunreinigungen mit anderen Proteinen, die jedoch in viel geringerer Konzentration vorliegen.

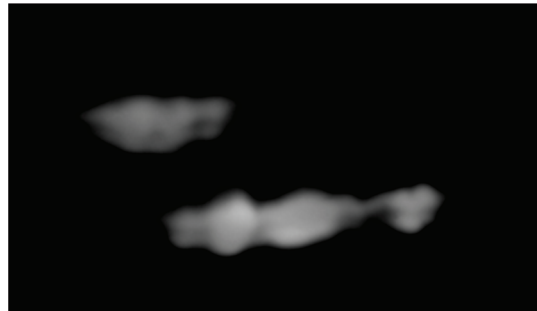


**Abb. 14 2D-Gel einer Probe des gereinigten Serum-cCRP nach Proteinfärbung.** Eine gereinigte Serum-cCRP-Fraktion wurde in der 2D-Gelelektrophorese getrennt und anschließend die Proteine durch Flamingo Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Der gestrichelte Bereich gibt den Ausschnitt des Gels an, der in den weiteren 2D-Gelen untersucht wurde.

Nach dem Nachweis des cCRP-Proteins durch Proteinfärbung mit Flamingo Fluoreszenz Farbstoff wurde das Protein im Western Blot (Abb. 15) sowie mittels unspezifischen Glykosylierungsfärbung (Abb. 16a) und Lektinbindung (Abb. 16b) untersucht. Im Folgenden sind nur noch die Ausschnitte der Gele, auf denen das cCRP lokalisiert ist (s. gestrichelter Bereich Abb. 14), gezeigt.

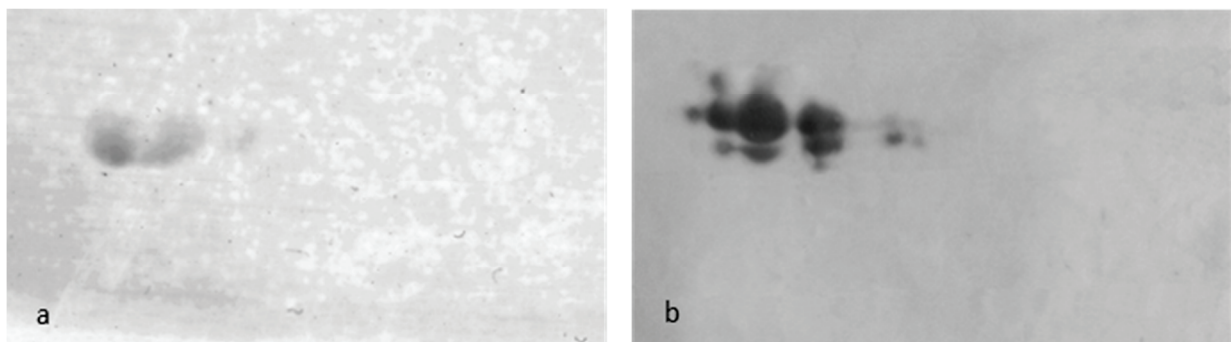
Zur Bestätigung, dass es sich bei den angefärbten Proteinspots (Flamingo Rot Fluoreszenz) um Serum-cCRP handelt wurde nach Abschluss der 2D-Gelelektrophorese ein Western Blot

angefertigt. Die Immundetektion erfolgte mit dem anti-cCRP-AK. Bei der Entwicklung zeigten sich keine vollständigen Abgrenzungen der einzelnen Spots im Gegensatz zur Fluoreszenz-Proteinfärbung. Es wurden jeweils sechs Proteinspots mit unterschiedlichem Molekulargewicht von 22 kDa und 24 kDa gefunden, wobei diejenigen mit höherem Molekulargewicht im saureren pH Bereich vorlagen. Die Proteinspots teilten sich wiederum jeweils in zwei größere und einen kleineren Spot auf. Das Muster der Immundetektion stimmte mit dem der Fluoreszenzfärbung weitgehend überein (Abb. 15) und auch hier stellten sich der Großteil der Proteinspots in einer Dopplung dar.



**Abb. 15 Western Blot einer gereinigten cCRP-Fraktion nach 2D-Gelelektrophorese.** Im Anschluss an die 2D-Gelelektrophorese erfolgte ein Western Blot mit Immundetektion durch den spezifischen anti-cCRP-AK.

Im Weiteren wurde untersucht, ob die in der unspezifischen Glykoproteinfärbung gefundene obere Bande (vgl. Abb. 12) sich auch in allen drei Spots mit dem höheren Molekulargewicht bestätigen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei 24 kDa-Spots mit der unspezifischen Glyko-Färbung reagierten, obwohl sich der kleinste Spot schlechter darstellte. Die Proteinspots lagen bei einer Höhe von 24 kDa und einem pH < 6 und teilten sich wie bereits in den vorigen Untersuchungen in zwei größere und einen kleineren Spot auf (Abb. 16a). Die 22 kDa großen Proteinspots wurden dagegen nicht angefärbt.



**Abb. 16 Glykosylierungsnachweis nach 2D-Gelelektrophorese von gereinigtem Serum-cCRP.** Der Nachweis der Glykosylierung von gereinigtem cCRP-Protein in der 2D-Gelelektrophorese wurde durch unspezifische Anfärbung (a) und spezifischer Detektion durch Lektinbindung mit SNA (b) durchgeführt.

Die Untersuchung der glykosylierten Untereinheiten des cCRP nach der Auftrennung von Serumfraktionen in der 2D-Gelelektrophorese wurde nach Übertrag auf eine Nitrocellulosemembran auch mit dem Lektin SNA durchgeführt (Abb. 16b). Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der unspezifischen Glykoproteinfärbung, jedoch konnten die einzelnen Spots bei einem Molekulargewicht von 24 kDa hier deutlicher dargestellt werden. Die sichtbaren Bereiche zeigten zwei eng beieinander liegende größere und einen kleinen Proteinspot. Darüber hinaus war ein vierter Punkt im basischen Bereich sichtbar (Abb. 16b). Wie auch in der Proteinfärbung und im Western Blot erschienen die gefundenen Proteinspots in der Anfärbung durch das SNA-Lektin gedoppelt.

### 3.2.5 Partielle Sequenzierung des nativen Proteins

Die Proteinsequenzierung aus SDS-PAGE gereinigtem cCRP mittels massenspektrometrischer Analyse ergab eine Übereinstimmung der cCRP-Sequenz mit der bisher bekannten abgeleiteten Sequenz (NCBI, Acc. Nr. XP\_545746). Bei der Analyse mittels MALDI-TOF-MS fanden sich sowohl in der 22 kDa als auch der 24 kDa großen Bande drei gleiche Sequenzstücke:

- ESENSYVILFPQLQKPMK (zwischen AS 32 und 51 der Originalsequenz von NCBI)
- ERPGLFSVSVGGSDAFINFPQK (zwischen AS 84 und 107 der Originalsequenz von NCBI)
- ALSPNVLNWR (zwischen AS 195 und 205 der Originalsequenz von NCBI).

Zusätzlich fanden sich bei dieser Untersuchungsmethode bei den beiden Banden jeweils noch unterschiedliche Teilsequenzen. In der oberen Bande (24 kDa) wurde vor der AS-Sequenz ERPGLFSVSVGGSDAFINFPQK ein Fragment aus 10 AS (SQSNEILLFK) erkannt. Bei der Untersuchung der unteren Bande (22 kDa) wurde zusätzlich zwischen den AS 140 und 165 die Sequenz RGYTVGSGASIVLGQEQDSFGGGFDK gefunden.

In der Analyse mittels OrbiTrap konnten weitere AS-Teilsequenzen bestätigt werden:

- die sieben AS lange Teilsequenz KAFVFP zu Beginn der cCRP-Proteinsequenz (zwischen AS 25 und 33 der Originalsequenz von NCBI)
- NQSLVGDIEDVNMWDFVLSPSQILTLYTTR (zwischen AS 164 und 196 der Originalsequenz von NCBI)
- am Ende der cCRP-Proteinsequenz YETRGEVFLKK (zwischen AS 207 und 219 der Originalsequenz von NCBI)

Nach der N-terminaler Sequenzierung (Proteome factory, Berlin) von gereinigtem Serum-cCRP wurde sowohl in der Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 22 kDa als auch in der 24 kDa schweren Proteinbande die AS-Sequenz QIDLDE ermittelt. Diese Sequenz findet sich in der bisher angenommenen Sequenz von NCBI erst nach einer 19 AS-langen Anfangssequenz.

Insgesamt konnten 140 von bisher vorhergesagten 223 AS bestätigt werden (62,8% AS-Sequenzbestätigung). Die 19 AS zu Beginn der *in silico* cCRP-Sequenz sind beim nativen Serum-cCRP nicht vorhanden. Die durch die verschiedenen Proteomanalysen nachgewiesene, 204 AS lange Sequenz, ist vollständig in Abb. 17 dargestellt.

**QIDLDEKAFVFPRESENSYVILFPQLQKPMKAFTVCLQVYTDLTRPHSLFSYATKSQSNEILL  
FKERPGLFSVSVGGSDAFINFPQKFYAPQHFVCTWESVTGLTELWVDGKPMVRASLRG  
TVGSGASIVLGQEQDSFGGGFDKNQSLVGDIEDVNMWDFVLSPSQILTLYTTRALSPNVLN  
WRNLRYETRGEVFLKKELWS**

**Abb. 17 Darstellung der nachgewiesenen cCRP-AS-Sequenzen der beiden 22 kDa bzw. 24 kDa Banden.** Die in Gelb dargestellte Startsequenz wurde mittels N-terminaler Sequenzierung gefunden. In Rot markierte Sequenzbereiche stellen durch MALDI-TOF bestätigte Sequenzen dar. AS-Sequenzen, die mittels OrbiTrap detektiert wurden, sind blau markiert. Alle Sequenzen, die in massenspektrometrischen Untersuchungen nicht gefunden werden konnten, sind in schwarz dargestellt.



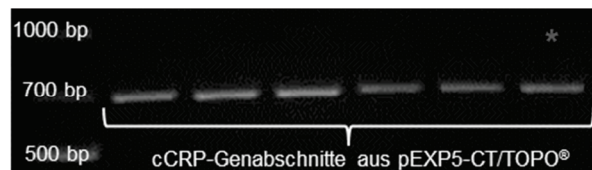
### 3.2.6 Vollständige cDNA-Sequenzierung

Um die komplette cCRP-Gensequenz zu bestätigen, wurde eine Analyse des cCRP Transkripts an die Untersuchung der Proteinsequenz angeschlossen.

Bei der Isolation der mRNA aus Lebergewebe einer Boxerhündin konnten ca. 40 µg GesamtmRNA gewonnen werden. Nach der Umschreibung der cCRP-mRNA in cDNA, eine angeschlossene Amplifikation und Aufreinigung des cCRP-PCR-Produktes, wurde in der kommerziellen cDNA-Sequenzierung die cCRP-Sequenz bestätigt und als eigene Sequenz in die Datenbank eingespeist (NCBI Acc. Nr. HG003655). Diese stimmte in 668 bp von 669 bp mit der bisher angenommenen *in silico* Sequenz (NCBI Acc. Nr. XM\_545746) überein. Die Base an der 465. Stelle der cDNA-Sequenz enthielt eine Mischsequenz. Diese Position zeigte sowohl die Base Guanin als auch die Base Thymin an, wobei in der *in silico* Sequenz die Base Guanin angegeben ist. Der Austausch von Guanin zu Thymin führt zu einer Veränderung des Codons an der dritten Stelle, von dem ursprünglichen Triplet GAG zu dem veränderten Triplet GAT. Dies würde wiederum zu einer Veränderung der codierten Aminosäure von Glutaminsäure (GAG) zu Asparaginsäure (GAT) führen. Die vollständige cDNA-Sequenz ist im Anhang VIII dargestellt.

### 3.3 Rekombinantes cCRP

Die kommerziell erstellte cCRP-Gensequenz wurde in das Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO® kloniert und deren Position und Sequenz mittels cCRP-spezifischer PCR überprüft. Im Agarosegel, das zum Nachweis der Plasmide an die PCR angeschlossen wurde, fanden sich Banden auf Höhe von etwa 700 bp.



**Abb. 18 cCRP-spezifische PCR nach Klonierung des cCRP-Gens in das Vektorplasmid pEXP5-CT/TOPO®.** Untersuchung cCRP-genhaltiger Vektorplasmide von verschiedenen Subklonen mittels PCR. In fünf von sechs Spuren finden sich DNA-Fragmente von ca. 800 bp Länge. Der mit „\*“ gekennzeichnete Subklon (Nr. 26) wurde für weitere Proteinexpressions-Experimente verwendet.

Nach Ausschnitt dieser Banden und Isolation des PCR-Produktes aus dem Agarosegelstück wurden die korrekte, 669 bp lange cCRP-Basensequenz mittels kommerzieller Sequenzierung bestätigt. Das korrekt klonierte Plasmid (pEXP5/TOPO\_cCRP) wurde für die Hitzetransformation in *E. coli* BL21(DE3)pLyS verwendet und die erfolgreiche Transformation konnte durch Plasmidisolierung aus diesen Bakterien bestätigt werden.

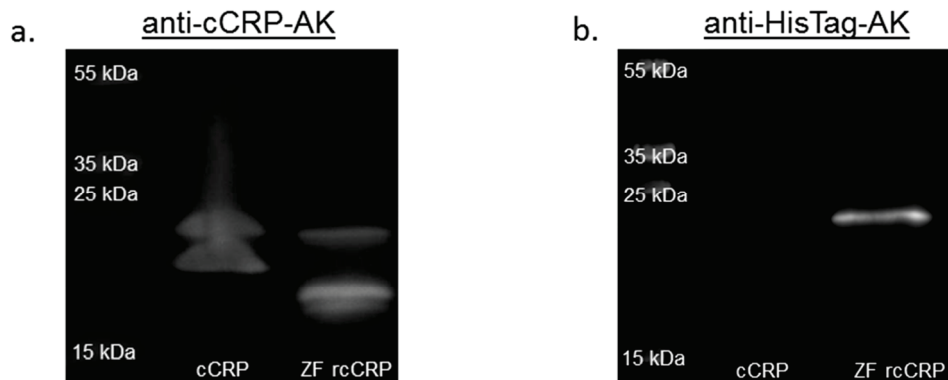
Auf Basis der bestätigten, korrekten Sequenz des Vektorplasmides (Anhang VII.) erfolgte die Proteinexpression in zwei verschiedenen Systemen: der zellfreien Expression (Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System) sowie der Expression in *E. coli*-Bakterien (*E. coli* BL21(DE3)pLyS).

### 3.3.1 Untersuchungen der Expression des rekombinanten cCRP

#### 3.3.1.1 Proteinexpression mittels Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System

Zunächst wurde die rcCRP-Proteinproduktion durch die zellfreie Expression in kleineren Mengen (100 µl-Ansätze) durchgeführt. Ein Western Blot des zellfrei produzierten rcCRP zeigte die Detektion von Proteinbanden bei 20 kDa und 24 kDa sowie zusätzlich eine schmale Proteinbande bei 19 kDa durch den anti-cCRP-AK. Als Positivkontrolle wurde

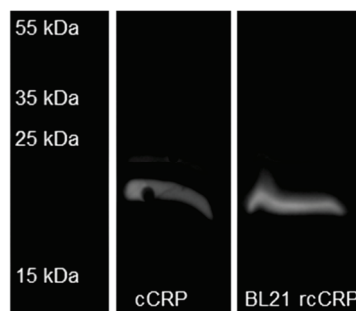
natives cCRP aufgetragen und stellte sich wie bereits in den vorigen Untersuchungen als Proteindoppelbanden mit etwa 22 kDa und 24 kDa Molekulargewicht dar (Abb. 19a). Im Vergleich des rekombinanten mit dem gereinigten Serum-cCRP mittels anti-HisTag-AK wurde aber nur eine, deutlich sichtbare Proteinbande mit 24 kDa Molekulargewicht in der Probe des rcCRPs detektiert. Bei der Untersuchung des gereinigten Serum-cCRPs mit dem anti-HisTag-AK wurde erwartungsgemäß keine Proteinbande sichtbar (Abb. 19b).



**Abb. 19 Western Blot-Vergleich von zellfrei produziertem rcCRP-Protein und gereinigtem Serum-cCRP.** Im Western Blot mit dem anti-cCRP-AK (a) sowie dem anti-HisTag-AK (b) wurde cCRP-Protein aus dem zellfreien Expressionssystem (ZF cCRP), mit einer Probe gereinigten Serum-cCRP (cCRP) verglichen.

### 3.3.1.2 Proteinexpression mittels *E. coli* BL21(DE3)pLysS

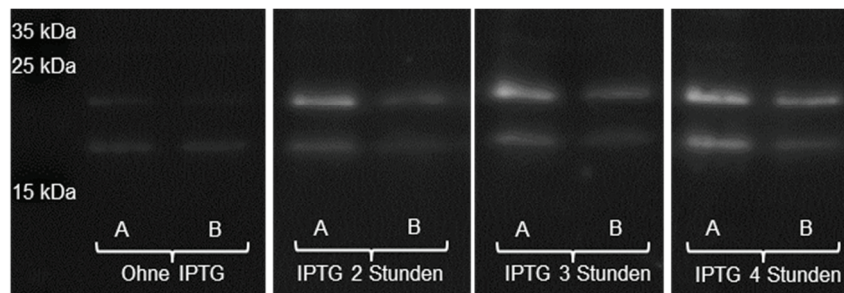
Nach dem Nachweis der Proteinproduktion durch das zellfreie Expressionssystem in kleineren Mengen wurde die Proteinexpression im nachfolgenden Schritt in größeren Ansätzen (5 ml) mittels *E. coli* BL21(DE3)pLyS intensiviert. Der im Anschluss durchgeführte Western Blot des durch *E. coli* BL21(DE3)pLyS produzierten rekombinanten cCRP-Proteins mit anti-cCRP-AK zeigte immunreaktive Proteindoppelbanden mit  $\leq 20$  kDa und ca. 24 kDa Molekulargewicht (Abb. 20), wobei die untere Bande stärker war. Auch diese Untersuchung wurde im Vergleich mit gereinigtem Serum-cCRP (Affinitätschromatographie) durchgeführt, welches sich wie auch in den übrigen Untersuchungen als Proteindoppelbande mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und 24 kDa darstellt.



**Abb. 20 Western Blot-Vergleich von *E. coli* BL21(DE3)pLysS rcCRP-Protein mit gereinigtem Serum-cCRP.** Ein Vergleich von rcCRP-Protein aus dem bakteriellen Expressionssystem BL21(DE3)pLysS (BL21 rcCRP) mit einer Probe gereinigten Serum-cCRP (cCRP) im Western Blot (anti-cCRP-AK) ist dargestellt.

Um die optimale Inkubationszeit der *E. coli* BL21(DE3)pLyS Kulturen für die Expression des cCRP-Proteins nach Stimulation mit IPTG zu evaluieren, wurden verschiedene Inkubationszeiten verglichen. Dabei zeigte sich eine geringe Grundexpression von immunreaktivem Protein ohne Stimulation durch IPTG. Auch die Länge der Inkubationszeit

hatte einen Einfluss auf die Stärke der Proteinexpression. Im Western Blot wurden zwei verschiedene Ansätze desselben Subklons (Nr. 26) auf ihre Proteinproduktion untersucht. Dabei zeigten sich in allen untersuchten Proben unterschiedlich starke Proteinbanden bei < 20 kDa und ca. 24 kDa, bei denen jeweils ein Ansatz des Subklon 26 stärker exprimierte als der andere (Abb. 21). Die Untersuchung zeigte eine Grundexpression auch ohne IPTG-Stimulation, jedoch war diese vergleichsweise gering. Bei allen Proben nach Stimulation (2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden) war die Proteinbande mit dem höheren Molekulargewicht von ca. 24 kDa deutlicher ausgeprägt (Abb. 21). Insgesamt nahm die Proteinsynthese mit längeren IPTG Inkubationszeiten zu.



**Abb. 21 Western Blot-Vergleich verschiedener Inkubationszeiten von *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit IPTG.** Die transformierten (pEXP5-CT/TOPO\_cCRP) *E. coli* BL21(DE3)pLysS (BL21) wurden durch IPTG-Zusatz (1 mM) stimuliert. Vergleichend wurden zwei Ansätze (A, B) desselben Subklons (Nr. 26) angesetzt und vor der Stimulation sowie zu drei definierten Zeitpunkten (2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden) Proben entnommen und im Western Blot mit dem spezifischen anti-cCRP-AK untersucht.

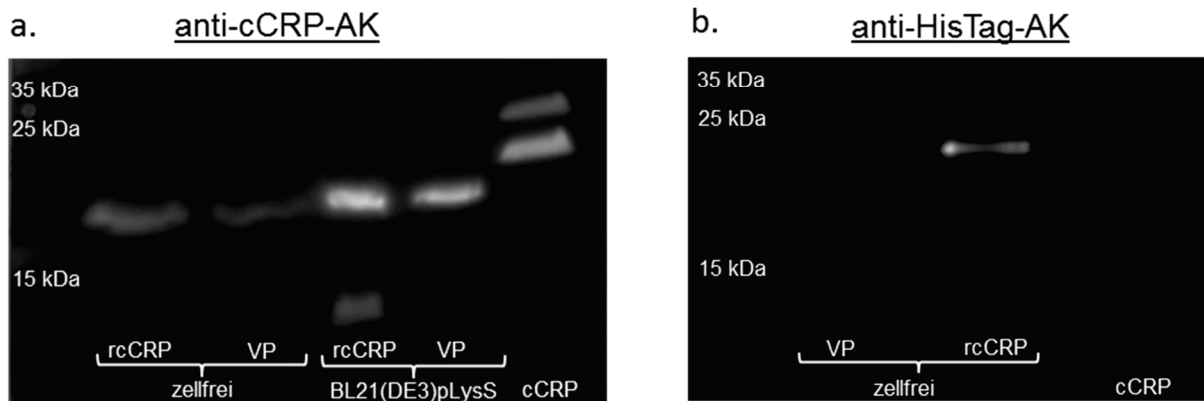
### 3.3.1.3 Vergleichende Untersuchungen beider Expressionssysteme

Als Negativkontrolle wurde auch cCRP-genfreies Vektorplasmid pEXP5/TOPO in das Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System sowie in den *E. coli* BL21(DE3)pLysS Stamm transformiert und inkubiert. Bei der Untersuchung des exprimierten Proteins im Western Blot mit dem anti-cCRP-AK zeigten sich dabei mehrere Proteinbanden, sowohl in den Proben aus dem zellfreien Expressionssystem als auch in den Proben aus *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Abb. 22).

Im vergleichenden Western Blot von Proteinproben aus dem Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System mit reinem Vektorplasmid pEXP5/TOPO und dem cCRP-genhaltigen Vektorplasmid (pEXP5/TOPO\_cCRP), zeigte sich bei beiden Systemen eine deutliche ca. 19 kDa große Proteinbande. In der Probe mit pEXP5/TOPO\_cCRP zeigten sich zusätzlich noch schwache Proteinbanden bei 23 kDa und 27 kDa (Abb. 22a).

Im *E. coli*-System (*E. coli* BL21(DE3)pLysS) zeigten sich bei derselben Untersuchung ebenfalls deutliche cCRP-immunreaktive Proteinbanden, bei etwa 20 kDa, sowohl in den Bakterien mit reinem Vektorplasmid als auch bei denen mit pEXP5/TOPO\_cCRP. In beiden untersuchten Proben zeigten sich zusätzlich Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 12 kDa, wobei diese bei den Bakterien mit pEXP5/TOPO\_cCRP stärker ausgeprägt war. In dieser Probe mit cCRP-genhaltigem Vektorplasmid wurde noch ein dritte, etwa 23 kDa große Proteinbande detektiert, die jedoch nur undeutlich sichtbar war (Abb. 22a).

Bei Untersuchungen von zellfrei produzierten, rekombinanten cCRP-Proteinproben mittels anti-HisTag-AK konnten diese Banden nicht nachgewiesen werden. Hier wurde nur im zellfrei produzierenden Expressionssystem eine deutlich sichtbare Einzelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa detektiert (Abb. 22b).



**Abb. 22 Vergleich der verschiedenen Proteinproduktionen des rcCRP im Western Blot.** Die Abbildung 22a zeigt den Vergleich rekombinanter Proteinproben von bakteriellen Zellen (BL21(DE3)pLysS) und einem zellfreien Expressionssystem mit dem anti-cCRP-AK. Untersucht wurden jeweils Proben mit reinem Vektorplasmid (VP) als Negativkontrolle und cCRP-genhaltigen Vektorplasmid (rcCRP). Als Positivkontrolle wurde gereinigtes Serum-cCRP (cCRP) verwendet. Die Untersuchung mit dem anti-HisTag-AK (b) wurde nur bei von Proben des zellfreien Expressionssystems durchgeführt, da sich in einer Untersuchung gezeigt hat, dass dieser AK in den Proben aus bakteriellen System zu unspezifisch reagiert (vgl. Abb. 24).

Auch bei dieser Untersuchung wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigtes Serum-cCRP als Positivkontrolle verwendet. Dieses zeigte sich in der Untersuchung durch den anti-cCRP-AK, wie auch in den vorigen Untersuchungen als Proteindoppelbande mit 22 kDa und 24 kDa Molekulargewicht (Abb. 22a). In der Untersuchung mit dem anti-HisTag-AK dagegen wurde keine Bande detektiert (Abb. 22b).

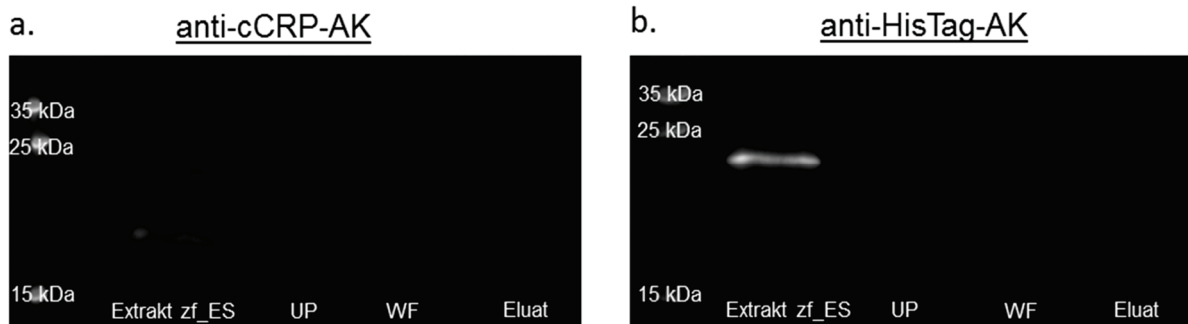
### 3.3.2 Reinigungsversuche des rekombinanten cCRP

Im Anschluss an die rcCRP-Proteinproduktion im zellfreien (Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System) sowie bakteriellen Expressionssystem (*E. coli* BL21(DE3)pLysS) erfolgten erste Reinigungen mittels IMAC über eine Ni<sup>2+</sup>-IDAhigh-Säule. Nach der Elution des bakteriell produzierten Proteins wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Western-Blot mit dem anti-cCRP-AK sowie dem anti-HisTag-AK untersucht.

#### 3.3.2.1 Expressway™ Cell-free *E. coli* Expression System

Bei den nachfolgenden Experimenten mit den IMAC-gereinigten Proben aus dem zellfrei produzierenden Expressionssystem zeigte sich, dass der Proteinnachweis mit beiden Antikörpern nur im Expressionsgemisch vor der Elution aus der Ni<sup>2+</sup>-IDAhigh-Säule möglich war. Im cCRP-spezifischen Western Blot mittels anti-cCRP-AK (Abb. 23a) zeigte sich in dieser untersuchten Fraktion eine immunreaktive Proteindoppelbande mit 20 kDa und 24 kDa Molekulargewicht. In den übrigen Fraktionen des Überstandes nach Inkubation, dem Waschschriff und dem Eluat konnte kein Protein detektiert werden.

In der Untersuchung mit dem anti-HisTag-AK wurden diese Befunde bestätigt. Hier wurde nur eine Proteinbande im Bakterien-Proteinextrakt vor Inkubation bei 24 kDa detektiert (Abb. 23b).



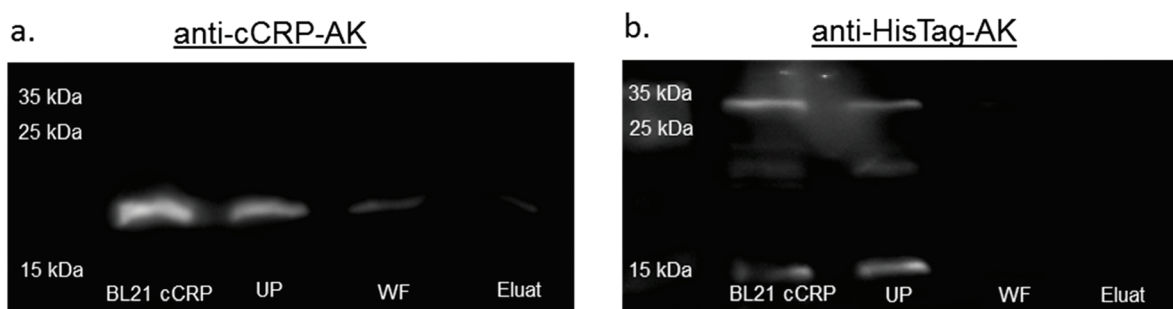
**Abb. 23 Western Blot von Proteinproben der zellfreien Expression vor und nach IMAC-Reinigung.** Die Effektivität der IMAC-Reinigung von Protein aus dem zellfreien Expressionssystem wurde im Western Blot mit dem anti-cCRP-AK (a) und anti-HisTag-AK (b) untersucht. Es wurde das unbehandelte Extrakt des zellfreien Expressionssystem (Extrakt zf\_ES), der Überstand nach der Inkubation (UP), die Waschfraktion (WF) und das Eluat untersucht.

### 3.3.2.2 *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Bei der Untersuchung von bakteriell produziertem rcCRP-Protein wurde der deutlichste cCRP-immunreaktive Proteinnachweis mit beiden Antikörpern im bakteriellen Pellet erreicht. Im Verlauf der Reinigung dagegen nahm der Gesamtproteingehalt sowie der Gehalt des cCRP-Proteins deutlich ab (Abb. 24a).

Im Western Blot mit dem anti-cCRP-AK zeigte sich in allen untersuchten Fraktionen eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von < 20 kDa. Im Bakterienzellysate konnte nur eine undeutliche Proteinbande mit ca. 22 kDa Molekulargewicht beobachtet werden (Abb. 24a).

In der Analyse durch den anti-HisTag-AK wurden deutlich mehr Banden detektiert (Abb. 24b). Sowohl im Bakterienzellysate als auch im Durchfluss der Ni<sup>2+</sup>-IDAhigh-Säule zeigten sich Proteinbanden bei ca. 15 kDa und ca. 30 kDa. Weniger deutliche Proteinbanden zeigten sich bei einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa, ca. 22 kDa und ca. 24 kDa. In der aufgefangenen Waschpufferfraktion konnte insgesamt nur wenig Protein detektiert werden und Proteinbanden waren nur noch bei ca. 15 kDa, ca. 20 kDa und ca. 30 kDa sichtbar. In der Probe des abschließenden Elutionsschritts für HisTag-Proteine zeigte sich keine detektierbare Proteinbande mehr (Abb. 24b).



**Abb. 24 Western Blot von Proteinproben aus BL21(DE3)pLysS Kulturen vor und nach IMAC-Reinigung.** Die Abbildung stellt vergleichend Western Blots der Reinigungsergebnisse von Proben aus der bakteriellen Proteinexpression mit dem anti-cCRP-AK (a) und anti-HisTag-AK (b) dar. Es wurde das unbehandelte Extrakt des zellfreien Expressionssystem (Extrakt zf\_ES), der Überstand nach der Inkubation mit der IMAC-Säule (UP), die Waschfraktion (WF) und das Eluat untersucht.

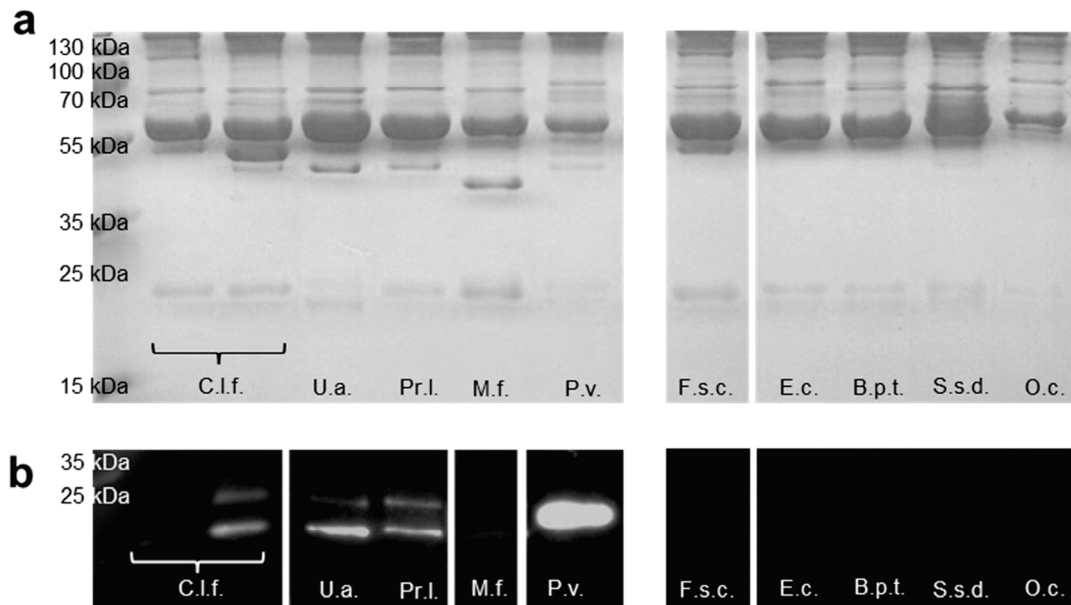
### 3.4 Erster immunologischer cCRP-Vergleich verschiedener Spezies

Um einen ersten Eindruck von der Immunreaktivität des CRPs in anderen Spezies und der zwischenartigen Bedeutung des CRPs zu erhalten, wurden Serumproben verschiedener Spezies miteinander verglichen. Alle vergleichenden Untersuchungen wurden sowohl im Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gel als auch im Western Blot mit dem spezifischen anti-cCRP-AK durchgeführt.

In der Anfärbung des Proteingels mit Coomassie-Blau stellen sich in den Seren der verschiedenen Tierspezies eine Vielzahl von Proteinbanden dar (Abb. 25a): unterhalb von 25 kDa bei allen Spezies mit Ausnahme des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) sowie verschieden stark ausgeprägte Proteinbanden mit einem Molekulargewicht oberhalb von 50 kDa. Besonders deutlich ist bei allen Tieren eine Proteinbande bei ca. 60 kDa (vermutlich Serumalbumin) ausgeprägt. Das Serum des Steinmarders (*Martes foina*) zeigte zusätzlich zwei klare Proteinbanden bei ca. 42 kDa und 45 kDa. Die Anfärbung des Proteingels mit Coomassie-Blau zeigte annähernd gleich aufgetragene Proteinmengen in allen Spuren (Abb. 25a).

Alle Seren wurden auch im Western Blot untersucht (Abb. 25b). Obwohl sich in der einfachen SDS-PAGE auf Höhe des caninen CRPs bei allen Spezies Doppelbanden mit einer Molekülgröße von 22 kDa und 24 kDa erkennen ließen, zeigte sich im Immunblot ein cCRP-Nachweis nur bei den Proben der *Caniformia*. Bei den Proben der beiden untersuchten Hunde sind deutliche Unterschiede in der Intensität der Doppelbanden, korrelierbar mit der cCRP-Konzentration, sichtbar. Auch die Proben der anderen Vertreter der Überfamilie der *Caniformia* zeigten unterschiedlich starke Proteinbanden von 22 kDa und 24 kDa. Lediglich in der Seehund (*Phoca vitulina*) - Probe zeigte sich eine sehr deutliche Bande. Aufgrund der starken Chemilumineszenz konnte nicht sicher differenziert werden, ob es sich um eine Einzel- oder eine Doppelbande handelte. Wie auch bei den vorhergehenden Proteinuntersuchungen in Serumproben verschiedener caniner Einzeltiere (vgl. Abb. 11), zeigte sich bei den anderen Vertretern der *Caniformia* eine unterschiedliche Intensität der Doppelbanden. Bei dem untersuchten Braunbär (*Ursus arctos*) war die leichtere, ca. 22 kDa Untereinheit deutlicher sichtbar. Die Banden in den Proben der Einzeltiere der Spezies Waschbär (*Procyon lotor*) und Steinmarder (*Martes foina*) erschienen etwa gleich stark, wobei auch hier die 22 kDa Bande etwas deutlicher war. Insgesamt waren die Banden des cCRP bei dem untersuchten Steinmarder nur schwach sichtbar.

Ein immunologischer Nachweis des Proteins mit dem anti-cCRP-AK bei der Katze (*Felis silvestris catus*) oder einem der anderen hier untersuchten domestizierten Tierspezies (*Equus ferus caballus*, *Bos primigenius taurus*, *Sus scrofa domestica*, *Oryctolagus cuniculus*) war nicht möglich. In keiner Probe der untersuchten Tiere zeigte sich eine Bande auf Höhe von 22 kDa oder 24 kDa (Abb. 25b).



**Abb. 25 Vergleich von Serumproben verschiedener Spezies in SDS-PAGE (a) und Western Blot (b).** Der linke Teil der Abbildung zeigt Serumproben verschiedener Spezies aus der Gruppe der Hundeartigen: C.I.f. = *Canis lupus familiaris*, U.a. = *Ursus arctos*, Pr.I. = *Procyon lotor*, M.f. = *Martes foina* und P.v. = *Phoca vitulina*. Zum Vergleich gibt der rechte Teil der Abbildung das Ergebnis der Untersuchung von Serumproben der verschiedenen domestizierten Spezies F.s.c. = *Felis silvestris catus*, E.f.c. = *Equus caballus*, B.p.t. = *Bos primigenius taurus*, S.s.d. = *Sus scrofa domestica* und O.c. = *Oryctolagus cuniculus* wieder.

Im oberen Teil der Abbildung ist das Proteingel nach Coomassie-Färbung (a) und darunter das Ergebnis der entsprechenden Untersuchung im Western Blot nach Inkubation mit dem anti-cCRP-AK (b) dargestellt.

Aufgrund der nachgewiesenen Doppelbanden kann vermutet werden, dass auch das CRP anderer *Caniformia* eine Glykosylierung der oberen Proteinbande aufweist. Der versuchte Nachweis dieser Glykosylierung in den Einzelseren der verschiedenen Spezies mittels unspezifischen Glykosylierungsfärbung gelang direkt im Serum jedoch nicht (Daten nicht gezeigt). Eine Reinigung von CRP einzelner Spezies und die daran angeschlossenen Untersuchungen mittels 2D-Gelelektrophorese sowie ein Glykosylierungsnachweis waren nicht möglich, da dafür zu geringe Serummengen zur Verfügung standen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Klinische Studie zur Evaluierung der Messgeräte

Die Entzündung ist die Reaktion auf jede Art von Verletzung innerer oder äußerer Zellen. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden vom Organismus eine Reihe von Proteinen produziert, die dem Eliminieren einer Noxe dienen und die verstärkte Reaktionsbereitschaft der Immunzellen zur Folge haben (Baumann und Gauldie 1994). Die Messung dieser Zellen (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen) wie auch verschiedener Proteine, u.a. auch APPs, werden zur medizinischen Diagnostik herangezogen. In der Humanmedizin ist das CRP bereits seit vielen Jahren ein nützlicher Parameter für Entzündungen. Die Messung des hCRP wird insbesondere für die regelmäßige Untersuchung auf organische Erkrankungen, das Überprüfen von Therapieerfolgen bei Entzündungen und Infektionen sowie das Erkennen von auftretenden Infektionen bei immunsupprimierten Individuen (Pepys und Hirschfield 2003) angewandt. Auch beim Hund ist das CRP ein messbarer Parameter, um Entzündungsprozesse zeitnah nach Entstehung erkennen zu können, so dass es ein Kriterium zur Differenzierung von Symptomen in „entzündlich“ und „nicht-entzündlich“ darstellen kann (Eckersall und Bell 2010).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Serumkonzentration des cCRP gering. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben für Referenzbereiche gesunder Hunde zwischen 0 und 8,9 mg/l (Griebsch et al. 2009),  $5,06 \pm 3,6$  mg/l (Otabe et al. 1998),  $8,4 \pm 4,6$  mg/l (Yamamoto et al. 1994) sowie 0,22 und 4,04 mg/l (Martínez-Subiela et al. 2004). Obwohl diese Werte alle durch Messung mittels ELISA ermittelt wurden, zeigen sich Differenzen zwischen den verschiedenen untersuchten Gruppen. Dies ist möglicherweise bedingt durch die Nutzung verschiedener ELISA-Systeme wie des Tridelta (Griebsch et al. 2009) sowie des ELISA von Yamamoto et al. (1992) durch (Otabe et al. 1998) und (Yamamoto et al. 1994). Auch die Heterogenität der unterschiedlichen Gruppen von Kontrolltieren in diesen Studien könnte ein Grund für die Unterschiede sein.

Ein Vorteil der Messung des cCRP gegenüber traditionellen Entzündungsmarkern ist seine höhere Spezifität für entzündliche Prozesse, wodurch es auch zur Diagnose bei Erkrankungen eingesetzt werden kann, die nicht über ein Blutbild oder Differentialblutbild erkannt werden können (Nakamura et al. 2008). Der Nachweis dieses Biomarkers ist daher auch bei myelosupprimierten Patienten (Chemotherapeutika, Neoplasien) möglich (Ceron et al. 2005). Darüber hinaus wird die Ausschüttung des CRP nicht, wie Immunzellen, durch steroidbasierte, anti-inflammatorische Therapien beeinflusst (Martínez-Subiela et al. 2004). Weiterhin können auftretende Veränderungen, insbesondere bei Erkrankungen die Langzeittherapien erfordern, regelmäßig erfasst werden und daraus eine schnelle und adäquate Therapieumstellung erfolgen (Eckersall und Bell 2010).

Die Durchführung einer schnellen und zuverlässigen Diagnostik ist für die einwandfreie Betreuung von Patienten, besonders bei kritischen Zuständen, unerlässlich. Für die Messung des Parameters sind entsprechende Schnelltestgeräte hilfreich.

Bisher fehlen in der Tiermedizin validierte quantitative Schnelltestgeräte für die Messung des Entzündungsmarkers cCRP und anderer APPs. Daher sollte diese Studie zur Etablierung von drei Messgeräten zur schnellen und patientennahen Messung des Entzündungsproteins beitragen. Ein zusätzliches Ziel war es weitere Kenntnisse über die Struktur des cCRP-Proteins zu gewinnen, um daraus neue Möglichkeiten für die Diagnostik und Therapie – auch im Hinblick auf andere Spezies – zu ergründen.

Insgesamt konnten 125 Tiere mit cCRP-Werten zwischen 0 und 282 mg/l in die Studie eingeschlossen werden. Die Proben wurden für diese Studie mit einem neuen ELISA (TECOmedical) gemessen, der eine gute Korrelation mit dem Tridelta ELISA hat (Selting et al. 2013). Bei der Beurteilung der Bedienung der Testgeräte unterschieden sich zwar Vorbereitungszeit, Probenmenge und Durchführung geringgradig voneinander, jedoch zeigten sich bei keinem der Schnelltestgeräte deutliche Vorteile gegenüber einem der anderen Beiden.

Alle drei getesteten Schnelltestgeräte konnten die cCRP-Konzentration in den verschiedenen Serumproben messen, jedoch zeigten sich Unterschiede hinsichtlich Reliabilität,



systematischem sowie dem totalen Fehler. Die Reliabilität, auch Inter-Assay Varianz genannt (CV), war bei den EUROLyser und LifeAssays Geräten gut resp. innerhalb der zulässigen Grenzwerte nach Jensen und Kjølgaard-Hansen (2006). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Messgeräte zuverlässig reproduzierbar sind. Das TECOmedical Gerät erreichte diesen Grenzwert jedoch nicht. Der Bias war dagegen bei allen Testgeräten deutlich oberhalb des zulässigen Maximalwertes von 9,5 %. Der dritte, entscheidende Parameter zur Beurteilung neuer Messmethoden ist der totale Fehler. Der Grenzwert des  $TE_{Des}$  wurde vom EUROLyser knapp unterschritten, das LifeAssays Gerät lag knapp darüber. Das Schnelltestgerät von TECOmedical lag deutlich über dem zulässigen Maximalwert.

Der Gehalt an cCRP zeigte keine statistisch signifikante Änderung bei der Lagerung über 24 Stunden. Auch konnte kein Unterschied zwischen der Lagerung bei Raumtemperatur und bei 4°C festgestellt werden. Da jedoch nur sechs verschiedene Serumproben für die Messungen herangezogen wurden, erlaubt dies keine ausreichend zuverlässige Empfehlung für die Lagerung von Proben. Serumproben, die für einen langen Zeitraum aufbewahrt werden sollen, sollten bei mindestens -10°C (Riley und Zontine 1972) oder -20°C (Dillman und Coles 1966) gelagert werden.

Bezüglich der Genauigkeit der Messgeräte zeigten sich hier z.T. deutliche Unterschiede zwischen den Schnelltestgeräten. Von den in dieser Studie untersuchten Schnelltestgeräten zeigte das LifeAssays Testgerät die beste Korrelation mit dem als Referenzmethode ausgewählten ELISA. Nach Flatland et al. (2010) ist bei Daten mit einem engen Messbereich ein Korrelationskoeffizient  $> 0,975$  und bei Daten mit einem weiten Messbereich ein Korrelationskoeffizient  $> 0,99$  notwendig, um die lineare Regression und daraus folgend den systematischen Fehler zu ermitteln. Da es sich bei dem Messbereich der drei Schnelltestgeräte eher um einen weiten Messbereich ( $< 10$  mg/l bis  $> 200$  mg/l) handelt, wäre ein Korrelationskoeffizient  $> 0,99$  für eine sichere Aussage über die Fehlertendenz erforderlich. Dies trifft bei keinem der Geräte zu, daher wurde ein alternatives Regressionsmodell verwendet und die Deming Regression mit dem Achsenschnittpunkt und der Steigung ermittelt. Auch dabei zeigten sich keine deutlich veränderten Korrelationswerte. Zwar waren die Ergebnisse zum Achsenschnittpunkt und damit zum konstanten Fehler bei allen Testgeräten signifikant, jedoch die Steigung nur bei dem LifeAssays Testgerät. Daher müssen weitere Daten gesammelt oder Messreplikate angefertigt werden, um eine genauere Aussage bezüglich des Messfehlers der Geräte zu treffen.

In den ASVCP Vorgaben zur Qualitätsanforderungen bei der Messung biochemischer Parameter ist als Alternative zum  $TE_{Des}$  der minimal erlaubter Fehler ( $TE_{Min}$ ) angegeben, der durch eine einer etwas anderen Berechnung ermittelt wird (Anhang IV). Dieser  $TE_{Min}$  hat einen Grenzwert von 44,4%. Bei Annahme dieses Fehlers lägen zumindest zwei der drei Testgeräte innerhalb des zulässigen totalen Fehlerbereiches.

In den Bland-Altman Diagrammen stellte sich die Differenz zwischen den Messwerten der Schnelltestgeräte und dem ELISA deutlicher dar. Sowohl das Gerät von TECOmedical als auch der LifeAssays Schnelltest zeigten im direkten Vergleich mit dem ELISA eine Tendenz für einen systematischen Messfehler. Bei einer guten Übereinstimmung zweier Methoden sind die Werte etwa um die Mittellinie (= Mittelwert der Differenzen) verteilt, wobei sich etwa die Hälfte der Werte oberhalb und die andere Hälfte unterhalb dieser Linie befinden (Flatland et al. 2010). Dies ist bei beiden Geräten nicht zutreffend. Dabei unterscheiden sich die Messfehler jedoch sichtbar voneinander: Für das TECOmedical Schnelltestgerät zeigt sich eine negative Steigung, was darauf schließen lässt, dass der Test tendenziell höhere cCRP-Werte misst. Im LifeAssays Messgerät verhält es sich reziprok: Hier zeigt sich eine positive Steigung als Tendenz für niedrigere Werte im Vergleich mit dem ELISA. Bei allen Schnelltestgeräten gab es im Vergleich mit dem ELISA einige Werte, die außerhalb der Übereinstimmungsgrenzen lagen. Der EUROLyser wies trotz einiger Abweichungen und Streuungen insgesamt die geringste Differenz zwischen den einzelnen Werten, den kleinsten Bereich zwischen den Übereinstimmungsgrenzen und daher die geringste Tendenz für einen systematischen Messfehler auf. Im LifeAssays und EUROLyser gemessene Werte lagen ausschließlich über der oberen Übereinstimmungsgrenze. Werte, die mittels TECOmedical Testgerät ermittelt wurden, lagen sowohl ober- als auch unterhalb der

Übereinstimmungsgrenzen. Dieses Gerät (TECOmedical) wies auch die breiteste Streuung der Werte auf, die mit steigender cCRP-Konzentration zunahm. Die scheinbaren, systematischen Messfehler waren in keinem der Testgeräte signifikant.

Mit dem EUROLyser Messgerät konnten bei einigen Proben trotz erhöhter cCRP-Gehalte diese Erhöhung nicht abgebildet werden und die cCRP-Konzentration wurde als < 10 mg/l angegeben. Auch bei mehrfacher Messung derselben Probe, vergleichbar mit den Messungen zur Berechnung der Inter-Assay Varianz, wurde immer eine Konzentration < 10 mg/l gemessen. Dies änderte sich nur in einer Probe nach Verdünnung. Daher erschien der zunächst vermutete Hook-Effekt als Auslöser für die falsch-niedrigen Messungen unwahrscheinlich. Offensichtliche Störfaktoren wie Probenbeschaffenheit, verabreichte Medikamente oder unterschiedliche Behandlung der Proben resp. des Testmaterials wurden retrospektiv verglichen und als Ursache ausgeschlossen. Möglicherweise sind andere Störfaktoren vorhanden, die in dieser Studie nicht ermittelt werden konnten.

Für die statistische Auswertung waren die unterschiedlichen unteren Messgrenzwerte von 5 mg/l im TECOmedical und 10 mg/l im EUROLyser und LifeAssays Testsystem problematisch. Im Vorfeld der Auswertung wurden mögliche Alternativen (Ausschluss der Werte außerhalb des Referenzbereiches, Mittelung der ELISA- Werte außerhalb des Referenzbereiches) diskutiert, die Anpassung der ELISA Werte erwies sich jedoch für die statistische Auswertung als am besten geeignet. Eine weitere Schwachstelle der Studie war, dass das Probenmaterial für die Messung im ELISA zunächst eingefroren und bei -30 °C für max. zwei Monate gelagert wurde. Laut Literatur ist das cCRP-Protein allerdings innerhalb dieses Zeitraums stabil (Riley und Zontine 1972; Dillman und Coles 1966). Mögliche Unterschiede, die sich durch die Messung von frischem Serum im Schnelltest und aufgetautem Serum im ELISA ergeben haben, sind jedoch nicht auszuschließen (Einfrier-Auftau-Effekte).

Das Fazit der durchgeführten Studie ist, dass alle Schnelltestgeräte grundsätzlich für die Messung der cCRP-Konzentration verwendet werden können. Um einen exakten Wert der cCRP-Konzentration zu erhalten, sollten die Proben jedoch immer mittels ELISA überprüft werden. In der durchgeführten Studie zeigten alle klinisch gesunden Hunde cCRP-Konzentrationen von maximal 4,7 mg/l und lagen damit in dem in der Literatur beschriebenen Rahmen. Die unteren Messgrenzen der in dieser Studie getesteten Schnelltestgeräte lagen bei 5 mg/l bzw. 10 mg/l. Somit liegt möglicherweise der Referenzbereich für gesunde Hunde generell unterhalb des möglichen messbaren Grenzbereichs dieser Schnelltestgeräte.

Darüber hinaus sollten, um die Vergleichbarkeit von Werten zu gewährleisten und im Hinblick auf die scheinbaren systematischen Messfehler der einzelnen Geräte, in jedem Fall Messungen immer mit demselben Gerät erfolgen. Nur Werte, welche mit demselben Messgerät gemessen wurden, sind direkt miteinander vergleichbar. Dies bezieht sich insbesondere auf Reihenmessungen eines Einzeltieres, zum Beispiel im Rahmen von Therapie- und Verlaufskontrollen. Aber auch für die Festlegung eines internen Referenzbereichs in der jeweiligen Institution, die ein solches Schnelltestgerät nutzt, ist dies sinnvoll.

Das CRP ermöglicht die Überwachung von Patienten unter der Therapie. Dabei ist es spezifischer als die traditionellen Entzündungsindikatoren (Fieber, Anstieg der Gesamt-Leukozytenzahl), die auch durch Stress oder eine Glukokortikoid-basierte Therapie direkt beeinflusst werden (Martínez-Subiela et al. 2004). Daher kann die Messung des Parameters cCRP einen wichtigen Einfluss auf die Versorgung des Patienten in verschiedenen klinischen Situationen haben, in denen eine Entscheidung über das Vorhandensein einer subklinischen Entzündung oder einer nicht-entzündlichen Ursache (Ceron et al. 2005) resp. über die Änderung der bisherigen Therapie getroffen werden muss. Dies ist insbesondere für Tiere mit immun-medierten, entzündlichen Erkrankungen relevant, da diese häufig unter dauerhaften oder Langzeit-Therapien mit Immunsuppressiva wie Glukokortikoiden oder Ciclosporin stehen.

Bei der Messung von cCRP-Konzentrationen desselben Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung zeigte sich bei den in dieser Studie untersuchten Tieren ein

deutlich sichtbarer Abfall innerhalb von 14 Tagen unter Therapie. Dieser Verlauf war nicht nur bei der Messung des cCRP-Gehaltes im ELISA, sondern auch mit dem TECOmedical Schnelltestgerät erfassbar. Zwar unterschieden sich die Einzelwerte zwischen ELISA und dem Schnelltestgerät in ihrer ermittelten absoluten cCRP-Konzentration, eine positive Antwort auf den Therapiebeginn war jedoch mit beiden Methoden erfassbar. Auch die Durchführung eines Langzeitmonitorings war mit dem Schnelltestgerät grundsätzlich möglich. Eine Veränderung der cCRP-Konzentration und besonders ein Wiederanstieg des Serum-cCRP-Gehaltes nach einem längeren Zeitraum unter Therapie konnte mit dem in dieser Studie verwendeten Schnelltestgerät von TECOmedical eindeutig gemessen werden. Um im klinischen Alltag die Krankheitsentwicklung abzuschätzen, kann die cCRP-Messung bei Patienten unter Langzeittherapie mit einem Schnelltestgerät daher sinnvoll sein. Für genaue Einzelwerte jedoch sollte die cCRP-Konzentration der entsprechenden Probe immer mit einem ELISA bestimmt werden.

Eine Limitation der durchgeführten Verlaufskontrollen war, dass zwar die Gruppengrößen von Tiergruppe 1 (14 Tage) und Tiergruppe 2 (150 Tage) gleich waren, jedoch die Einzeltiere der beiden Gruppen nur teilweise dieselben waren. Aufgrund der heterogenen Krankheitsbilder und bei einigen Patienten auch schwerwiegenden Erkrankungen war es nicht möglich, alle Tiere weiter zu beproben. Die Gründe hierfür waren entweder eine Besserung des Gesundheitszustandes, wodurch weitere Kontrolluntersuchungen nicht mehr notwendig waren oder eine Verschlechterung des klinischen Zustandes der Tiere, weshalb sie euthanasiert werden mussten. Auch erfolgte bei einigen der zunächst stationär behandelten Hunde die weitere Behandlung beim zuständigen Haustierarzt. Außerdem wurden die Proben nicht zu standardisierten Zeitpunkten entnommen. Da für die durchgeführte Studie nur Blutproben verwendet wurden, die zu diagnostischen Zwecken entnommen wurden, waren die Entnahmezeitpunkte abhängig vom Behandlungsstatus des Einzeltieres und zum Teil nicht so einheitlich wie gewünscht.

Trotz der Limitationen zeigen die Verlaufskontrollen von beiden untersuchten Tiergruppen, dass ein erstes Monitoring auch mittels Schnelltestgeräten möglich ist. Durch das Monitoring könnte ein frühzeitiges Erkennen von Entzündungsreaktionen auch ohne klinische Anzeichen, wie bereits in der Humanmedizin für kardiovaskuläre Erkrankungen praktiziert (Wilson et al. 2006), möglich werden. Außerdem erleichtert es das rechtzeitige Erkennen von rezidivierenden Entzündungsprozessen, wodurch ein schnelles, zielgerichtetes therapeutisches Eingreifen möglich wird (Kjelgaard-Hansen et al. 2006; Lowrie et al. 2009a). Allerdings korreliert das Protein als Einzelparameter nicht mit dem Behandlungsergebnis und muss daher immer im Zusammenhang mit anderen klinischen Parametern betrachtet werden (Gebhardt et al. 2009; Griebisch et al. 2009). Die regelmäßige Messung des Proteins in Form von Verlaufskontrollen kann daher zum Monitoring bestimmter Erkrankungen beitragen und dabei eine verlässliche Aussage über einen Therapieerfolg erleichtern.

## 4.2 Charakterisierung des nativen cCRP-Proteins und der mRNA

Um die im vorigen Abschnitt angesprochenen, diagnostischen Verfahren anbieten zu können, ist es notwendig, über detaillierte Struktur-Kenntnisse des entsprechenden Proteins zu verfügen. In der durchgeführten Studie zur Charakterisierung des CRP-Proteins des Hundes konnte bereits bekanntes Wissen bestätigt und darauf aufbauend neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Bisher sind sowohl zu der mRNA-Sequenz als auch zu der Proteinsequenz des cCRP nur Daten aus *in silico* Studien (abgeleitet aus dem Hunde-Genom) bekannt. Die mRNA-Sequenz, die in dieser Studie erstmalig aus der Lebergewebsprobe eines Einzeltieres gewonnen wurde, stimmte in 668 bp von 669 bp mit der bisher angenommenen Sequenz (NCBI, Acc. Nr. XM\_545746) überein. Bei einer Base konnte nicht sicher zwischen Guanin und Thymin differenziert werden. Hierbei kann es sich jedoch um eine Punktmutation in der Gensequenz dieses individuellen Tieres handeln. Die in dieser Studie durchgeführte, erstmalige Isolierung der mRNA und Sequenzierung der cDNA des cCRP zeigt, dass die von NCBI veröffentlichte deduzierte Sequenz die korrekte mRNA-Sequenz darstellt.

Die Identifikation der Proteinsequenz mittels massenspektrometrischer Analysen und N-terminaler Sequenzierung erfolgte mit mehr als 60% Sequenzabdeckung. Trotz der nicht vollständigen Bestätigung der cCRP-AS-Sequenz kann davon ausgegangen werden, dass die bisher angenommene, durch *in silico* Untersuchungen aus der Gensequenz abgeleitete AS-Sequenz (NCBI, Acc. Nr. XP\_545746) korrekt ist. Lediglich der Beginn der Sequenz konnte durch N-terminale Sequenzierung als abweichend von der abgeleiteten, längeren AS-Sequenz gezeigt werden. Da zunächst nicht sicher war, ob es sich bei den unterschiedlichen Molekulargewichten im Coomassie-Blau gefärbten Proteingel resp. Western Blot lediglich um eine Unterscheidung aufgrund einer Glykosylierung oder einer möglichen N-terminalen Trunkierung handelt, wurden beide Proteinbanden einzeln untersucht. Bei der Analyse von gereinigtem cCRP-Protein aus dem Serum konnte nachgewiesen werden, dass die ersten 19 AS im nativen cCRP nicht vorhanden sind, obwohl diese in der mRNA codiert sind. Die N-terminale Sequenz des Serum-cCRP lautet QIDLDE und daraus ergibt sich eine Gesamtlänge des cCRP-Proteins von 204 AS, im Gegensatz zur deduzierten AS-Sequenz (NCBI) mit 223 AS. Dies lässt auf eine posttranslationale Modifikation des Proteins schließen. Möglicherweise wird über diese Modifikation die Freisetzung des Proteins aufgrund eines Entzündungsreizes gesteuert. Diesbezüglich könnten die zwei Carboxylesterasen, die von Macintyre et al. (1994) in humanen Hepatozyten beschrieben wurden, eine Rolle bei der Regulation der Freisetzung spielen.

Die Isolierung von cCRP aus Serum von euthanasierten Hunden stellte eine gute Möglichkeit dar, um für die Charakterisierung nutzbares Protein zu erhalten. Auch wenn die Gelfiltration nur eine geringe zusätzliche Reinigung des zuvor mittels Affinitätschromatographie gewonnenen cCRPs bewirkte, konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass natives cCRP als Pentamer im nativen Zustand ein Molekulargewicht von 110 kDa hat. Zur Untersuchung des cCRP-Proteins wurden im Weiteren Methoden verwendet, in denen das Protein im denaturierten Zustand als Monomer (22 kDa mit 204 AS) vorlag.

Der in dieser Studie getestete anti-cCRP-AK detektierte in den meisten untersuchten Seren von Einzeltieren eine Proteindoppelbande mit Molekülgrößen von 22 kDa und 24 kDa. Dabei handelt es sich voraussichtlich um die einzelnen Untereinheiten des Proteins, von denen der Teil mit dem größeren Molekulargewicht glykosyliert vorliegt (24 kDa). In denjenigen Proben, in denen keine cCRP-Proteinbanden im Western Blot nachgewiesen werden konnten, lag vermutlich keine ausreichend hohe, detektierbare cCRP-Konzentration vor. Dies war hauptsächlich bei Tieren mit nicht-entzündlichen Erkrankungen der Fall, obwohl auch bei dem Tier mit Magendrehung nur eine sehr schwache Proteinbande sichtbar war. Diese schwache cCRP-Proteinbande trotz des zugrundeliegenden inflammatorischen Prozesses ist durch eine intensive Infusionstherapie dieses Tieres erklärbar, da die Serumprobe erst nach einer bereits vorangegangenen Behandlung und *post mortem* entnommen wurde. Für die diagnostische Aussagekraft sollte in Erwägung gezogen werden, dass auch der Einfluss (Verdünnung) durch Therapien zu beachten ist. Außerdem wurde eine 22 kDa große Proteinbande bei einem Hund mit CNI nachgewiesen. Diese Erkrankung hat verschiedene entzündliche sowie nicht-entzündliche Grundursachen. Möglicherweise kann die Bestimmung der cCRP-Serumkonzentration zur Differenzierung zwischen einer rezidivierend-aktiven, chronischen Entzündung und einer nicht inflammatorischen Ursache beitragen, da der APP-Spiegel bei chronischen Erkrankungen nur erhöht ist, wenn ein anhaltender Entzündungsprozess vorliegt (Ceron et al. 2005). Allerdings beschreiben verschiedene Studien auch, dass eine verminderte Nierenfunktion zur verminderten Ausscheidung von cCRP zum einen und proinflammatorischen Zytokinen zum anderen führt. Beide können dadurch zu einer erhöhten Serum-cCRP-Konzentration führen (Raila et al. 2011).

Die Glykosylierung, die bereits von Caspi et al. (1984) gefunden wurde, konnte bei der Untersuchung des gereinigten cCRP-Proteins für die höher-molekulare Bande (24 kDa) bestätigt werden. Diese Glykosylierung der Untereinheiten des cCRP wurde in weiteren Analysen mittels unspezifischer Glykoproteinfärbung und in Kenntnis der Erkrankung der Hunde untersucht.

Bei elektrophoretisch getrennten Einzelseren war der Nachweis einer cCRP-Glykosylierung nicht möglich, daher kann postuliert werden, dass in der untersuchten Probe möglicherweise

keine ausreichenden Mengen an glykosyliertem cCRP-Protein vorhanden waren. Da jedoch bei der unspezifischen Glykosylierungsfärbung auch bei gereinigten Serum-cCRP Proben nur ein schwacher Nachweis trotz vorhandener Proteindoppelbande möglich war, wurde auf die weitere Analyse von Einzelseren verzichtet. Die Detektionsgrenze der unspezifischen Glykosylierungsfärbung für die direkte Untersuchung in Einzelseren ist scheinbar zu gering, um eine Glykosylierung nachweisen zu können. In den gereinigten Serum-cCRP Proben konnte auch in der zweidimensionalen elektrophoretischen Analyse die höhermolekularen Proteinspots als glykosyliert identifiziert werden. Bei der Untersuchung mittels spezifischer Lektinbindung fiel außerdem ein zusätzlicher Proteinspot mit pI-Verschiebung zum basischen Bereich auf, der in keinem der anderen Untersuchungen sichtbar war. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass in diesem Versuch eine andere Reinigungsfraction verwendet werden musste und dadurch unterschiedliche Zuckerreste zusätzliche den pI-beeinflusst haben.

Weitere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis einer N-glykosidischen Bindung von terminaler Sialinsäure gekoppelten Gal- oder GalNAc-Molekülen (2,6-Bindung). Dieses Kohlenhydratmuster wurde auch bereits bei Studien mit hCRP gefunden (Das et al. 2003). Die terminale Kopplung der Kohlenhydratkette mit Sialinsäure ist gleichzeitig eine Erklärung für die Verschiebung des 24 kDa-Proteinteils zum saureren pH Bereich. Die molekulare *in silico* Analyse möglicher Stellen für die Glykosylierung in Kombination mit der ermittelten cCRP-AS-Sequenz ergab, dass die Asparagine N17 und N181 am wahrscheinlichsten die Modifikationsstellen sind.

Die Ergebnisse einer humanmedizinischen Studie (Das et al. 2003) haben darüber hinaus ergeben, dass das Monosaccharid-Muster der Kohlenhydratkette bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen individuell variiert. Solche variablen Glykosylierungsmuster sind auch bereits für das canine Haptoglobin bei Hunden mit verschiedenen Lebererkrankungen beschrieben (Andersson et al. 1998). Es ist daher denkbar, dass unterschiedliche Glykosylierungsmuster auch bei dem caninen CRP-Protein in Abhängigkeit von der Erkrankung auftreten. Um detailliertere Kenntnis darüber zu erhalten, ob auch beim Hund spezifische Glykosylierungsmuster mit verschiedenen Erkrankungen korrelieren, so wie es beim hCRP und caninem Haptoglobin bereits bekannt ist, müsste gereinigtes Serum-cCRP von mehreren Einzeltieren pro verschiedenen Erkrankungen gewonnen werden. Inwiefern veränderte Kohlenhydratmuster durch die Entzündungsnöxe beeinflusst werden resp. den Verlauf der Entzündungsreaktion beeinflussen, ist bisher nicht bekannt. Auch ob diese variablen Glykosylierungsmuster für diagnostische Zwecke verwendbar sind, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Um solche Projekte zu ermöglichen, müssten *in vitro*-Systeme etabliert werden, die aufgrund verschiedener Stimuli glykosylierte cCRP-Proteine produzieren. Dazu könnte die rekombinante Produktion von cCRP beispielsweise in Säugerzellen erfolgen. Erste Schritte, dieses rekombinante cCRP-Protein zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit vorgestellt.

Bei der Analyse von Proben des rekombinanten Proteins aus bakteriellen resp. zellfreien Expressionssystemen fiel zunächst auf, dass sich die nachgewiesenen Proteine in Doppelbanden von 20 kDa und 24 kDa darstellten. Bakterielle Hostsysteme sind jedoch nicht in der Lage posttranslationale Modifikationen in Form von Glykosylierungen vorzunehmen. Daher kann bei der Produktion in bakteriellen Expressionssystemen nur der Nachweis einer Einzelbande erwartet werden. Als cCRP-Proteinbande ist die obere der beiden Banden wahrscheinlicher, da an der künstlichen cCRP-Gensequenz zusätzlich Codons für sechs Histidine (HisTag) addiert wurden, wodurch sich das Molekulargewicht erhöht. Worum es sich bei der kleineren, etwa 20 kDa großen Proteinbande handelt, ist zunächst unklar. Möglicherweise ist dies immunreaktives bakterielles Protein, das sowohl im bakterienhaltigen als auch im zellfreien Expressionssystem vorhanden ist resp. produziert wird. Beim Vergleich des Lysates von cCRP-genhaltigen *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit der Negativkontrolle wurden in beiden Proben Proteinbanden auf derselben Höhe (20 kDa) gefunden. Demnach wurden auch Proteinbanden in denjenigen Expressionssystemen detektiert, die kein cCRP-genhaltiges Vektorplasmid enthielten. Das gleiche Ergebnis wurde bei dem Vergleich von zellfreiem Expressionssystem mit cCRP-genhaltigen und reinem Vektorplasmid erzielt. Daher

liegt die Vermutung nahe, dass der anti-cCRP-AK außer dem nativen cCRP noch weitere, bakterielle Strukturen erkennt. Dies ist insbesondere deshalb möglich, da es sich bei dem genutzten anti-cCRP-AK um einen polyklonalen Antikörper handelt. Inwiefern die Antikörper-Detektion auch anderer Strukturen als der des cCRPs einen Einfluss auf die Verwendbarkeit in kommerziellen Testsystemen, insbesondere Schnelltestsystemen hat, sollte aufgrund dieses Befundes kritisch überprüft werden.

Abgesehen von der Detektion zusätzlicher immunreaktiver Strukturen konnte die Produktion von rekombinantem cCRP und seine Isolation aus den bakteriellen sowie zellfreien Expressionssystemen nicht abschließend durchgeführt werden. Bei der Reinigung zeigte sich eine unzureichende Löslichkeit des Proteins aus den bakteriellen Strukturen. Dies ist möglicherweise darin begründet, dass die Hauptfunktion des Serum-cCRP die Opsonierung bakterieller Strukturen (durch Bindung von PCh) ist, wodurch ihre Aufnahme durch phagozytierende Zellen erleichtert wird. Jedoch ist diese Bindung der PCh-Bestandteile nur calciumabhängig möglich. Da dem Lysispuffer kein Calcium beigefügt war und auch nach Zugabe von EDTA in den Lysis- sowie Elutionspuffer keine verbesserten Ergebnisse erzielt wurden, sind möglicherweise noch andere Faktoren ursächlich (z.B. geringe Löslichkeit rekombinanter Proteine in Form von „inclusion bodies“). Welche Faktoren hier eine Rolle spielen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

### 4.3 Immunreaktives CRP in verschiedenen Tierarten

Die Untersuchung von verschiedenen Tierarten zeigte positive immunreaktive cCRP-Nachweise für alle Vertreter der Überfamilie der *Caniformia*. Bei Western Blot Analysen zeigten sich sowohl bei den beiden untersuchten Hunden, als auch in den Serumproben des *Ursus arctos*, *Procyon lotor* und *Martes foina* unterschiedlich stark ausgeprägte Doppelbanden. In der Probe der *Phoca vitulina* war eine eindeutige Differenzierung der detektierten Struktur aufgrund eines stark ausgeprägten Chemilumineszenzsignals in Einzel- oder Doppelbande nicht möglich. Basierend auf dem Nachweis von Proteinbanden mittels anti-cCRP-AK ist es denkbar, dass die CRP-Proteinstruktur der *Caniformia* eng miteinander verwandt ist. Außerdem kann aufgrund der Doppelbanden im Western Blot vermutet werden, dass auch das CRP anderer in dieser Studie untersuchter *Caniformia*-Spezies glykosyliert ist. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wäre einerseits die Entnahme einer Leberprobe und Untersuchung der mRNA und andererseits die Reinigung und Sequenzierung von Serum-CRP der verschiedenen Spezies notwendig. Da die postmortale Gewinnung geringer Mengen einer Leberprobe zur Untersuchung dabei weniger Herausforderungen als die Gewinnung einer ausreichenden Serummenge zur Reinigung von nativem Serum-CRP der Wildtierspezies darstellt, wäre die cDNA-Analyse hierfür die Methode der Wahl.

Im Gegensatz zu den untersuchten *Caniformia* Spezies gelang in keiner der untersuchten anderen domestizierten Tierarten der Nachweis von immunreaktivem CRP mittels des verwendeten anti-cCRP-AK. Dies lässt sich zum einen durch die geringere Bedeutung dieses APP bei anderen Tierarten erklären und deutet darauf hin, dass eine Speziespezifität seitens des Antikörpers besteht.

Eine Limitation dieser Studie war das sehr heterogene Material und die geringe Probenzahl (n=1) pro Spezies. Sowohl die Probenqualität, als auch die Probengewinnung unterschieden sich voneinander. Auch hatten nicht alle Tiere eine Entzündung oder die zugrundeliegende Erkrankung war nicht bekannt, weshalb die Aussagekraft bezüglich variierender Proteinbandenmuster eingeschränkt ist. Somit war auch eine Untersuchung in der 2D-Gelelektrophorese aufgrund von zu geringen Serummengen nicht möglich. Zusätzlich zu dem bisher untersuchten Material wäre es wünschenswert, auch Analysen von Serumproben einheimischer *Caniformia*, wie *Canis lupus* oder *Vulpes vulpes* als Vertreter der Füchse, durchzuführen. Dies war durch einen Mangel an Probenmaterial nicht möglich. Aufgrund der generierten Ergebnisse in den Proben der anderen Tierarten dieser Überfamilie ist es jedoch wahrscheinlich, dass auch das Fuchs- resp. Wolfs- CRP durch den anti-cCRP-AK erkannt werden kann.

Aufgrund der in diesem Teil der Studie generierten Ergebnisse ist die Übertragung der Anwendung der im ersten Teil der Arbeit validierten hundespezifischen Diagnostikmethoden, welche mit dem in der Studie verwendeten AK (TECOmedical) arbeiten, auf *Caniformia*-Arten denkbar.

#### **4.4 Ausblick**

Die in dieser Studie generierten zusätzlichen Informationen über das cCRP-Protein ermöglichen sowohl die Nutzung des Wissens für diagnostische Optionen als auch die Etablierung neuer Forschungsfelder. Eine schnelle, sichere und gleichzeitig kostengünstige Diagnostik ist in der heutigen Zeit auch in der Veterinärmedizin nicht mehr wegzudenken. Dabei steht in der Kleintiermedizin, anders als bei der Überwachung von Nutztieren, der einzelne Patient im Mittelpunkt, weshalb hier Patienten-orientierte Diagnostik besonders wichtig ist. Daher bietet die Entwicklung solcher individualisierten Messmethoden ein wichtiges Feld für labordiagnostische Forschungsbereiche. Auch die genauere Identifizierung von einzelnen cCRP-Glykosylierungsmustern bei bestimmten Erkrankungsarten/-gruppen ist in diesem Zusammenhang interessant und könnte der Entwicklung neuer diagnostischer Systeme dienen, bei denen beispielsweise nicht nur das Protein selbst, sondern vielmehr auch seine Proteinmodifikation (z.B. Glykosylierung) bestimmt und für die Diagnose verwendet wird. Da bisher noch nicht bekannt ist, welche Faktoren im Einzelnen einen Einfluss auf die posttranslationalen, insbesondere die glykosidischen Modifikationen haben, könnte Grundlagenforschung in diesem Bereich möglicherweise neue Erkenntnisse zu den Abläufen von Entzündungsvorgängen hervorbringen. In diesem Zusammenhang könnte auch die Untersuchung anderer APPs hinsichtlich der Glykosylierung von Interesse sein. Da die Glykosylierung des cCRP darüber hinaus denen des hCRP ähnelt, wäre es außerdem denkbar, den Hund als mögliches Tiermodell für verschiedene humane Erkrankungen zu nutzen.

Aufgrund der immunologischen Strukturähnlichkeit des CRP von den verschiedenen Vertretern der *Caniformia* kommen Fortschritte im diagnostischen Bereich auch verwandten Wildtieren zugute. Das Anwendungsgebiet der in der Kleintiermedizin verwendeten diagnostischen Verfahren bietet eine mögliche Basis für eine effiziente Untersuchung und Therapie auch von in Gefangenschaft lebenden Wildtieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das cCRP spielt als major Akute-Phase-Protein beim Hund eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Regulation von Entzündungsprozessen. Die Bildung und Freisetzung durch Hepatozyten aufgrund eines Interleukin-Stimulus folgt dem Entzündungsreiz innerhalb von 4 Stunden. Dieser schnelle Anstieg bei akuten Entzündungsreaktionen zeichnet CRP als nützlichen Biomarker für die Überwachung von Patienten und Therapieerfolgen aus – sowohl beim Hund wie auch beim Menschen.

Ein Ziel der Arbeit war daher die Evaluierung verschiedener Schnelltestsysteme für die Messung des cCRP. Grundvoraussetzung, um gute diagnostische Testverfahren zu entwickeln, ist eine möglichst genaue Kenntnis über den zu untersuchenden Parameter. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, den aktuellen Kenntnisstand über die strukturellen Eigenschaften des cCRP-Proteins sowie seine diagnostischen Einsatzmöglichkeiten zu erweitern.

Da es sich bei dem cCRP-Protein um einen so genannten „Real-time“-Biomarker handelt, ist die Messung besonders bei Patienten in akuten Notfallsituationen diagnostisch wertvoll. Um solch eine Diagnostik durchführen zu können, sind entsprechende Schnelltestgeräte notwendig, die für den klinischen Einsatz geprüft sind. Im ersten Teil der Arbeit wurden daher drei verschiedene quantitative Schnelltestgeräte (TECO<sup>®</sup>dogCRP-quant, EUROLyser solo cCRP, LifeAssays<sup>®</sup> canine CRP) für die Messung der cCRP-Konzentration in Serumproben von caninen Patienten der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin evaluiert. Die Geräte wurden hinsichtlich ihrer Genauigkeit durch statistische Auswertung mit der Referenzmethode (ELISA) verglichen und darüber hinaus die Praktikabilität im klinischen Alltag bewertet. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ( $TE_{TECOmedical}$  69%,  $TE_{EUROLyser}$  28,2%,  $TE_{LifeAssays}$  30,3%), jedoch ist die Verwendung aller drei Schnelltestgeräte im klinischen Alltag möglich. Auch die Anwendbarkeit für Verlaufskontrollen ist möglich, allerdings ist hier zu beachten, dass immer dasselbe Testsystem verwendet werden sollte, da sich alle Geräte bezüglich Abweichung der absoluten cCRP-Konzentrationswerte unterscheiden.

Der in einem dieser Schnelltestgeräte (TECOmedical) eingesetzte, neu entwickelte anti-cCRP-Antikörper wurde in biochemischen Analysen hinsichtlich seiner Qualität untersucht und auch für die meisten immunologischen Nachweisverfahren in dieser Arbeit verwendet. Dabei zeigte sich zum einen seine speziesspezifische Detektion von CRP bei Hundartigen und zum anderen eine unspezifische Bindung an ein bisher nicht näher charakterisiertes bakterielles Protein.

Im zweiten Teil der Studie wurden weitere Details über die Struktur des cCRP-Proteins generiert. Die bisher bekannten Daten aus *in silico* Studien zur RNA- und Aminosäuresequenz konnten durch die durchgeführten biochemischen Analysen von gereinigtem, nativem Serum-cCRP größtenteils bestätigt und darüber hinaus neue Struktureigenschaften charakterisiert werden. Es wurde einerseits eine Verkürzung der primären Aminosäuresequenz von bisher angenommenen 223 auf 204 Aminosäuren im nativen cCRP festgestellt, was möglicherweise eine Bedeutung bei der Freisetzung des Proteins aus Hepatozyten spielt. Außerdem wurden die spezifischen Proteinmodifikationen bezüglich Glykosylierungen analysiert und eine Ähnlichkeit mit dem humanen CRP-Glykosylierungsmuster festgestellt.

In einem dritten Teilprojekt wurde aufgrund der immunologischen Ähnlichkeit des cCRPs die Verwandtschaft mit dem anderer Tierarten untersucht. Hier gelang der Nachweis von immunreaktivem Protein mittels des anti-cCRP-Antikörpers in Einzeltieren nur aus der Gruppe der *Caniformia*. Bei den übrigen untersuchten Tierarten der Unterfamilie der *Eutheria* war durch den Antikörper kein CRP detektierbar. Es wäre aufgrund immunologischer Gemeinsamkeiten denkbar, die diagnostischen Möglichkeiten der cCRP-Analyse der veterinärmedizinischen Praxis zukünftig auch auf Wildtiere aus der Gruppe der *Caniformia* auszuweiten.



## 6 SUMMARY

### Clinical, biochemical and immunological aspects of the canine C-reactive protein

Canine C-reactive protein is a major acute phase protein in dogs that plays an important role in initiation and regulation of inflammatory processes. It is produced in hepatocytes after interleukin stimulus and is released in the circulation where it can be detected in serum within 4 hours after initiation of the inflammatory process. Human medicine routinely uses CRP as a diagnostic measure and it has potential for the use in veterinary clinical practice as a biomarker for monitoring health status and response to therapy. Therefore, one objective of the study was to evaluate three different point-of-care (POC) systems for the measurement of cCRP. However, to establish its diagnostic possibilities, many details about the parameter cCRP still need to be elucidated. Another objective of this study was to increase knowledge about cCRP, with a focus on structural details and use within the clinical setting.

Measuring of cCRP may be particularly useful for application in emergency medicine, as it can help determine if the underlying problem is caused by an inflammatory process. In addition, it may be used in conjunction with other diagnostic measures to help determine how severe the health condition is. Point-of-care testing devices can be used to provide rapid measurement of cCRP, however testing and evaluation of their performance is necessary due to the current lack of data regarding their applicability in veterinary clinical practice. For the first part of the study, three different quantitative POC (TECO<sup>®</sup>dogCRP-quant, EUROLyser solo cCRP, LifeAssays<sup>®</sup> canine CRP) systems for measuring the cCRP-concentration in serum samples of dogs presented to the Small Animal Clinic, Freie Universität Berlin were evaluated. All assays were tested for their clinical applicability and precision was compared to the gold standard (ELISA). Results revealed distinct variations in their accuracy as well as reproducibility of values (TE<sub>TECOmedical</sub> 69%, TE<sub>EUROLyser</sub> 28,2%, TE<sub>LifeAssays</sub> 30,3%). However, all POC systems provide potential for their clinical usage not only in one-point measuring but also to monitor patients. For disease-monitoring, it is important to measure all parameters with the same POC system, because the measured cCRP-concentration varies between the assays as well as between assay and reference method.

The anti-cCRP-antibody used in the TECOmedical device was also used in the majority of immunological analyses performed, to examine its' quality and specificity. It was found that CRP could be detected by the antibody in different species from the *Caniformia* family while it was not detected in unrelated species but also reacts with some bacterial proteins, which are not specified yet.

In the second part of the study, further information about the cCRP was determined. Specifically, *in silico* data about mRNA and amino acid (aa) sequence of cCRP were confirmed by biochemical analysis and new structural properties were characterized. The primary amino acid sequence was found to be shorter in the serum cCRP (204 aa) than the mRNA codes for cCRP (223 aa). This might have an influence on cCRP release from hepatocytes as well as protein activation. Furthermore, the specific glycosylated protein modifications were analyzed and revealed similar structure to human CRP.

The importance of and immunological similarity with CRP in other species was examined in the third part of the study. CRP-protein could be detected in serum samples of different *Caniformia* species by the anti-cCRP-antibody, but failed to be detected in several species of the *Eutheria* family. However, the detection of CRP in the serum of dog-related species might increase the diagnostic possibilities for wild animals from the *Caniformia* family.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abernethy, T.J.; Avery, O.T.** (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. I. Distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C polysaccharide of *Pneumococcus*. *J Exp Med*. 73 (2), S. 173–182.
- Andersson, M.; Stenström, M.; Vatne, M.; Sevelius, E.; Jönsson, L.** (1998). Disease-related variations of the glycosylation of haptoglobin in the dog. *J Comp Pathol*. 119 (3), S. 227–238.
- Baldo, E.A.; Fletcher, T.C.** (1973). C-reactive protein-like precipitins in plaice. *Nature*. 246 (5429), S. 145–146.
- Baltz, M.L.; Beer, F.C. de; Feinstein, A.; Munn, E.A.; Milstein, C.P.; Fletcher, T.C.; March, J.F.; Taylor, J.; Bruton, C.; Clamp, J.R.; Davies, A.J.; Pepys, M.B.** (1982). Phylogenetic aspects of C-reactive protein and related proteins. *Ann NY Acad Sci*. 389, S. 49–75.
- Baumann, H.; Gauldie, J.** (1994). The acute phase response. *Immunol. Today*. 15 (2), S. 74–80.
- Baric Rafaj, R.; Kules, J.; Selanec, J.; Vrkic, N.; Zovko, V.; Zupancic, M.; Trampus Bakija, A.; Matijatko, V.; Crnogaj, M.; Mrljak, V.** (2013). Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis. *J Vet Intern Med*. 27 (5), S. 1172–1178.
- Bathen-Noethen, A.; Carlson, R.; Menzel, D.; Mischke, R.; Tipold, A.** (2008). Concentrations of Acute-Phase Proteins in Dogs with Steroid Responsive Meningitis-Arteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22 (5), S. 1149–1156.
- Bayramli, G.; Ulutas, B.** (2008). Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. *Veterinary Clinical Pathology*. 37 (3), S. 312–316.
- Burton, S.A.; Honor, D.J.; Mackenzie, A.L.; Eckersall, P.D.; Markham, R.J.; Horney, B.S.** (1994). C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. *Am. J. Vet. Res*. 55 (5), S. 613–618.
- Buttke, T.M.; Shipper, G.; Delano, E.O.; Trope, M.** (2005). C-reactive protein and serum amyloid A in a canine model of chronic apical periodontitis. *J Endod*. 31 (10), S. 728–732.
- Caldin, M.; Tasca, S.; Carli, E.; Bianchini, S.; Furlanello, T.; Martinez-Subiela, S.; Cerón, J.J.** (2009). Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Veterinary Clinical Pathology*. 38 (1), S. 63–68.
- Caspi, D.; Baltz, M.L.; Snel, F.; Gruys, E.; Niv, D.; Batt, R.M.; Munn, E.A.; Buttress, N.; Pepys, M.B.** (1984). Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*. 53 (2), S. 307–313.
- Caspi, D.; Snel, F.W.; Batt, R.M.; Bennett, D.; Rutteman, G.R.; Hartman, E.G.; Baltz, M.L.; Gruys, E.; Pepys, M.B.** (1987). C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res*. 48 (6), S. 919–921.
- Castelli, G.P.; Pognani, C.; Meisner, M.; Stuardi, A.; Bellomi, D.; Sgarbi, L.** (2004). Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care*. 8 (4), S. R234–42.
- Ceron, J.J.; Eckersall, P.D.; Martínez-Subiela, S.** (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 34 (2), S. 85–99.
- Chan, D.; Rozanski, E.; Freeman, L.** (2009). Relationship among Plasma Amino Acids, C-Reactive Protein, Illness Severity, and Outcome in Critically Ill Dogs. *J Vet Intern Med*. 23 (3), S. 559–563.
- Chase, D.; McLauchlan, G.; Eckersall, P.D.; Pratschke, J.; Parkin, T.; Pratschke, K.** (2012). Acute phase protein levels in dogs with mast cell tumours and sarcomas. *Vet Rec*. 170 (25), S. 648.
- Christensen, M.B.; Langhorn, R.; Goddard, A.; Andreassen, E.B.; Moldal, E.; Tvarijonaviciute, A.; Kirpensteijn, J.; Jakobsen, S.; Persson, F.; Kjelgaard-Hansen, M.** (2014). Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. *Can Vet J*. 55 (2), S. 161–168.
- Conner, J.G.; Eckersall, P.D.; Ferguson J.; Douglas T.A.** (1988). Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res Vet Sci*. 45 (1):107-110
- Cunningham, S.M.; Rush, J.E.; Freeman, L.M.** (2012). Systemic inflammation and endothelial dysfunction in dogs with congestive heart failure. *J Vet Intern Med*. 26 (3), S. 547–557.

- Dąbrowski, R.; Kostro, K.; Lisiecka, U.; Szczubiał, M.; Krakowski, L.** (2009). Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology*. 72 (4), S. 471–476.
- Dabrowski, R.; Kostro, K.; Szczubial, M.** (2013). Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. *Theriogenology*. 80 (5), S. 494–497.
- Dąbrowski, R.; Wawron, W.; Kostro, K.** (2007). Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology*. 67 (2), S. 321–327.
- Das, T.; Sen, AK.; Kempf, T.; Pramanik, SR.; Mandal, C.; Mandal, C.** (2003). Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. *Biochem J*. 373 (2), S. 345–355.
- Dillman, RC.; Coles, EH.** (1966). A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *Am J Vet Res*. 27 (121), S. 1769–1775.
- Dong, Q.; Wright JR.** (1996). Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J Immunol*. 156 (12), S. 4815–4820.
- Du Clos, TW.** (2000). Function of C-reactive protein. *Ann. Med.* 32 (4), S. 274–278.
- Ebersole, JL.; Cappelli, D.** (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000*. 23, S. 19–49.
- Eckersall, PD.; Bell, R.** (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 185 (1), S. 23–27.
- Eckersall, PD.; Conner, JG.; Harvie, J.** (1991). An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Vet Res Commun*. 15 (1), S. 17–24.
- Eckersall, PD.; Lawson, FP.; Bence, L.; Waterston, MM.; Lang, TL.; Donachie, W.; Fontaine, MC.** (2007). Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Vet Res*. 3 (1), S. 35.
- Eckersall, PD.; Conner, JG.; Parton, H.** (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *Vet Rec*. 124 (18), S. 490–491.
- Flatland, B.; Freeman, KP.; Friedrichs, KR.; Vap, LM.; Getzy, KM.; Evans, EW.; Harr, KE.** (2010). ASVCP quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol*. 39 (3), S. 264–277.
- Foster, JD.; Sample, S.; Kohler, R.; Watson, K.; Muir, P.; Trepanier, LA.** (2014). Serum Biomarkers of Clinical and Cytologic Response in Dogs with Idiopathic Immune-Mediated Polyarthropathy. *J Vet Intern Med*. 28 (3), S. 905–9011.
- Fransson, BA.; Bergström, A.; Wardrop, KJ.; Hagman, R.** (2007). Assessment of three automated assays for C-reactive protein determination in dogs. *Am J Vet Res*. 68 (12), S. 1281–1286.
- Fransson, BA.; Karlstam, E.; Bergstrom, A.; Lagerstedt, A.; Park, JS.; Evans, MA.; Ragle, CA.** (2004). C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 40 (5), S. 391–399.
- Galezowski, AM.; Snead, EC.; Kidney, BA.; Jackson, ML.** (2010). C-Reactive Protein as a Prognostic Indicator in Dogs with Acute Abdomen Syndrome. *J Vet Diagn Invest*. 22 (3), S. 395–401.
- Gebhardt, C.; Hirschberger, J.; Rau, S.; Arndt, G.; Krainer, K.; Schweigert, FJ.; Brunnberg, L.; Kaspers, B.; Kohn, B.** (2009). Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *J Vet Emerg Crit Care*. 19 (5), S. 450–458.
- Gewurz, H.; Zhang, XH.; Lint, TF.** (1995). Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol*. 7 (1), S. 54–64.
- Gow, AG.; Marques, AI.; Yool, DA.; Crawford, K.; Warman, SM.; Eckersall, PD.; Jalan, R.; Mellanby, RJ.** (2012). Dogs with congenital porto-systemic shunting (cPSS) and hepatic encephalopathy have higher serum concentrations of C-reactive protein than asymptomatic dogs with cPSS. *Metab Brain Dis*. 27 (2), S. 227–229.

- Green, MR.; Sambrook, J.** (op. 2012). Molecular cloning. A laboratory manual. 4. Aufl. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Griebsch, C.; Arndt, G.; Raila, J.; Schweigert, F.J.; Kohn, B.** (2009). C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Vet Clin Pathol.* 38 (4), S. 421–425.
- Gulkarov, I.; Pintucci, G.; Bohmann, K.; Saunders, PC.; Sullivan, RF.; Ferrari, G.; Mignatti, P.; Galloway, AC.** (2006). Mechanisms of c-reactive protein up-regulation in arterialized vein grafts. *Surgery.* 139 (2), S. 254–262.
- Hack, CE.; Wolbink, GJ.; Schalkwijk, C.; Speijer, H.; Hermens, WT.; van den Bosch, H.** (1997). A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunol Today.* 18 (3), S. 111–115.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166 (4), S. 557–580.
- Harvey, JW.** (1978). Feline haptoglobin. *Am J Vet Res.* 39 (4), S. 549–553.
- Heegaard, PM.; Klausen, J.; Nielsen, JP.; González-Ramón, N.; Piñeiro, M.; Lampreave, F.; Alava, MA.** (1998). The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp Biochem Phys B.* 119 (2), S. 365–373.
- Hengst, JM.** (2003). The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. *Adv Neonatal Care.* 3 (1), S. 3–13.
- Horadagoda, NU.; Knox, KM.; Gibbs, HA.; Reid, SW.; Horadagoda, A.; Edwards, SE.; Eckersall, PD.** (1999). Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec.* 144 (16), S. 437–441.
- Hurlimann, J.; Thorbecke, GJ.; Hochwald, GM.** (1966). The liver as the site of C-reactive protein formation. *J Exp Med.* 123 (2), S. 365–378.
- Hurter, K.; Spreng, D.; Rytz, U.; Schawalder, P.; Ott-Knüsel, F.; Schmökel, H.** (2005). Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Vet J.* 169 (2), S. 281–285.
- Ishida, A.; Ohno, K.; Fukushima, K.; Nakashima, K.; Takahashi, M.; Goto-Koshino, Y.; Fujino, Y.; Tsujimoto, H.** (2011). Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein. *J Vet Med Sci.* 73 (9), S. 1127–1132.
- Israeli, I.; Steiner, J.; Segev, G.; Kass, PH.; Suchodolski, JS.; Sattasathuchana, P.; Bruchim, Y.; Yudelevitch, S.; Aroch, I.** (2012). Serum pepsinogen-A, canine pancreatic lipase immunoreactivity, and C-reactive protein as prognostic markers in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Vet Intern Med.* 26 (4), S. 920–928.
- Jabs, WJ.; Lögering, BA.; Gerke, P.; Kreft, B.; Wolber, E.; Klinger, MH.; Fricke, L.; Steinhoff, J.** (2003). The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol.* 33 (1), S. 152–161.
- Jenner, E.** (1798) The Three Original Publications on Vaccination Against Smallpox. I. An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, or Cow-Pox. The Harvard Classics 1909-14.
- Jensen, AL.; Kjølgaard-Hansen, M.** (2006). Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol.* 35 (3), S. 276–286.
- Jergens, AE.; Schreiner, CA.; Frank, DE.; Niyo, Y.; Ahrens, FE.; Eckersall, PD.; Benson, TJ.; Evans, R.** (2003). A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J. Vet. Intern. Med.* 17 (3), S. 291–297.
- Jitpean, S.; Holst, BS.; Höglund, OV.; Pettersson, A.; Olsson, U.; Strage, E.; Södersten, F.; Hagman, R.** (2014). Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology,* 82 (1), S. 43-48.
- Jury, DR.; Mikkelsen, DJ.; Dunn, PJ.** (1990). Prozone effect and the immunoturbidimetric measurement of albumin in urine. *Clin Chem.* 36 (8 Pt 1), S. 1518–1519.

- Kaplan, MH.; Volanakis, JE.** (1974). Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J Immunol.* 112 (6), S. 2135–2147.
- Karlsson, I.; Hagman, R.; Johannisson, A.; Wang, L.; Karlstam, E.; Wernersson, S.** (2012). Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reprod Domest Anim.* 47 Suppl 6, S. 337–341.
- Karlsson, I.; Wernersson, S.; Ambrosen, A.; Kindahl, H.; Södersten, F.; Wang, L.; Hagman, R.** (2013). Increased concentrations of C-reactive protein but not high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis. *Vet Immunol Immunopathol.* 156 (1-2), S. 64–72.
- Kjelgaard-Hansen, M.; Jensen, A.; Houser, GA.; Jessen, L.; Kristensen, AT.** (2006). Use of serum C-reactive protein as an early marker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report. *Acta Vet Scand.* 48 (1), S. 9.
- Kjelgaard-Hansen, M.; Jensen, AL.; Kristensen, AT.** (2003a). Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol.* 32 (2), S. 81–87.
- Kjelgaard-Hansen, M.; Kristensen, AT.; Jensen, AL.** (2003b). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *J Vet Med.* 50 (3), S. 164–168.
- Kjelgaard-Hansen, M.; Jensen, AL.; Kristensen, AT.** (2004). Internal quality control of a turbidimetric immunoassay for canine serum C-reactive protein based on pooled patient samples. *Vet Clin Pathol.* 33 (3), S. 139–144.
- Klenner, S.; Bauer, N.; Moritz, A.** (2010). Evaluation of Three Automated Human Immunoturbidimetric Assays for the Detection of C-Reactive Protein in Dogs. *J Vet Diagn Invest.* 22 (4), S. 544–552.
- Kouki, MI.; Papadimitriou, SA.; Kazakos, GM.; Savas, I.; Bitchava, D.** (2013). Periodontal disease as a potential factor for systemic inflammatory response in the dog. *J Vet Dent.* 30 (1), S. 26–29.
- Kushner, I.** (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Ann NY Acad Sci.* 389, S. 39–48.
- Kushner, I.; Feldmann, G.** (1978). Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *J Exp Med.* 148 (2), S. 466–477.
- Kuwajima, S.; Okuda, K.** (1987). Affinity chromatography for C-reactive protein using p-nitrophenylphosphorylcholine as a ligand. *Clin Chim Acta.* 166 (1), S. 101–102.
- La Fuente, C. de; Monreal, L.; Ceron, J.; Pastor, J.; Viu, J.; Anor, S.** (2012). Fibrinolytic activity in cerebrospinal fluid of dogs with different neurological disorders. *J Vet Intern Med.* 26 (6), S. 1365–1373.
- Lampreave, F.; González-Ramón, N.; Martínez-Ayensa, S.; Hernández, MA.; Lorenzo, HK.; García-Gil, A.; Piñeiro, A.** (1994). Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis.* 15 (5), S. 672–676.
- Langhorn, R.; Persson, F.; Ablad, B.; Goddard, A.; Schoeman, JP.; Willeesen, JL.; Tarnow, I.; Kjelgaard-Hansen, M.** (2013). Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 24 (2) S. 174–181
- Lee, W.; Hsiao, H.; Wu, Y.; Lin, J.; Lee, Y.; Fung, H.; Chen, H.; Chen, Y.; Chu, R.** (2003). Serum C-reactive protein in dairy herds. *Can J Vet Res.* 67 (2), S. 102–107.
- Lin, L.; Liu, TY.** (1993). Isolation and characterization of C-reactive protein (CRP) cDNA and genomic DNA from *Xenopus laevis*. A species representing an intermediate stage in CRP evolution. *J Biol Chem.* 268 (9), S. 6809–6815.
- Ljungvall, I.; Höglund, K.; Tidholm, A.; Olsen, LH.; Borgarelli, M.; Venge, P.; Häggström, J.** (2010). Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. *J Vet Intern Med.* 24 (1), S. 153–159.

- Lowrie, M.; Penderis, J.; Eckersall, PD.; McLaughlin, M.; Mellor, D.; Anderson, T.** (2009). The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. *Vet J.* 182 (1), S. 125–130.
- Lowrie, M.; Penderis, J.; McLaughlin, M.; Eckersall, PD.; Anderson, T.** (2009b). Steroid Responsive Meningitis-Arteritis: A Prospective Study of Potential Disease Markers, Prednisolone Treatment, and Long-Term Outcome in 20 Dogs (2006-2008). *J Vet Intern Med.* 23 (4), S. 862–870.
- Macintyre, S.; Samols, D.; Dailey, P.** (1994). Two carboxylesterases bind C-reactive protein within the endoplasmic reticulum and regulate its secretion during the acute phase response. *J Biol Chem.* 269 (39), S. 24496–24503.
- Mackiewicz, A.** (1997). Acute phase proteins and transformed cells. *Int Rev Cytol.* 170, S. 225–300.
- Maddens, BE. J.; Daminet, S.; Demeyere, K.; Demon, D.; Smets, P.; Meyer, E.** (2010). Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol binding protein in canine urine. *Vet Immunol Immunopathol* 134 (3-4), S. 259–264.
- Martínez-Subiela, S.; Caldin, M.; Parra, MD.; Ottolini, N.; Bertolini, G.; Bernal, LJ.; García-Martínez, JD.; Cerón, JJ.** (2011). Canine C-reactive protein measurements in cerebrospinal fluid by a time-resolved immunofluorimetric assay. *J Vet Diagn Invest.* 23 (1), S. 63–67.
- Martínez-Subiela, S.; Ginel, PJ.; Cerón, JJ.** (2004). Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec.* 154 (26), S. 814–817.
- Mastorilli, C.; Dondi, F.; Agnoli, C.; Turba, ME.; Vezzali, E.; Gentilini, F.** (2007). Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). *J Vet Intern Med* 21 (1), S. 3–10.
- Mayer, MM.; Hammer, CH.; Michaelis, DW.; Shin, ML.** (1979). Immunological mediated membrane damage: The mechanism of complement action and the similarity of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Immunochemistry* (15), S. 813–831.
- McClure, V.; van Schoor, M.; Thompson, PN.; Kjelgaard-Hansen, M.; Goddard, A.** (2013). Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *J Am Vet Med Assoc.* 243 (3), S. 361–366.
- McDonald, TL.; Larson, MA.; Mack, DR.; Weber, A.** (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet Immunol Immunopathol.* 83 (3-4), S. 203–211.
- McGrotty, YL.; Knottenbelt, MC.; Ramsey, IK.; Reid, SW. J.; Eckersall, PD.** (2004). Evaluation of a rapid for canine C-reactive protein. *Vet Rec.* (154), S. 175–176.
- Merlo, A.; Rezende, BC.; Franchini, ML.; Simões, DM.; Lucas, SR.** (2007). Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. *J Am Vet Med Assoc.* 230 (4), S. 522–526.
- Mischke, R.; Waterston, M.; Eckersall, PD.** (2007). Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *Vet J.* 174 (1), S. 188–192.
- Mitchell, KD.; Kruth, SA.; Wood, RD.; Jefferson, B.** (2009). Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* 23 (3), S. 585–591.
- Mukorera, V.; Dvir, E.; van der Merwe, LL.; Goddard, A.** (2011). Serum C-reactive protein concentration in benign and malignant canine spirocercosis. *J. Vet. Intern. Med.* 25 (4), S. 963–966.
- Mylonakis, ME.; Ceron, JJ.; Leontides, L.; Rallis, TS.; Koutinas, AF.** (2012). Serum acute phase proteins in dogs with symptomatic esophageal spirocercosis. *Vet Parasitol.* 190 (1-2), S. 191–195.
- Mylonakis, ME.; Ceron, JJ.; Leontides, L.; Siarkou, VI.; Martínez, S.; Tvarijonaviciute, A.; Koutinas, AF.; Harrus, S.** (2011). Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *J Vet Intern Med.* 25 (4), S. 811–817.
- Nakamura, M.; Takahashi, M.; Ohno, K.; Koshino, A.; Nakashima, K.; Setoguchi, A.; Fujino, Y.; Tsujimoto, H.** (2008). C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci.* 70 (2), S. 127–131.

- Nielsen, L.; Toft, N.; Eckersall, PD.; Mellor, DJ.; Morris, JS.** (2007). Serum C-Reactive Protein Concentration as an Indicator of Remission Status in Dogs with Multicentric Lymphoma. *J Vet Inter Med.* 21, S. 1231–1236.
- Nikolic Nielsen, L.; Kjelgaard-Hansen, M.; Kristensen, AT.** (2013). Monocyte chemotactic protein-1 and other inflammatory parameters in Bernese Mountain dogs with disseminated histiocytic sarcoma. *Vet J.* 198 (2), S. 424–428.
- Nivy, R.; Caldin, M.; Lavy, E.; Shaabon, K.; Segev, G.; Aroch, I.** (2014). Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocerosis and their association with esophageal neoplasia - A prospective cohort study. *Vet Parasitol.* In press
- Ohno, K.; Yokoyama, Y.; Nakashima, K.; Setoguchi, A.; Fujino, Y.; Tsujimoto, H.** (2006). C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *J Vet Med Sci.* 68 (12), S. 1275–1279.
- Osmand, AP.; Friedenson, B.; Gewurz, H.; Painter, RH.; Hofmann, T.; Shelton, E.** (1977). Characterization of C-reactive protein and the complement subcomponent C1t as homologous proteins displaying cyclic pentameric symmetry (pentraxins). *Proc Natl Acad Sci USA.* 74 (2), S. 739–743.
- Otobe, K.; Ito, T.; Sugimoto, T.; Yamamoto, S.** (2000). C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Lab Anim.* 34 (4), S. 434–438.
- Otobe, K.; Sugimoto, T.; Jinbo, T.; Honda, M.; Kitao, S.; Hayashi, S.; Shimizu, M.; Yamamoto, S.** (1998). Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Vet Res Commun.* 22 (2), S. 77–85.
- Paim, FC.; Da Silva, AS.; Paim, CV.; França, RT.; Costa, MM.; Duarte, MM. M. F.; da Silva, CB.; Mazzanti, CM. A.; Monteiro, SG.; Lopes, ST. A.** (2012). Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Parasitol.* 192, S.137–142.
- Paltrinieri, S.** (2008). The feline acute phase reaction. *Vet J.* 177 (1), S. 26–35.
- Parra, MD.; Tuomola, M.; Cabezas-Herrera, J.; Cerón, JJ.** (2005). Use of a time-resolved immunofluorometric assay for determination of canine C-reactive protein concentrations in whole blood. *Am J Vet Res.* 66 (1), S. 62–66.
- Parra, MD.; Tuomola, M.; Cabezas-Herrera, J.; Cerón, JJ.** (2006). Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Vet Res Commun.* 30 (2), S. 113–126.
- Pépin, M.; Pardon, P.; Lantier, F.; Marly, J.; Levieux, D.; Lamand, M.** (1991). Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in lambs: kinetics of bacterial dissemination and inflammation. *Vet Microbiol.* 26 (4), S. 381–392.
- Pepys, MB.** (1981). C-reactive protein fifty years on. *Lancet.* 1 (8221), S. 653–657.
- Pepys, MB.; Dash, AC.; Fletcher, TC.; Richardson, N.; Munn, EA.; Feinstein, A.** (1978). Analogues in other mammals and in fish of human plasma proteins, C-reactive protein and amyloid P component. *Nature.* 273 (5658), S. 168–170.
- Pepys, MB.; Hirschfield, GM.** (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111 (12), S. 1805–1812.
- Petersen, HH.; Nielsen, JP.; Heegaard, PM.** (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 35 (2), S. 163–187.
- Planellas, M.; Bassols, A.; Siracusa, C.; Saco, Y.; Giménez, M.; Pato, R.; Pastor, J.** (2009). Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. *Vet Clin Pathol.* 38 (3), S. 348–352.
- Planellas, M.; Cuenca, R.; Tabar, M.; Bertolani, C.; Poncet, C.; Closa, JM.; Lorente, J.; Ceron, JJ.; Pastor, J.** (2012). Evaluation of C-reactive protein, haptoglobin and cardiac troponin 1 levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome. *BMC Vet Res.* 8, S. 152.
- Plickert, HD.; Einspanier, R.; Arndt, G.; Brunenberg, L.; Kohn, B.** (2011). Evaluation of a point-of-care test for canine C-reactive protein. *Vet Clin Pathol.* 40 (3), S. 384–388.

- Raila, J.; Schweigert, FJ.; Kohn, B.** (2011). C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. *J Vet Diagn Invest.* 23 (4), S. 710–715.
- Rikihisa, Y.; Yamamoto, S.; Kwak, I.; Iqbal, Z.; Kociba, G.; Mott, J.; Chichanasiriwithaya, W.** (1994). C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol.* 32 (4), S. 912–917.
- Riley, RF.; Zontine, W.** (1972). Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J Lab Clin Med.* 80 (5), S. 698–703.
- Robey, FA.; Jones, KD.; Tanaka, T.; Liu, TY.** (1984). Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem.* 259 (11), S. 7311–7316.
- Robey, FA.; Liu, TY.** (1981). Limulin: a C-reactive protein from *Limulus polyphemus*. *J Biol Chem.* 256 (2), S. 969–975.
- Rush, JE.; Lee, ND.; Freeman, LM.; Brewer, B.** (2006). C-reactive protein concentration in dogs with chronic valvular disease. *J Vet Intern Med.* 20 (3), S. 635–639.
- Saunders, AB.; Smith, BE.; Fosgate, GT.; Suchodolski, JS.; Steiner, JM.** (2009). Cardiac troponin I and C-reactive protein concentrations in dogs with severe pulmonic stenosis before and after balloon valvuloplasty. *J Vet Cardiol.* 11 (1), S. 9–16.
- Schettlers, TP.; Kleuskens, JA.; van de Crommert, J.; Leeuw, PW. de; Finizio, A.; Gorenflot, A.** (2009). Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Vet Parasitol.* 162 (1-2), S. 7–15.
- Selting, KA.; Sharp, CR.; Ringold, R.; Knouse, J.** (2013). Serum thymidine kinase 1 and C-reactive protein as biomarkers for screening clinically healthy dogs for occult disease. *Vet Comp Oncol.* Open access
- Seo, K.; Lee, J.; Ahn, J.; Lee, H.; Hwang, C.; Youn, H.; Lee, C.** (2012). C-reactive protein as an indicator of inflammatory responses to experimentally induced cystitis in dogs. *J Vet Sci.* 13 (2), S. 179–185.
- Sheahan, D.; Bell, R.; Mellanby, RJ.; Gow, AG.; Friend, E.; Heller, J.; Bence, LM.; Eckersall, PD.** (2010). Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease. *Vet Rec.* 167 (23), S. 895–899.
- Shine, B.; Beer, FC. de; Pepys, MB.** (1981). Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. *Clin Chim Acta.* 117 (1), S. 13–23.
- Shrive, AK.; Cheetham, GM.; Holden, D.; Myles, DA.; Turnell, WG.; Volanakis, JE.; Pepys, MB.; Bloomer, AC.; Greenhough, TJ.** (1996). Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat Struct Biol.* 3 (4), S. 346–354.
- Tagata, K.; Yokoyama, S.; Ginbo, T.; Honda, M.; Okimura, T.; Odakura, M.; Nomura, M.; Yamamoto, S.** (1996). Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Vet Res Commun.* 20 (1), S. 21–30.
- Takiguchi, M.; Fujinaga, T.; Naiki, M.; Mizuno, S.; Otomo, K.** (1990). Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. *Am J Vet Res.* 51 (8), S. 1215–1220.
- Tecles, F.; Spiranelli, E.; Bonfanti, U.; Cerón, JJ.; Paltrinieri, S.** (2005). Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J Vet Intern Med.* 19 (6), S. 865–870.
- Thompson, D.; Pepys, MB.; Wood, SP.** (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* 7 (2), S. 169–177.
- Tillett, WS.; Francis, T.** (1930). Serological Reactions in Pneumonia with a non-protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *J Exp Med.* 52 (4), S. 561–571.
- Toniatti, C.; Arcone, R.; Majello, B.; Ganter, U.; Arpaia, G.; Ciliberto, G.** (1990). Regulation of the human C-reactive protein gene, a major marker of inflammation and cancer. *Mol Biol Med.* 7 (3), S. 199–212.

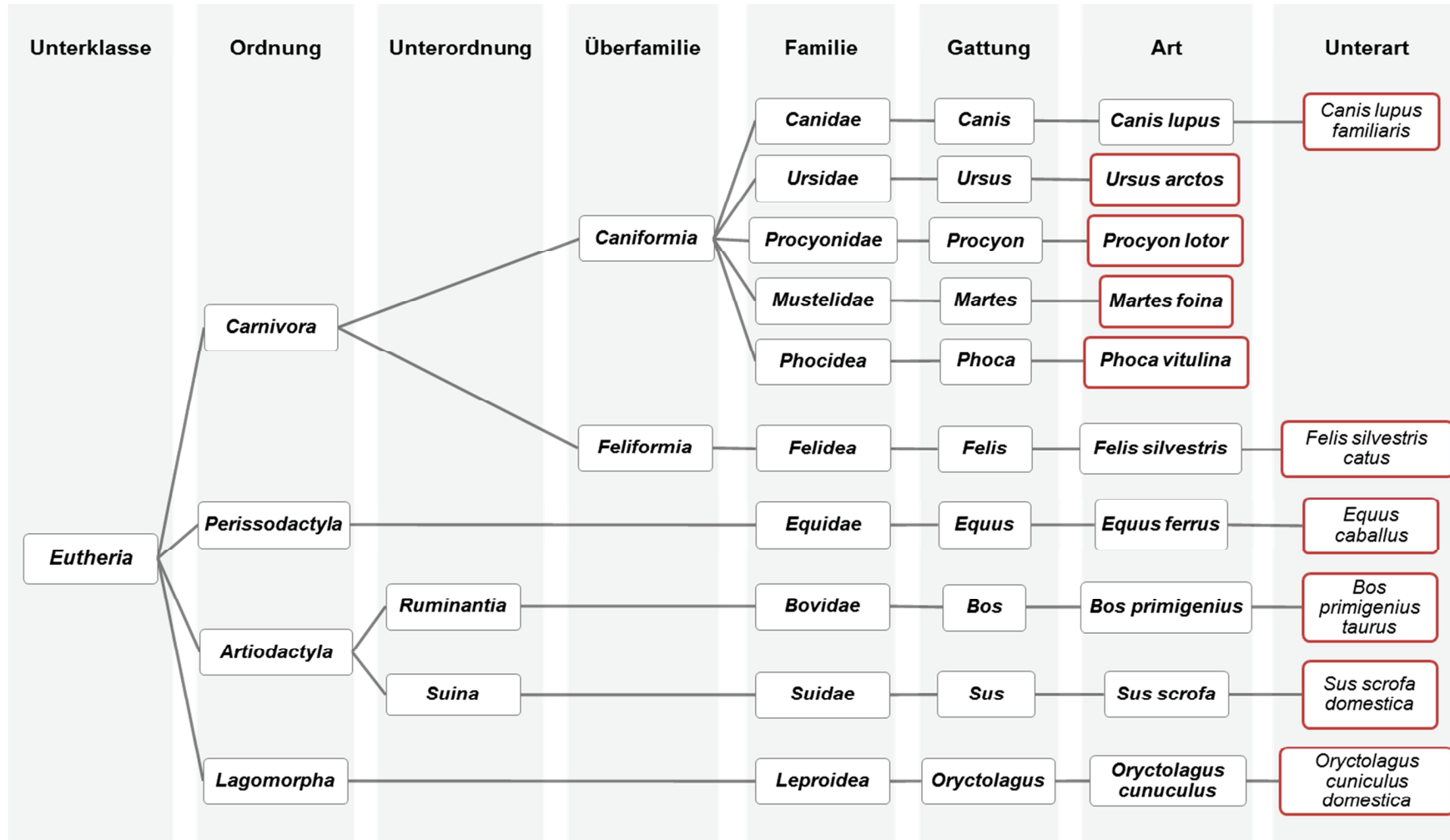


- van Vugt, SF.; Broekhuizen, BD.; Lammens, C.; Zuithoff, NP.; Jong, PA. de; Coenen, S.; Ieven, M.; Butler, CC.; Goossens, H.; Little, P.; Verheij, TJ.** (2013). Use of serum C reactive protein and procalcitonin concentrations in addition to symptoms and signs to predict pneumonia in patients presenting to primary care with acute cough: diagnostic study. *BMJ Group*.
- Viitanen, SJ.; Laurila, HP.; Lilja-Maula, LI.; Melamies, MA.; Rantala, M; Rajamaki, MM.** (2014). Serum C-reactive protein as a diagnostic biomarker in dogs with bacterial respiratory diseases. *J Vet Intern Med.* 28 (1), S. 84–91.
- Volanakis, JE.** (1982). Complement activation by C-reactive Protein complexes. *Ann NY Acad Sci.* 389, S. 235–250.
- Volanakis, JE.** (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol.* 38 (2-3), S. 189–197.
- Volanakis, JE.; Clements, WL. Schrohenloher RE.** (1978). C-Reactive protein: Purification by affinity chromatography and physicochemical characterization. *J Immunol Methods.* 23, S 285-295
- Whitehead, AS.; Bruns, GA.; Markham, AF.; Colten, HR.; Woods, DE.** (1983). Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localization of the gene to chromosome 1. *Science.* 221 (4605), S. 69–71.
- Whittemore, J.; Marcum, B.; Mawby, D.; Coleman, M.; Hacket, T.; Lappin, M.** (2011). Associations among Albuminuria, C-Reactive Protein Concentrations, Survival Predictor Index Scores, and Survival in 78 Critically Ill Dogs. *J Vet Intern Med.* 25 (4), S. 818–824.
- Wilson, AM.; Ryan, MC.; Boyle, AJ.** (2006). The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: Risk marker or pathogen. *Int J Cardiol.* 106 (3), S. 291–297.
- Woo, P.; Korenberg, JR.; Whitehead, AS.** (1985). Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 260 (24), S. 13384–13388.
- Yamamoto, M.; Katoh, N.; Adachi, Y.** (1998). The presence of two low molecular mass proteins immunologically related to 14 kilodalton serum amyloid A in the lipoprotein fraction and their decreased serum concentrations in calves with experimentally induced pneumonia. *J Vet Med Sci.* 60 (2), S. 181–187.
- Yamamoto, S.; Miyaji, S.; Abe, N.; Otabe, K.; Furukawa, E.; Naiki, M.** (1993a). Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. *Vet Res Commun,* S. 259–266.
- Yamamoto, S.; Shida, T.; Miyaji, S.; Santsuka, H.; Fujise, H.; Mukawa, K.; Furukawa, E.; Nagae, T.; Naiki, M.** (1993b). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Commun.* 17 (2), S. 85–93.
- Yamamoto, S.; Shida, T.; Okimura, T.; Otabe, K.; Honda, M.; Ashida, Y.; Furukawa, E.; Sarikaputi, M.; Naiki, M.** (1994). Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Vet Q.* 16 (2), S. 74–77.
- Yamamoto, S.; Tagata, K.; Nagahata, H.; Ishikawa, Y.; Morimatsu, M.; Naiki, M.** (1992). Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. *Vet Immunol Immunopathol.* 30 (4), S. 329–339.
- Yamashita, K.; Fujinaga, T.; Miyamoto, T.; Hagio, M.; Izumisawa, Y.; Kotani, T.** (1994). Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci.* 56 (3), S. 487–492.
- Zachowski, A.** (1993). Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 294 (Pt 1), S. 1–14.
- Zouki, C.; Beauchamp, M.; Baron, C.; Filep, JG.** (1997). Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest.* 100 (3), S. 522–529.

## 8 ANHANG

### Anhang I.

Darstellung der Klassifikation der untersuchten Spezies in der Systematik der Eutheria. Die rot umrandeten Spezies stellen jeweils die in dieser Arbeit untersuchten Tierarten dar:



## Anhang II

Übersicht der Studien über die cCRP-Konzentration bei Hunden mit verschiedenen Erkrankungen (bis April 2014)

Kategorie	Erkrankung	Autor	Titel der Publikation	Jahr	Journal
Immunologische Erkrankungen	Immun-hämolytische Anämie (IHA)	Griebsch et al.	C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia	2009	Vet Clin Pathol
		Mitchell et al.	Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia	2009	J Vet Intern Med
	Inflammatory bowel disease (IBD)	Jergens et al.	A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease	2003	J Vet Intern Med
	Polyarthritis/	Foster et al.	Serum Biomarkers of Clinical and Cytologic Response in Dogs with Idiopathic Immune-Mediated Polyarthropathy	2014	J Vet Intern Med
	Polyarthropathien	Kjelgaard-Hansen et al.	Use of serum C-reactive protein as an early marker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report	2006	Acta Vet Scand
Ohno et al.		C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis	2006	J Vet Med Sci	
Infektion	Atemwegsinfektionen	Viitanen et al.	Serum C-reactive protein as a diagnostic biomarker in dogs with bacterial respiratory diseases	2014	J Vet Intern Med
	Babesiose	Baric Rafaj et al.	Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis	2013	J Vet Intern Med
	Ehrlichiose	Mylonakis et al.	Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis	2011	J Vet Intern Med
	Leptospirose	Mastrorilli et al.	Clinicopathologic features and outcome predictors of Leptospira interrogans Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004)	2007	J Vet Intern Med
	Parvovirose	McClure et al.	Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus	2013	J Am Vet Med Assoc
	Pyometra	Dąbrowski et al.	Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra	2007	Theriogenology
		Dąbrowski et al.	Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications	2009	Theriogenology

<b>Infektion</b>	Pyometra	Dabrowski et al.	Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra	2013	Theriogenology
		Fransson et al.	C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs	2004	J Am Anim Hosp Assoc
		Jitpean et al.	Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra	2014	Theriogenology
		Karlsson et al.	Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra	2012	Repro Domest Anim
	SIRS/Sepsis	Karlsson et al.	Increased concentrations of C-reactive protein but not high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis	2013	Vet Immunol Immunopathol
		Gebhardt et al.	Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis	2009	J Vet Emerg Crit Care
	Spirocericose	Mukorera et al.	Serum C-reactive protein concentration in benign and malignant canine spirocercosis	2011	J Vet Intern Med
		Mylonakis et al.	Serum acute phase proteins in dogs with symptomatic esophageal spirocercosis	2012	Vet Parasitol
		Nivy et al.	Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocercosis and their association with esophageal neoplasia - A prospective cohort study	2014	Vet Parasitol
	Systemische Entzündung	Christensen et al.	Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs	2014	Can Vet J
Kouki et al.		Periodontal disease as a potential factor for systemic inflammatory response in the dog	2013	J Vet Dent	
<b>Kardiologie</b>	Gefäßtransplantation	Gulkarov et al.	Mechanisms of c-reactive protein up-regulation in arterialized vein grafts	2006	Surgery
	Klappenerkrankungen	Langhorn et al.	Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation	2013	J Vet Emerg Crit Care
		Ljungvall et al.	Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs	2010	J Vet Intern Med
		Saunders et al.	Cardiac troponin I and C-reactive protein concentrations in dogs with severe pulmonic stenosis before and after balloon valvuloplasty	2012	J Vet Intern Med
	Systemische Entzündung	Cunningham et al.	Systemic inflammation and endothelial dysfunction in dogs with congestive heart failure		

<b>Onkologische Erkrankungen</b>	Histiozytäres Sarkom	Nikolic Nielsen et al.	Monocyte chemotactic protein-1 and other inflammatory parameters in Bernese Mountain dogs with disseminated histiocytic sarcoma	2013	Vet J
	Lymphatische Neoplasien	Mischke et al.	Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia	2007	Vet J
	Lymphom	Merlo et al.	Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy	2007	J Am Vet Med Assoc
		Nielsen et al.	Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma	2007	J Vet Intern Med
	Mamma Tumor	Planellas et al.	Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors	2009	Vet Clin Pathol
	Mastzelltumor / Sarkom	Chase et al.	Acute phase protein levels in dogs with mast cell tumours and sarcomas	2012	Vet Rec
	Verschiedenes	Tecles et al.	Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog.	2005	J Vet Intern Med
<b>Neurologische Erkrankungen</b>	Steroid-responsive Meningitis	Bathen-Noethen et al.	Concentrations of acute-phase proteins in dogs with steroid responsive meningitis-arteritis	2008	J Vet Intern Med
		Lowrie et al.	The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs	2009	Vet J
		Lowrie et al.	Steroid responsive meningitis-arteritis: a prospective study of potential disease markers, prednisolone treatment, and long-term outcome in 20 dogs (2006-2008)	2009	J Vet Intern Med
	Verschiedenes	La Fuente et al.	Fibrinolytic activity in cerebrospinal fluid of dogs with different neurological disorders	2012	J Vet Intern Med
<b>Sonstige</b>	Akutes Abdomen	Galezowski et al.	C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome	2010	J Vet Diagn Invest
	Hyperadrenokortizismus	Caldin et al.	Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions	2009	Vet Clin Pathol
	Magendrehung	Israeli et al.	Serum pepsinogen-A, canine pancreatic lipase immunoreactivity, and C-reactive protein as prognostic markers in dogs with gastric dilatation-volvulus	2012	J Vet Intern Med
	Nierenerkrankungen	Raila et al.	C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease	2011	J Vet Diagn Invest

<b>Sonstige</b>	Oberer Respirationstrakt	Sheahan et al.	Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease	2010	Vet Rec
		Planellas et al.	Evaluation of C-reactive protein, haptoglobin and cardiac troponin 1 levels in brachycephalic dogs with upper airway obstructive syndrome	2012	BMC Vet Res
	Osteoarthritis	Hurter et al.	Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis	2005	Vet J
	Peridontitis	Buttke et al.	C-reactive protein and serum amyloid A in a canine model of chronic apical periodontitis	2005	J Endod
	Porto-systemischer Shunt	Gow et al.	Dogs with congenital porto-systemic shunting (cPSS) and hepatic encephalopathy have higher serum concentrations of C-reactive protein than asymptomatic dogs with cPSS	2012	Metab Brain Dis
	Verschiedenes	Burton et al.	C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms	1994	Am J Vet Res
		Chan et al.	Relationship among plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity, and outcome in critically ill dogs	2009	J Vet Intern med
		Ishida et al.	Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein	2011	J Vet Med Sci
		Nakamura et al.	C-reactive protein concentration in dogs with various diseases	2008	J Vet Med Sci
		Yamamoto et al.	Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas	1993	Vet Res Commun
Whittemore et al.	Associations among albuminuria, C-reactive protein concentrations, survival predictor index scores, and survival in 78 critically ill dogs	2011	J Vet Intern Med		

### Anhang III

Übersicht der Publikationen zu verschiedenen automatisierten und Schnelltestgeräten für die Messung der cCRP-Konzentration (bis April 2014)

Testsystem	Autor	Titel der Publikation	Jahr	Journal
<b>ELISA</b>	Eckersall et al.	An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein	1989	Vet Rec
	Fransson et al.	Assessment of three automated assays for C-reactive protein determination in dogs	2007	Am J Vet Res
	Kjelgaard-Hansen et al.	Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum	2003	J Vet Med
	Maddens et al.	Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol binding protein in canine urine	2010	Vet Immunol Immunopathol
	Yamamoto et al.	Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test	1994	Vet Q
	Yamamoto et al.	Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties	1992	Vet Immunol Immunopathol
<b>Immunfluorometrie</b>	Martínez-Subiela et al.	Canine C-reactive protein measurements in cerebrospinal fluid by a time-resolved immunofluorimetric assay	2011	J Vet Diagn Invest
	Parra et al.	Use of a time-resolved immunofluorometric assay for determination of canine C-reactive protein concentrations in whole blood	2005	Am J Vet Res
	Jergens et al.	Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum	2006	Vet Res Commun
<b>Immunturbidometrie</b>	Eckersall et al.	An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein	1991	Vet Res Commun
	Kjelgaard-Hansen et al.	Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration	2003	Vet Clin Pathol
	Kjelgaard-Hansen et al.	Internal quality control of a turbidimetric immunoassay for canine serum C-reactive protein based on pooled patient samples	2004	Vet Clin Pathol
	Klenner et al.	Evaluation of three automated human immunoturbidimetric assays for the detection of C-reactive protein in dogs	2010	J Vet Diagn Invest
<b>Latex-Agglutination</b>	Fransson et al.	Assessment of three automated assays for C-reactive protein determination in dogs	2007	Am J Vet Res
	Tagata et al.	Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog	1996	Vet Res Commun
	Yamamoto et al.	Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test	1994	Vet Q
<b>Radial Immunodiffusion</b>	Conner et al.	Acute phase response in the dog following surgical trauma	1988	Res Vet Sci

<b>Schnelltest (qualitativ)</b>	McGrotty et al.	Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein	2004	Vet Rec
	Plickert et al.	Evaluation of a point-of-care test for canine C-reactive protein	2011	Vet Clin Pathol



## Anhang IV

ASVCP Vorgaben zu statistischen Grenzwerten für Methoden, die neu etabliert werden sollen (Stand März 2013):

### RECOMMENDATIONS FOR ANALYTICAL COEFFICIENT OF VARIATION, BIAS AND TOTAL ERROR BASED ON BIOLOGIC VARIATION OF VARIOUS BIOCHEMICAL AND HAEMATOLOGICAL ANALYTES IN DOGS

Information from the Literature				Traditional Quality Specifications Based on Biologic Variation <sup>2</sup>									Alternative TE Based on Biologic Variation <sup>3</sup>			Index of Individuality <sup>4</sup> (category <sup>5</sup> )
Analyte	CVg = Betwdog <sup>1</sup>	CVi = Withindog <sup>1</sup>	CVa <sup>1</sup>	CV Opt <sup>A</sup>	CV Des <sup>B</sup>	CV Min <sup>C</sup>	Bias Opt <sup>D</sup>	Bias Des <sup>E</sup>	Bias Min <sup>F</sup>	TE Opt <sup>G</sup>	TE Des <sup>H</sup>	TE Min <sup>I</sup>	Alt TE Opt <sup>J</sup>	Alt TE Des <sup>K</sup>	Alt TE Min <sup>L</sup>	
RBC	4.4	5.4	2.8	1.35	2.70	4.05	0.87	1.74	2.61	3.10	6.20	9.29	2.23	4.46	6.68	0.73 (Intermediate)
Hct	5.2	6.4	1.1	1.6	3.20	4.80	1.03	2.06	3.09	3.67	7.34	11.01	2.64	5.28	7.92	0.80 (Intermediate)
Hgb	4.7	5.9	2.9	1.48	2.95	4.43	0.94	1.89	2.83	3.38	6.76	10.14	2.44	4.87	7.31	0.72 (Intermediate)
WBC	12.3	12.1	3.7	3.03	6.05	9.08	2.16	4.31	6.47	7.16	14.29	21.45	5.00	9.98	14.98	0.97 (Intermediate)
ALT	23.7	9.7	3.2	2.43	4.85	7.28	3.20	6.40	9.60	7.21	14.40	21.61	4.01	8.00	12.01	2.32 (High)
AST	10.9	11.4	3.3	2.85	5.70	8.55	1.97	3.94	5.91	6.67	13.35	20.02	4.70	9.41	14.11	0.92 (Intermediate)
ALP	34.2	8.6	1.7	2.15	4.30	6.45	4.41	8.82	13.22	7.96	15.92	23.86	3.55	7.10	10.64	3.90 (High)
Alb	3.0	2.4	1.6	0.60	1.20	1.80	0.46	0.93	1.39	1.45	2.91	4.36	0.99	1.98	2.97	1.04 (Intermediate)
TP	3.1	2.6	1.1	0.65	1.30	1.95	0.51	1.01	1.52	1.58	3.16	4.74	1.07	2.15	3.22	1.10 (Intermediate)
Creatinine	12.9	14.6	2.9	3.65	7.30	10.95	2.44	4.88	7.31	8.46	16.93	25.38	6.02	12.05	18.07	0.87 (Intermediate)
Cholesterol	15.1	7.3	3.0	1.83	3.65	5.48	2.10	4.19	6.29	5.12	10.22	15.33	3.02	6.02	9.04	1.91 (High)
Glucose	3.8	9.5	3.7	2.38	4.75	7.13	1.28	2.56	3.84	5.21	10.40	15.60	3.93	7.84	11.76	0.37 (Low)
Fructosamine	4.2	11.1	2.8	2.78	5.55	8.33	1.48	2.97	4.45	6.07	12.13	18.20	4.59	9.16	13.75	0.37 (Low)
Potassium	3.6	3.3	0.1	0.83	1.65	2.48	0.61	1.22	1.83	2.07	3.94	5.92	1.37	2.72	4.09	1.09 (Intermediate)
Total T4	17.2	17.0	4.0	4.25	8.50	12.75	3.02	6.05	9.07	10.03	20.08	30.11	7.01	14.03	21.04	0.99 (Intermediate)
Ctsh	43.6	13.6	8.8	3.40	6.80	10.20	5.71	11.42	17.13	11.32	22.64	33.96	5.61	11.22	16.83	2.69 (High)
Iron	17.2	17.8	0.7	4.45	8.90	13.35	3.09	6.19	9.28	10.43	20.88	31.31	7.34	14.69	22.03	0.97 (Intermediate)
Fibrinogen	19.0	17.1	2.8	4.28	8.56	12.84	3.20	6.39	9.59	10.26	20.51	30.78	7.06	14.12	21.19	1.10 (Intermediate)
CRP	29.3	24.3	7.2	6.08	12.16	18.24	4.76	9.52	14.27	14.79	29.58	44.37	10.03	20.06	30.10	1.16 (Intermediate)

**RECOMMENDATIONS FOR ANALYTICAL COEFFICIENT OF VARIATION, BIAS AND TOTAL ERROR BASED ON BIOLOGIC VARIATION OF VARIOUS BIOCHEMICAL AND HAEMATOLOGICAL ANALYTES IN DOGS**

a-1-AGP	67.0	9.6	8.1	2.40	4.80	7.20	8.46	16.92	25.38	12.42	24.84	37.26	3.96	7.92	11.88	5.33 (High)
Haptoglobin	20.2	17.0	4.9	4.25	8.50	12.75	3.30	6.60	9.90	10.31	20.63	30.94	7.01	14.03	21.04	1.14 (Intermediate)

CV = coefficient of variation.

CVa = analytical CV

CVi = within dog CV

CVg = between dog CV

**Superscript Designations:**

A = CV Opt = recommended optimal analytical CV based on  $CVa \leq 0.25 CVi$

B = CV Des = recommended desirable analytical CV based on  $CVa \leq 0.5 CVi$

C = CV min = recommended minimally acceptable analytical CV based on  $CVa \leq 0.75 CVi$

D = Bias opt = recommended optimal Bias based on  $B \leq 0.125(CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

E = Bias Des = recommended desirable Bias based on  $B \leq 0.250 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

F = Bias min = recommended minimally acceptable Bias based on  $B \leq 0.375(CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

G = TE Opt = recommended optimal TE based on  $TEa \leq 1.65(0.25CVi) + 0.125(CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

H = TE Des = recommended desirable TE based on  $TEa \leq 1.65 (0.50CVi) + 0.250 (CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

I = TE min = recommended minimally acceptable TE based on  $TEa \leq 1.65 (0.75CVi) + 0.375(CVi^2 + CVg^2)^{1/2}$

J = Alt TE Opt = recommended optimal TE based on  $TEa \leq 1.65 (CV Opt)$  – calculation from Oosterhuis, WP, Gross Overestimation of Total Error Based on Biologic Variation, Letter to the Editor, *Clin Chem* 57:9 (2011), pp. 1334-1336.

## RECOMMENDATIONS FOR ANALYTICAL COEFFICIENT OF VARIATION, BIAS AND TOTAL ERROR BASED ON BIOLOGIC VARIATION OF VARIOUS BIOCHEMICAL AND HAEMATOLOGICAL ANALYTES IN DOGS

K = Alt TE Des = recommended desirable TE based on  $TEa \leq 1.65$  (CV Des) – calculation from Oosterhuis, WP, Gross Overestimation of Total Error Based on Biologic Variation, Letter to the Editor, *Clin Chem* 57:9 (2011), pp. 1334-1336.

L = Alt TE min = recommended desirable TE based on  $TEa \leq 1.65$  (CV Min) – calculation from Oosterhuis, WP, Gross Overestimation of Total Error Based on Biologic Variation, Letter to the Editor, *Clin Chem* 57:9 (2011), pp. 1334-1336.

1 = Asger Lunderoff Jensen and Mads Kjelgaard-Hansen Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol*. September 2006;35(3):270-80.

2 = Calculation formulas from:

- (a) Fraser CG, Petersen PH, Libeer JC, et al. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* 1997;34:8-12.
- (b) Fraser, CG. Chapter 2: Quality Specifications, *Biological Variation: From Principles to Practice*. AACC Press. 2001, p.29-66.
- (c) Sciacovelli, L, Secchiero, S., Zarlo, L and Plebani, M. External Quality Assessment Schemes: Need for Recognized Requirements. *Clinica Chimica Acta* 309 (2001): 183-199

3 = Calculation formula using CV opt, CV des and CV min from Oosterhuis, WP, Gross Overestimation of Total Error Based on Biologic Variation, Letter to the Editor, *Clin Chem* 57:9 (2011): 1334-1336.

4 = Index of individuality (II) =  $CVb / \text{square root of } (CVi^2 + CVa^2)$ . Interpretation:  $> 1.7$  = high index of individuality; reference change value likely to provide better determination of significant difference in sequential analyses; use of 95% population-based reference interval may hamper diagnostic sensitivity.  $< 0.7$  = low index of individuality; use of 95% population-based reference interval is valid. Between  $0.7 - 1.7$  = reference change value may be of benefit in determining significant difference in sequential analyses.

Note: the II will change with assays having a CVa different from that presented in this table. See CG Fraser, *Biologic Variation. From Principles to Practice*. AACC Press, 2001, p. 29-66.

5 = categories of II = High ( $> 1.7$ ), intermediate ( $0.7 - 1.7$ ), low ( $< 0.7$ )

Quelle: <http://www.asvcp.org/pubs/qas/newQas/PDF/FINAL%20ADDENDUM%20for%20TEa%20Biochem%20guideline.pdf>

**Anhang V.** Genomisch deduzierte cCRP-cDNA-Sequenz (NCBI Accession No. XM\_545746):

5' ATG GAG AAG CTG TGG CCT TGT CTC CTG GTC CTC ATG AAC CTC CCT GGT  
GCT TTT CTC CAG ATA GAC CTG GAC GAA AAA GCC TTC GTG TTC CCC AGA GAA  
TCA GAG AAT TCC TAC GTG ATC CTG TTT CCT CAG TTG CAG AAG CCG ATG AAG  
GCT TTC ACC GTG TGC CTG CAG GTC TAT ACG GAC TTG ACG CGC CCG CAC AGC  
CTC TTC TCT TAC GCC ACC AAG TCA CAA AGC AAT GAG ATC CTC CTC TTC AAG  
GAG AGG CCC GGC TTG TTC AGC GTA TCC GTG GGC GGA TCT GAC GCC TTC ATC  
AAT TTT CCT CAG AAG TTC TAC GCG CCT CAG CAC TTC TGC GTC ACC TGG GAG  
TCC GTC ACG GGG CTC ACA GAG CTC TGG GTG GAC GGC AAG CCC ATG GTG  
AGG GCG AGT CTG AGG AGG GGG TAC ACC GTG GGG TCG GGA GCC AGC ATC  
GTC CTC GGG CAG GAG CAG GAC TCG TTC GGT GGG GGC TTT GAT AAG AAC CAG  
TCC TTG GTG GGC GAC ATC GAG GAC GTG AAC ATG TGG GAC TTT GTG CTG TCC  
CCA AGT CAG ATT CTC ACC CTC TAC ACC ACC AGG GCC TTG AGC CCT AAT GTC  
CTG AAC TGG CGG AAC CTG AGA TAT GAA ACC CGA GGT GAA GTG TTC CTC AAG  
AAG GAG CTG TGG TCC TGA 3'

**Anhang VI.** An das bakterielle Hostsystem angepasste Gensequenz des cCRPs (Codon-Gebrauch):

5' ATG GAG AAA CTG TGG CCC TGT TTA CTG GTG TTG ATG AAC TTA CCA GGT GCC  
TTT CTC CAA ATT GAC CTG GAT GAA AAG GCA TTC GTC TTT CCG CGG GAA TCG  
GAG AAT AGC TAC GTG ATC CTC TTT CCG CAA CTG CAG AAA CCC ATG AAA GCC  
TTC ACC GTA TGC CTT CAG GTT TAT ACC GAT TTA ACT CGC CCT CAT AGC CTG  
TTT TCC TAT GCG ACC AAA AGC CAG TCT AAC GAG ATT CTG CTG TTC AAA GAA  
CGC CCA GGC CTC TTT TCT GTC TCC GTT GGC GGA AGC GAT GCG TTC ATC AAC  
TTT CCG CAG AAA TTC TAT GCT CCG CAA CAC TTC TGC GTC ACA TGG GAA TCC  
GTT ACT GGG TTA ACC GAA CTG TGG GTG GAT GGC AAA CCG ATG GTA CGT GCA  
AGT CTG CGC CGT GGT TAC ACG GTA GGT AGT GGA GCG TCA ATT GTG CTG GGT  
CAA GAA CAG GAC TCG TTT GGC GGT GGC TTT GAC AAG AAC CAG AGC CTG GTT  
GGC GAT ATT GAG GAT GTG AAC ATG TGG GAC TTT GTC CTT TCA CCT TCG CAG  
ATC TTG ACC CTT TAC ACG ACA CGT GCT CTG AGT CCG AAT GTG TTG AAT TGG  
CGC AAT CTG CGC TAT GAA ACG CGT GGG GAA GTG TTC CTG AAG AAA GAA CTG  
TGG TCT 3'

**Anhang VII.**

Vollständige, Codon-angepasste cCRP-Sequenz (Großbuchstaben) inklusive sechs Histidin-Codons (cat) und dem Vektorplasmid pEx-A (mwg eurofins). Die beiden hervorgehobenen und unterstrichenen Bereiche stellen jeweils die Primer-Bereiche (**Reverse-Primer**, **Forward-Primer**) und die unterstrichenen Bereiche die Schnittbereiche der Restriktionsenzyme (NcoI, EagI) dar:

5'-ccatggctcatcatcatcatcatcatATGGAGAACTGTGGCCCTGTTTACTGGTGTGATGAACT  
TACCAGGTGCCTTTCTCCAAATTGACCTGGATGAAAAGGCATTCGTCTTTCCGCGGGAA  
TCGGAGAATAGCTACGTGATCCTCTTTCCGCAACTGCAGAAACCCATGAAAGCCTTCAC  
CGTATGCCTTCAGGTTTATACCGATTTAACTCGCCCTCATAGCCTGTTTTCTATGCGAC  
CAAAGCCAGTCTAACGAGATTCTGCTGTTCAAAGAACGCCAGGCCTCTTTTCTGTCT  
CCGTTGGCGGAAGCGATGCGTTCATCAACTTTCCGCAGAAATTCTATGCTCCGCAACAC  
TTCTGCGTCACATGGGAATCCGTTACTGGGTTAACCGAACTGTGGGTGGATGGCAAACC  
GATGGTACGTGCAAGTCTGCGCCGTGGTTACACGGTAGGTAGTGGAGCGTCAATTGTG  
CTGGGTCAAGAACAGGACTCGTTTGGCGGTGGCTTTGACAAGAACCAGAGCCTGGTTG  
GCGATATTGAGGATGTGAACATGTGGGACTTTGTCCTTTACCTTCGCAGATCTTGACC  
CTTTACACGACACGTGCTCTGAGTCCGAATGTGTTGAATTGGCGCAATCTGCGCTATGA  
AACGCGTGGGGAAGTGTTCCTGAAGAAAGAACTGTGGTCTccggccgacctgcccgaagcttg  
gatccgaattcctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggg  
gcctaatagtgagctaacctcacattaattgcttgctcactgcccgtttccagtcgggaacctgtgctgcccagctgacattaat  
gaatcggccaacgcgcggggagagcggttgcgtattggcgctctccgcttccgctcactgactgctgctcggctgctc  
ggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaagcggttaacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacat

gtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggtttccataggctccgccccctgacg  
agcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctggaag  
ctccctcgtgctctcctgtccgaccctgccgctaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcggtggcgtttctcatag  
ctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccggtcagcccagcgtg  
cgccitaccggtaactatcgtctgagtcacaaccggtaagacacgactatcgccactggcagcagccactggtaacaggatta  
gcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtattggatc  
tgcgctcgtgtaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctctgtatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtggttt  
ttgtttgcaagcagcagattacgcgcaaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtcgtgacgctcagttg  
aacgaaaactcacgtaagggttttggctagattatcaaaaaggatctcacctagatccttttaataaaaaatgaagttaa  
atcaatctaaagtataatagtaaaactggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagatcgtctatttcg  
ttcatccatagttgctgactccccgctgtagataactacgatacgggagggctaccatctggccccagtgctgcaatgatacc  
gcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtctcgc  
aactttatccgctccatccagcttataattgttccgggaagctagagtaagtagttcggcagtaataagtttgcaacggtgtgc  
cattgctacagcagcagctggtgtcacgctcgtcgtttggtatggctcattcagctccggttcccaacgatacaggcgagttacatgat  
ccccatggtgtgcaaaaaagcggtagctcctcggctcccgatcgttgtagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggtt  
atggcagcactgcataattctctactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaa  
tagtgtatgctggcgaccgagttgctctgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaagtgtcat  
cattgaaaacggttctcggggcgaaaactctcaaggatctaccgctgttgatccagttcagatgaaccactcgtgcacccaa  
ctgatctcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggggaataagg  
gagacacggaaatgtgaataactcactctccttttcaatattattgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatatt  
gaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgacatttccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaaccattattat  
catgacattaacctataaaaaatagggcgtatcacgaggcccttctcgtcgcgcttccgggtgatgacggtgaaaacctctgacacat  
gcagctcccgagacggtcacagctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgtt  
ggcgggtgtcggggctggcttaactatcgccatcagagcagattgtactgagagtgaccatagggtagcagctcgcgg  
ccgcaagc-3'

### Anhang VIII

Durch Sequenzierung der cDNA aus einer Leberprobe ermittelte Gensequenz des cCRP (Acc. Nr. HG003655). Das „Stopp-Codon“ ist am Ende kursiv dargestellt:

ATGGAGAAGCTGTGGCCTTGTCTCCTGGTCCTCATGAACCTCCCTGGTGCTTTTCTCCA  
GATAGACCTGGACGAAAAGCCTTCGTGTTCCCCAGAGAATCAGAGAATTCCTACGTGA  
TCCTGTTTCTCAGTTGCAGAAGCCGATGAAGGCTTTCACCGTGTGCCTGCAGGTCTAT  
ACGGACTTGACGCGCCCGCACAGCCTCTTCTCTTACGCCACCAAGTCACAAAGCAATGA  
GATCCTCCTCTTCAAGGAGAGGCCCGGCTTGTTACGCGTATCCGTGGGCGGATCTGAC  
GCCTTCATCAATTTTCTCAGAAGTTCTACGCGCCTCAGCACTTCTGCGTCACCTGGGA  
GTCCGTACAGGGGCTCACAGAGCTCTGGGTGGACGGCAAGCCCATGGTGAGGGCGAG  
TCTGAGGAGGGGGTACACCGTGGGGTCCGGAGCCAGCATCGTCCTCGGGCAGGATCA  
GGACTCGTTCGGTGGGGGCTTTGATAAGAACCAGTCCTTGGTGGGCGACATCGAGGAC  
GTGAACATGTGGGACTTTGTGCTGTCCCCAAGTCAGATTCTCACCTCTACACCACCAG  
GGCCTTGAGCCCTAATGTCCTGAACTGGCGGAACCTGAGATATGAAACCCGAGGTGAA  
GTGTTCTCAAGAAGGAGCTGTGGTCC TGA

**Anhang IX.** Auflistung der 125 Hunde, welche in die Studie zur Evaluierung der drei Schnelltestgeräte eingeschlossen wurden mit Angaben zu Rasse, Geschlecht, Alter und Erkrankung:

<u>Nr.</u>	<u>Rasse</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Alter</u>	<u>Erkrankung</u>	<u>Kategorie</u>
1	Rottweiler	wk	7	Immunhämolytische Anämie	Immun-medierte Erkrankung
2	Airedale Terrier	mk	10	Immunhämolytische Anämie	Immun-medierte Erkrankung
3	Mischling	wk	3	Fieber unbekannter Genese	Entzündliche Erkrankung/Infektion
4	Bayr. Gebirgsschweißhund	w	4	Vaskulitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
5	Golden Retriever	w	3	Polyarthritits	Immun-medierte Erkrankung
6	Cocker Spaniel	wk	12	Hyperadrenocortizismus	nicht-entzündliche Dysfunktion
7	Labrador	w	10	Wundinfektion	Entzündliche Erkrankung/Infektion
8	Mischling	mk	7	Magendrehung	Entzündliche Erkrankung/Infektion
9	Mischling	wk	12	Diskopathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
11	Podenco Canario	-	-	infektiöse Laryngotracheitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
12	Boxer	m	6	Diskoprolaps	nicht-entzündliche Dysfunktion
13	Zwerg-Schnauzer	wk	12	chron. Hepatopathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
14	West Highland White Terrier	mk	11	allergische Hautreaktion	nicht-entzündliche Dysfunktion
15	Dalmatiner	wk	5	Kontrolluntersuchung	Gesund
16	Mischling	wk	3	Enteropathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
17	Labrador	w	3	Blutspender	Gesund
18	Cocker Spaniel	mk	10	Immunhämolytische Anämie	Immun-medierte Erkrankung
19	Samojede	m	5	Blutspender	Gesund
20	Rhodesian Ridgeback	w	1	akute Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
21	Rottweiler	wk	9	Polyarthritits	Immun-medierte Erkrankung
22	Beagle	w	9	chron. Enteropathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
23	Beagle	m	4	epileptiforme Anfälle	nicht-entzündliche Dysfunktion
24	Boxer	m	1	Polyarthritits	Immun-medierte Erkrankung
25	Labrador	m	10	Wirbelkörperlyse	nicht-entzündliche Dysfunktion
26	Husky	m	6	Lahmheit	nicht-entzündliche Dysfunktion
27	Bordeauxdogge	w	4	Kontrolluntersuchung	Gesund
28	Mischling	-	12	Hämorrhagische Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
29	Boxer	mk	7	Hyperadrenokortizismus	nicht-entzündliche

					Dysfunktion
30	Mischling	m	12	multiples Myelom	Neoplasie
31	Mischling	w	11	Pancreatitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
32	Golden Retriever	w	14	Pyometra	Entzündliche Erkrankung/Infektion
33	Beagle	m	8	Leptospirose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
34	Mischling	mk	11	Hyperadrenocortizismus	nicht-entzündliche Dysfunktion
35	Mischling	w	5	Kontrolluntersuchung	Gesund
36	Hovawart	m	8	Leishmaniose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
37	Mischling	m	5	Blutspender	Gesund
38	Mischling	m	3	Blutspender	Gesund
39	Mischling	w	16	Trauma	Trauma
40	Mischling	m	6	Chronische Niereninsuffizienz	nicht-entzündliche Dysfunktion
41	Mischling	mk	12	Prostatatumor	Neoplasie
42	Australian Shepherd	m	3	Immunbedingte Thrombozytopenie	Immun-medierte Erkrankung
43	Berner Sennenhund (BSH)	mk	6	Immunbedingte Thrombozytopenie	Immun-medierte Erkrankung
44	Bearded Collie	m	8	Thrombozytopenie	nicht-entzündliche Dysfunktion
45	Tibet Terrier	mk	5	Immunhämolytische Anämie	Immun-medierte Erkrankung
46	Dt. Drahthaar	m	6	FK-Ileus	Entzündliche Erkrankung/Infektion
47	Yorkshire Terrier	m	16	Hepatoencephalopathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
48	Mischling	wk	4	Tumor der Nebennierenrinde	Neoplasie
49	Jack Russel Terrier	wk	8	Schilddrüsenkarzinom	Neoplasie
50	Mischling	m	2	Trauma	Trauma
51	Mischling	mk	13	Inflammatory Bowel Disease	Immun-medierte Erkrankung
52	Mischling	mk	11	Kontrolluntersuchung	Gesund
53	Sheltie	m	3	Kontrolluntersuchung	Gesund
54	Sheltie	w	10	Kontrolluntersuchung	Gesund
55	Sheltie	w	2	Kontrolluntersuchung	Gesund
56	Mischling	w	11	Schilddrüsenadenokarzinom	Neoplasie
57	Mischling	mk	-	Hämorrhagische Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
58	Mischling	mk	8	Lymphom	Neoplasie

59	Golden Retriever	wk	2	Pneumonie	Entzündliche Erkrankung/Infektion
60	Mischling	m	14	Lebertumor	Neoplasie
61	Dt. Drahthaar	w	2	Trauma	Trauma
63	Mischling	w	0,5	Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
64	Beagle	w	7	Tonsillitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
65	Mischling	w	6	Kreislaufkollaps	nicht-entzündliche Dysfunktion
66	Mischling	wk	14	Vestibulärsyndrom	nicht-entzündliche Dysfunktion
67	Mischling	m	1	Demodikose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
68	West Highland White Terrier	w	9	Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
69	Labrador	w	9	Milztumor	Neoplasie
70	Cocker Spaniel	m	6	Immunbedingte Thrombozytopenie	Immun-medierte Erkrankung
71	Mischling	m	15	Kontrolluntersuchung	Gesund
75	Dt. Schäferhund	wk	13	Pneumonie	Entzündliche Erkrankung/Infektion
76	Cocker Spaniel	mk	9	Leptospirose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
77	Mischling	w	15	Encephalopathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
78	Dt. Dogge	mk	8	Pneumonie	Entzündliche Erkrankung/Infektion
79	Polski Owczarek Nizinny (PON)	w	3	Diabetes mellitus	nicht-entzündliche Dysfunktion
80	Kangal	m	4	Unfall	Trauma
81	Golden Retriever	m	10	Nierentumor	Neoplasie
82	Golden Retriever	w	3	Blutspender	Gesund
83	Boxer	m	4	Fieber unbekannter Genese	Entzündliche Erkrankung/Infektion
84	Rhodesian Ridgeback	m	3	Unfall	Trauma
85	Mischling	w	11	Infektiöse Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
86	Foxterrier	wk	11	Zahnsanierung	nicht-entzündliche Dysfunktion
87	Dt. Dogge	m	6	Magendrehung	Entzündliche Erkrankung/Infektion
88	Dalmatiner	wk	9	Blutspender	Gesund
89	Briard	w	4	Blutspender	Gesund
90	Labrador	m	4	Polyarthritits	Immun-medierte Erkrankung
91	Dobermann	w	9	Ileus	Entzündliche Erkrankung/Infektion
92	Dt. Schäferhund	wk	4	Pyometra	Entzündliche Erkrankung/Infektion



93	Kl. Münsterländer	m	4	Blutspender	Gesund
94	Husky	mk	13	Ehrlichiose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
95	Cane Corso	m	1	Zystitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
96	Mischling	wk	11	Gastroenteritis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
97	Golden Retriever	w	12	Pneumonie	Entzündliche Erkrankung/Infektion
98	Mischling	mk	4	Polyarthritits	Immun-medierte Erkrankung
99	Cocker Spaniel	m	2	Enteropathie, Pancreasinsuffizienz	nicht-entzündliche Dysfunktion
100	Mischling	wk	8	Fieber unbekannter Genese, Hypothyreose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
101	Rottweiler	w	10	Magendrehung	Entzündliche Erkrankung/Infektion
102	Flat Coated Retriever	m	6	Magendrehung	Entzündliche Erkrankung/Infektion
103	Mischling	m	-	Prostatitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
104	Labrador	mk	8	Magendrehung	Entzündliche Erkrankung/Infektion
105	Mischling	wk	13	Hepatopathie	nicht-entzündliche Dysfunktion
106	Polski Owczarek Nizinny (PON)	wk	12	malignes Adenokarzinom	Neoplasie
107	Dt. Dogge	wk	9	Magendrehung	Entzündliche Erkrankung/Infektion
108	Mischling	w	0,5	Parvovirose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
109	Mischling	wk	12	Kontrolluntersuchung	Gesund
110	Jack Russel Terrier	m	5	Immunhämolytische Anämie	Immun-medierte Erkrankung
111	West Highland White Terrier	wk	14	Rechtsherzinsuffizienz	nicht-entzündliche Dysfunktion
112	Mischling	w	-	Ehrlichiose	Entzündliche Erkrankung/Infektion
113	Mischling	m	7	Blutspender	Gesund
114	Mischling	w	2	Blutspender	Gesund
115	Mischling	w	5	Blutspender	Gesund
116	Mischling	m	6	Blutspender	Gesund
117	Mischling	m	14	malignes Melanom	Neoplasie
118	Podenco Andaluz	wk	9	Fibrosarkom	Neoplasie
119	Airedale Terrier	wk	14	orales malignes Melanom	Neoplasie
120	Rhodesian Ridgeback	mk	3	Wildschweinverletzung	Trauma
121	Cocker Spaniel	mk	7	Bissverletzung	Trauma
122	Golden Retriever	m	7	Blutspender	Gesund

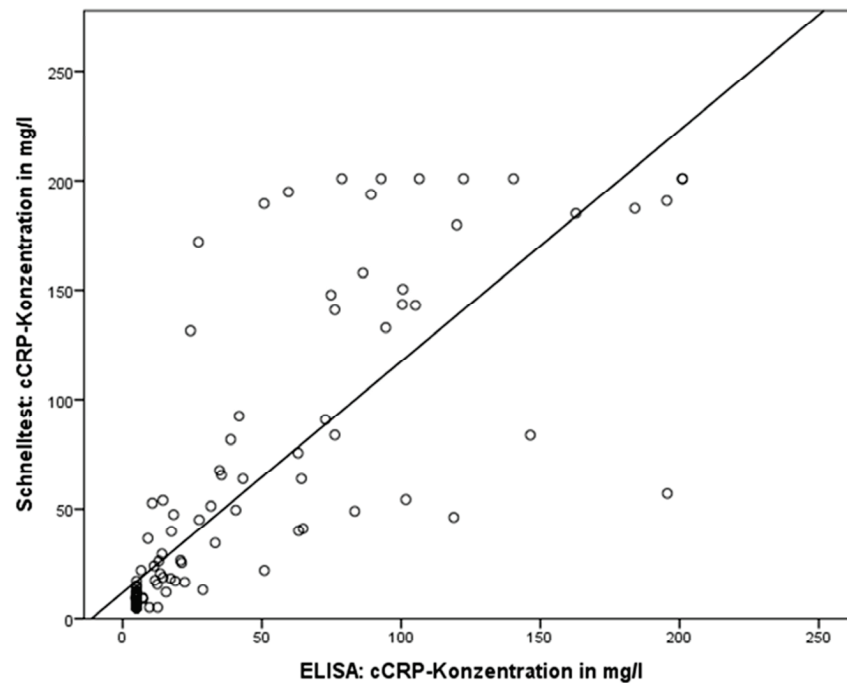
123	Golden Retriever	m	6	Blutspender	Gesund
124	Tibet Terrier	wk	11	Pyometra	Entzündliche Erkrankung/Infektion
125	Mischling	m	2	Epilepsie	nicht-entzündliche Dysfunktion
126	Jack Russel Terrier	mk	7	Hämorrhagische Gastroenteritis/Pancreatitis	Entzündliche Erkrankung/Infektion
127	Silken Windhound	mk	9	Chylothorax	nicht-entzündliche Dysfunktion
128	Mischling	wk	3	Autounfall	Trauma
129	Riesenschnauzer	w	7	Pyometra	Entzündliche Erkrankung/Infektion
130	Foxterrier	m	1	Bissverletzung	Trauma

## Anhang X.

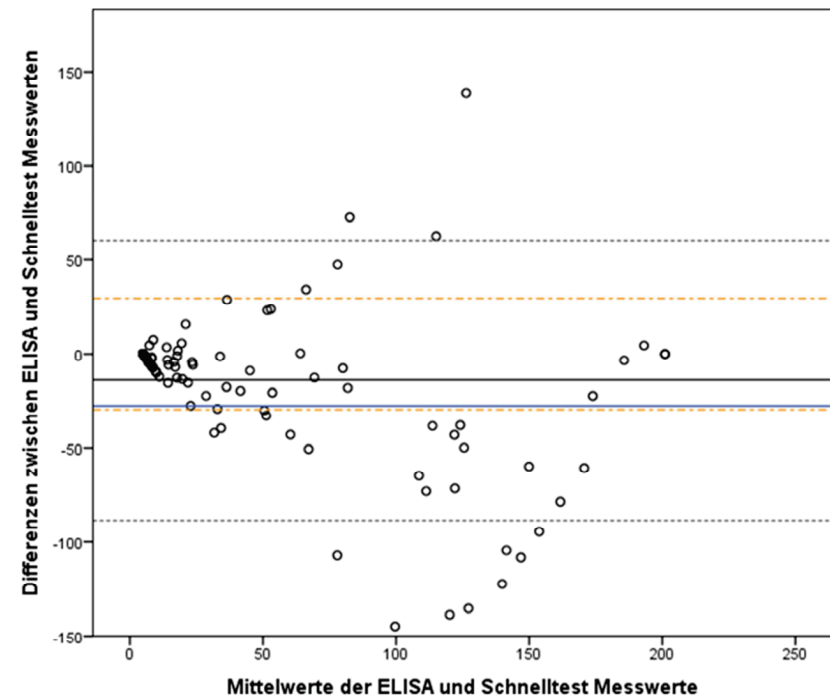
Graphische Darstellung des statistischen Vergleiches zwischen dem ELISA und dem Schnelltestgerät von TECOmedical:

- Assoziation zwischen den Messwerten des Schnelltestgerätes und denen des ELISA mit Darstellung der Regressionsgeraden
- Bland-Altman Diagramm des direkten Vergleiches der Messergebnisse von ELISA und dem Schnelltestgerät

**a** Spearman's' r (TECOmedical)



**b** Bland-Altman Graph (TECOmedical)

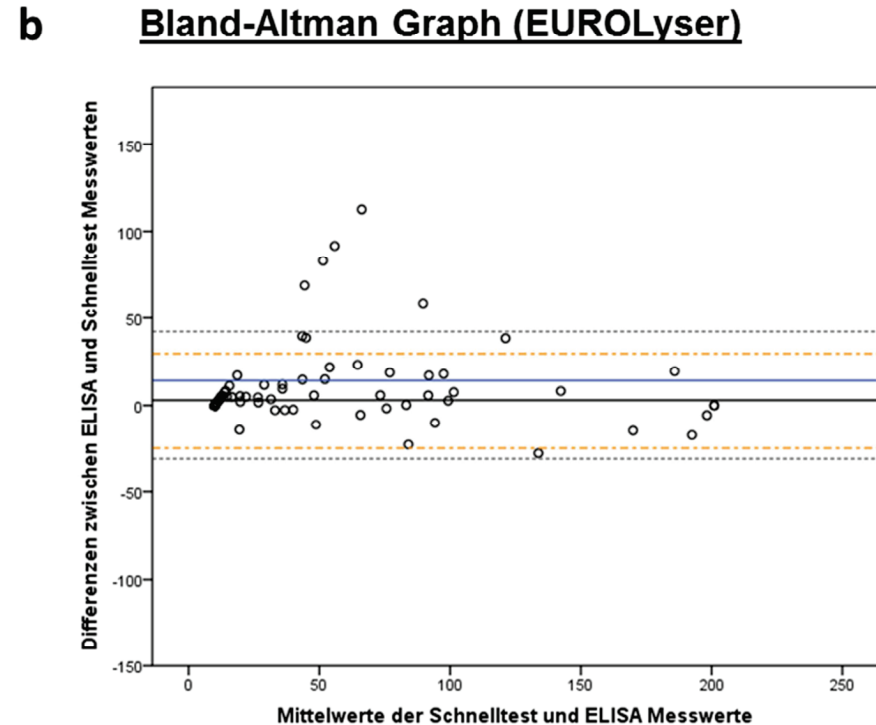
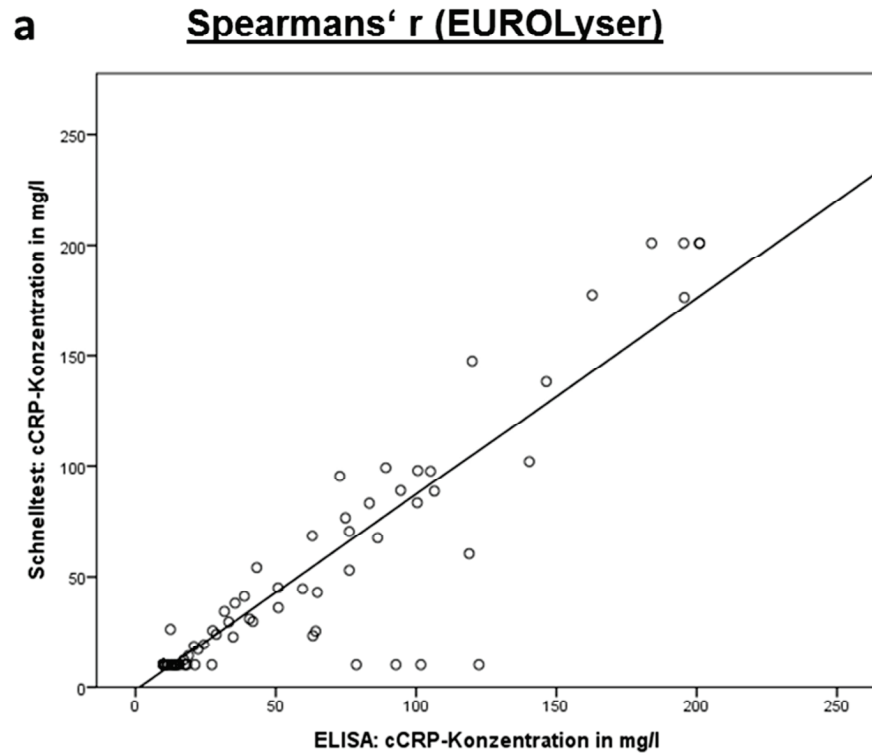


Das einfache Streudiagramm in der Abb. 2a stellt die Korrelation zwischen dem Schnelltestgerät von TECOmedical und dem ELISA dar. Der Verlauf der Regressionsgerade spiegelt den Korrelationskoeffizienten nach Spearman wieder. Der Graph der Abb. 2b zeigt den direkten Methodenvergleich zwischen dem Schnelltestgerät (TECOmedical) und der Referenzmethode ELISA in einem Bland-Altman Diagramm mit dem Mittelwert der Differenzen als durchgezogene schwarze Linie und den Übereinstimmungsgrenzen als gestrichelte graue Linien. Zusätzlich ist der Bias des Gerätes als blaue Linie und der erlaubte Fehler ( $TE_{Des}$ ) von 29,6 % mit zwei orangen gestrichelten Linien eingezeichnet.

## Anhang XI.

Graphische Darstellung des statistischen Vergleiches zwischen dem ELISA und dem Schnelltestgerät von EUROLyser:

- Assoziation zwischen den Messwerten des Schnelltestgerätes und denen des ELISA mit Darstellung der Regressionsgeraden
- Bland-Altman Diagramm des direkten Vergleiches der Messergebnisse von ELISA und dem Schnelltestgerät



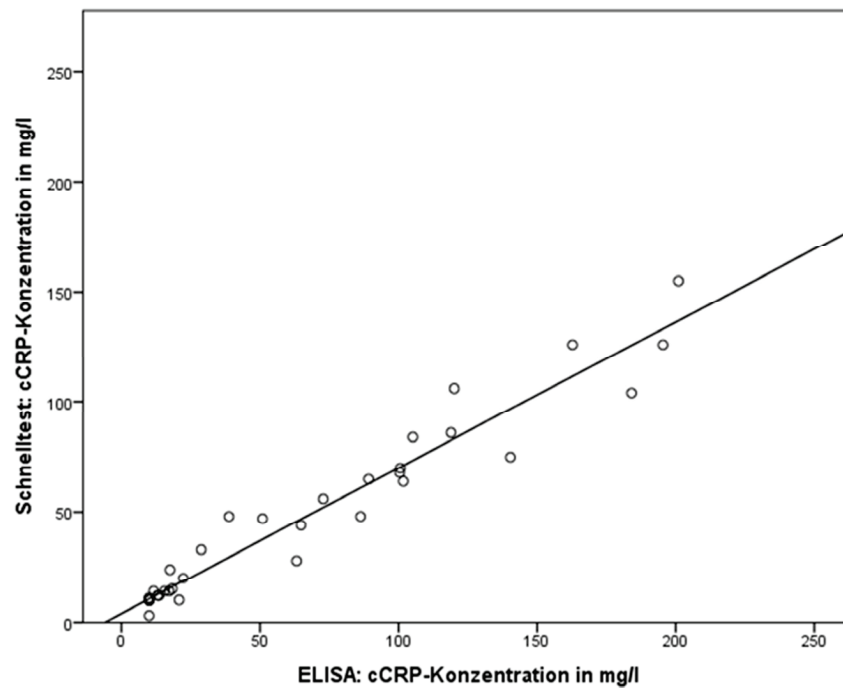
Der Graph der Abb. 3a zeigt die Korrelation zwischen dem Schnelltestgerät (EUROLyser) und der Referenzmethode ELISA im einfachen Streudiagramm. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman, wird durch die Regressionsgerade repräsentiert. Das Bland-Altman Diagramm der Abb. 3b zeigt den Mittelwert der Differenzen zwischen dem Schnelltestgerät und dem ELISA als durchgezogene schwarze Linie und die Übereinstimmungsgrenzen als gestrichelte graue Linien. Der Bias des Gerätes ist als blaue Linie und der erlaubte Fehler ( $TE_{Des}$ ) von 29,6 % mit zwei orangen gestrichelten Linien dargestellt.

## Anhang XII.

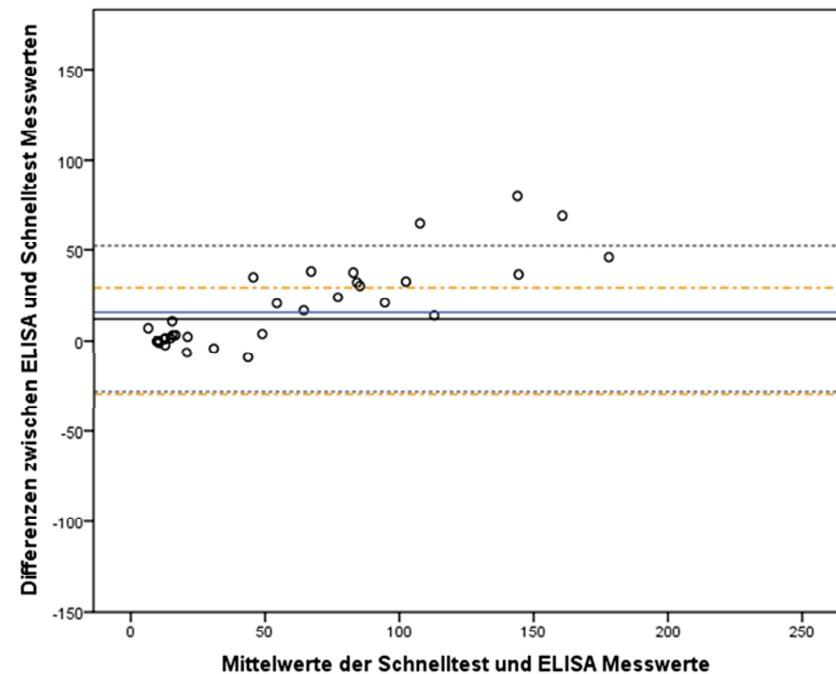
Graphische Darstellung des statistischen Vergleiches zwischen dem ELISA und dem Schnelltestgerät von LifeAssays:

- Assoziation zwischen den Messwerten des Schnelltestgerätes und denen des ELISA mit Darstellung der Regressionsgeraden
- Bland-Altman Diagramm des direkten Vergleiches der Messergebnisse von ELISA und dem Schnelltestgerät

**a** Spearman's' r (LifeAssays)



**b** Bland-Altman Graph (LifeAssays)



Das in der Abb. 4a dargestellte einfache Streudiagramm der Korrelation zwischen dem Schnelltestgerät (EUROlyser) und der Referenzmethode ELISA zeigt den Korrelationskoeffizienten nach Spearman als Regressionsgerade. Die Abb. 4b zeigte im Bland-Altman Diagramm den direkten Methodenvergleich zwischen dem Schnelltestgerät von EUROlyser und dem ELISA mit dem Mittelwert der Differenzen als durchgezogene Linie dargestellt. Die Übereinstimmungsgrenzen sind als gestrichelte graue Begrenzungslinien, der Bias des Gerätes als blaue durchgezogene Linie und der erlaubte Fehler ( $TE_{Des}$ ) von 29,6 % mit zwei orangen gestrichelten Linien angegeben.

**Anhang XIII.** Auflistung der Hund die in die Verlaufskontrollen zur Messung des cCRP im Serum in die Studie eingeschlossen wurden unter Angabe von Rasse, Geschlecht (Geschl.), Alter zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme, Erkrankung, Tiergruppe (TG), Tage der Probenentnahme (PE) und Anzahl der Beprobungen:

Nr.	Rasse	Geschl.	Alter	Erkrankung	TG	PE (Tag)	Beprobungen
1	Mischling	wk	13	Hepatopathie	1	0, 1, 4, 7, 14	5
2	Langhaardackel	mk	9	ITP	1	0, 2, 4, 5, 6	5
3	Foxterrier	mk	6	IHA	1	0, 2, 5, 14	4
4	Mischling	mk	4	Ehrlichiose	1	0, 2, 5, 11, 14	8
					2	35, 56, 111	
5	Cockerspaniel	mk	10	IHA	1	0, 1, 2, 5, 7, 9, 14	11
					2	54, 93, 107, 125	
6	Australian Shepherd	wk	3	ITP	1	0, 6, 12, 14	8
					2	28, 61, 95, 135	
7	Rottweiler	wk	8	Polyarthritis	2	0, 29, 60, 114, 123, 144	6
8	Berner Sennenhund	mk	6	Polyarthritis	2	0, 24, 33, 82	4
9	Tibet-Terrier	mk	4	IHA	2	0, 12, 56, 71, 150	5

**Anhang XIV.** Tabelle der für die Affinitätschromatographie eingesetzten Serumengen und erzielte Proteinmengen:

Nr.	Serummenge (ml)	Anzahl der verwendeten Hunde	Gesamtproteinmenge der gereinigten Fraktion (mg/ml)
1	20	2	0,38
2	20	1	0,16
3	17,5	1	0,32
4	70	2	1,1
5	70	2	1,2
6	70	1	0,8
7	70	1	1,4
8	70	1	2,2
9	50	1	1,4
10	75	1	5,9
11	190	6	1,9

## 9 PUBLIKATIONSLISTE

### 9.1 Publikationen

Jasensky, Anne-Katherine; Klenner, Stefanie; Einspanier, Ralf; Kohn, Barbara  
Evaluation of three different point-of-care tests for quantitative measurement of canine C-reactive protein (cCRP). *Vet Clin Pathology*. 2014. (in press)

### 9.2 Posterbeiträge

Jasensky, A.-K.; Bondzio, A.; Jayaseelan, M.; Roesler, U.; Kohn, B.; Einspanier, R. (2013): A combined proteomic and transcriptomic approach: Deciphering the native canine C-reactive protein (cCRP). 20. Arbeitstagung Micromethods in Protein Chemistry, Bochum 24.06.-26.06.2013

Jasensky, A.-K.; Einspanier, R.; Kohn, B. (2013): Evaluierung von drei Schnelltestgeräten für die quantitative Bestimmung von C-reaktivem Protein beim Hund. 21. Jahrestagung der Fachgruppe Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab) München 01.02.-02.02.2013.

In: *Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere*, 40(1), S. A24

Jasensky, A.; Einspanier, R.; Kohn, B. (2013): Evaluation of three different point-of-care tests for quantitative detection of canine C-reactive protein. ACVIM Forum Seattle 12.06.-15.06.2013.

In: *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 27(3), S. 746

Jasensky, A. K.; Hennies, M.; Kohn, B.; Einspanier, R. (2012): Development of an Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) for the Measurement of canine C-reactive Protein.

7. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar Biomedical Sciences am FB Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin 13.07.2012

In: *7. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar Biomedical Sciences am FB Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin Programm & Abstracts Berlin: mensch und buch verlag*, S. 34 ISBN: 978-3-86387-153-6

Jasensky, A. K.; Kohn, B.; Einspanier, R. (2012): Detection and characterization of C-reactive protein structures in different Caniformia species using a new anti-canine CRP antibody. 20. Jahrestagung der FG Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab) Göttingen 03.02.-04.02.2012.

In: *Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere*; 40(1), S. A19

Jasensky, A. K.; Wienen, C.; Einspanier, R.; Kohn, B. (2012): Evaluation of a quantitative point-of-care test for canine C-reactive protein (cCRP). SEVC Southern European Veterinary Congress Barcelona – 18.10.-20.10.2012.

Jasensky, A.-K.; Kohn, B.; Einspanier, R. (2012): Untersuchung der verschiedenen glykolisierten Protomere des caninen C-reaktiven Proteins. 20. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) München – 16.02.-18.02.2012.

## 10 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich zuerst bei Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier und Prof. Dr. Barbara Kohn für die Bereitstellung des interessanten und spannenden Themas, dem Bemühen um finanzielle Unterstützung, die wissenschaftlichen Anregungen und die gute Betreuung während der gesamten Zeit.

Ein herzliches Dankeschön allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Biochemie, die mir mit Rat und Tat beiseite standen wann immer es nötig war und dank denen die Arbeit immer größtenteils auch Spaß bereitete. Auch einen Dank an die Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, die mich in der ersten, klinischen Phase unterstützt haben - bei kniffligen Fällen oder organisatorischen Schwierigkeiten.

Ein Dank gilt außerdem allen die in anderer Form an der Fertigung der Arbeit beteiligt waren. Frau Wippermann und Herrn Hennies der TECOMedical Group für ihre Unterstützung bei der klinischen Studie.

Für die Bereitstellung der Proben danke ich Prof. Dr. Katarina Jewgenow vom Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierkunde, Berlin und Prof. Dr. Ursula Siebert vom Institut für aquatische Wildtierforschung der Stiftung tierärztlichen Hochschule Hannover, sowie der Praxis Dr. Thomas Göbel, Berlin.

Außerdem Dr. Jayaseelan Murugaiyan vom Institut für Tier- und Umwelthygiene, FU Berlin für die massenspektrometrische Analyse des Proteins.

Und für die vielen Stunden Erklärung und Hilfe im Dschungel der statistischen Auswertungen, Verena Pflieger von der statistischen Beratungseinheit der FU Berlin und Dr. Stefanie Klenner von der scil animal care company GmbH.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie!

Meinen Eltern für die Möglichkeit des Studiums und der Doktorarbeit, für die finanzielle Unterstützung und nicht zuletzt für ihre Geduld und Liebe in allen Lebenslagen.

„Meine Mutter hat mir nie gesagt, ich könne nicht tun, was ich mir wünsche oder nicht der Mensch sein, der ich sein möchte. Immer hat sie unser Haus mit Liebe und Freude erfüllt, mit Büchern und Musik, und mich unermüdlich mit Vorbildern versorgt.“

Meinem Vater für die vielen spannenden und lehrreichen Diskussionen. Du hast mir beim Blick auf die Welt beigebracht die Dinge immer von zwei Seiten zu betrachten.

Und meinen Geschwistern einfach dafür, dass sie so sind wie sie sind. Die mich immer gefordert haben, für ihre Liebe und ihr Vertrauen.

Last - but not least - meinen Freunden! Die mich getragen haben, immer ein offenes Ohr oder eine entsprechende Tür hatten und ohne deren Hilfe und Zuspruch diese Arbeit sicher nicht fertig geworden wäre. Ohne euch wäre das Leben nicht so lebenswert ☺.



## **11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 13.05.2014

Anne-Katherine Jasensky