

Aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung  
und dem  
Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin

**Identifizierung und Nachweis von tier- und gewebespezifischen Markern in tierischen  
Nebenprodukten und Futtermitteln zur Eindämmung der Übertragung der  
transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE)**

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

vorgelegt von  
Grit Kreuz  
Tierärztin  
aus Strausberg

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3586

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Stenzel

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

meat and bone meal, bovine spongiform encephalopathy, animal feeding,  
osteocalcin, ELISA, species diversity

Tag der Promotion: 30.04.2013

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: 978-3-86387-306-6

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

*Meinen Schwestern*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG</b>	1
<b>1. Hintergrund</b>	1
1.1. Transmissible spongiforme Enzephalopathie	1
1.1.1. Prionen	2
1.1.2. Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	3
1.1.3. Atypische BSE	5
1.1.4. BSE verursacht die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK)	6
1.2. BSE-Bekämpfung	8
1.2.1. Klinische Überwachung	8
1.2.2. Post mortem Untersuchung	8
1.2.3. Entfernung von spezifiziertem Risikomaterial (SRM)	9
1.2.4. Das Verfütterungsverbot tierischer Proteine	11
<b>2. Zielsetzung</b>	12
<b>3. Theoretische Grundlagen</b>	14
3.1. Antigen-Antikörper-Reaktion als Grundlage immunologischer Detektionssysteme	14
3.2. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	16
3.3. SDS-Page und Western Blot	17
3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
3.5. Immuno-PCR	20
3.6. Phage Display	21
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	22
<b>1. Probenmaterial und Probenvorbereitung</b>	22
<b>2. Extraktionsmethoden und Proteinkonzentrationsbestimmung</b>	23
<b>3. Entwicklung eines Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	25
3.1. Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA	25
3.2. AK-Generierung gegen bovines Osteocalcin	25
3.3. Auswahl geeigneter AK für den Nachweis bovinen Osteocalcins	26
3.4. Im Sandwich-ELISA eingesetzte Antikörper	26
3.5. Markierung des sekundären pAK mit Streptavidin und Horseradish Peroxidase	27
3.6. SDS-Page und Western Blot	28
3.7. Eignung des Sandwich-ELISA für die Osteocalcindetektion	28
3.7.1. Sensitivität, Intra- und Inter-Assay-Variabilität	28
3.7.2. Spezifität	28
3.7.3. Anwendbarkeit mit realen FKM	29
3.7.4. Selektivität	29

<b>4. Entwicklung einer RT-iPCR für den Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	30
4.1. Funktionsprinzip der RT-iPCR	30
4.2. Primer- und Sonden-Design	31
4.3. Generierung der biotinylierten Ziel-DNA mittels Endpunkt-PCR	31
4.3.1. Nachweis der biotinylierten Ziel-DNA mittels Gelelektrophorese	32
4.3.2. Aufreinigung der biotinylierten Ziel-DNA	33
4.3.3. Konzentrationsbestimmung der biotinylierten gereinigten Ziel-DNA	33
4.4. Detektion der biotinylierten Ziel-DNA mittels real-time PCR	34
4.5. Eignung der biotinylierten Ziel-DNA für die Protein-Analyse	34
4.5.1. Mastermix	34
4.5.2. Bestimmung der optimalen Primerkonzentration	35
4.5.3. Effizienzbestimmung der RT-PCR mit SYBR <sup>®</sup> Green und TaqMan <sup>®</sup> -Sonde	36
4.6. Untersuchung der RT-iPCR für den Nachweis bovinen Osteocalcins	37
4.6.1. Untersuchung der generellen Durchführbarkeit und Ermittlung der Sensitivität	39
4.6.2. Untersuchung der Selektivität	39
<b>5. Einsatz von Phage-Display-Methoden zum Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	40
5.1. Auswahl einer geeigneten Zielsequenz	40
5.2. Phage-Display-Bibliothek	40
5.3. Funktionsprinzip des Phage Display	40
5.4. Panning gegen OC 16-22 und Amplifizierung der selektierten Phagen	41
5.5. Titrierung	43
5.6. Auswahl geeigneter Phagen-Poole	44
5.6.1. Nachweis boviner Fleisch- und Knochenmehle	45
5.7. Isolierung und Amplifizierung individueller Phagen-Klone	45
5.7.1. Titrierung geeigneter Poole, um einzelne Klone zu picken	45
5.7.2. Amplifizierung der gepickten Klone	45
5.8. Auswahl geeigneter Klone mit ELISA	46
5.9. Sequenzierung einzelner Klone, um die codierte Peptidsequenz zu ermitteln	46
5.10. Peptidsynthese	47
5.11. Einsatz der synthetisierten Peptide im ELISA	47
5.11.1. Sandwich-ELISA	48
5.11.2. Direkter ELISA	49
 <b>III. ERGEBNISSE</b>	 50
<b>1. Identifizierung möglicher Gewebemarker</b>	50
1.1. Osteocalcin	50
1.2. Kollagen und Hydroxyprolin	52
1.3. Myoglobin	53

1.4. Albumin	54
1.5. Perilipin	55
<b>2. Entwicklung eines Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	<b>56</b>
2.1. AK-Generierung gegen bovinen Osteocalcin	56
2.2. Auswahl geeigneter AK für den Nachweis bovinen Osteocalcins	56
2.3. SDS-Page und Western Blot	58
2.4. Im Sandwich-ELISA eingesetzte Antikörper	59
2.5. Arbeitsprotokoll des Sandwich-ELISA für den Osteocalcinnachweis	61
2.6. Eignung des Sandwich-ELISA für die Osteocalcindetektion	62
2.6.1. Sensitivität	63
2.6.2. Intra- und Inter-Assay-Variabilität	64
2.6.3. Spezifität	64
2.6.4. Anwendbarkeit mit realen FKM	65
2.6.5. Selektivität	66
<b>3. Entwicklung einer RT-iPCR für den Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	<b>68</b>
3.1. Funktionsprinzip der RT-iPCR für die Osteocalcin-Detektion	68
3.2. Arbeitsbeschreibung der RT-iPCR für die Osteocalcin-Detektion	69
3.3. Ziel-DNA	69
3.3.1. Generierung der biotinylierten Ziel-DNA mittels Endpunkt-PCR	70
3.3.2. Detektion der biotinylierten Ziel-DNA	71
3.3.3. Eignung der biotinylierten Ziel-DNA für die Protein-Analyse	71
3.4. Arbeitsbeschreibung und Arbeitsprotokoll der entwickelten RT-iPCR	74
3.5. Eignung der entwickelten RT-iPCR für die Detektion von bovinem Osteocalcin	75
3.5.1. Sensitivität	75
3.5.2. Intraassay-Variabilität	78
3.5.3. Selektivität	78
<b>4. Einsatz von Phage-Display-Methoden zum Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	<b>81</b>
4.1. Funktionsprinzip des Phage Display	81
4.2. Panning gegen OC 16-22 und Amplifizierung der selektierten Phagen	81
4.3. Auswahl geeigneter Phagen-Poole	82
4.3.1. Anwendbarkeit mit realen FKM	83
4.4. Isolierung und Amplifizierung individueller Phagen-Klone	84
4.5. Auswahl geeigneter Klone mit ELISA	84
4.6. Sequenzierung einzelner Klone, um die codierte Peptidsequenz zu ermitteln	85
4.7. Peptidsynthese	86
4.8. Einsatz der synthetisierten Peptide im ELISA	86
4.8.1. Sandwich-ELISA	87
4.8.2. Direkter ELISA	88

<b>IV. DISKUSSION</b>	90
<b>1. Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln</b>	90
<b>2. Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	91
<b>3. Real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) für den Nachweis bovinen Osteocalcins</b>	94
<b>4. Phage-Display-Methoden</b>	99
<b>5. Fazit</b>	102
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	105
<b>VI. SUMMARY</b>	107
<b>VII. LITERATUR</b>	109
<b>VIII. ANHANG</b>	122
<b>1. Proteine, Antikörper, Enzyme und biochemische Farbreagenzien</b>	122
<b>2. Chemikalien</b>	123
<b>3. Puffer und Lösungen</b>	124
<b>4. Geräte</b>	125
<b>5. Software</b>	126
<b>6. Verbrauchsmaterialien</b>	126
<b>IX. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	127
<b>X. DANKSAGUNG</b>	128
<b>XI. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	129

**ABBILDUNGEN**

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Prion-Proteins.	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung des neuronalen Weges des Erregers aus dem Magen- Darm-Trakt zu dem zentralen Nervensystem (ZNS).	5
Abb. 3:	Schematische Darstellung der drei Glykosylierungsformen von PrP <sup>Sc</sup> im Immunoblot von Gehirn-Extrakten nach der Digestion mit Proteinase K.	7
Abb. 4:	Schematische Darstellung eines Antikörpers.	15
Abb. 5:	Osteocalcinsequenz vom Rind mit Lage der zur Immunisierung herangezogenen Aminosäuresequenzen (AS).	25
Abb. 6:	Schematische Darstellung des entwickelten Sandwich-ELISA und der RT-iPCR.	30
Abb. 7:	Schematische Darstellung der entwickelten RT-iPCR.	38
Abb. 8:	Schematische Darstellung des Panning.	42
Abb. 9:	Schematische Darstellung des ELISA zur Auswahl geeigneter Phagen-Poole.	44
Abb. 10:	Schematische Darstellung von OC und Kennzeichnung der Glutaminsäurereste an den Aminosäurepositionen 17, 21 und 24, die posttranslational in $\gamma$ -Carboxy-glutaminsäuren transformiert werden.	50
Abb. 11:	Vergleich von veröffentlichten Osteocalcin-Sequenzen für Nutztiere, Haustiere, Nagetiere, Amphibien und Knochenfische.	51
Abb. 12:	Auswahl des geeigneten Antikörpers für den Nachweis bovinen Osteocalcins.	57
Abb. 13:	Direkter ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins.	58
Abb. 14:	Spezifität des pAK-OC1-9 (polyklonale Anti-Osteocalcin-IgG-Fraktion) gegenüber nativem Rinderknochenprotein im Western-Blot.	59
Abb. 15:	Darstellung eines Kreuzungsschemas (Grid-Experiment) zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentrationen.	60
Abb. 16:	Sandwich-ELISA zur Ermittlung der optimalen Konzentration des streptavidinierten pAK-OC1-9.	60
Abb. 17:	Sandwich-ELISA zur Ermittlung der optimalen Konzentration des mit HRP markierten pAK-OC1-9 zum Nachweis bovinen Osteocalcins.	61
Abb. 18:	Osteocalcin-spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Empfindlichkeit mit gereinigtem bovinen Osteocalcin.	63

Abb. 19:	Osteocalcin-spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Spezifität mit EDTA-Extrakten aus nativen Knochen und Futtermittelkomponenten.	65
Abb. 20:	Osteocalcin spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Leistungsmerkmale der Methode mit Fleisch- und Knochenmehl-Extrakten (FKM).	66
Abb. 21:	Osteocalcin spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Selektivität in Mischungen mit 0,1 % bovinem FKM (BFKM).	67
Abb. 22:	Optimierung des PCR-Systems zum Nachweis der Ziel-DNA.	70
Abb. 23:	Effizienzbestimmung des RT-PCR Systems zum Nachweis der Ziel-DNA mit SYBR <sup>®</sup> Green und TaqMan-Sonde.	73
Abb. 24:	Messung einer OC Standardreihe mit SYBR <sup>®</sup> Green.	76
Abb. 25:	Messung einer OC Standardreihe mit TaqMan-Sonde.	77
Abb. 26:	Validierung der Selektivität der RT-iPCR mit SYBR <sup>®</sup> Green durch Messung eines Futtermittelextraktes (FM) mit bovinen FKM-Beimischungen.	79
Abb. 27:	Validierung der Selektivität der RT-iPCR mit TaqMan-Sonde durch Messung eines Futtermittelextraktes (FM) mit bovinen FKM-Beimischungen.	80
Abb. 28:	Auswahl geeigneter Phagen-Poole.	83
Abb. 29:	Auswahl geeigneter Phagen-Poole für den Nachweis boviner Fleisch- und Knochenmehle (BFKM).	84
Abb. 30:	Auswahl geeigneter Klone für den Nachweis bovinen Osteocalcins.	85
Abb. 31:	Sequenzierungsergebnis für die Heptapeptidsequenz der Phagen-Klone, die sich im ELISA als geeignet erwiesen haben, um bovines Osteocalcin zu binden.	86
Abb. 32:	Sandwich-ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins.	87
Abb. 33:	Sandwich-ELISA zum Nachweis der Reaktivität des synthetisierten Peptids gegen bovines Osteocalcin.	88
Abb. 34:	Direkter ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins.	89
Abb. 35:	Direkter ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins.	89

**TABELLEN**

Tab. 1:	Ätiologie von Prionenerkrankungen (Transmissible spongiforme Enzephalopathien, TSE).	1
Tab. 2:	Zusammensetzung des Mastermixes für die Endpunkt-PCR zur Herstellung der Ziel-DNA.	31
Tab. 3:	Zusammensetzung der Mastermixe für die real-time PCR mit TaqMan-Sonde und SYBR <sup>®</sup> Green.	35
Tab. 4:	Proteinkonzentration der EDTA-Extrakte.	62
Tab. 5:	Selektivität im Osteocalcin-spezifischen Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper, für BFKM-Hintergrund unterschiedlicher Konzentrationen in Schweinemehl in drei unabhängigen Messungen.	67
Tab. 6:	Intraassay-Variation der entwickelten RT-iPCR-Systeme.	78
Tab. 7:	Intraassay-Variation der entwickelten RT-iPCR-Systeme bei der Detektion unterschiedlicher Konzentrationen boviner Fleisch- und Knochenmehle in pflanzlichen Futtermitteln.	80

**ABKÜRZUNGEN**

Δ	delta
°C	Grad Celsius
A	Absorption
A	Adenin (Base)
A. purif.	<i>aqua purificata</i>
Abb.	Abbildung
AG	Antigen(e)
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n), Aminosäuresequenz
BCA	Bicinchoninsäure
BFKM	bovine(s) Fleisch- und Knochenmehl(e)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Base)
ca.	cirka
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Ct	threshold cycle
CV	Variationskoeffizient
CWD	Chronic Wasting Disease
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMNV	Nucleus dorsalis des Vagus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENS	enterales Nervensystem
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EU	Europäische Union
EUE	Exotic Ungulate spongiform Encephalopathy
EU-RL-AP	gemeinschaftliches Referenzlabor für tierische Proteine
evtl.	eventuell

fCJK	familiäre CJK
FFI	Fatal Familial Insomnia
FKM	Fleisch- und Knochenmehl(e)
FM	Futtermittel(n)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin (Base)
GC	Guanin-Cytosin
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gly	Glycerin
GMCG	Ganglion mesenteriale craniale / Ganglion coeliacum-Komplex
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
h	Stunde(n)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertz
iCJK	iatrogene CJK
IgG	Immunglobulin G
iPCR	Immuno-PCR
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
log	Logarithmus
LPH	Limulus polyphenus Hämocyanin
M	Molar
mA	Milliampere
mAK	monoklonale(r) Antikörper
Mb	Myoglobin
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
N	Normal

## ABKÜRZUNGEN

---

ng	Nanogramm
NHP	TSE in nicht-humanen Primaten
nm	Nanometer
NTC	No Template Control (Negativkontrolle)
OC	Osteocalcin
OD	optische Dichte
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit
pAK	polyklonale(r) Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pfu	plaque forming units (Plaque-bildende Einheiten)
pg	Pikogramm
PrP <sup>C</sup>	physiologische(s) Prion-Protein(e)
PrP <sup>Sc</sup>	pathogene(s) Prion-Protein(e)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-iPCR	real-time Immuno-PCR
RT-PCR	real-time PCR
sCJK	sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Ser	Serin
sFI	sporadische fatale Insomnia
SRM	spezifizierte(s) Risikomaterial(ien)
ssDNA	single-strand DNA (Einzelstrang-DNA)
STV	Streptavidin
T	Thymin (Base)
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBA	Tierkörperbeseitigungsanlage(n)
TCE	Tetrachlorethylen
TM	Marke, USA (trademark)
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
TMR	Tetramethylrhodamin
TP	tierische(s) Protein(e)
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie(n)
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
UV	ultraviolett

## ABKÜRZUNGEN

---

v. Chr.	vor Christus
vCJK	neue Variante der CJK
VPSPr	variably protease sensitive prionopathy
Xgal	5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
YAK	Yakima Yellow
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrale(s) Nervensystem
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar



**I. EINLEITUNG**

**1. Hintergrund**

**1.1. Transmissible spongiforme Enzephalopathie**

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) bilden eine Gruppe infektiöser, übertragbarer neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), die sowohl Menschen als auch eine Vielzahl von Tieren befallen. Das verantwortliche infektiöse Agens ist das Prion, ein pathologisch gefaltetes und aggregiertes Protein, welches zu einer Zerstörung des Hirngewebes führt (Aguzzi & Calella 2009). TSE verursachen nach einer Monate bis Jahrzehnte andauernden Inkubationszeit eine chronisch progressive Degeneration des ZNS, und enden nach unterschiedlich langen Krankheitsverläufen stets tödlich (Beekes & McBride 2007). Rasch fortschreitende Demenz, Myoklonus, visuelle oder cerebelläre Beeinträchtigung, pyramidale / extrapyramidale Zeichen und akinetischer Mutismus charakterisieren das klinische Bild (Aguzzi & Calella 2009). Sowohl Intra- als auch Interspeziesübertragungen sind möglich. Bisher wurden 16 verschiedene Prionenkrankheiten dokumentiert, 9 beim Menschen und 7 bei Tieren (Tab. 1, nach Imran & Mahmood 2011).

**Tab. 1: Ätiologie von Prionenerkrankungen (Transmissible spongiforme Enzephalopathien, TSE).**

<i>Tierische Prionenerkrankungen</i>			
<b>Krankheit</b>	<b>Wirt</b>	<b>Ätiologie</b>	<b>Jahr der Beschreibung</b>
Scrapie	Schaf, Ziege	Infektion mit Prionen unbekannter Herkunft	1732
TME	Nerz	Infektion mit Prionen entweder von Schaf oder Rind	1947
CWD	Hirschartige	Infektion mit Prionen unbekannter Herkunft	1967
BSE	Rind	Infektion mit Prionen unbekannter Herkunft	1986
EUE	Nyala, Kudu	Infektion mit BSE-ursprünglichen Prionen	1986
FSE	Katze	Infektion mit BSE-ursprünglichen Prionen	1990
NHP	Lemur	Infektion mit BSE-ursprünglichen Prionen	1996
<i>Humane Prionenerkrankungen</i>			
<b>Krankheit</b>	<b>Wirt</b>	<b>Ätiologie</b>	<b>Jahr der Beschreibung</b>
Kuru	Mensch	Ritueller Kannibalismus	um 1900
sCJK	Mensch	Spontane PrP <sup>C</sup> → PrP <sup>Sc</sup> Konversion oder somatische Mutation	1920
fCJK	Mensch	Mutation des PRNP	1924
GSS	Mensch	Mutation des PRNP	1936
iCJK	Mensch	Infektion mit Prionen humanen Ursprungs	1974
FFI	Mensch	PRNP Haplotyp 178N-129M	1986
vCJK	Mensch	Infektion mit BSE-ursprünglichen Prionen	1996
sFI	Mensch	Spontane PrP <sup>C</sup> → PrP <sup>Sc</sup> Konversion oder somatische Mutation	1999
VPSPr	Mensch	Spontane PrP <sup>C</sup> → PrP <sup>Sc</sup> Konversion oder somatische Mutation	2008

TME= Transmissible Mink Encephalopathy; CWD= Chronic Wasting Disease; BSE= Bovine spongiforme Enzephalopathie; EUE= Exotic Ungulate spongiform Encephalopathy; FSE= Feline spongiforme Enzephalopathie; NHP= TSE in nicht-humanen Primaten; sCJK= sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit; fCJK= familiäre CJK; GSS= Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom; iCJK= iatrogene CJK; FFI= Fatal Familial Insomnia; vCJK= neue Variante der CJK; sFI= sporadische fatale Insomnia; VPSPr= variably protease sensitive prionopathy (nach Imran & Mahmood 2011).

### 1.1.1. Prionen

Prionen, von Stanley B. Prusiner 1982 als „proteinaceous infectious particle“ definiert, verursachen fatale, neurodegenerative Krankheiten, welche sowohl Tiere als auch Menschen befallen. Das Agens ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) ist eine fehlgefaltete aggregierte Form des wirtskodierten zellulären Prion-Proteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), welches sich durch autokatalytische Umwandlung verbreitet und hauptsächlich im Gehirn anreichert (Béringue *et al.* 2008). Prionen sind infektiöse pathologisch gefaltete aggregierte Proteine, welche sich vermehren, indem sie dem wirtsspezifischen zellulären Prion-Protein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) ihre Konformation aufzwingen und sich somit selbst replizieren (Aguzzi & Calella 2009; Prusiner 1991).

Im Gegensatz zu Krankheitserregern mit einem Nukleinsäuregenom scheinen Prionen stammspezifische Eigenschaften in der Tertiärstruktur zu verschlüsseln. Sie sind extrem stabil und resistent gegen Proteasen, Hitze, Strahlung sowie andere denaturierende Behandlungen und können selbst durch Prozesse in Tierkörperbeseitigungsanlagen nicht vollständig inaktiviert werden (Prusiner 1998).

Wirtskodierte Prion-Proteine liegen mit einer überwiegend  $\alpha$ -helix Struktur ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) physiologisch auf den Oberflächen von Säugerzellen vor. Nach der Infektion mit pathologisch gefalteten Prionen ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) kommt es zu einer Konformationsänderung von der  $\alpha$ -helix-reichen, in die hauptsächlich  $\beta$ -Faltblatt beinhaltende unlösliche und Protease-K-resistente Isoform  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  (Abb. 1). Dies erfolgt zunächst in Gegenwart von exogenem  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  und dann durch einen autokatalytischen Prozess (Béringue *et al.* 2008). Proteasen können die unphysiologische  $\beta$ -Faltblatt-reiche Form nicht abbauen, was zu einer Akkumulation von Amyloidfibrillen in dem ZNS und zu Neurodegeneration führt, wodurch es zu neurologischen Abnormalitäten kommt (Kupfer *et al.* 2009).

Das zentrale Geschehen bei der Prionpathogenese ist somit die Konformationsänderung des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ins  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , eine unlösliche und



Abb. 1: Schematische Darstellung des Prion-Proteins. Links die physiologische ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), rechts die pathologische Form ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) (aus Bhakdi & Bohl 2002).

partiell Protease-resistente Isoform. Das verdeutlicht, dass die Expression membranständiger  $\text{PrP}^{\text{C}}$  für die Initiierung der Krankheit notwendig ist (Aguzzi & Calella 2009), was mit nicht infizierbaren Knockout-Mäusen ohne zelluläres Prion-Protein gezeigt werden konnte (Campbell 1998). Die physiologische Funktion von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ist bisher unbekannt, es wird eine neuroprotektive Eigenschaft vermutet (Kupfer *et al.* 2009).

### **1.1.2. Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)**

Die 1987 von Wells *et al.* nach dem histopathologischen Bild benannte bovine spongiforme Enzephalopathie ist eine langsam fortschreitende Erkrankung des zentralen Nervensystems bei Rindern, welche unausweichlich letal endet und erstmals 1986 in Großbritannien nachgewiesen wurde (Wilesmith *et al.* 1988). Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch aggressives Verhalten bzw. Verhaltensstörungen, Gangataxie, Parese, Verlust von Körpergewicht, Zittern, Angst sowie Hyperreaktivität auf Stimuli, als Zeichen einer diffusen ZNS-Erkrankung (Wilesmith *et al.* 1988; Imran & Mahmood 2011).

#### ***Ätiologie***

Um 1980 wurde das Verfahren zur Herstellung von Tiermehlen in Tierkörperbeseitigungsanstalten geändert (Campbell 1998), woraufhin pathogene Prion-Proteine (PrP<sup>Sc</sup>) nicht mehr abgetötet wurden. Die Verfütterung unzureichend erhitzter, mit BSE-Erregern kontaminierter Tiermehle führte zur massenhaften Infektion bei Rindern und somit zum Ausbruch der Krankheit. Es wird vermutet, dass Scrapie-Prionen von Schafen den Tierkörperbeseitigungsprozess überlebten und auf Rinder übertragen wurden. Alternativ dazu könnten auch sporadisch auftretende pathologische bovine Prionen den Tierkörperbeseitigungsprozess überlebt und durch orale Inokulation über Fleisch- und Knochenmehle (FKM) BSE bei Rindern initiiert haben. So bleibt bis heute ungeklärt, ob mit Scrapie infizierte Schafe, oder spontan an BSE erkrankte Rinder am Anfang der Infektionskette standen. Selbst eine Aminosäuresequenzanalyse der PrP<sup>Sc</sup> im BSE-infizierten Rind kann dies nicht klären, da das PrP<sup>Sc</sup> die bovine Sequenz aufweist, egal ob das erste Prion bovinen oder ovinen Ursprungs war (Prusiner 1998). Allerdings ist Scrapie eine seit über 200 Jahren bekannte Erkrankung bei Schafen (Aguzzi & Calella 2009) und weist im Vereinigten Königreich, dem Land mit den meisten BSE-Fällen, eine hohe Prävalenz auf. Dort existiert außerdem ein hohes Verhältnis von Schafen zu Rindern und FKM wurden in Rinderfutter in großem Ausmaß genutzt. Diese Fakten sprechen dafür, dass die ursprünglichen Erreger der BSE Scrapie-Prionen ovinen Ursprungs waren (Chatzidaki 2010). Die Tatsache, dass eher Milchviehherden, welche oft mit hoch konzentriertem Futter und Milchaustauscher gefüttert werden, als Fleischherden betroffen sind, unterstützt die futtermittelbedingte Hypothese (Wilesmith *et al.* 1988). Ebenso scheinen im Herbst geborene Milchkühe einem höheren Infektionsrisiko als im Frühling geborene ausgesetzt zu sein, was sich damit erklären lässt, dass die Tiere während der Winterperiode in den Ställen gehalten und mit konzentriertem Futter versorgt werden. Bemerkenswert ist, dass auch Nyala und Gemsbok, welche mit FKM gefüttert wurden, eine Scrapie-ähnliche Erkrankung mit spongiformer Enzephalopathie entwickelten (Wilesmith *et al.* 1988; Ducrot *et al.* 2008). Hingegen tritt BSE in Ländern wie Australien oder Brasilien, wo Rinder nahezu ausschließlich auf Grasweiden gehalten werden, nicht auf (Chatzidaki 2010).

Die meisten Tiere erwerben die Infektion innerhalb der ersten 6 Lebensmonate durch orale Aufnahme BSE-kontaminierter Futtermittel (Wilesmith *et al.* 1988), wobei die mittlere Inkubationszeit bei 5 bis 5,5 Jahren liegt (Prusiner 1998; Ghani *et al.* 2002; Arnold & Wilesmith 2004). In Studien konnte eine Dosis-abhängige Inkubationszeit nachgewiesen werden, wobei eine Infektion schon bei oraler Gabe von 1 g Gehirnhomogenat infizierter Tiere stattfand. Die maternale Übertragung von Kuh auf Kalb scheint keine bedeutende Rolle in der Epidemiologie von BSE zu spielen (Anderson *et al.* 1996) und in Übertragungsstudien konnten BSE-Prionen bisher nicht in Milch, Spermia oder Embryonen nachgewiesen werden (Imran & Mahmood 2011).

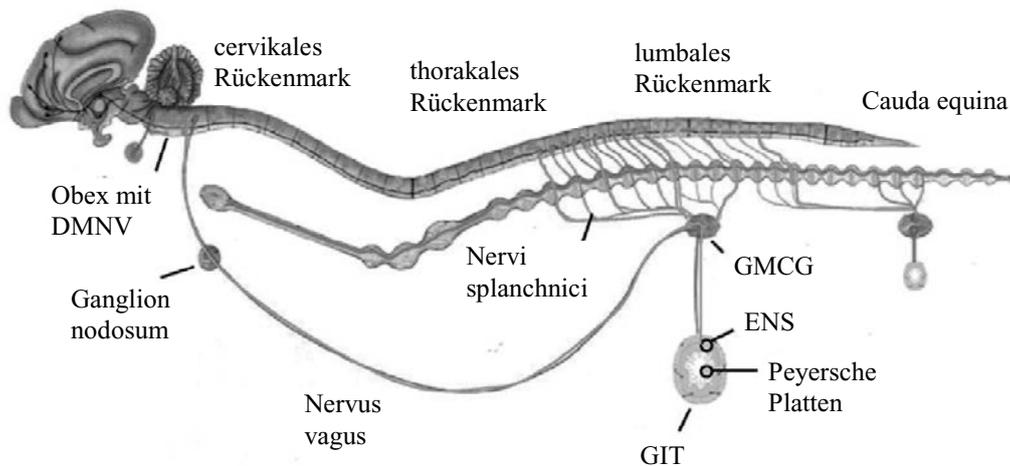
### ***Erregerverbreitung im Körper***

Anders als beim kleinen Wiederkäuer erfolgt der Erregertransport und die Erregerverbreitung beim Rind ausschließlich auf neuronalem Weg zum Gehirn, während das lymphatische System beim Transport keine Rolle zu spielen scheint (Buschmann & Groschup 2005). Allerdings stellen die Peyerschen Platten des distalen Ileums und die Tonsillen die Eintrittspforte des Agens nach oraler Aufnahme dar (Balkema-Buschmann *et al.* 2011 a). Die Aufnahme des Erregers erfolgt hauptsächlich im Ileum, aber auch im Jejunum und auch noch am Übergang zum Dickdarm (Hoffmann *et al.* 2011; Okada *et al.* 2011).

Nach der Aufnahme des BSE-Agens und der Überquerung des Darmepithels folgt eine Replikation im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe. Daraufhin verbreitet sich das Agens über das enterale Nervensystem des Darms (van Keulen *et al.* 2008).

Prionen breiten sich anterograd aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) auf das ZNS über zwei Routen, bei denen jeweils das vegetativen Nervensystem involviert ist, aus: (i) über den Nervus Vagus (parasymphatische GIT Innervation) (Beekes & McBride 2007) und (ii) über den coeliakalen und mesenterialen Ganglionkomplex, N. Splanchnicus und das thorakale Rückenmark (sympathische GIT Innervation) (Abb. 2).

Die Spinalganglien scheinen anschließend betroffen zu sein und eine Invasion mit BSE-Prionen des nicht-autonomen peripheren Nervensystems (z.B. des Nervus Ischiadicus) scheint ein sekundäres retrogrades Ereignis nach der Prion-Replikation im ZNS zu sein (Hoffmann *et al.* 2007). Somit ist es wahrscheinlich, dass im Spätstadium der Erkrankung eine zentrifugale Verbreitung von dem ZNS in die Peripherie stattfindet (Balkema-Buschmann *et al.* 2011 a).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des neuronalen Weges des Erregers aus dem Magen-Darm-Trakt zu dem zentralen Nervensystem (ZNS). Nach oraler Aufnahme sind PrP<sup>Sc</sup> in den Peyerschen Platten und dem enteralen Nervensystem (ENS), gefolgt von dem Ganglion mesenteriale craniale / Ganglion coeliacum-Komplex (GMCG) nachweisbar. Von dort folgt das Agens afferenten (sensorischen) oder efferenten (motorischen) Fasern des parasympathischen und / oder sympathischen Nervensystems. Der parasympathische Weg führt über den Nervus vagus zum Ganglion nodosum und weiter zum Nucleus dorsalis des Vagus (DMNV), welcher in der Obexregion gelegen ist. Der sympathische Weg führt über die Nervi splanchnici des thorakalen Rückenmarkes und breitet sich in beide Richtungen (Gehirn und Cauda equina) aus (aus Balkema-Buschmann *et al.* 2011 a; nachgedruckt mit Genehmigung von Elsevier).

### 1.1.3. Atypische BSE

Neben dem BSE-Stamm, welcher die klassische BSE verursacht, wurden zwei weitere Stämme (H-Typ und L-Typ), welche die sogenannte atypische BSE verursachen, beschrieben (Imran & Mahmood 2011). Diese vermutlich spontanen BSE-Fälle wurden bei über 8 Jahre alten Rindern gefunden und lassen sich voneinander und von der klassischen BSE anhand biochemischer Eigenschaften und Übertragungscharakteristika unterscheiden (Groschup *et al.* 2008). So weist beispielsweise der H-Typ, verglichen mit der klassischen BSE, eine höhere Molekularmasse bei gleichem Glykopprofil auf (Biacabe *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu verfügt die L-Typ BSE über eine etwas geringere Molekularmasse sowie ein anderes Glykopprofil und weist amyloide Plaques auf, welche ebenfalls nicht bei der klassischen BSE vorkommen (Casalone *et al.* 2004). Für die L-Form der atypischen BSE wird außerdem ein höheres zoonotisches Potential vermutet (Comoy *et al.* 2008). Bemerkenswert ist, dass bei der L-Typ BSE die Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> in den verschiedenen Hirnregionen nicht genau dem Muster folgt, das für klassische BSE bekannt ist. So waren die höchsten PrP<sup>Sc</sup>-Mengen nicht im Hirnstamm (Obexregion), sondern stattdessen im Thalamus und der olfaktorischen Region detektierbar (Casalone *et al.* 2004). Dieser Befund stellt in Frage, ob schwache Fälle von L-Typ BSE detektiert werden, wenn die Hirnstamm-Regionen, die die Zielgebiete für BSE-Diagnosemethoden darstellen, möglicherweise kein positives Ergebnisse in den diagnostischen Tests ergeben (Balkema-Buschmann *et al.* 2011 a). Daher scheint das jetzige

Überwachungssystem, das Schnelltests vor allem im Hirnstamm der Tiere vorsieht, für die Erfassung atypischer BSE-Erkrankungen nicht geeignet zu sein.

Bei der atypischen BSE dürfte es sich um das bovine Gegenstück zur sporadischen CJK des Menschen handeln. Wie sie entstehen wahrscheinlich auch atypische BSE-Formen ohne äußeren Einfluss vor allem in höherem Alter. Eine Übertragung durch den Konsum infizierter Tiere auf den Menschen bzw. ein Eintrag in die Lebens- und Futtermittelkette sollte allerdings trotz des sporadischen Auftretens durch entsprechende Regelungen verhindert werden, wobei Diagnosemethoden, welche eine sichere Detektion atypischer BSE (insbesondere der L-Form) ermöglichen, zum Einsatz kommen sollten.

### **1.1.4. BSE verursacht die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK)**

Bei der vCJK, welche erstmals 1996 beschrieben wurde (Will *et al.* 1996), handelt es sich um das humane Gegenstück zu BSE. Sowohl im Hinblick auf klinische, pathologische und molekulare Kriterien lassen sich vergleichbare Übertragungscharakteristika für vCJK und BSE feststellen. Dabei unterscheidet sich vCJK von allen anderen Formen von sporadischen und erworbenen CJK, weshalb suggeriert wird, dass BSE die vCJK verursacht (Hill *et al.* 1997). Klinisch äußert sich die vCJK mit dem Einsetzen von psychiatrischen Auffälligkeiten, sensorischen Symptomen sowie Ataxie und führt schließlich zu Demenz (Aguzzi & Calella 2009). Die Erkrankung schreitet fort mit Prion-Akkumulation und einer progressiven Degeneration des zentralen Nervensystems (Will *et al.* 1996).

Im Unterschied zu den typischen CJK sind bei der BSE-induzierten vCJK eher junge Erwachsene als ältere Menschen betroffen, wobei die Krankheit einen ungewöhnlich langen klinischen Verlauf aufweist und große PrP-Amyloid-Plaques im Kleinhirn provoziert (Manuelidis *et al.* 2009). Die bereits erwähnten PrP-Plaques sind von einer schwammartigen Zone umrundet, welche in ähnlicher Weise auch für Scrapie beschrieben wurden („florid plaques“). Desweiteren weist die vCJK ein neues neuropathologisches Profil auf, wobei keine, für CJK sonst typischen, EEG-Veränderungen sichtbar sind (Will *et al.* 1996).

PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> existieren in 3 Glykosylierungszuständen: unglykosyliert, monoglykosyliert und diglykosyliert, wobei die physiologische Signifikanz der PrP<sup>C</sup>-Glykosylierung unbekannt ist (Aguzzi & Calella 2009). Mit Hilfe eines Proteaseverdau können die beiden Isoformen voneinander unterschieden werden. Proteinase-K hydrolysiert PrP<sup>C</sup> vollständig, während PrP<sup>Sc</sup> an der Amino-terminalen Region fragmentiert wird, wobei ein resistentes carboxylterminales Kernprotein mit einer Molekularmasse von 27-30 kDa entsteht (Kuczius *et al.* 2009).

Auf der Grundlage der Glykosylierung, der Fragmentgröße und der relativen Häufigkeit einzelner Banden im Western Blot (Gelelektrophorese) konnten drei verschiedene Muster von PrP<sup>Sc</sup> (Typen 1-3) für sporadische und iatrogene CJK-Fälle identifiziert werden. Typ 1 und 2 sind assoziiert mit der sporadischen CJK und Typ 3 mit der iatrogenen CJK. Im

Gegensatz dazu zeigen alle Fälle von vCJK ein neues Muster, welches als Typ 4 bezeichnet wurde (Abb. 3). Interessanterweise wird das Glykoformmuster von vCJK hingegen auch bei BSE sowie bei mit BSE infizierten Mäusen, Katzen und Makaken beobachtet (Collinge *et al.* 1996). Diese Ergebnisse unterstützen mit Nachdruck die Hypothese, dass vCJK das Ergebnis einer Übertragung von BSE auf den Menschen ist (Aguzzi & Calella 2009).

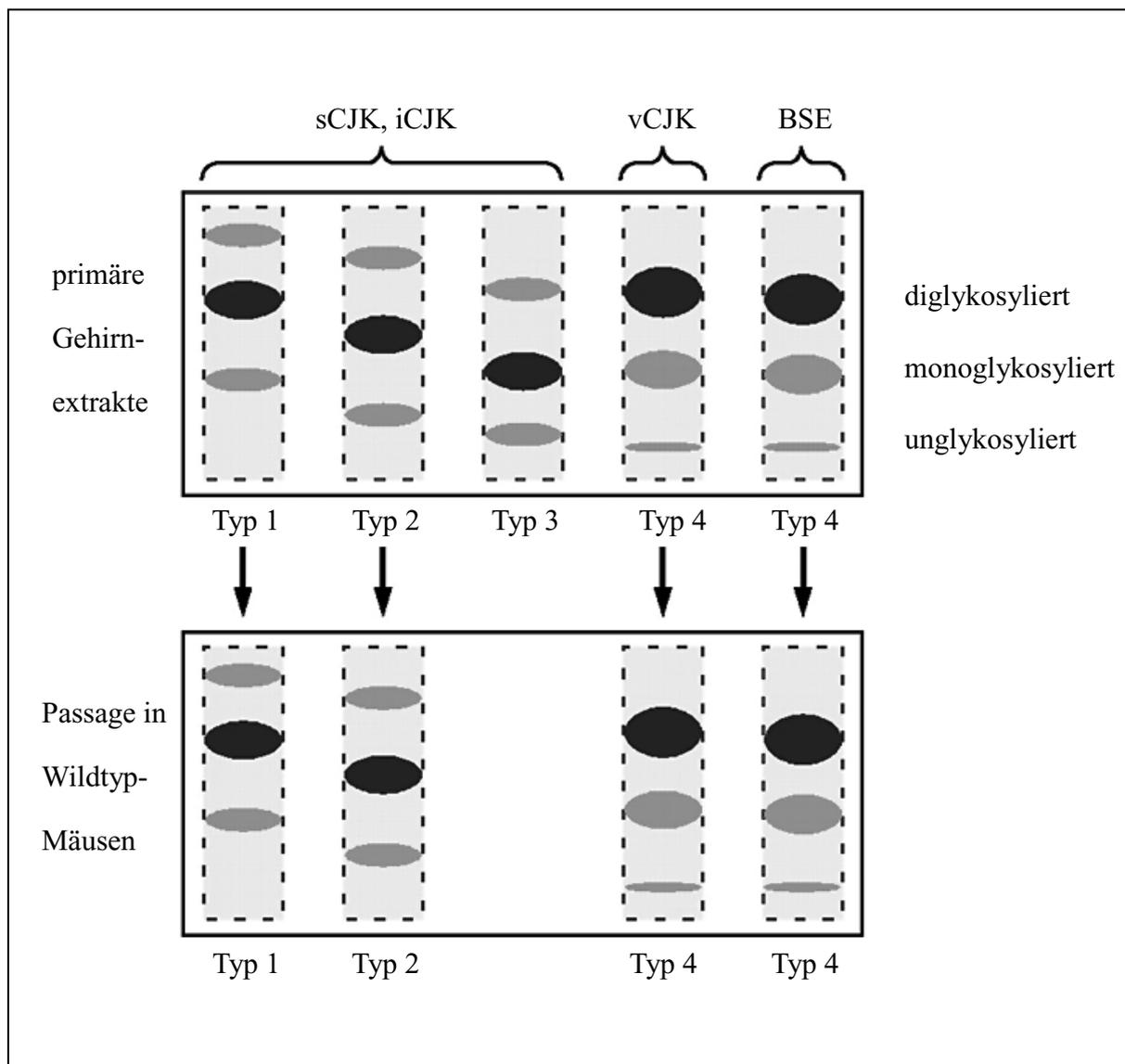


Abb. 3: Schematische Darstellung der drei Glykosylierungsformen von PrP<sup>Sc</sup> im Immunoblot von Gehirnextrakten nach der Digestion mit Proteinase K. Aufgrund der Glykosylierung, der Fragmentgröße und der relativen Häufigkeit einzelner Banden können drei verschiedene Muster von PrP<sup>Sc</sup> (Typen 1-3) für sporadische und iatrogene CJK-Fälle identifiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigen alle Fälle von vCJK und BSE ein neues Muster, welches als Typ 4 bezeichnet wird. Die charakteristischen Muster bleiben auch nach der Passage in infizierten Mäusen erhalten. sCJK= sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit; iCJK= iatrogene CJK; vCJK= Variante der CJK; BSE= Bovine spongiforme Enzephalopathie (aus Aguzzi & Calella 2009).

Bisher wurden weltweit 225 Fälle ([www.eurocjd.ed.ac.uk/](http://www.eurocjd.ed.ac.uk/)) der tödlichen neuen vCJK dokumentiert. Der enorme Unterschied zu allen bisherigen CJK lässt allerdings vermuten, dass eine Diagnose mit den „klassischen“ Untersuchungsmethoden schwierig möglich war. Will *et al.* bemerken, dass wohl keiner der von ihnen benannten Fälle mit den bis dahin etablierten Diagnostik-Methoden als CJK eingestuft worden wäre. Es muss somit vermutet werden, dass auch andere solcher atypischen Fälle möglicherweise nicht erkannt wurden. Ebenso sind Fehldiagnosen besonders in Altersgruppen, in denen Demenz weit verbreitet ist, denkbar (Will *et al.* 1996). Wie hoch die reale Zahl der vCJK-Fälle wirklich ist, lässt sich somit schwer sagen. Der Fakt, dass BSE die vCJK verursacht, lässt aber keinen Zweifel daran, dass die Übertragung der TSE unbedingt verhindert werden muss. Auch muss dabei dokumentierten Fällen einer Übertragung von BSE auf andere Tierarten wie Katzen, Schaf, Schwein, Ziege, Nyala und Kudu (Bruce *et al.* 1994) Rechnung getragen werden.

### **1.2. BSE-Bekämpfung**

BSE hat Rinder in vielen Ländern der Welt befallen, wobei bisher weltweit über 190.000 Fälle registriert wurden ([www.oie.int/](http://www.oie.int/)).

#### **1.2.1. Klinische Überwachung**

Da BSE bei Rindern erst nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 5 Jahren auftritt und die Mehrzahl der Tiere vor diesem Zeitpunkt geschlachtet wurde, ab dem mit klinischen Symptomen gerechnet werden kann, lag die Zahl der infizierten Tiere wahrscheinlich um ein Vielfaches höher (Arnold & Wilesmith 2003; Chatzidaki 2010). Viele infizierte Tiere werden vor dem Auftreten klinischer Symptome für den humanen Konsum geschlachtet worden sein. Es wird geschätzt, dass nur grob 1 von 5 infizierten Tieren als klinischer Fall bestätigt wird (Ghani *et al.* 2002). Somit besitzt die klinische Überwachung nur eine limitierte Fähigkeit, Fälle zu detektieren (Ducrot *et al.* 2008).

#### **1.2.2. Post mortem Untersuchung**

Um den Eintrag der BSE-Erreger in die Lebensmittelkette zu verhindern, wurde ein EU-weites Maßnahmenpaket geschnürt. Dieses beinhaltet unter anderem die Untersuchung aller über 72 Monate alten geschlachteten Rinder, sowie aller Notgeschlachteten, verendeten und getöteten Tiere ab 48 Monate mittels BSE-Schnelltest (Verordnung (EG) Nr. 999/2001; Entscheidung 2009/719/EG; Durchführungsbeschluss 2011/358/EU). Der Vergleich zwischen dem Alter der Detektion gesund geschlachteter und den bestätigten Feld-Fällen legt allerdings nahe, dass eine Detektion erst spät in der Inkubationszeit für gesund geschlachtete positive Tiere möglich ist (Arnold *et al.* 2007). Ebenfalls zu beachten ist, dass Jungrinder, die im Wesentlichen für den Frischfleischkonsum bestimmt sind, durch die Tests nicht erfasst werden, da sie zum Schlachtzeitpunkt in der Regel für eine detektierbare Erkrankung zu jung

sind (Statistisches Bundesamt 2008). Eine Detektion von PrP<sup>Sc</sup> im ZNS ist wahrscheinlich erst 42 Monate nach Exposition in der Mehrheit der Tiere möglich (Arnold *et al.* 2007).

In einer Studie wurden nach oraler Gabe von 100 oder 1 g BSE-infizierten Gehirns, frühestens 30 (100 g) bzw. 44 (1 g) Monate nach der Exposition PrP<sup>Sc</sup> detektiert. Das Alter, bei dem PrP<sup>Sc</sup> in 50 % der Tiere immunohistochemisch in der Medulla-Obexregion detektierbar war, wird auf 9,6 (100 g) und 1,7 (1 g) Monate vor dem Auftreten klinischer Symptome geschätzt. Hierbei sind die Ergebnisse der 1 g-Gruppe eher relevant für die Feldsituation, da eine 1 g-Dosis von Gehirnhomogenat einer mittleren Inkubationszeit von 5 Jahren entspricht, welche mit berichteten Fällen übereinstimmt. Das deutet an, dass PrP<sup>Sc</sup> in Rindern mit hoher Wahrscheinlichkeit erst schätzungsweise 1,5 Monate vor dem Auftreten klinischer Erscheinungen detektiert werden können (Arnold *et al.* 2007).

Das ultimative Verbraucherrisiko liegt letztendlich in der Menge infektiösen Materials, welches in die Lebensmittelkette gelangt. Das bedeutet, je weniger sensitiv der Test, umso mehr Tiere im Finalstadium der Inkubationsphase können in die Lebensmittelkette gelangen (Arnold & Wilesmith 2003).

### **1.2.3. Entfernung von spezifiziertem Risikomaterial (SRM)**

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Bekämpfung der BSE ist die Entfernung und unschädliche Beseitigung von spezifiziertem Risikomaterial. SRM sind diejenigen Gewebe beziehungsweise Organe eines BSE-infizierten Tieres, von denen angenommen wird, dass sie die BSE-Infektiosität enthalten. In der EU ist die SRM-Entfernung aus der Lebens- und Futtermittelkette seit dem Jahr 2000 verbindlich vorgeschrieben. Die Beschränkungen der SRM-Verwendung schließen das Verbot der Verwendung daraus gewonnener Erzeugnisse in Lebens- und Futtermitteln, wie Talg, Gelatine, Kollagen und Dikalziumphosphat, ein (Zweiter Fahrplan für die TSE-Bekämpfung 2010). Allerdings kann das Entfernen von SRM das ernährungsbedingte Expositionsrisiko nicht vollständig verhindern, da es unter anderem schwierig ist, bestimmte Gewebe komplett zu entfernen (Ducrot *et al.* 2008).

Als SRM gelten der Schädel ohne Unterkiefer, jedoch einschließlich Gehirn und Augen, und das Rückenmark von Rindern, die über 12 Monate alt sind; die Wirbelsäule ohne Schwanzwirbel, die Dorn- und Querfortsätze der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule und Crista sacralis mediana sowie Kreuzbeinflügel, einschließlich der Spinalganglien von über 30 Monate alten Tieren (Verordnung (EG) Nr. 357/2008); die Tonsillen, die Eingeweide von Duodenum bis Rektum und das Gekröse von Rindern aller Altersklassen (Verordnung (EG) Nr. 999/2001).

Die Liste an SRM variiert zwischen den Ländern, unter anderem auch zwischen der Europäischen Union und Nord-Amerika. Bisher existiert keine internationale SRM Regelung. Beispielsweise ist der Dünndarm von Rindern jeder Altersklasse in der EU [noch] verboten, während in Nord-Amerika nur das distale Ileum verboten ist. Rinderdärme, welche vom

Jejunum hergestellt werden, sind somit in der EU für den Humankonsum verboten, nicht aber in Nord-Amerika (Hoffmann *et al.* 2011).

Es wird angestrebt, die SRM-Liste der EU mit den internationalen Standards der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) in Einklang zu bringen (insbesondere in Bezug auf Rinderdärme) (Zweiter Fahrplan für die TSE-Bekämpfung 2010). Dabei sollte allerdings beachtet werden, inwieweit eine Lockerung mit den Interessen des Verbraucherschutzes in Übereinstimmung zu bringen ist.

In einer Studie wiesen 40 von 46 oral mit BSE infizierte Tiere detektierbare Mengen von PrP<sup>Sc</sup> und / oder BSE-Infektiösität im Dünndarm auf. Die meisten positiven Ergebnisse waren auf das distale Ileum beschränkt, aber auch in allen anderen Teilen des Dünndarms waren PrP<sup>Sc</sup> und / oder BSE-Infektiösität detektierbar. Dabei hatte die Studie ihren Fokus auf den Dünndarm präklinischer BSE-Rinder und insbesondere auf junge Tiere zwischen 4 und 24 Monaten, weil die Mehrheit des Rindfleisches und der Rindfleisch-Nebenprodukte für den Konsum aus dieser Altersgruppe kommt (Hoffmann *et al.* 2011). Sowohl Ileum, Jejunum als auch der ileocaecale Bereich sind nachweislich in der frühen Pathogenese von BSE nach oraler Aufnahme involviert. Die Restriktion, in Nord-Amerika nur das Ileum als SRM zu entfernen, könnte die Möglichkeit erlauben, dass BSE-Erreger in die Lebens- und Futtermittelkette gelangen (Balkema-Buschmann *et al.* 2011 a). Bei einer möglichen inner-europäischen Lockerung des SRM-Gebots sollte dies Berücksichtigung finden, um den Verbraucherschutz sicherzustellen.

Darüber hinaus wurden BSE-assoziierte PrP<sup>Sc</sup> bereits im Hirnstamm von einem Tier 24 Monate nach der Infektion erfasst, 8 Monate früher als bisher berichtet (Hoffmann *et al.* 2007). Dies könnte zu einer Diskrepanz zwischen der Altersbeschränkung für das Entfernen von SRM führen, da beispielsweise die Wirbelsäule erst ab dem 30. Lebensmonat entfernt werden muss (Verordnung (EG) Nr. 999/2001). Auch das sollte Beachtung finden bei der Diskussion über die Altersbeschränkung für SRM.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass während der klinischen Phase eines BSE-infizierten Rindes eine zentrifugale Verbreitung der Infektiösität entlang Nervenfasern in die Peripherie auftreten kann (Buschmann & Groschup 2005). Auch konnte BSE-Infektiösität in der Zunge und der nasalen Mucosa (welche bisher als BSE-frei galten) bei einem an BSE erkrankten Rind festgestellt werden. Es kann vermutet werden, dass die Infektiösität in diesen Geweben ein Ergebnis der radialen Verbreitung vom ZNS entlang kleiner Nervenfasern ist. Das zeigt, dass BSE-Infektiösität auch in peripheren Geweben erkrankter BSE-Rinder im terminalen Stadium auftreten kann, selbst in Geweben, die für den Humankonsum genutzt werden. Dieser Fakt könnte ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher bedeuten, da bisher Zungenmuskulatur nicht als SRM gelistet ist und regelmäßig verzehrt wird (Balkema-Buschmann *et al.* 2011 b).

Geringe Mengen von BSE-Infektiösität waren auch in einer Probe des M. Semitendinosus nachweisbar. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass der Muskel durch einen Zweig des N. Ischiadicus innerviert wird, für welchen auch eine Infektiösität gezeigt werden konnte (Buschmann & Groschup 2005).

Im Endstadium können somit auch Gewebe, die zum menschlichen Verzehr geeignet sind, den Erreger enthalten (Buschmann & Groschup 2005; Hoffmann *et al.* 2007; Balkema-Buschmann *et al.* 2011 a). Dies verdeutlicht, dass das alleinige Entfernen von SRM keinen 100 %igen Schutz vor einer Erregerübertragung durch die Lebens- und Futtermittelkette darstellen kann. Den einzigen sicheren Schutz vor einer Infektion bietet somit nur das völlige Verfütterungsverbot potentiell erregerhaltigen Materials.

### **1.2.4. Das Verfütterungsverbot tierischer Proteine**

Die Verfütterung von Fleisch- und Knochenmehlen (FKM) an Nutztiere ist in Europa durch die Verordnung (EG) Nr. 999/2001 verboten. Darüber hinaus wurde ein übergreifendes Intraspezies-Verfütterungsverbot gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 festgelegt. Die einzigen Ausnahmen von dem strengen FKM-Verbot sind Fischmehle, die für die Verfütterung an Schweine, Geflügel und in Milchaustauschern für Kälber verwendet werden können (Verordnung (EG) Nr. 999/2001) sowie die unbeabsichtigte und unvermeidbare Kontamination von Knochensplittern in pflanzlichen Futtermitteln (Verordnung (EG) Nr. 163/2009). Das offizielle Verfahren für den Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln basiert auf der klassischen Lichtmikroskopie (Verordnung (EG) Nr. 152/2009). Derzeit wird verarbeitetes tierisches Eiweiß, dessen Verwendung als Futtermittel verboten ist, hauptsächlich zur Herstellung von Düngemitteln, Kompost oder Brennstoffen für Zementwerke eingesetzt. Es wird eine Aufhebung des Verbots, verarbeitete tierische Proteine von Nicht-Wiederkäuern an Nicht-Wiederkäuer zu verfüttern, erwogen, allerdings ohne das bestehende Verbot der Rückführung ein und derselben Tierart in die Futtermittelkette aufzuheben. Dies wäre jedoch nur akzeptabel, wenn validierte Analyseverfahren zur Feststellung von welcher Art das verarbeitete tierische Eiweiß stammt, verfügbar sind (Zweiter Fahrplan für die TSE-Bekämpfung 2010). Dabei gilt außerdem zu beachten, dass die Sicherstellung der Einhaltung des Verfütterungsverbots boviner FKM wahrscheinlich der wichtigste Schritt bei der Verhinderung der Ausbreitung von BSE ist (Lewis 2010) und somit auch einen essentiellen Beitrag zur Verhütung der vCJK leistet, die durch die Aufnahme BSE-erregerhaltigen Materials verursacht wird (Will *et al.* 1996; Hill *et al.* 1997).

## 2. Zielsetzung

Sowohl die klinische Überwachung, die post mortem Untersuchung, als auch die Entfernung von SRM weisen Mängel in Bezug auf eine sichere Verhütung des Eintrags pathologischer Prionen in die Futter- bzw. Lebensmittelkette auf. Das Verfütterungsverbot tierischer Proteine an Lebensmittel liefernde Tiere ist die tragende Säule bei der Verhinderung der Übertragung der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE), allerdings nur dann, wenn entweder das vollständige Verfütterungsverbot tierischer Proteine aufrecht erhalten bleibt oder sichere Nachweisverfahren, die eine speziesspezifische Detektion in Futtermitteln zulassen, zur Verfügung stehen. Es ist anzunehmen, dass das Verfütterungsverbot für Wiederkäuer in naher Zukunft nicht aufgehoben wird, während das Verbot der Verfütterung von verarbeiteten tierischen Proteinen an Nicht-Wiederkäuer gelockert werden könnte, sobald analytische Möglichkeiten für die Speziesbestimmung zur Verfügung stehen. Die erste Erlaubnis zur Wiederverwendung von Fischmehl in Milchersatzfutter für junge Wiederkäuer (Verordnung (EG) Nr. 956/2008) sowie die Akzeptanz gegenüber Knochensplittern als unbeabsichtigte und unvermeidbare Kontamination in pflanzlichen Futtermitteln (Verordnung (EG) Nr. 163/2009) weisen in diese Richtung. Weitere Lockerungen sind derzeit ebenso in der Diskussion wie die Einführung eines generellen Schwellenwertes für unbeabsichtigte Einträge von Fleisch- und Knochenmehl (FKM) in Futtermitteln. Vor diesem Hintergrund wird derzeit intensiv nach analytischen Verfahren gesucht, welche idealerweise das Potential zur Tierarten- und / oder Gewebedifferenzierung aufweisen und zudem quantitative Bestimmungen erlauben. Das offizielle Verfahren für den Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln basiert auf der klassischen Lichtmikroskopie (Verordnung (EG) Nr. 152/2009). Ein zweiter Test mit alternativen Methoden kann durchgeführt werden, um den Nachweis bestimmter Arten tierischer Bestandteile zu verbessern oder den Ursprung der tierischen Bestandteile weiter zu spezifizieren.

Um die Infektiösität pathologischer Prionen auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die Prozessstandards für die Behandlung von Tierkörpern geändert (133 °C bei einem Druck von 300 kPa für 20 Minuten) (Lewis 2010). Die mikroskopische Methode ermöglicht die Detektion wärme- und druckresistenter Partikel tierischen Ursprungs wie Knochenfragmente, Zähne, Haare, Kiemen oder Schuppen, die resistent gegen die gesetzlich vorgeschriebene FKM-Behandlung von 133 °C für 20 Minuten bei 300 kPa sind (Liu *et al.* 2011). Jedoch können Tierkörperverwertungsprozesse infektiöse Prionen nicht vollständig inaktivieren und erlauben die Verbreitung der Krankheit (Prusiner 1998), wenn die Erreger in die Futtermittel- bzw. Lebensmittelkette gelangen. Im März bzw. Mai 2005 wurden in Deutschland zwei BSE-Fälle bei Rindern festgestellt, welche nach Einführung des Verfütterungsverbots im Jahr 2001 geboren worden waren. Dies deutet darauf hin, dass die Tiere mit Futtermitteln, die unter das Verbot fielen, gefüttert wurden (Groschup *et al.* 2008). Es besteht somit eine dringende Notwendigkeit der Entwicklung sicherer Nachweismethoden für die Detektion tierischer

Proteine in Futtermitteln (insbesondere bovinen Materials), da es durch die Anwendung des Mikroskops bisher nicht möglich ist, zwischen Arten in Futtermittelproben, die verarbeitete tierische Proteine enthalten, zu unterscheiden. Ebenfalls kann bisher das Intraspezies-Verfütterungsverbot nicht kontrolliert werden. Es bleibt außerdem fraglich, inwieweit eine zuverlässige mikroskopische Diskriminierung von Fischmehlen, welche in Milchaustauschern bereits wieder eingesetzt werden dürfen, gegenüber anderen FKM möglich ist, da dies gerade jene Altersgruppe betrifft, die besonders empfänglich für eine Infektion ist (Wilesmith *et al.* 1988). Darüber hinaus hängt die mikroskopische Untersuchung von individuellen Fähigkeiten ab und ermöglicht zwar eine Abschätzung, nicht aber die Quantifizierung der FKM-Gehalte in einer Futtermittelprobe. Der individuelle Faktor dieses Verfahrens ist mit verantwortlich für die großen Interlabordifferenzen hinsichtlich quantitativer Angaben, wie die bislang durchgeführten Ringversuche des gemeinschaftlichen Referenzlabors für tierische Proteine in Futtermitteln (EU-RL-AP) gezeigt haben. Im Rahmen seines Jahresarbeitsprogramms hat das EU-RL-AP die Leistungsfähigkeit des mikroskopischen Verfahrens bei der quantitativen Bestimmung tierischer Bestandteile von Futtermitteln untersucht. Die Ergebnisse dieser Bewertung haben gezeigt, dass das derzeitige Verfahren für die Zwecke der Quantifizierung nicht zuverlässig ist. Die zwingende zwanzigminütige Behandlung von Säugerproteinen bei 133 °C und 300 kPa führt in der Tat zu sehr kleinen Fragmenten tierischer Proteine, die mit den derzeitigen Analyseverfahren schwer nachzuweisen sind (Zweiter Fahrplan für die TSE-Bekämpfung 2010). Deshalb - und vor dem Hintergrund der vor kurzem diskutierten Schwellenwerte und einer weiteren Aufhebung des Verfütterungsverbots in der Europäischen Union - besteht ein dringender Bedarf an alternativen Methoden, um die derzeitigen Nachteile zu überwinden und eine rechtlich einheitliche Futtermitteluntersuchung sowie Strafverfolgung bei Nichteinhaltung zu ermöglichen. Dazu möchte diese Arbeit beitragen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, basierend auf der Verifizierung potentieller tierischer Marker, ein Detektionssystem für den Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln zu entwickeln. Im Gegensatz zu vielen in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen, sollten dazu zunächst anhand von Sequenzanalysen und Literaturrecherche, potentielle tierische Marker identifiziert und auf ihre Eignung überprüft werden. Ziel war es, einen oder mehrere Marker zu identifizieren, welche sowohl eine Tierart- und / oder Gewebedifferenzierung ermöglichen könnten, als auch temperatur- und druckresistent sind und in hohem Maße in tierischen Abfallprodukten vorkommen. Als Alternative zur Mikroskopie sollte der sequenz- und speziesspezifische Nachweis zumindest an einem potentiellen Marker demonstriert werden. Im Besonderen sollte verifiziert werden, inwieweit Rind von anderen Tierarten diskriminiert werden kann und ob es möglich ist, selbst geringste Beimischungen bovinen Materials in Futtermitteln oder Fischmehl zu detektieren. Die Bemühungen der vorliegenden Arbeit sollen dem Eintrag bovinen Materials in die Lebens- und Futtermittelkette entgegenwirken und somit die Übertragung transmissibler spongiformer Enzephalopathien einzudämmen helfen.

### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1. Antigen-Antikörper-Reaktion als Grundlage immunologischer Detektionssysteme

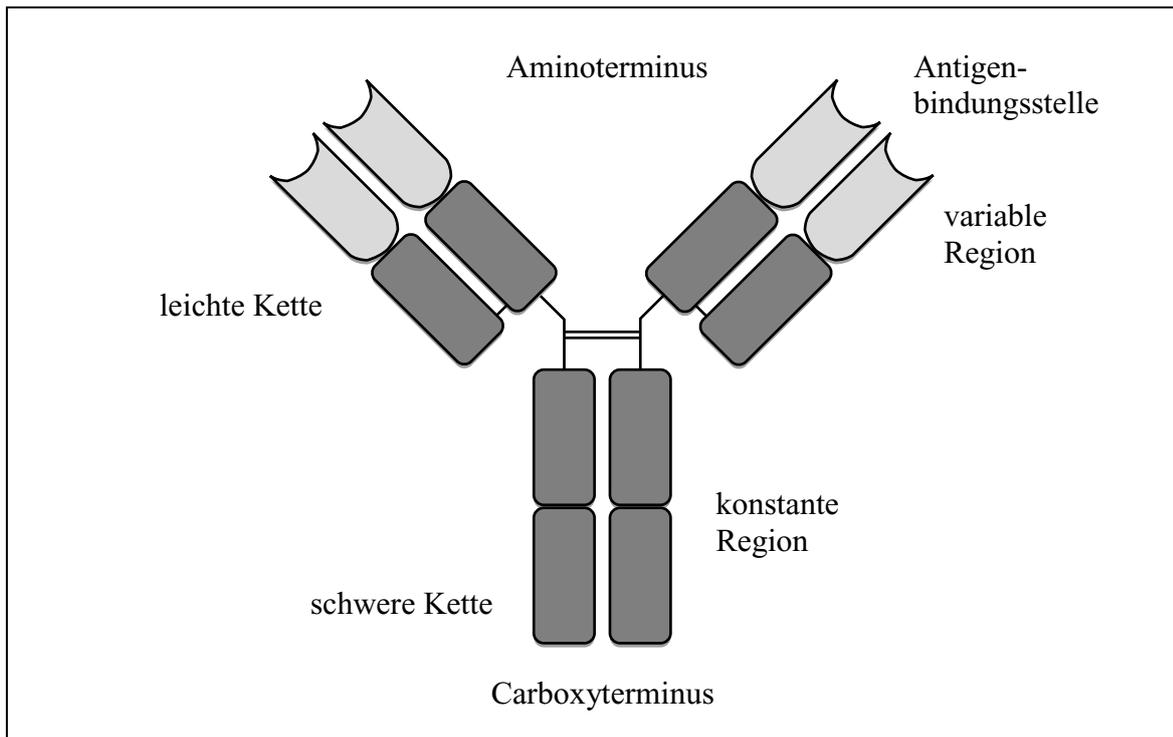
Immunologische Nachweismethoden basieren auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei Antikörper an ein oder mehrere spezifische Epitope binden, welche vom Antigen präsentiert werden. Sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper können für die Antigen-Antikörper-Bindung genutzt werden.

##### *Antigene*

Antigene (AG) sind Moleküle, die spezifisch an einen Antikörper (AK) binden können. Ihre Bezeichnung ist bedingt durch ihre Fähigkeit, die Bildung von Antikörpern, durch Bindung an Lymphozytenrezeptoren zu generieren. Dabei wird der Bereich eines Antigenmoleküls, an den ein bestimmter Antikörper oder Antigenrezeptor bindet, als Epitop oder Antigen determinante bezeichnet. Unter Affinität versteht man die Bindungsstärke eines Antikörpers zu einem Antigen (Janeway *et al.* 2002).

##### *Antikörper*

Antikörper (AK) sind (Plasma-) Proteine, die spezifisch an eine bestimmte Substanz (ihre Antigene) binden können. Aufgrund der einzigartigen Struktur kann jedes Antikörpermolekül sein entsprechendes AG spezifisch binden. AK werden als Reaktion auf eine Infektion oder Immunisierung von Plasmazellen gebildet. Dabei fungieren membrangebundene AK auf den B-Lymphozyten als spezifische Antigenrezeptoren, wobei AK die sezernierte Form der B-Zell-Antigenrezeptoren darstellen. Die Antikörpermoleküle bestehen aus zwei unterschiedlichen Bereichen: einer konstanten Region, die eine von nur vier oder fünf biochemisch unterschiedlichen Formen annehmen kann, und einer variablen Region, die in einer unendlichen Vielfalt von sehr fein abgestuften Formen auftreten kann, was eine spezifische Bindung von ebenso vielfältigen Antigenen ermöglicht (Abb. 4). Die beiden variablen Regionen eines Antikörpermoleküls bestimmen die Spezifität des Antikörpers bei der Antigenbindung, während die konstante Region festlegt, wie das Antigen mithilfe des Antikörpers beseitigt wird, wenn es erst einmal gebunden ist. Jedes Antikörpermolekül besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Sowohl die schweren, als auch die leichten Ketten besitzen je einen variablen und einen konstanten Bereich. Die variablen Abschnitte einer schweren und einer leichten Kette bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle, sodass beide Ketten zur Spezifität des Antikörpers beitragen, welche bestimmt, inwieweit er sein Antigen von anderen Antigenen unterscheidet.



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines Antikörpers (modifiziert nach Janeway *et al.* 2002).**

Die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers befindet sich an der Oberfläche des Antikörpermoleküls, die mit dem Antigen in Kontakt tritt. Antigenbindungsstellen bestehen aus sechs hypervariablen Schleifen, von denen drei zur variablen Region der leichten Ketten und drei zur variablen Region der schweren Ketten gehören. Handelt es sich um Proteinantigene, nimmt das Antikörpermolekül Kontakt über ein großes Areal seiner Oberfläche auf, das zu der erkannten Oberfläche des Antigens komplementär ist. Elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen (zusammen nichtkovalente Bindungen) können zur Bindung beitragen. Aminosäureseitenketten in den meisten oder allen hypervariablen Schleifen treten mit dem Antigen in Kontakt und bestimmen sowohl die Spezifität als auch die Affinität der Interaktion (Janeway *et al.* 2002).

#### *Polyklonale Antikörper (pAK)*

Bei der Immunisierung löst man durch absichtlichen Kontakt mit einem bestimmten Antigen eine Immunreaktion aus. Als Ergebnis erhält man verschiedene Antikörper gegen dieses Antigen, die alle eine spezifische Struktur besitzen aber unterschiedliche Epitope auf dem Antigen erkennen. Die Fähigkeit der pAK viele Epitope eines Antigens zu erkennen, kann für den Nachweis sehr kleiner Moleküle, die nur wenige Epitope aufweisen, von Vorteil sein. Allerdings kann es aufgrund der Heterogenität zu unspezifischen Bindungen aufgrund von Kreuzreaktionen mit verschiedenen Antigenen kommen (Janeway *et al.* 2002).

## *Monoklonale Antikörper (mAK)*

Monoklonale AK werden von einem einzigen B-Zell-Klon produziert. Im Allgemeinen werden sie durch Hybridome erzeugt. Dabei handelt es sich um antikörperbildende hybride Zelllinien, die durch die Fusion eines spezifischen antikörperproduzierenden B-Lymphozyten mit einer speziellen nichtsezernierenden Myelomzelle erzeugt wurden. Diese kann sich in Kultur vermehren und so den gewünschten AK erzeugen (Janeway *et al.* 2002).

### **3.2. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

1971 veröffentlichten Engvall und Perlmann eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, die seither eine bedeutende Rolle in der Proteinanalytik eingenommen hat.

Untersucht man ein Antigen mit einem ELISA, markiert man einen spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörper mit einem Enzym. Das Antigen wird an einen festen Träger (z.B. eine Mikrotiterplatte) befestigt und anschließend lässt man den markierten Antikörper an das Antigen binden. Nicht gebundenes Material wird abgewaschen und die AK-Bindung mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, die ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, festgestellt. Ebenfalls kann auch die Bindung unmarkierter Antikörper an das Antigen nachgewiesen werden, indem markierte Anti-Immunglobulin-Antikörper verwendet werden, was gleichzeitig auch zu einer Signalverstärkung führen kann, da mindestens zwei Moleküle des markierten Anti-Immunglobulin-Antikörpers an jeden unmarkierten Antikörper binden können.

Eine Abwandlung des ELISA stellt der Sandwich-ELISA dar. Hier werden keine Antigene, sondern antigenspezifische Antikörper an den Träger gebunden. Diese können dann das Antigen mit hoher Affinität binden und so auf der Trägeroberfläche konzentrieren. Ein weiterer markierter Antikörper, der im Vergleich zum fixierten Antikörper ein anderes Epitop bindet, dient zum Nachweis des Antigens (Janeway *et al.* 2002). Sehr hohe Spezifität, bei gleichzeitig hoher Sensitivität, die sogar über der der PCR liegen kann, ist das Ergebnis dieser Doppelstrategie. Die Vorteile des ELISA liegen in der einfachen Handhabung, der Schnelligkeit und dem Potential zum automatisierbaren Hoch-Durchsatzverfahren. Außerdem kann die Technologie eines entwickelten ELISA auf ein mikrochromatographisches System in Stäbchenform (Lateral Flow / Dip Stick Assays) übertragen werden. Die Probe kann dann direkt am Untersuchungsort in einer geeigneten Extraktionslösung prozessiert und über das feinmaschige System des Stäbchens in Verbindung mit dem antigenspezifischen Antikörper gebracht werden. Bei Vorhandensein des Antigens kommt es dann zu einer positiven Farbreaktion. Die Vorteile solcher Tests liegen in der sehr kurzen Durchführungszeit, wobei außerdem kein technisch speziell ausgebildetes Personal benötigt wird (Rudy & Dreusch 2009). Desweiteren können im ELISA erfolgreich eingesetzte Antikörper auch in der mikroskopischen Untersuchung eingesetzt werden. Diese können dafür entweder fluoreszenz- oder enzymmarkiert werden. Der immunhistochemische Nachweis hat dabei den Vorteil, dass

er mit anderen lichtmikroskopischen Färbemethoden kombiniert werden kann, während für die Immunfluoreszenzmikroskopie ein spezielles Dunkelfeldmikroskop oder UV-Mikroskop erforderlich ist (Janeway *et al.* 2002).

### 3.3. SDS-Page und Western Blot

Bei der SDS (Sodiumdodecylsulphat)-Page werden Proteine ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend mit einem Immunoblot (Western Blot) nachgewiesen.

Die mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden durch das Blotting-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörpern, die mit den Proteinen reagieren, nachgewiesen. Diese Methode eignet sich für den spezifischen Proteinnachweis (Janeway *et al.* 2002).

### 3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Unter den extrem sensitiven Methoden zur Erfassung nur weniger Moleküle steht als Standardmethode die Polymerasekettenreaktion (PCR) für Nukleinsäuren zur Verfügung (Niemeyer & Blohm 1996). Die PCR bezeichnet die enzymatische DNA-Vervielfältigung *in vitro*, bei der eine spezifische DNA-Sequenz amplifiziert wird. Dabei kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung, da Produkte vorhergehender Zyklen als Ausgangsstoffe für folgende Zyklen dienen. Unter Verwendung kurzer sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer), deren Basensequenzen zu Abschnitten der Ursprungs-DNA revers-komplementär sind, können DNA-Polymerasen neue DNA-Stränge generieren. Das dabei am häufigsten verwendete Enzym ist die hitzebeständige *Taq*-DNA-Polymerase. Durch Hitzedenaturierung bei hohen Temperaturen werden nach jeder Runde der DNA-Vervielfältigung, Einzelstränge der DNA-Matrize erzeugt, an welche die Primer sequenzspezifisch binden (Annealing). Mit Hilfe der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase werden die Primer (Forward und Reverse) dann von ihrem 3'-Ende aus polymerisiert (Elongation), indem einzelne komplementäre Nukleotide zugefügt werden, um einen neuen DNA-Strang zu generieren (Valasek & Repa 2005).

Die Sichtbarmachung der amplifizierten DNA-Sequenzen erfolgt dann bei der sogenannten Endpunkt-PCR (auch klassische oder Standard-PCR genannt) über die Anfärbung und Auftrennung im Agarosegel mittels interkalierender Farbstoffe. Hingegen erfolgt die Sichtbarmachung der Amplifikate bei der sogenannten real-time PCR (RT-PCR) während der PCR mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden.

#### ***Endpunkt-PCR***

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird verwendet, um DNA spezifisch zu amplifizieren, d.h. um Millionen von Kopien eines bestimmten DNA-Segments herzustellen. Der Prozess ist einfach, schnell, robust und basiert auf synthetischen Oligonukleotiden (Primer), DNA-

Polymerasen und Nukleotidbasen. Das verwendete Enzym (*Taq*-DNA-Polymerase) stammt vom *Thermus aquaticus*, einem in heißen Quellen lebenden Bakterium.

Ein Zyklus in der PCR verläuft folgendermaßen: Zunächst wird die doppelsträngige DNA-Matrize in ihre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Dazu wird ein Thermocycler verwendet, um die Temperaturen auf 95 °C oder mehr zu erhöhen. Bei diesen Temperaturen würden die meisten Säuger- oder Bakterienenzyme inaktiviert, die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase toleriert diese jedoch. Nachdem die DNA-Stränge getrennt worden sind, wird die Temperatur auf 60 °C gedrosselt um kurzen DNA-Primern das komplementäre Binden an Sequenzen der DNA-Matrize zu ermöglichen (Annealing). Dabei werden jeweils zwei Primer verwendet, einen für jeden der beiden DNA-Stränge (Forward und Reverse). Wenn die Primer ihre spezifischen Zielsequenzen gebunden haben, können die Polymerasen beginnen, Basen an deren 3'-Enden zu binden. Bei diesem Schritt erfolgt die eigentliche Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes mit Hilfe der zugegeben DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung. Da dieser Prozess bei der relativ niedrigen Annealing-Temperatur ineffizient wäre, wird die Reaktionstemperatur auf 72 °C erhöht, was dazu führt, dass beide Stränge der DNA, beginnend an der Primer-Stelle, repliziert werden. Am Ende des ersten PCR-Zyklus sind schließlich vier DNA-Stränge statt den ursprünglichen zwei vorhanden. Bei Beginn einer PCR sind alle Reagenzien außer der DNA-Matrize in hohen Konzentrationen vorhanden. Daher wird die Primer-Bindung begünstigt und die Amplifikation verläuft exponentiell. Nach vielen abgeschlossenen Zyklen kann dies nicht mehr der Fall sein und die Produktbildung kommt schließlich zum Stillstand (Brownstein 2004).

Nach dem Ende der Reaktion erfolgt eine Darstellung der amplifizierten DNA im Agarosegel mittels elektrophoretischer Auftrennung. Durch Mitführung eines Längenstandards während der Auftrennung kann die Größe des Amplifikates abgeschätzt und somit kontrolliert werden, ob die gewünschte Zielsequenz amplifiziert wurde.

Die Nachteile der Endpunkt-PCR liegen darin, dass viele einzelne durchzuführende Laborschritte nötig sind und eine Quantifizierung der eingesetzten DNA-Matrize nicht möglich ist, da sich die Mengen, trotz unterschiedlicher DNA-Konzentration zu Beginn der PCR, in der Plateau-Phase annähern. Dieses Problem kann durch die Anwendung einer real-time PCR umgangen werden (Valasek & Repa 2005).

### ***real-time PCR (RT-PCR)***

Die real-time PCR ist heute die dominierende Technik für eine präzise Quantifizierung der DNA-Detektion (Adler *et al.* 2008) und eine der am häufigsten verwendeten Techniken in der modernen Molekularbiologie. Die Vorteile der RT-PCR gegenüber der Endpunkt-PCR liegen darin, dass die Amplifikation vom ersten bis zum letzten Zyklus beobachtet werden kann. Dies ermöglicht eine zuverlässige Erkennung und Quantifizierung von Nukleinsäuresequenzen in der anfänglichen exponentiellen Phase. Außerdem erlaubt die extreme

Sensitivität der RT-PCR die Detektion von weniger als 5 Kopien (Vaerman *et al.* 2004; Valasek & Repa 2005). Grundlage für die Quantifizierung ist die kontinuierliche Messung eines Fluoreszenzsignals, welches proportional mit der Menge des entstandenen PCR-Produktes ansteigt. Das Fluoreszenzsignal kann auf verschiedene Weise generiert werden: bei SYBR<sup>®</sup>Green findet eine Interkalierung in die DNA statt. SYBR<sup>®</sup>Green ist ein DNA-Farbstoff, der Licht bei Anregung emittiert und dessen Fluoreszenz bei der Bindung an DNA stark ist. In Lösung zeigt der ungebundene Farbstoff wenig Eigenfluoreszenz. Weiterentwickelte Methoden, welche spezifischer sind, nutzen den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen dem Reportermolekül (Fluoreszenzfarbstoff oder Fluorophor) und einem dunklen oder nicht-fluoreszierenden Molekül (Quencherfarbstoff), um Fluoreszenzsignale zu erzeugen (Barletta 2006). Bei der TaqMan<sup>®</sup>-Technologie wird im Vergleich zur Endpunkt-PCR neben den beiden Primern ein weiteres Oligonukleotid (die sogenannte Sonde) für die Reaktion benötigt, welches zwischen den Primern innerhalb der Zielsequenz bindet. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff markiert (Gašparič *et al.* 2008). Solange Quencher und Reporter im gleichen kurzen Oligonukleotid gebunden sind, absorbiert der Quencher die Signale des Reporterfarbstoffes. Während der Amplifikation wird das Oligonukleotid durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut, wobei Reporter und Quencher voneinander entfernt und Fluoreszenzsignale durch den Reporter generiert werden. Der Anstieg der Reporter-Signale entspricht der spezifischen Amplifikation der DNA (Valasek & Repa 2005; Barletta 2006).

In der real-time PCR kommt es zu einem typischen Kurvenverlauf, da mit steigenden PCR-Zyklen immer mehr PCR-Produkte gebildet werden, welche in einer zunehmenden Fluoreszenz resultieren. Die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes verläuft während bestimmter Zyklen im Idealfall zu 100 % effizient (exponentielle Phase), nimmt aber zum Ende hin stark ab. Jede RT-PCR-Reaktion lässt sich somit in zwei Segmente aufteilen: eine exponentielle Wachstumsphase und ein Plateau. Wie bereits erwähnt ist die Abnahme an Reaktionskomponenten eine Erklärung dafür. In den ersten Zyklen wird anhand der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert (Threshold) berechnet, der für alle Reaktionen, die verglichen werden sollen, gleichgesetzt wird. Der Zeitpunkt (Zyklus), bei dem der Threshold überschritten wird, wird als threshold cycle (Ct) des entsprechenden Reaktionsansatzes definiert (Vaerman *et al.* 2004). Durch Auswertung der gemessenen Ct-Werte lässt sich die Startkopienzahl der untersuchten DNA-Sequenz quantifizieren, wobei der zu erwartende Ct-Wert umso niedriger ist, je höher die Ausgangskopienzahl der DNA und *vice versa*. Bei einem PCR-System mit 100 %iger Effizienz nimmt der Ct-Wert mit jeder Verdopplung der Startkopienzahl um einen Zyklus ab und ermöglicht somit, über einen Ct-Wert-Vergleich die quantitative Aussage über die ursprüngliche DNA-Menge.

### **3.5. Immuno-PCR**

Eine Bestimmungsgrenze von wenigen Zielmolekülen, wie sie routinemäßig in der PCR-Analyse möglich ist, stellt auf dem Gebiet der Proteinanalytik eine Herausforderung dar. Die im ELISA verwendete enzymatische Signalverstärkung erlaubt Nachweisgrenzen im Bereich von ng/ml bis pg/ml (Adler & Wacker 2006). Im Gegensatz dazu verbindet die Immuno-PCR (iPCR) die Vorteile der robusten immunologischen Nachweisverfahren mit dem exponentiellen Amplifikationsvermögen der PCR und erlaubt eine 100 bis 10000fach höhere Sensitivität der Protein-Detektion im Vergleich zum ELISA (Niemeyer *et al.* 2005). Dabei wird bei der iPCR, die ursprünglich 1992 von Sano *et al.* entwickelt wurde, das signalbildende Antikörper-Enzym-Konjugat des ELISA durch ein Antikörper-DNA-Konjugat ersetzt, welches mittels PCR detektiert wird. Somit erfolgt die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung bei der iPCR durch den Nachweis der am Detektions-AK gebundenen DNA. Mit dieser neuen empfindlichen Methode gelingt es, Proteine ähnlich empfindlich wie Nukleinsäuren nachzuweisen (Niemeyer & Blohm 1996). Daher wird die iPCR mittlerweile in vielfältigen Anwendungsgebieten genutzt. Dazu zählen beispielsweise die Analyse von vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktoren, Mumps-Antigen, rViscumin, verschiedenen IgG, Gliadin, HIV-1 p24 Antigen, Rotavirus VP6, pathologischen und rekombinanten Prionen und Prostata-spezifischen Antigenen (Barletta 2006).

#### ***real-time-immuno-PCR***

Als die Technik der iPCR entwickelt wurde, beurteilte man das PCR-Produkt durch Gelelektrophorese (Sano *et al.* 1992). Diese eher umständliche und unempfindliche Post-PCR-analytische Methode limitiert die Quantifizierung der iPCR und damit deren Anwendbarkeit. Durch die Entwicklung der real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) kann die Menge an DNA mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit quantifiziert werden. Die Beseitigung der Post-PCR-Schritte reduziert dabei auch die Dauer der Durchführung und die Gefahr einer Kontamination. Dafür werden spezifische Antikörper für das nachzuweisende Protein auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert, die Probe wird zugegeben und die Zielproteine werden von den immobilisierten Antikörpern gebunden. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der mit einem DNA-Molekül gekoppelt wird, zugegeben. Dieser so genannte Detektions-Antikörper bindet an ein zweites Epitop auf dem immobilisierten Ziel-Protein. Nach sorgfältigem Waschen, um alle ungebundenen Reagenzien zu entfernen, wird die DNA amplifiziert. Während der exponentiellen Phase der PCR spiegelt die Menge an gebildetem PCR-Produkt die Menge an Ziel-Protein wider, das durch den Antikörper gebunden wurde. Durch die RT-iPCR kann die Menge an DNA mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit quantifiziert werden. Die Anwendung von Sandwich-Assays führt zu einer höheren Spezifität im Vergleich zur Anwendung eines einzelnen Antikörpers (Lind & Kubista 2005).

### 3.6. Phage Display

Bakteriophagen, auch bakterielle Viren oder kurz Phagen genannt, infizieren Bakterien und wurden 1915 von Frederick W. Twort und 1917 von Felix d'Hérelle beschrieben (Twort 1915; d'Hérelle 1917).

Die 1985 von George P. Smith erfundene Phage-Display-Methode basiert auf einer Selektionstechnik, bei der eine Bibliothek unterschiedlicher Phagen eingesetzt wird, wobei auf der Außenseite eines jeden Phagen ein anderes Peptid exprimiert wird, welches wiederum im genetischen Material des jeweiligen Phagen kodiert wird (Wilson & Finlay 1998; Rodi & Makowski 1999; Sidhu 2000). Diese Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp ermöglicht es, eine schnelle Erkenntnis über die Bindungsaffinität zu einem bestimmten Zielmolekül durch eine *in-vitro*-Selektion namens „Panning“ zu erhalten (Parmley & Smith 1988). Dabei ist das Panning durch die Inkubation einer Phage-Display Bibliothek an ein, mit dem Antigen beschichtetes Immunröhrchen sowie das Abwaschen ungebundener und Eluieren spezifisch gebundener Phagen gekennzeichnet, welche anschließend in Bakterien amplifiziert werden. Durch sich wiederholende Panningrunden werden Phagen-Poole mit spezifischen Bindungseigenschaften angereichert, aus denen später einzelne Klone isoliert und durch ELISA und DNA-Sequenzierung charakterisiert werden können (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc. Instruction Manual). Anhand der Sequenzierungsergebnisse können anschließend die exprimierten Peptide, welche zu einer positiven Bindungseigenschaft führten, synthetisiert und für die Entwicklung verschiedener Detektionsmethoden genutzt werden.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Probenmaterial und Probenvorbereitung

#### *Probenmaterial*

Reines bovines Osteocalcin (OC) wurde von Merck Calbiochem (Darmstadt) erworben. Knochen von Nutztieren und pasteurisierte Ei- und Milchpulver wurden von lokalen Händlern in Berlin gekauft. 100 % reines bovines Fleisch- und Knochenmehl (BFKM), behandelt bei 145 °C, mit einem Knochengehalt von ca. 80 % sowie 100 % bovines FKM wurden von dem europäischen Referenzlabor für tierische Proteine (EU-RL-TP, Gembloux, Belgien) eingereicht. Von derselben Quelle wurde auch eine Probe mit 0,1 % BFKM in pflanzlichen Futtermitteln, welches als Referenz- und Schulungsmaterial für Mikroskopiker dient, bezogen. Dieses Material wurde mittels klassischer Mikroskopie und PCR auf seine Reinheit überprüft. Basierend auf den Ergebnissen der EU-RL-TP wird das Material als eine Mischung aus vier reinen FKM aus verschiedenen Wärmebehandlungen mit einem Knochengehalt von ~ 54 % ausgewiesen. Ebenfalls stellte das EU-RL-TP auch eine Probe des nicht-kontaminierten pflanzlichen Futtermittels, welches für die Herstellung des Referenz- und Schulungsmaterials genutzt wurde, zur Verfügung. Dieses besteht aus einer klassischen Futtermischung, die Weizen, Tapioka-, Soja-, Raps-, Palmkernöl und Gerstenmehl, Rübenschnitzel, Melasse, Bäckerei-Nebenprodukte, pflanzliches Fett, Kalk, Salze und Vitamine enthält. Ein kommerzielles Hundefutter-BFKM (laut Etikett 100 % Rind) wurde von PerNaturam V.O.F. (Aalten, Niederlande) gekauft. Fischmehl und Geflügelmehl, welche unter unbekanntem Prozessparametern hergestellt wurden, wurden aus verschiedenen Tierkörperbeseitigungsanlagen (TBA) in Deutschland (SARIA Bio-Industries GmbH & Co., Selm) bezogen. Eine BFKM-Probe, welche in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Anforderungen (133 °C) behandelt wurde, stellte die Abteilung für Futtermittel und Futtermittelzusatzstoffe des Bundesinstituts für Risikobewertung bereit. Reines Schweinemehl von einer anonymen Quelle wurde von LUFA Nord-West (Oldenburg) geliefert. Proben mit 0,1, 1 und 10 % BFKM wurden hergestellt, indem eine entsprechende Menge von BFKM-Extrakten mit Pflanzenextrakten, die eine vergleichbare Gesamt-Protein-Konzentration enthielten, gemischt wurde.

#### *Probenvorbereitung*

Für die Herstellung von Referenz-Proteinen wurden native Knochen verschiedener Spezies von Fett, Fleischrückständen und Knochenmark gereinigt und grob zerkleinert. Knochenfragmente wurden durch Soxhlet-Extraktion mit siedendem Petrolether entfettet. Das entfettete Material wurde in Stahl-Patronen überführt, für 2-3 Minuten mit flüssigem Stickstoff abgekühlt und mit einer Stahl-Kugelmühle für 3 min und 30 Hz zu einem feinen Pulver gemahlen.

## 2. Extraktionsmethoden und Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Proteine zu extrahieren, wurden mehrere Methoden angewandt. Ziel war es, eine geeignete Extraktionsmethode zu finden.

Alle im Folgenden genannten Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 15000 g, 10-20 min bei 4 °C durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bicinchoninsäure-Kit von Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA) bestimmt, die hergestellten Extrakte aliquotiert und bei - 80 °C bis zur Verwendung gelagert.

### **EDTA-Extraktion** (modifiziert nach Ajie *et al.* 1991)

2 g Probe wurden in einen Glaskolben mit Deckel eingewogen, mit 8 ml 0,5 M Ammonium-EDTA (pH 6,1) unter Rühren bei 4 °C über Nacht extrahiert. Der Schlamm wurde in ein konisches Falconröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Ausschluss-Größe von 3000 Da überführt, zentrifugiert und die zurückbehaltene Proteinfraction mit 2 ml PBS (pH 7,4) gewaschen, um den Puffer auszutauschen.

### **BaCl<sub>2</sub>-Extraktion** (modifiziert nach Nelsestuen & Suttie 1973)

Bei dieser Extraktionsmethode wurden ebenfalls 2 g Probe in einen Glaskolben mit Deckel eingewogen, 8 ml 0,1 M Natrium-Citrat dazugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Am nächsten Tag wurde die Masse in ein Falconröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Falconröhrchen überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass möglichst kein Fett in das neue Röhrchen gelangt. Das Pellet wurde verworfen. Der überführte Überstand wurde mit 1/10 Volumen 1 M BaCl<sub>2</sub> versetzt und 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit dem Pellet weitergearbeitet. Das Pellet wurde in 5 ml 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aufgenommen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein Ultrazentrifugationsröhrchen mit einer Ausschluss-Größe von 3000 Da überführt und abermals zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die verbleibende Proteinfraction mit PBS gewaschen.

### **Extraktion** (modifiziert nach Smith *et al.* 2005)

200 mg der jeweiligen Probe wurden in einen Glaskolben mit Deckel eingewogen, mit 2 ml 0,6 M HCl versetzt und unter Rühren bei 4 °C über Nacht demineralisiert. 0,6 M NaOH wurde zur Neutralisation zugegeben. Anschließend wurden 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA (1ml) zugegeben und der pH auf 7,5 eingestellt. Die Proben wurden in ein konisches Falconröhrchen überführt, zentrifugiert und der Überstand in ein Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Ausschluss-Größe von 3000 Da überführt, zentrifugiert und die zurückbehaltene Proteinfraction mit 2 ml PBS gewaschen, um den Puffer auszutauschen.

### ***Extraktion mit 0,5 M Na<sub>4</sub>EDTA***

100 mg Probe wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß eingewogen, 1 ml 0,5 M Na<sub>4</sub>EDTA (pH 9) dazugegeben und über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 15000 g 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Ausschluss-Größe von 3000 Da überführt, zentrifugiert und die zurückbehaltene Proteinfraction mit 2 ml PBS gewaschen.

### ***Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay***

Zur Bestimmung von Proteingehalten entwickelten Smith *et al.* 1985 das BCA-Verfahren, welches von Redinbaugh *et al.* 1986 an das Mikrotiterplatten-Format angepasst wurde. Dem BCA-Assay liegt folgendes Prinzip zugrunde: Proteine reduzieren Cu<sup>2+</sup> im alkalischen Milieu zu Cu<sup>+</sup>. Das Na<sup>+</sup>-Salz der Bicinchoninsäure ist in der Lage mit Cu<sup>+</sup> in alkalischer Lösung einen intensiv purpurfarbenen Komplex einzugehen, welcher photometrisch detektiert werden kann. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 562 nm (die Messung erfolgt in einem spektrometrischen Bereich zwischen 540 und 590 nm) und verhält sich proportional zur Proteinkonzentration in der untersuchten Probe. Mittels einer Kalibrationsreihe aus BSA-Lösungen (bovines Serumalbumin) bekannter Konzentrationen (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/ml) wurde eine Eichgerade erstellt. Anhand der Geradengleichung der hergestellten Eichkurve können somit die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde für alle Extrakte in dreifacher Ausfertigung mit dem Bicinchoninsäure-Kit von Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA) gemessen. Für die Messung wurde eine Mikrotiterplatte mit je 10 µl der zu messenden Proteinextraktproben und der BSA-Standardproteinlösung belegt, wobei jede Probe dreifach bestimmt wurde. Bei jeder Messung wurde eine Standardreihe mitgeführt. Anschließend wurde zu jeder benutzten Vertiefung 190 µl fertiges BCA-Reagenz pipettiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Absorption des violetten Komplexes bei 590 nm photometrisch bestimmt. Anhand der Absorptionswerte der bekannten Proteinkonzentrationen (BSA-Standardreihe) können die Konzentrationen der unbekanntenen Proben errechnet werden.

### ***Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben:***

Die hergestellte Eichkurve ist eine lineare Funktion und wird über die allgemeine Formel der Geradengleichung:  $y = mx + b$  beschrieben.

- y = Wert für die Absorption bei 590 nm
- m = Steigung der Eichgeraden
- b = Schnittpunkt mit der y-Achse
- x = Proteinkonzentration in mg/ml

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgt durch Umstellung nach x.

### 3. Entwicklung eines Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins

Exemplarisch für das Markerprotein Osteocalcin (OC) sollte ein Sandwich-ELISA entwickelt werden, der mit hoher Spezifität, Selektivität und Sensitivität Rind in Futtermitteln detektieren und möglichst von anderen Spezies diskriminieren kann.

#### 3.1. Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA

Beim Sandwich-ELISA wird ein OC-spezifischer Antikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden. Dieser sogenannte Fänger-AK kann dann OC mit hoher Affinität binden und so auf der Trägeroberfläche konzentrieren. Nach der Zugabe der Probe erfolgt eine Inkubation mit einem weiteren Antikörper, der im Vergleich zum fixierten Antikörper ein anderes Epitop bindet. Dieser sekundäre Antikörper kann entweder direkt mit einem Enzym gekoppelt werden oder über einen dritten enzymmarkierten Anti-Immunglobulin-AK zum Nachweis des Antigens führen.

#### 3.2. AK-Generierung gegen bovines Osteocalcin

Um für den Knochengewebsmarker Osteocalcin (OC) ein immunologisches Detektionssystem für den speziesspezifischen Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln zu entwickeln, wurden speziell gegen bovines OC gerichtete Antikörper generiert. Dabei wurden ausgehend von der Sequenzdatenanalyse tierartspezifische Unterschiede in den Aminosäuresequenzen beachtet, welche eine Diskriminierung bovinen Osteocalcins gegenüber dem anderer Spezies erlauben. Bei einem Vergleich der relevanten Nutztierarten werden besonders im Aminosäurebereich 1-9 Unterschiede deutlich. Dabei unterscheidet sich bovines OC von dem vom Schwein in einer (AS 5), vom Schaf in zwei (AS 4 und AS 5) und von der Ziege in drei Aminosäuren (AS 4, AS 5, AS 9). Die Aminosäuresequenz 1-9 ist bei Pferd und Rind identisch, jedoch ist ein Unterschied an AS 19 vorhanden. Eine Abgrenzung bovinen Osteocalcins zu dem vom Huhn und Fisch wird durch starke AS-Abweichungen möglich. Auch Maus und Ratte scheinen gut gegen bovines OC abgrenzbar zu sein. Auf diese Sequenzanalyse aufbauend wurden polyklonale Antikörper (pAK) gegen die synthetische und LPH- (Limulus polyphenus Hämocyanin) gekoppelte Osteocalcin-Aminosäuresequenz OC1-9 und OC16-22 in Kaninchen durch ein Service-Labor (BioGenes, Berlin) hergestellt (Abb. 5).

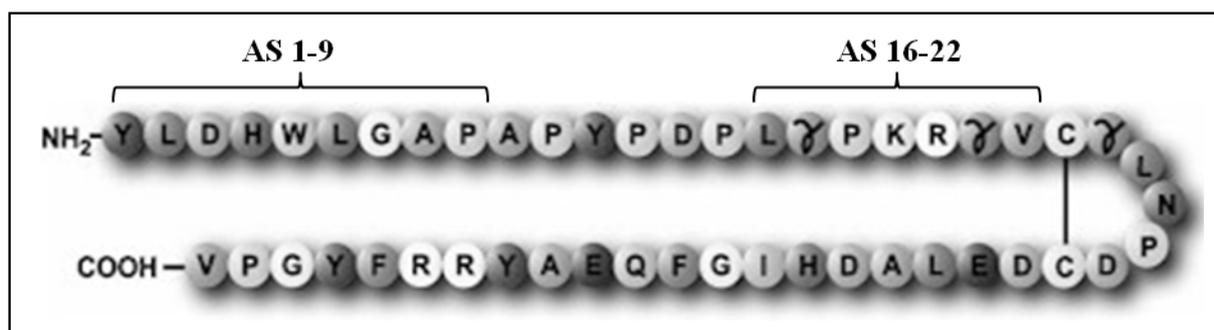


Abb. 5: Osteocalcinsequenz vom Rind mit Lage der zur Immunisierung herangezogenen Aminosäuresequenzen (AS) (nach: <http://www.haemtech.com/images2/Osteocalcin2.jpg>).

### 3.3. Auswahl geeigneter AK für den Nachweis bovinen Osteocalcins

Einer oder mehrere der vier gegen die Aminosäuresequenz OC 1-9 und OC 16-22 generierten AK sollten im ELISA für die BFKM-Erkennung in Futtermitteln eingesetzt werden. Um eine Auswahl treffen zu können, wurden die generierten Antikörper zunächst anhand eines Titrierungsschemas (Grid-Experimente) plattiert und somit die optimale AK-Konzentration im ELISA ermittelt. Dies ist notwendig, da suboptimale Konzentrationen zu unspezifischen Bindungen und somit zu hohen Hintergrundsignalen führen können. Dafür wurde zunächst ein direkter ELISA durchgeführt, wobei das nachzuweisende Antigen OC (Merck Calbiochem, Darmstadt) mit einer Konzentration von 10 µg/ml auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert wurde. Daraufhin folgte ein Blockierungsschritt, um eventuell frei gebliebene Bindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurden die generierten Antikörper auf die geblockte und gewaschene Mikrotiterplatte pipettiert und nach einem Waschschrift mit dem Detektionsantikörper (Peroxidase-Conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L), AnaSpec Inc., San Jose, CA, USA), welcher spezifisch gegen Kaninchen gerichtet und mit Horseradish Peroxidase (HRP) markiert war, nachgewiesen. Durch die Zugabe von 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde ein Farbumschlag sichtbar, der, nach der Zugabe von 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mit einem Photometer gemessen wurde. Anschließend wurde anhand der ermittelten optimalen AK-Konzentrationen ein direkter ELISA nach dem selben Schema durchgeführt und der beste AK durch das Service-Labor mittels Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose gereinigt, um die monospezifische IgG-Fractionen zu isolieren. Hiernach wurden abermals Titrierungsexperimente durchgeführt und so die optimale AK-Konzentration des monospezifisch gereinigten AK bestimmt.

### 3.4. Im Sandwich-ELISA eingesetzte Antikörper

Ein kommerzieller monoklonaler Maus-Antikörper (OC4-30, Takara Bio Inc., Otsu / Shiga, Japan), welcher an das Epitop um AS17 von bovinem Osteocalcin bindet und spezifiziert ist, Kreuzreaktionen mit Mensch, Rind, Kaninchen, Schaf, Hund, Affe und Ziege, aber nicht mit Ratte oder Maus aufzuweisen, wurde als Fänger-Antikörper in einem Sandwich-ELISA verwendet. Aufbauend auf eine OC-Sequenzanalyse wurden polyklonale Antikörper (pAK) gegen die synthetischen und LPH- (Limulus polyphenus Hämocyanin) gekoppelten Osteocalcin-Aminosäuresequenzen OC 1-9 und OC 16-22 in Kaninchen durch ein Service-Labor (BioGenes, Berlin) hergestellt. Das Serum, welches in einem Vortest im direkten ELISA zum Nachweis bovinen OC das beste Ergebnis erzielte, wurde durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierte Sepharose durch das Service-Labor gereinigt, um eine monospezifische IgG-Fraktion zu isolieren, die im Sandwich-ELISA als sekundärer Antikörper verwendet wurde. Zu diesem Zweck wurde der polyklonale Antikörper pAK-OC1-9 sowohl mit Streptavidin (pAK-OC1-9-STV) als auch mit HRP (pAK-OC1-9-HRP) konjugiert, unter Verwendung kommerzieller Kits (siehe 3.5.).

### ***Titrierung (Grid-Experimente) der AK-Paare***

Die Konzentrationen der Antikörperpaare sowie die Inkubationszeiten und -temperaturen des Sandwich-ELISA wurden in Grid-Experimenten optimiert. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit dem Fängerantikörper (OC4-30) in einer Konzentration von 1 µg/ml belegt. Nach anschließenden Wasch- und Blockierungsschritten wurde das nachzuweisende bovine OC (Merck Calbiochem, Darmstadt) in Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 1000 ng/ml auf die geblockte Mikrotiterplatte pipettiert. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. Im Falle des streptavidinierten pAK-OC1-9 folgte daraufhin noch eine Detektion mit biotinylierter HRP (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA). Durch die Zugabe von 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde ein Farbumschlag sichtbar, der, nach der Zugabe von 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mit einem Photometer gemessen wurde.

### **3.5. Markierung des sekundären pAK mit Streptavidin und Horseradish Peroxidase**

Da die Entwicklung eines Sandwich-ELISA im Fokus stand, wurde der monospezifisch aufgereinigte pAK-OC1-9 mit Streptavidin bzw. HRP markiert. Der Vorteil einer HRP-Markierung liegt darin, dass ein weiterer Detektionsantikörper entfällt, da das Enzym direkt an den Antikörper gebunden vorliegt. Allerdings entfallen weitere Waschschriffe, was eventuell unspezifische Bindungen begünstigen könnte. Der Vorteil einer Antikörpermarkierung mit Streptavidin liegt darin, bei der Detektion mit HRP-markiertem Biotin eine Signalverstärkung zu erlangen, da Streptavidin über vier Bindungsstellen für Biotin verfügt. Ebenfalls könnten die zusätzlichen Waschschriffe zu weniger unspezifischen Bindungen führen.

Für die Konjugation wurde zunächst die Konzentration des pAK-OC1-9, welcher in einem 10 mM PBS Puffer (pH 7,4) vorlag, mittels BCA-Assay (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) bestimmt. Diese betrug 0,6 mg/ml. Nach den Herstellerangaben der zur Konjugation eingesetzten kommerziellen Kits (Lightning-Link™ Streptavidin bzw. HRP Konjugation Kit, Innova Biosciences, Cambridge, UK) wurden 100 µg des pAK in einem Volumen von 166 µl (bei einer Konzentration von 0,6 mg/ml) verwendet. Pro 10 µl des eingesetzten pAK wurde 1 µl LL-Modifier (also 16,6 µl) hinzugegeben und danach der pAK-Modifier-Mix in das jeweilige Vial mit dem lyophilisierten Streptavidin bzw. HRP gegeben, zur Resuspension 2 x das komplette Volumen mit der Pipette aufgenommen und wieder abgelassen und für 3 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils noch 16,6 µl LL-Quencher hinzupipettiert und nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit war das Konjugat einsatzbereit.

### **3.6. SDS-Page und Western Blot**

Um die Reaktivität der isolierten monospezifischen IgG-Fraktion zu bestätigen, wurde ein Immunoblot mit einem EDTA-Proteinextrakt, der aus reinem Rinderknochen hergestellt wurde, mit dem streptavidinierten pAK-OC1-9 durchgeführt.

Dafür wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) mit Tris-Glycin-Puffer nach Laemmli (1970) realisiert. Für die Trennung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht enthielt das Trenngel 16,5 % und das Sammelgel 7,5 % Acrylamid. Im Gel aufgetrennte Proteine wurden mit einer Blotting-Einheit auf eine Nitrocellulosemembran bei 4 °C und 350 mA / 400 V für 1 h mit Transfer-Puffer elektrotransferiert, wie in der Bedienungsanleitung der Blotting-Einheit (Bio-Rad, Laboratories Inc., München) beschrieben. Der Blot wurde für 45 Minuten bei RT in PBS / 3 % BSA blockiert, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 4 °C mit pAK-OC1-9-STV (1:500 in PBS / 1,5 % BSA verdünnt). Die Membran wurde dreimal mit TBST gewaschen und die Bindung von pAK-OC1-9-STV an den Blot wurde mit biotinylierter HRP (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA), welche zuvor 1:5000 in PBS / 1,5 % BSA verdünnt wurde, nach 1 h Inkubationszeit bei RT detektiert. Nach dem Waschen wurde der Blot durch Zugabe von 750 µl einer Entwicklerlösung (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) entwickelt und die Chemolumineszenz mit einem Imaging System (VersaDoc MP 4000, Bio-Rad, Laboratories Inc., München) gemessen.

### **3.7. Eignung des Sandwich-ELISA für die Osteocalcindetektion**

Um ein Arbeitsprotokoll für einen Sandwich-ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins zu entwickeln, wurden die Konzentrationen des Fänger-, sekundären und Detektions-Antikörpers sowie die Inkubationszeiten und -temperaturen in Grid-Experimenten optimiert. Das daraus resultierende Protokoll (siehe 2.5. im Ergebnisteil) wurde anschließend verifiziert.

#### **3.7.1. Sensitivität, Intra- und Inter-Assay-Variabilität**

Unter Anwendung des entwickelten Arbeitsprotokolls wurde zunächst die Sensitivität sowie die Intra- und Inter-Assay-Variabilität des ELISA mit Standard-Verdünnungen bovinen Osteocalcins validiert. Hierfür wurde reines bovines OC unterschiedlicher Konzentrationen von 1 ng / ml bis 1000 ng / ml jeweils in dreifacher Ausführung an drei verschiedenen Tagen mit Hilfe des entwickelten Sandwich-ELISA untersucht.

#### **3.7.2. Spezifität**

Nachdem der Assay in Bezug auf die Sensitivität und Variabilität beurteilt wurde, musste die Spezifität für bovines OC in Futtermitteln verifiziert werden. Dafür wurden EDTA-Extrakte nativer Knochen der wichtigsten Nutztiere sowie Ei- und Milcheiweiß und ein pflanzliches FM gemessen, welche alle unverdünnt im ELISA verwendet wurden, um auch stark

verarbeitete Materialien mit geringem FKM-Gehalt zu erfassen. Die Nachweisgrenze (LOD) wurde als Mittelwert der Absorption  $A_{450\text{ nm}}$  plus dreifache Standardabweichung von 13 verschiedenen negativen Proben (gemessen in dreifacher Ausführung) berechnet. Diese Proben beinhalteten sowohl typische Futtermischungen (pflanzliches FM, Vollmilchpulver, Hühnerei) als auch mögliche Kontaminanten mit anderen Spezies als Rind (Fischmehl, Geflügelmehl, Schaf-FKM, Schafknochen, Schweine-FKM, Schweineknochen, Hühnerknochen, Ziegenknochen, Kaninchenknochen) und die NTC. In allen folgenden Versuchen stellte das LOD den Ausgangswert dar, um richtig positive von negativen Ergebnissen zu diskriminieren.

### **3.7.3. Anwendbarkeit mit realen FKM**

Im nächsten Schritt wurde die Kapazität des Immunoassays im Hinblick auf die Detektion von OC in wärmebehandelten FKM-Extrakten untersucht, um die Anwendbarkeit des ELISA für echte Proben zu testen. Da kein Pferde-FKM verfügbar war, wurde Pferdeserum als eine beispielhafte Matrix, welche nur Spuren von Osteocalcin enthält, verwendet.

### **3.7.4. Selektivität**

Schließlich wurde die Selektivität des Tests mit Extrakten aus einem pflanzlichen FM, welches mit 0,1 % BFKM versetzt war, im Vergleich zu dem nativen pflanzlichen FM evaluiert. Darüber hinaus wurden Verdünnungen von 0,1 % BFKM in Fischmehl-Extrakten hergestellt, da kein validiertes homogenes Material zur Verfügung stand.

Außerdem wurde ein separates Selektivitätsexperiment durchgeführt, wobei BFKM-Extrakt-Mischungen unterschiedlicher Konzentrationen (0,1, 1 und 10 %) in Schweinemehl-Extrakten an drei Tagen untersucht wurden.

#### 4. Entwicklung einer RT-iPCR für den Nachweis bovinen Osteocalcins

Um verifizieren zu können, ob die Sensitivität des entwickelten Sandwich-ELISA für die Detektion bovinen Osteocalcins gesteigert werden kann, wurde eine real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) entwickelt, welche mit hoher Sensitivität Rind in Futtermitteln detektieren sollte. Dabei sollte zunächst die generelle Durchführbarkeit mit reinem bovinen OC verifiziert und darauf aufbauend eruiert werden, ob und bis zu welchen Konzentrationen hoch prozessiertes bovines Tiermehl in pflanzlichen Futtermitteln mittels RT-iPCR detektierbar ist.

##### 4.1. Funktionsprinzip der RT-iPCR

Basierend auf dem entwickelten Sandwich-ELISA wurde ein spezifisch gegen Osteocalcin gerichteter Fänger-Antikörper (OC4-30) auf proteinbindungsfähige und PCR-geeignete Mikrotiterstreifen immobilisiert. Anschließend wurden eventuell frei gebliebene Bindungsstellen geblockt und die zu untersuchende Probe inkubiert. Hiernach detektierte der streptavidinierte Detektions-Antikörper (pAK-OC1-9-STV), welcher gegen bovines Osteocalcin gerichtet ist, spezifisch das ihm präsentierte Epitop. Streptavidin enthält vier Bindungsstellen für die mit Biotin markierte DNA, welche im darauffolgenden Schritt zugegeben wurde. Nach gründlichem Waschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde ein spezifischer Abschnitt innerhalb der gebundenen DNA mittels real-time PCR amplifiziert und somit die immunologische Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion visualisiert. Abb. 6 zeigt einen Vergleich zwischen entwickeltem ELISA und RT-iPCR.

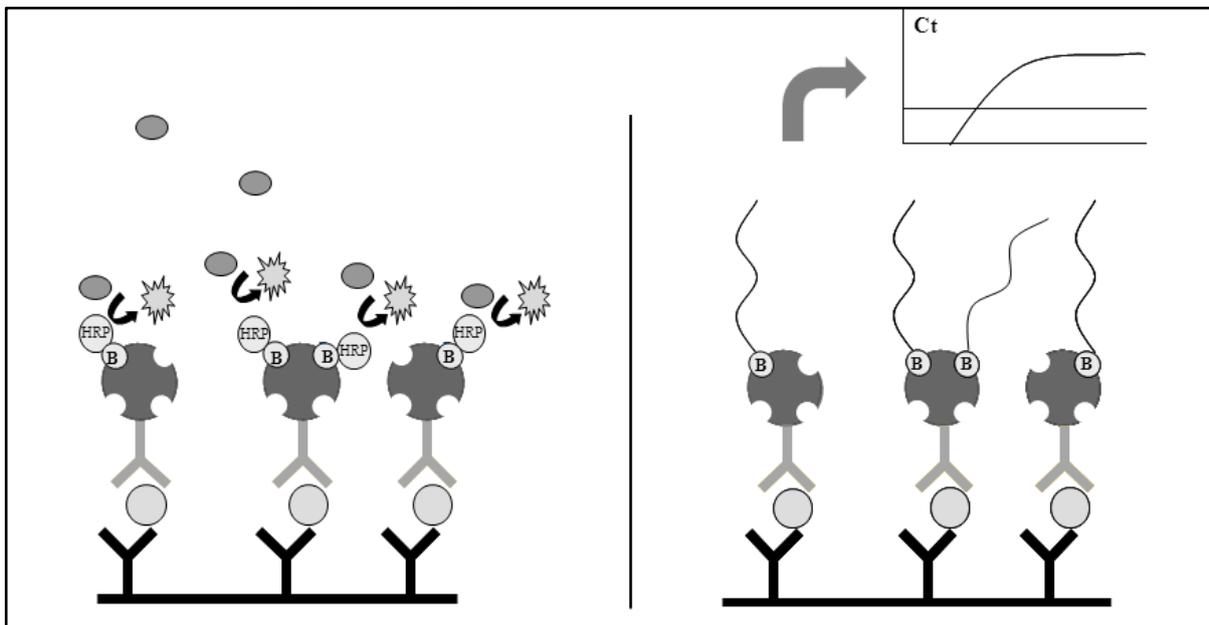


Abb. 6: Schematische Darstellung des entwickelten Sandwich-ELISA (links) und der RT-iPCR (rechts). Der Grundaufbau des ELISA wurde auf die RT-iPCR übertragen. Beide Systeme unterscheiden sich insbesondere in der Art der Detektion, welche beim ELISA durch biotinylierte HRP und bei der RT-iPCR durch biotinylierte DNA realisiert wird. Für den Nachweis bovinen Osteocalcins wird zunächst der Fänger-Antikörper OC4-30 auf einer Platte immobilisiert. Darauf folgt für beide Systeme die Inkubation mit dem Standard (bovinen OC) oder einer Probe. Anschließend wird mit dem streptavidinierten Detektions-Antikörper pAK-OC1-9-STV inkubiert und die Reaktion mit Biotin-HRP (ELISA) bzw. mit biotinylierter DNA (RT-iPCR) detektiert. HRP= Horseradish-Peroxidase; B= Biotin; DNA= Desoxyribonukleinsäure.

#### 4.2. Primer- und Sonden-Design

Primer und Sonden für die Endpunkt- und die real-time PCR wurden mit Hilfe des Software-Programmes PrimerExpress® ausgewählt und analysiert, wobei Kriterien wie GC-Gehalt, Schmelztemperatur und eine mögliche Bildung von Primer- und self-Dimeren in die Prüfung einbezogen wurden. Sowohl die Primer als auch die Sonde wurden anschließend von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert, HPLC-gereinigt, in lyophilisiertem Zustand geliefert, in *A. purif.* gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### 4.3. Generierung der biotinylierten Ziel-DNA mittels Endpunkt-PCR

Um die RT-iPCR realisieren zu können, musste eine Ziel-DNA generiert werden, über die später die Antigen-Antikörper-Bindung visualisiert werden konnte. Dabei war es von besonderer Relevanz, dass es sich dabei um eine künstliche DNA handelt, um eventuell falsch positive Ergebnisse bei der Überprüfung von Futtermitteln zu verhindern. Aus diesem Grund wurde ein chimäres 202 Basenpaar (bp) langes DNA-Fragment aus einem pCR®2.1-TOPO®-Vector-Plasmid mit integriertem Mandelgen (Amandin Gen) mittels Endpunkt-PCR gewonnen. Dabei wurde ein mit Biotin markierter Forward-Primer eingesetzt, wodurch eine künstliche biotinylierte chimäre DNA generiert werden konnte, welche sowohl über Plasmid- als auch Mandel-DNA-Informationen verfügt und somit einzigartig ist. Für die Durchführung der Endpunkt-PCR wurde ein Mastermix hergestellt, der die in Tab. 2 aufgeführten Komponenten enthielt.

Tab. 2: Zusammensetzung des Mastermixes für die Endpunkt-PCR zur Herstellung der Ziel-DNA.

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)	Konzentration im Mastermix
Wasser	30,75	
10x PCR Puffer	5	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3	1,5 mM
2,5 mM dNTPs	4	0,2 mM
20 µM Forward-Primer	1	0,4 µM
20 µM Reverse-Primer	1	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,25	1,25 Units/Reaktion
<b>Mastermix-Volumen</b>	<b>45 µl</b>	
DNA	5 µl	
<b>Endvolumen</b>	<b>50 µl</b>	

Die eingesetzten Primer wiesen folgende Sequenzen auf:

Forward-Primer: 5`-BIOTEG-GCAACCTCGACTTCGTCCAG-3`

Reverse-Primer: 5`-CGACGGCCAGTGAATTGTAATA-3`.

Die Endpunkt-PCR verläuft in mehreren Schritten. Dabei sind die Zeit- und Temperaturangaben an die entsprechenden Bedingungen anzupassen. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Eine zu niedrig gewählte Temperatur kann dabei zu unspezifischen Produkten führen, während eine zu hohe Temperatur in einer ineffizienten Produktbildung resultieren kann. Die optimale Temperatur liegt oft bei ca. 2 - 3 °C unter der Schmelztemperatur der Primersequenzen. Zur Optimierung der PCR-Effizienz wurde ein Gradientencycler verwendet, mit dem Annealing-Temperaturen von 56 - 62 °C verifiziert werden konnten. Für die Herstellung und Überprüfung der Ziel-DNA wurden folgende Temperaturen verwendet:

1. Denaturierung: 95 °C
2. Annealing: 56 - 62 °C
3. Polymerisation (Elongation): 72 °C.

In einem Gradientencycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg), welcher das programmierte Temperaturprogramm durchläuft, wurden diese Temperaturzyklen 40mal wiederholt. Der Reaktionsbeginn ist durch eine lineare Vermehrung der DNA geprägt, gefolgt von einer exponentiellen Amplifikation, bei der die gewünschte DNA-Sequenz verdoppelt wird. In der sich anschließenden Plateau-Phase, wird die Zielsequenz nur noch in geringem Maße vervielfältigt, da die notwendigen Ausgangsstoffe verbraucht werden (Brownstein 2004). Nach der PCR wurde das Produkt in einem 1,5 %igen Agarosegel unter Anfärbung mit Ethidiumbromid aufgetrennt und mit einem Gel-Dokumentationssystem (GeneGenius Bio Imaging System, SYNGENE, Cambridge, UK) sichtbar gemacht. Durch Mitführung eines Längenstandards während der Auftrennung konnte über die Größe des Amplifikates verifiziert werden, ob die gewünschte Zielsequenz amplifiziert wurde. Die amplifizierte Ziel-DNA wurde mit illustra MicroSpin<sup>TMS</sup>-300HR Säulen (GE Healthcare, München) aufgereinigt und anschließend nochmals mit dem Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) auf Vorhandensein überprüft. Die DNA-Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie bestimmt (siehe 4.3.3.). Um wiederholte Gefrier- / Auftau-Zyklen zu vermeiden, wurde die biotinylierte Ziel-DNA aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

### **4.3.1. Nachweis der biotinylierten Ziel-DNA mittels Gelelektrophorese**

Mittels Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wobei ihre Länge durch einen Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe (Längenstandards, Marker) bestimmt werden kann. Bei der Herstellung von Agarosegelen werden lange Fäden aus Agarose-Polymeren zu einem Gel vernetzt, wobei je nach Größe der zu untersuchenden DNA unterschiedliche Agarose-Konzentrationen gewählt werden. Durch

das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Gelmatrix, wobei die Laufgeschwindigkeit der Moleküle umgekehrt proportional zu ihrer Fragmentlänge ist. Durch Ethidiumbromid, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert, wird die DNA im Gel sichtbar gemacht. Zum Nachweis der generierten Ziel-DNA wurden 1,5 % Agarose in TBE-Puffer eingewogen, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in einen Gelträger gegossen, wobei mit Hilfe von Kämmen Geltaschen erzeugt wurden. Nach vollständiger Polymerisation wurde die Gelelektrophorese in einer mit 0,5 x TBE-Puffer und Ethidiumbromid-Lösung (50 µl pro 2 l Puffer) befüllten Elektrophoresekammer durchgeführt, wofür zuvor jeweils 10 µl der DNA-Lösungen mit 2 µl Bromphenolblau versetzt wurden. Nach erwarteter Größe des Zielfragments wurde ein passender Längenstandard (50 bp, Roche Diagnostics, Mannheim) mitgeführt und parallel zu den Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden 12 µl Probenlösung in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei RT und einer Spannung von 300 V für eine Minute und danach bei 150 V für 45 Minuten durchgeführt. Die Visualisierung mittels UV-Licht und die Dokumentation der Ergebnisse der aufgetrennten DNA erfolgten in dem Gel-Dokumentationssystem GeneGenius Bio Imaging Systems von SYNGENE. Anhand des erhaltenen Gelbildes konnte die biotinylierte Ziel-DNA identifiziert werden.

### **4.3.2. Aufreinigung der biotinylierten Ziel-DNA**

Die generierte DNA wurde vor weiteren Anwendungen gereinigt, um überschüssige PCR-Reagenzien zu entfernen. Für die Reinigung der generierten DNA wurden illustra MicroSpin<sup>™</sup>S-300HR Säulen (GE Healthcare, München) verwendet, die entsprechend der Anleitung des Herstellers angewandt wurden.

### **4.3.3. Konzentrationsbestimmung der biotinylierten gereinigten Ziel-DNA**

Die spektrophotometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe des NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Das Grundprinzip basiert dabei auf einer spektrophotometrischen Messung, die die Lichtabsorption bei 260 nm (für Nukleinsäuren) und 280 nm (für Proteine) gleichzeitig misst. Anhand der Absorption bei 260 nm ( $A_{260 \text{ nm}}$ ) kann dann die Nukleinsäurekonzentration berechnet werden. Dabei entspricht eine  $A_{260 \text{ nm}}$ -Einheit von 1,0 OD für dsDNA einer Konzentration von 50 ng/µl (ssDNA: 33 ng/µl). Vor der Messung muss der NanoDrop kalibriert werden. Dafür sollten 1-2 µl Fluka-Wasser auf die Messlinse pipettiert und ein Blankwert eingestellt werden. Anschließend sind die Konzentration und die Reinheit der DNA ermittelbar. Dabei gibt das Verhältnis von  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$  die Reinheit der extrahierten DNA an. Dieser Wert sollte in einem Bereich zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Für die Messungen wurde 1 µl DNA-Lösung direkt auf die Messlinse pipettiert und die

Konzentration auf dem Bildschirm des Geräte-Computers dargestellt. Vor jedem Probenauftrag sollte die Messlinse vorsichtig gesäubert werden. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte an einem Lifebook von Fujitsu Siemens mit dem Computerprogramm ND-1000.

#### 4.4. Detektion der biotinylierten Ziel-DNA mittels real-time PCR

Um das Vorhandensein der 202 bp großen Ziel-DNA und damit die Antigen-Antikörper-Bindung bei der zu entwickelnden RT-iPCR detektieren zu können, war ein weiteres Primerpaar nötig, welches einen Abschnitt innerhalb der Ziel-DNA amplifiziert. Hierfür wurde abermals ein nested Primerpaar gewählt, wobei der Forward-Primer innerhalb des Mandel-Abschnittes und der Reverse-Primer an dem Plasmidanteil der Ziel-DNA bindet, wodurch ein 86 bp großer Abschnitt aus der Ziel-DNA vervielfältigt und diese somit detektiert werden konnte. Die Sonde wurde ebenfalls so designt, dass sie sowohl an dem Mandel-, als auch an dem Plasmidanteil der Ziel-DNA bindet. Im Folgenden sind die Sequenzen sowohl der Sonde, als auch der Primer aufgeführt:

Sonde: 5`-YAK-AGGAGAGGCAACAACAAGAAGGGCGA-TMR-3`  
Forward-Primer: 5`-GCACGAGGAGCGACAACAG-3`  
Reverse-Primer: 5`-CCGCCAGTGTGATGGATATCT-3`.

Um die generelle Eignung der Primer zu testen, wurde zunächst eine Endpunkt-PCR durchgeführt und anschließend das Ergebnis mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese verifiziert.

#### 4.5. Eignung der biotinylierten Ziel-DNA für die Protein-Analyse

Die biotinylierte Ziel-DNA wurde vor ihrem Einsatz in der RT-iPCR auf ihre Eignung in der real-time PCR überprüft. Dafür war es nötig, sowohl das Detektionslimit, als auch die Effizienz des PCR-Systems zu verifizieren. Zwei Systeme sollten dabei untersucht werden: SYBR<sup>®</sup>Green und TaqMan<sup>®</sup>.

##### 4.5.1. Mastermix

Für die Durchführung der real-time PCR wurden für die zwei Systeme Mastermixe hergestellt, die die in Tab. 3 aufgeführten Komponenten in ihren optimalen Konzentrationen enthielten. Es wurde mit dem TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Roche, New Jersey, USA) und dem Absolute SYBR<sup>®</sup>Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific, UK) gearbeitet.

Tab. 3: Zusammensetzung der Mastermixe für die real-time PCR mit TaqMan-Sonde und SYBR® Green.

Komponente	Volumen / Reaktion (µl)	Konzentration im Mastermix
<b>Mit TaqMan-Sonde:</b>		
Wasser	7	
Universal Mastermix	12,5	1x
20 µM Forward-Primer	0,13	0,1 µM
20 µM Reverse-Primer	0,13	0,1 µM
20 µM Sonde	0,25	0,2 µM
<b>Mit SYBR® Green:</b>		
Wasser	7,25	
SYBR® Green	12,5	1x
20 µM Forward-Primer	0,13	0,1 µM
20 µM Reverse-Primer	0,13	0,1 µM

#### 4.5.2. Bestimmung der optimalen Primerkonzentration

Um einen endültigen optimalen Mastermix herstellen zu können, musste zunächst die optimale Primerkonzentration ermittelt werden. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen an Forward- und Reverse-Primern anhand des folgenden Kreuzungsschemas miteinander kombiniert und in der real-time PCR getestet.

Reverse-Primer (nM)	Forward-Primer (nM)		
	100	300	600
100	Mastermix 1	Mastermix 2	Mastermix 3
300	Mastermix 4	Mastermix 5	Mastermix 6
600	Mastermix 7	Mastermix 8	Mastermix 9

Das für die PCR angesetzte Gesamtvolumen betrug 25 µl pro Well (Probenvolumen von 5 µl + Mastermixvolumen von 20 µl). Die eingesetzte Primerkonzentration ergab sich aus dem Kreuzungsschema für die Primeroptimierung. Die Sonde wurde stets in einer Konzentration von 200 nM zugegeben. Pro Mastermix, welcher dreifach bestimmt wurde, wurden Negativkontrollen, welche anstatt der Ziel-DNA Wasser enthielten, eingesetzt, um die Reagenzien und die eigene Arbeitsweise auf Kontaminationen zu überprüfen. Das Temperatur- und Zeitprogramm war in 3 Segmente unterteilt und lief wie folgt: Segment 1= 10 min bei 50 °C, Segment 2= 10 min bei 95 °C, Segment 3= 30 sek bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Segment 3 wurde 45mal wiederholt. Nachdem alle Komponenten in die 96-Well PCR Platte pipettiert und diese mit einer passenden Klebefolie verschlossen wurde, folgte, vor der eigentlichen RT-PCR, ein Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 1000 g in einer Megafuge, damit sich die gesamte Flüssigkeit luftblasenfrei am Boden der Platte sammeln konnte.

#### 4.5.3. Effizienzbestimmung der RT-PCR mit SYBR<sup>®</sup>Green und TaqMan<sup>®</sup>-Sonde

Um eine RT-iPCR realisieren zu können, musste, neben dem immunologischen Detektionssystem, auch ein geeignetes RT-PCR-System entwickelt werden. Für diesen Zweck wurde ein chimäres 202 bp langes biotinyliertes DNA-Fragment generiert, welches durch die Amplifikation eines 86 bp langen Abschnittes in der RT-PCR nachgewiesen werden sollte. Als Detektionsmethode wurde sowohl SYBR<sup>®</sup>Green als auch eine TaqMan<sup>®</sup>-Sonde verifiziert, und die Effizienz beider Systeme in der RT-PCR bestimmt.

##### *Berechnung der Genom-Kopienzahlen*

Um die Effizienz des RT-PCR-Systems bestimmen zu können, musste die eingesetzte Kopienzahl der Ziel-DNA berechnet werden. Dabei wurde für die Größe der chimären DNA 202 bp angenommen. Mit diesem Wert wurde die Kopienzahl wie folgt berechnet: Es wurde von einem Gewicht von 660 g/mol Basenpaare ausgegangen. Multipliziert man das Molekulargewicht mit der Genomgröße, so erhält man das Gewicht von einem Mol.

$$202 \text{ bp} \cdot 660 \text{ g/mol} = 1,3332 \cdot 10^5 \text{ g/mol.}$$

In einem Mol sind  $6,022 \cdot 10^{23}$  Moleküle enthalten (Avogadro'sche Konstante). Durch Multiplikation mit der Konstante kann berechnet werden, wie viele DNA-Moleküle einem Nanogramm entsprechen.

$$1 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle} / 1,3332 \cdot 10^5 \text{ g/mol} = 4,517 \cdot 10^9 \text{ Moleküle je ng.}$$

Da in der RT-PCR jeweils 5 µl DNA eingesetzt werden, musste bestimmt werden, wieviele DNA-Moleküle in einem µl vorhanden sind. Dazu wurde die spektrophotometrisch bestimmte DNA-Menge herangezogen, die in ng/µl ermittelt wurde. Somit konnte die Kopienzahl/µl berechnet und durch Verdünnung auf die gewünschte Menge eingestellt werden.

##### *Effizienzbestimmung*

Für die Bestimmung der Effizienz wurde das nachzuweisende DNA-Molekül in einem Konzentrationsbereich von  $10^8$  - 0 Genomkopien logarithmisch verdünnt, in die RT-PCR jeweils in Dreifachbestimmung eingesetzt und mit SYBR<sup>®</sup>Green oder einer spezifischen TaqMan<sup>®</sup>-Sonde fluorometrisch detektiert. Zusätzlich wurden die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen, ob es sich um das gewünschte Zielprodukt handelt. Das für die RT-PCR angesetzte Gesamtvolumen betrug 25 µl pro Well. Die DNA wurde in einem Volumen von 5 µl eingesetzt. Im Vergleich zum Einsatz geringerer Volumina können auf diese Weise Pipettierfehler verringert werden. Die eingesetzte Primerkonzentration von 100 nM ergab sich aus der vorher ermittelten Primeroptimierung.

Die Sondenkonzentration betrug 200 nM. Negativkontrollen wurden eingesetzt, um die Reagenzien und die eigene Arbeitsweise zu überprüfen. Das Temperatur- und Zeitprogramm war in 3 Segmente unterteilt und lief wie folgt:

Segment 1: 10 min bei 50 °C

Segment 2: 10 min bei 95 °C

Segment 3: 30 sek bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Segment 3 wurde 45mal wiederholt.

Anschließend wurden die PCR-Effizienzen berechnet, indem die Mittelwerte der Ct-Werte gegen den Logarithmus der Genomkopien aufgetragen und eine Regression durchgeführt wurde. Anhand der Steigung der Regressionsgeraden konnte dann die Effizienz durch einsetzen in die Formel  $E=10^{-1/S} - 1$  errechnet werden (Vaerman *et al.* 2004).

### **LOD**

Das LOD ist die Zahl der Genomkopien, bei der alle drei Kavitäten noch detektierbar sind. Es wurde bestimmt, um eine Auskunft über die Sensitivität des PCR-Systems im Vergleich zur Negativkontrolle zu erhalten.

### **4.6. Untersuchung der RT-iPCR für den Nachweis bovinen Osteocalcins**

Alle für die Untersuchung der Ziel-DNA eingesetzten SYBR<sup>®</sup>Green / TaqMan<sup>®</sup>-Analysen wurden mit dem Mx3005P (Stratagene Agilent Technologies) durchgeführt. Die Mastermix-Komponenten wurden jeweils in Anlehnung an Tab. 3 eingesetzt. Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde war am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff YAK (Reporter) und am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMR (Quencher) markiert. Das Temperatur- und Zeitprogramm war in 3 Segmente unterteilt und lief wie folgt:

Segment 1: 10 min bei 50 °C

Segment 2: 10 min bei 95 °C

Segment 3: 30 sek bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Segment 3 wurde 45mal wiederholt.

Es war wichtig, dass die verwendeten Mikrotiterstreifen für die RT-iPCR sowohl über eine gewisse Proteinbindungskapazität verfügen, als auch real-time-PCR-kompatibel sind, was für typische real-time-PCR-Mikrotiterplatten nicht der Fall ist (Adler *et al.* 2008). Daher wurden für die RT-iPCR spezielle Mikrotiterstreifen (NukleoLink<sup>™</sup>Strips) der Firma Nunc (Dänemark) genutzt, die sowohl proteinbindungsfähig, als auch RT-PCR-kompatibel sind.

**Arbeitsbeschreibung**

Für die Durchführung der RT-iPCR wurde das Arbeitsprotokoll für den Sandwich-ELISA übernommen, allerdings wurden je Well 50 µl eingesetzt. Für die Detektion von Osteocalcin mittels RT-iPCR musste der Fänger-AK auf einer festen Oberfläche immobilisiert werden. Für diesen Zweck geeignete Reaktionsgefäße mussten sowohl die Immobilisierung des AK ermöglichen, als auch für den Einsatz in der real-time PCR geeignet sein. Üblicherweise werden aus Polypropylen bestehende Gefäße für die RT-PCR verwendet. Dieses Material besitzt RT-PCR geeignete optische Eigenschaften, ist allerdings nicht fähig, Proteine zu binden. Herkömmliche Gefäße aus Polycarbonat, wie sie für ELISA verwendet werden, sind wiederum weder bezüglich ihres Formats noch hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften für den Einsatz in RT-PCR-Geräten geeignet. Die Firma Nunc (Dänemark) hat spezielle Mikrotiterstreifen (NukleoLink™ Strips) entwickelt, die sowohl eine hohe Proteinbindungsfähigkeit aufweisen und gleichzeitig RT-PCR-kompatibel sind. Es wurden jeweils 12 NukleoLink™-Streifen, jeweils bestehend aus 8 zusammenhängenden Mikrotitergefäßen, auf einer Haltevorrichtung arrangiert und somit Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen hergestellt. Nach der Immobilisierung des Fänger-AK, dem Waschen und Blocken konnten die Proben bzw. der Standard (OC) zu der beschichteten Oberfläche gegeben werden und dort, bei Vorhandensein von Osteocalcin, eine Bindung eingehen. Nach dem Waschen erfolgte durch Zugabe des streptavidinierten Detektions-AK (pAK-OC1-9-STV) eine Bindung an das präsentierte Epitop. Nach weiteren Waschschritten wurde die Antigen-Antikörper-Bindung durch die Zugabe der biotinylierten DNA, welche an Streptavidin bindet, mittels RT-PCR detektiert und somit das Vorhandensein bovinen Osteocalcins sichtbar gemacht. Das Prinzip des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verfahrens für die RT-iPCR ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

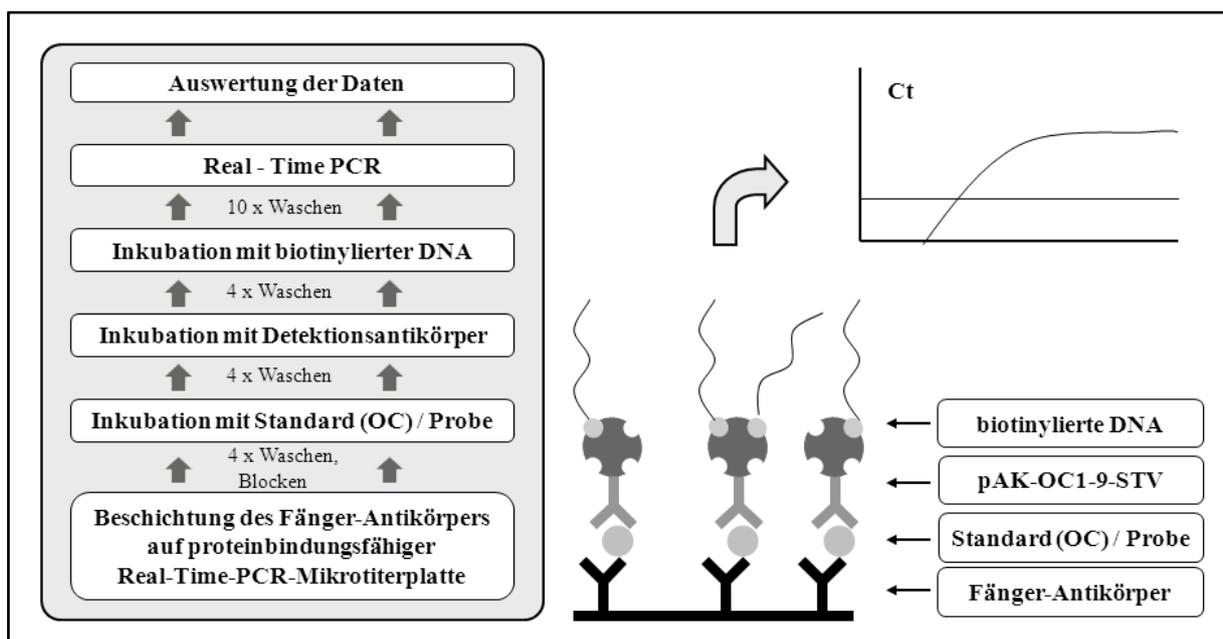


Abb. 7: Schematische Darstellung der entwickelten RT-iPCR.

### **4.6.1. Untersuchung der generellen Durchführbarkeit und Ermittlung der Sensitivität**

Um die generelle Durchführbarkeit der entwickelten RT-iPCR zu testen, wurde zunächst der Nachweis verschiedener Konzentrationen bovinen Osteocalcins verifiziert. Dafür wurden zwei RT-iPCR-Systeme entwickelt, welche sich in der Messung des Fluoreszenzsignals zum Nachweis der gebundenen Ziel-DNA unterscheiden. Dabei wurde vorerst der Nachweis mittels SYBR<sup>®</sup>Green untersucht. Dies ist ein DNA-Farbstoff, der in die vorhandene DNA interkaliert, Licht bei Anregung emittiert und somit das Vorhandensein der gebundenen DNA visualisiert. Der Nachteil bei dieser Methode liegt allerdings darin, dass Kontaminationen zu falsch positiven Ergebnissen führen können, da der Farbstoff in jede vorhandene DNA interkaliert und nicht spezifisch für die nachzuweisende Ziel-DNA ist. Daher wurde bei der zweiten Methode eine TaqMan<sup>®</sup>-Sonde genutzt, welche zwischen den Primern innerhalb der Zielsequenz bindet und sequenzspezifisch für die nachzuweisende DNA ist. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff markiert, welcher während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal generiert und somit das Vorhandensein der gebundenen DNA visualisiert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Kontaminationen das Ergebnis nicht verfälschen, da die Sonde nur an der Ziel-DNA bindet und somit selbst bei Vorhandensein fremder DNA kein Signal detektiert würde. Allerdings ist bei dieser Methode im Vergleich zur ersten auch oft die Sensitivität vermindert. Um diese zu ermitteln, wurden bei beiden Methoden Osteocalcin-Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml eingesetzt, welche im Vergleich zu den Negativkontrollen Blank (PBS anstatt des Fänger-AK) und NTC (PBS anstatt Osteocalcin) verifiziert wurden. Dabei wurden sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen jeweils in dreifacher Ausführung gemessen.

### **4.6.2. Untersuchung der Selektivität**

Nachdem die RT-iPCR auf ihre generelle Durchführbarkeit und Sensitivität überprüft wurde, wurde die Selektivität validiert, wofür abermals sowohl das RT-iPCR-System, welches auf SYBR<sup>®</sup>Green basiert, als auch jenes mit spezifischer TaqMan<sup>®</sup>-Sonde genutzt wurde. Hierfür wurden Extrakte boviner Fleisch- und Knochenmehle (BFKM) in pflanzlichen Futtermitteln in Konzentrationen von 0,1 % bis 10 % hergestellt und in der RT-iPCR nach dem Schema aus Abb. 7 in dreifacher Ausführung eingesetzt.

### **5. Einsatz von Phage-Display-Methoden zum Nachweis bovinen Osteocalcins**

Hierbei sollte generell verifiziert werden, ob mittels der angewandten Methodik ein sequenzspezifischer Nachweis bovinen Osteocalcins möglich wäre. Insbesondere sollte überprüft werden, ob eine *in-vitro*-Generierung immunologischer Detektionssysteme möglich wäre und somit für diese Fragestellung auf die Immunisierung von Tieren verzichtet werden könnte.

#### **5.1. Auswahl einer geeigneten Zielsequenz**

Um Phagen mit positiven Bindungseigenschaften gegen bovines Osteocalcin zu selektieren, wurde die spezifische Peptidsequenz OC 16-22 bovinen Osteocalcins als Zielsequenz gewählt. Da die Immunisierung von Kaninchen gegen die Peptidsequenz OC 16-22 nicht in positiven Ergebnissen resultierte, sollte in diesem Teil der Arbeit überprüft werden, ob für diesen schwer zugänglichen mittleren Bereich bindende Phagen selektiert werden können und somit eine Diskriminierung von Rind und Pferd möglich wäre.

#### **5.2. Phage-Display-Bibliothek**

Die genutzte Ph.D.<sup>TM</sup> Phage-Display Bibliothek (Ph.D.-7, New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., Ipswich, MA, USA) basiert auf einem M13-Phagen, welcher für die fünffache Darstellung von Peptiden als N-terminale Fusion an dem Hüllprotein pIII (Scott & Smith 1990; Cwirla *et al.* 1990; Devlin *et al.* 1990) modifiziert wurde. Dieses Protein moduliert die Phageninfektiosität durch Bindung an den F-Pilus der Empfänger-Bakterienzelle und ist in fünffacher Ausfertigung an einem Ende des M13-Phagen gebündelt (Russel *et al.* 1997; Rodi & Makowski 1999). Wenn das dargestellte Peptid kurz genug ist (<50 AS), wird die infektiöse Funktion von pIII nicht beeinträchtigt und alle fünf Exemplare können das dargestellte Peptid, ohne messbare Abschwächung der Phageninfektiosität tragen (Cwirla *et al.* 1990). Das Genom enthält dabei nur eine einzelne Kopie des Gens III.

Die genutzte vorgefertigte zufällige Peptid-Bibliothek von New England BioLabs (Ph.D.-7) besitzt am N-Terminus des Hüllprotein pIII ein lineares Heptapeptid, welches durch eine kurze Linker-Sequenz (Gly-Gly-Gly-Ser) mit dem pIII verbunden ist. Die Bibliothek weist eine Komplexität von mehr als 2 Milliarden unabhängigen Klonen auf, was ausreicht, um für die meisten, wenn nicht gar alle der möglichen 7-mer Peptidsequenzen ( $1,28 \times 10^9$ ) zu codieren (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc. Instruction Manual) und somit als geeignet erschien, um Phagen mit positiven Bindungseigenschaften gegen die Peptidsequenz OC 16-22 zu selektieren.

#### **5.3. Funktionsprinzip des Phage Display**

Das Phage-Display basiert auf einer Selektionstechnik, bei der eine Bibliothek von mehr als 2 Milliarden unabhängigen modifizierten M13-Phagen eingesetzt wird. Die Phagen weisen am

N-Terminus des Hüllproteins pIII ein Heptapeptid auf, über das sie eine Bindung mit dem jeweils passenden Antigen eingehen können. Dabei präsentiert jeder der eingesetzten Phagen ein anderes Heptapeptid, welches im genetischen Material des jeweiligen Phagen kodiert wird, wodurch die Analyse des Genotyps einen direkten Rückschluss auf den Phänotyp und somit auf das Heptapeptid zulässt. Das nachzuweisende Peptid OC 16-22 wurde an ein Immuno<sup>TM</sup>-Röhrchen (Nunc<sup>TM</sup>, Dänemark) gebunden und anschließend mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Die Phagen, die über ein passendes Heptapeptid verfügen, gingen mit OC 16-22 eine Bindung ein und wurden, nach dem Abwaschen ungebundener Phagen, eluiert und anschließend in *E. coli*-Bakterien amplifiziert. Ein weiteres Immuno<sup>TM</sup>-Röhrchen, an welches OC 16-22 gebunden vorlag, wurde mit dem amplifizierten Phagen-Pool der ersten Runde inkubiert, ungebundene Phagen abgewaschen, die gebundenen Phagen gelöst und abermals amplifiziert. Diese *in vitro* Selektion namens „Panning“ wurde mehrmals wiederholt, um spezifisch bindende Phagen anzureichern. Nach 3-4 Runden wurden dann zunächst die Phagen-Poole mittels ELISA auf die spezifische Bindungsaffinität hin verifiziert. Hiernach wurden einzelne Klone isoliert und durch ELISA und DNA-Sequenzierung charakterisiert, was Rückschlüsse auf das präsentierte Heptapeptid des jeweiligen Klons ermöglichte, welches im Anschluss synthetisiert und mittels ELISA verifiziert wurde.

#### **5.4. Panning gegen OC 16-22 und Amplifizierung der selektierten Phagen**

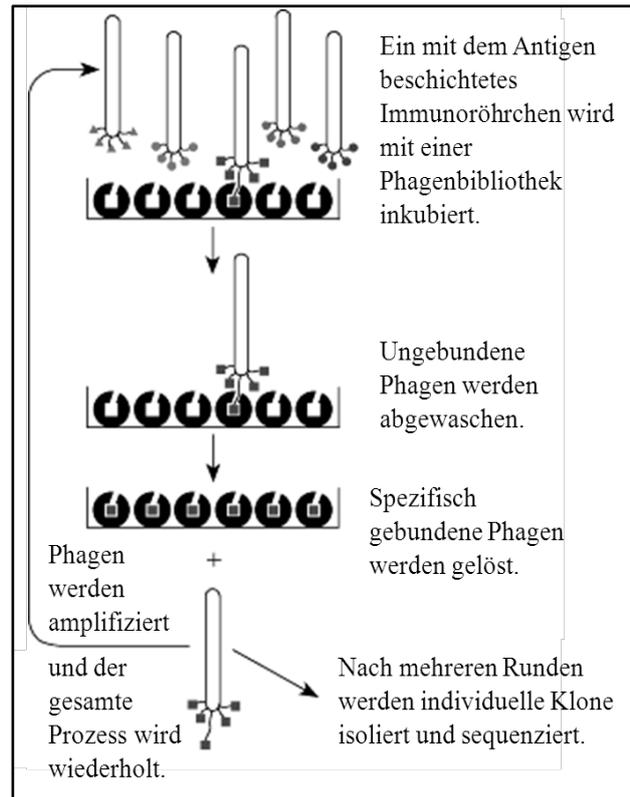
Panning ist durch die Inkubation einer Phage-Display Bibliothek an ein mit dem Antigen beschichtetes Immuno<sup>TM</sup>-Röhrchen, das Abwaschen der ungebundenen Phagen und Eluieren der spezifisch gebundenen Phagen gekennzeichnet. Die eluierten Phagen wurden amplifiziert und durch zusätzliche Bindungs- und Amplifikationszyklen wurde der Pool mit bindenden Phagen angereichert. Das Funktionsprinzip des Panning ist in Abb. 8 dargestellt.

#### ***Stammhaltung***

Um die Kontaminationsgefahr möglichst gering zu halten wurde zunächst der *E. coli*-Wirtsstamm ER2738 (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., Ipswich, MA, USA) auf einer Tetrazyklin-haltigen Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Dies hatte zum Ziel, nur die *E. coli*-Bakterien zu selektieren, die den sogenannten F'-Faktor aufweisen, welcher Tetrazyklin-Resistenz verleiht. Dies ist besonders für die Isolierung individueller Phagen-Klone essentiell, da dort mit Tetrazyklin-haltigen Medien gearbeitet wird, um Umweltkontaminationen zu vermeiden. Die bewachsene Platte konnte bei 4 °C im Dunkeln für maximal einen Monat aufbewahrt werden.

**Panning und Amplifizierung**

Um spezifisch bindende Phagen gegen bovines OC zu erhalten, wurde ein Immuno™-Röhrchen mit 1,5 ml einer Lösung aus 15 µg/ml OC bzw. OC 16-22 in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10 ml Tetrazyklin-haltiges LB-Medium für ca. 3 h und 20 ml LB-Medium für ca. 1,5 h mit den auf Tetrazyklin-Resistenz selektierten *ER2738* inokuliert. Beide Kulturen wurden bei 37 °C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Die 20-ml-Kultur sollte dabei nicht über die frühe-log-Phase (OD<sub>600</sub> 0,01 bis 0,05) wachsen. Parallel dazu wurde die OC-Lösung aus dem Immuno™-Röhrchen gegossen,



**Abb. 8: Schematische Darstellung des Panning. Durch aufeinander folgende Bindungs- und Amplifikationszyklen wird der Pool mit bindenden Phagen angereichert (modifiziert nach New England BioLabs® Inc. Instruction Manual).**

welches anschließend auf einem sauberen Papiertuch ausgeschlagen und hiernach komplett mit Blocking-Puffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6), 5 mg/ml BSA) befüllt wurde. Nach 1 h bei 4 °C wurde die Blocking-Lösung abgegossen und das Röhrchen auf einem sauberen Papiertuch ausgeschlagen und anschließend 6 x mit TBST (TBS + 0,1 % Tween-20) gewaschen. Die Phagen-Bibliothek bzw. der amplifizierte Phage-Pool vorhergehender Panning-Runden wurde mit 1 ml TBST auf die gewünschte Phagen-Konzentration von 10<sup>11</sup> Phagen verdünnt, zu dem beschichteten und geblockten Immuno™-Röhrchen gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Ungebundene Phagen wurden durch Abgießen und ausklopfen auf ein sauberes Papiertuch entsorgt und das Immuno™-Röhrchen 10 x mit TBST gewaschen um ungebundene unspezifische Phagen zu entfernen. Die gebundenen Phagen wurden durch Zugabe von 1 ml Elutionspuffer (0,2 M Glycin-HCl pH 2,2; 1 mg/ml BSA) unter schwenken bei RT für 10 min gelöst. Dann wurde das Eluat in ein Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und mit 150 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,1) neutralisiert. Eine kleine Menge (~ 1 µl) des Eluats wurde titriert (siehe 5.5.) und der Rest des Eluats amplifiziert, indem das Eluat auf die 20-ml-*ER2738*-Kultur gegeben wurde. Dabei erfolgte die Inkubation unter kräftigem Schütteln für 4,5 h bei 37 °C. Hiernach wurde das amplifizierte Eluat in ein Falconröhrchen überführt und für 10 min bei 12000 g / 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und nochmals zentrifugiert, wobei das Pellet verworfen wurde. Die oberen 80 % des Überstandes wurden abermals in ein frisches

Röhrchen übertragen und 1 / 6 Volumen PEG / NaCl dazugegeben. Die Phagen sollten bei 4 °C über Nacht ausfallen. Am darauffolgenden Tag wurde das PEG-Präzipitat bei 12000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und verworfen, das Röhrchen kurz nochmals zentrifugiert und Reste vom Überstand mit einer Pipette entfernt. Das Phagen-Pellet war als ein weißer Abstrich auf der Seite des Falconröhrchens sichtbar. Das Pellet wurde in 1 ml TBS aufgenommen, die Suspension in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, um restliche Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die Phagen durch Zugabe von 1 / 6 Volumen PEG / NaCl für 60 min auf Eis ausgefällt. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, nochmals kurz zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer Mikropipette entfernt. Das Pellet wurde in 200 µl TBS aufgenommen und für 1 min zentrifugiert um alle verbleibenden unlöslichen Materialien zu pelletieren. Daraufhin wurde der Überstand, welcher das amplifizierte Eluat darstellte, in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Das amplifizierte Eluat wurde titriert (siehe 5.5.) und für eine langfristige Lagerung das gleiche Volumen sterilen Glycerins dazu gegeben und bei - 20 °C gelagert.

### 5.5. Titrierung

Mit Hilfe der Titrierung kann untersucht werden, inwieweit bindende Phagen vorhanden sind bzw. wie hoch die Konzentration der amplifizierten Phagen ist und somit das Eingangsvolumen für die jeweils nächste Panning-Runde berechnet werden. Dazu wurden zunächst 10 ml Tetrazyklin-haltiges LB-Medium mit den auf Tetrazyklin-Resistenz selektierten *ER2738* beimpft und unter Schütteln ca. 3 h bis zur mittleren logarithmischen Phase ( $OD_{600} \sim 0,5$ ) inkubiert. Anschließend wurde Top-Agar in einer Mikrowelle geschmolzen und pro Phagenverdünnung 3 ml in sterile, vorgewärmte Kulturröhrchen abgefüllt und bei 45 °C warm gehalten. Pro erwarteter Verdünnung wurde für mindestens 1 h eine LB / IPTG / Xgal-Platte bei 37 °C bis zur Verwendung vorgeheizt. Die zu titrierenden Phagen wurden seriell in LB-Medium verdünnt, wobei die laut Manuskript empfohlenen Verdünnungsbereiche (für amplifizierte Panning-Eluate:  $10^8$ - $10^{11}$ ; für unamplifizierte Panning-Eluate:  $10^1$ - $10^4$ ) eingehalten wurden. Anschließend wurden pro Phagenverdünnung 190 µl der 10-ml-*ER2738*-Kultur in Mikrozentrifugenröhrchen abgefüllt und 10 µl jeder Phagenverdünnung zugegeben, schnell gevortext und bei RT für 1-5 min inkubiert. Hiernach wurden die insgesamt 200 µl in die Kulturröhrchen mit dem 45 °C Top-Agar übertragen, kurz gevortext und auf eine vorgewärmte LB / IPTG / Xgal-Platte gegossen. Nach kurzer Abkühlungszeit wurden die Platten umgedreht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques (blau) auf den Platten gezählt, die etwa 100 Plaques aufwiesen, mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor der Platte multipliziert und so der Phagentiter bestimmt. Dieser sollte in der Größenordnung von  $10^{13-14}$  plaque forming units (pfu) / ml liegen.

### 5.6. Auswahl geeigneter Phagen-Poole

Mittels ELISA wurde die Zielspezifität einzelner amplifizierter Phagen-Poole überprüft bzw. bestätigt. Dafür wurde nach jeder Panning-Runde eine Mikrotiterplatte mit bovinem Osteocalcin (bzw. dem Peptid OC 16-22) in hoher Konzentration beschichtet und der zu untersuchende Phagen-Pool in unterschiedlicher Konzentration zugefügt. Gebundene Phagen wurden daraufhin mit einem anti-M13-Antikörper (GE Healthcare, Freiburg) nachgewiesen. Der schematische Aufbau des genutzten ELISA ist in Abb. 9 sichtbar.

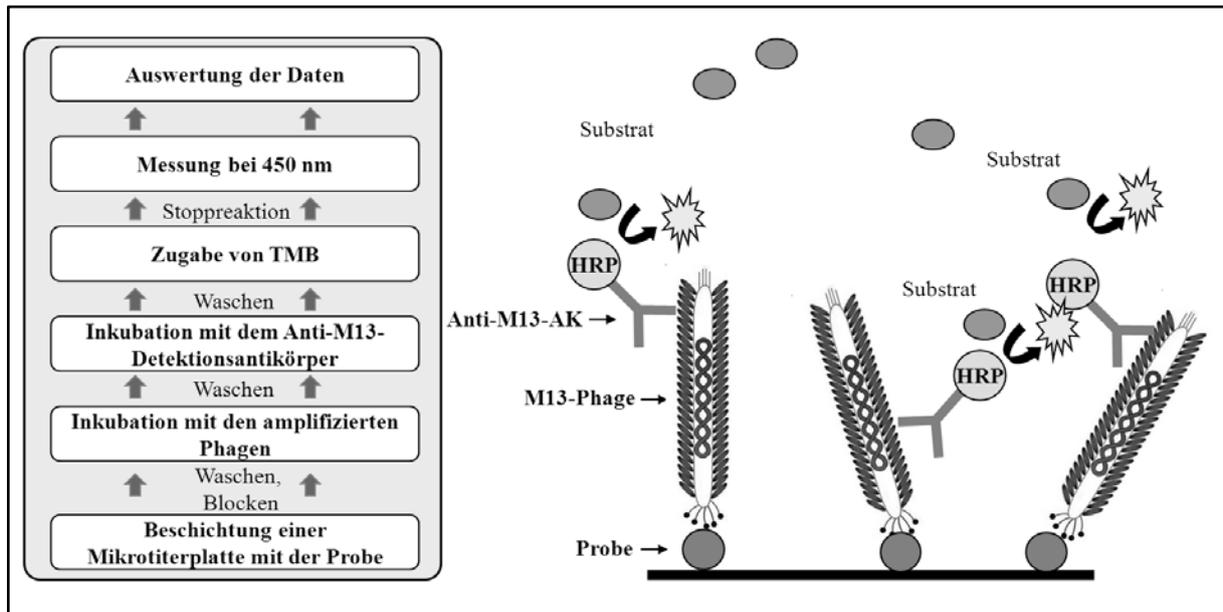


Abb. 9: Schematische Darstellung des ELISA zur Auswahl geeigneter Phagen-Poole. Das nachzuweisende Antigen wird auf einer 96-Well-Platte immobilisiert und anschließend mit M13-Phagen inkubiert. Bindende Phagen werden daraufhin mit einem HRP-markierten Anti-M13-AK nachgewiesen.

### ELISA-Protokoll

Für jeden Pool, der charakterisiert werden sollte, wurde eine Mikrotiterplatte mit 50 µl bovinem Osteocalcin (bzw. dem Peptid OC 16-22) mit einer Konzentration von 5 µg / ml in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6) beschichtet und über Nacht bei 4 °C gebunden. Parallel dazu wurden auch Negativkontrollen eingesetzt, die lediglich die Blocklösung (0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6; 5 mg / ml BSA), nicht aber das Antigen enthielten. Damit sollte überprüft werden, ob positive Signale durch die Bindung an das Antigen oder an Blocking-Reagenzien verursacht wurden. Überschüssige Lösung wurde ausgeschüttet und die Platte verdeckt auf einem Papiertuch abgeklopft und anschließend durch Zugabe von 200 µl / Well Blocklösung für 2 h bei 4 °C geblockt. Die Platte wurde unter Verwendung eines automatischen ELISA Washers 4 x mit TBST gewaschen (380 µl / Well) und der zu untersuchende Phagen-Pool mit TBST, 3 mg / ml BSA auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und mit 50 µl / Well für 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde anschließend 4 x mit TBST gewaschen und je Well 50 µl des HRP-konjugierten anti-M13 monoklonalen Antikörpers (GE Healthcare, Freiburg), welcher zuvor in einem Verhältnis von 1:3000 mit Blocklösung verdünnt wurde, zugegeben und bei

RT für 1 h inkubiert. Die Platte wurde 4 x mit TBST gewaschen und der Assay durch Zugabe von TMB entwickelt. Nach einer Inkubationszeit von 10-20 min bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Well gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm gegen Luft in einem Mikroplattenreader (Mithras LB 940, Berthold Tech. GmbH & Co. KG, Bad Wildbad) bestimmt.

### **5.6.1. Nachweis boviner Fleisch- und Knochenmehle**

Um geeignete Phagen-Poole zu isolieren, wurden die Poole mit den besten ELISA-Ergebnissen für reines bovines Osteocalcin zusätzlich mit FKM-Extrakten getestet. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit FKM-Extrakten beschichtet und der zu untersuchende Phagen-Pool in unterschiedlicher Konzentration zugefügt. Gebundene Phagen wurden daraufhin mit einem anti-M13-Antikörper nachgewiesen. Das oben genannte ELISA-Protokoll wurde angewandt.

### **5.7. Isolierung und Amplifizierung individueller Phagen-Klone**

Um Rückschlüsse auf das präsentierte Heptapaptid bindender Phagen ziehen zu können, ist es nötig, aus geeigneten Phagen-Poolen individuelle Klone zu isolieren. Hiernach können diese mittels ELISA und DNA-Sequenzierung charakterisiert und somit Sequenzinformationen des bindenden Peptids erhalten werden.

#### **5.7.1. Titrierung geeigneter Poole, um einzelne Klone zu picken**

Um separate Phagenklone zu erhalten, mussten Poole, die sich mittels ELISA als geeignet erwiesen haben, titriert werden. Hierzu wurden je Pool unterschiedliche Verdünnungsstufen eingesetzt. Die einzelnen Klone wurden als blaue Plaques auf den Platten sichtbar. Je Phagenpool sollten ca. 10-20 Plaques von Platten, die weniger als 100 blaue Plaques aufwiesen, gepickt werden, um Klone mit einer positiven Bindungsaffinität zu bovinem Osteocalcin zu isolieren.

#### **5.7.2. Amplifizierung der gepickten Klone**

Um die gepickten einzelnen Klone charakterisieren zu können, war es notwendig, diese vorerst zu amplifizieren. Dazu wurde zunächst eine Übernachtskultur von *ER2738* 1:100 mit LB-Medium verdünnt und pro Klon 1 ml der Lösung in ein Kulturröhrchen überführt. Die zu amplifizierenden Klone wurden nach dem Picken jeweils in ein Kulturröhrchen transferiert und bei 37 °C unter starkem Schütteln für 4,5 h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und bei 14000 rpm für 30 Sekunden bei 4 °C zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden für die DNA-Aufreinigung und anschließende Sequenzierung in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt (siehe 5.9.). Der restliche Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und nochmals

zentrifugiert. Die oberen 80 % des erhaltenen Überstandes wurden abermals in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C gelagert. Dies stellte das amplifizierte Eluat der jeweiligen Klone dar.

### **5.8. Auswahl geeigneter Klone mit ELISA**

Nach der Amplifizierung einzelner Klone musste die Zielspezifität dieser mittels direktem ELISA (siehe 5.6.) überprüft werden, da innerhalb eines Phagen-Pools auch immer unspezifische Phagen vorhanden sind, die gepickt worden sein könnten. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit bovinem Osteocalcin bzw. einem BFKM beschichtet und der jeweilige Phagenklon zugefügt. Gebundene Phagen wurden daraufhin mit einem anti-M13-Antikörper nachgewiesen. Die Phagen, die zum einen die stärksten Positivsignale für bovines Osteocalcin und BFKM und die schwächsten Negativsignale zeigten, wurden für die Sequenzierung ausgewählt.

### **5.9. Sequenzierung einzelner Klone, um die codierte Peptidsequenz zu ermitteln**

Einzelne Phagenklone mit einer nachgewiesenen positiven Bindungsaffinität zu bovinem Osteocalcin wurden durch die Firma Quiagen sequenziert, um Informationen über das bindende Peptid zu erhalten. Dazu wurden jeweils 15 µl der zu sequenzierenden aufgereinigten Phagen-DNA und der Sequenzierungs-Primer (96 gIII sequencing primer: 5'-<sup>HO</sup>CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3') eingeschickt und anschließend die Sequenzierungsergebnisse mit der Software Chromas Lite ausgewertet. Hierzu musste zuvor eine DNA-Extraktion und -Aufreinigung der zu sequenzierenden Klone durchgeführt werden.

#### ***DNA-Extraktion und -Aufreinigung***

Die 500 µl des Überstandes aus 5.7.2. wurden mit 200 µl PEG / NaCl vermischt und für 10-20 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch bei 4 °C für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals zentrifugiert und der restliche Überstand entfernt. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl Iodid-Puffer gelöst und nach der Zugabe von 250 µl Ethanol für 10-20 min bei RT inkubiert. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet unter Vakuum getrocknet. Hiernach wurde das Pellet in 30 µl Fluka-Wasser aufgenommen. Um sehr saubere DNA zu erhalten, wurde anschließend nochmals mit Phenol / Chloroform aufgereinigt.

#### ***Phenol-Chloroform-Extraktion***

Die zu reinigende DNA wurde mit Wasser auf ein Volumen von 200 µl eingestellt und das gleiche Volumen (200 µl) an Phenol:Ready Red (1:1) zugegeben. Im Anschluss wurde 3 x für

je 20 Sekunden gevortext und anschließend für 2 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, auf die organische Phase wurde erneut Wasser gegeben, gevortext und abermals die wässrige Phase in das neue Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Für eine folgende Ethanol-Präzipitation wurden 80 % des Probenvolumens an eiskaltem 2-Propanol und 10 % des Probenvolumens an 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) in ein Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt und der DNA-Extrakt dazu gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 4 °C folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4 °C bei maximaler Umdrehung. Daran anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei maximaler Umdrehung wurde der Überstand verworfen und das Pellet unter Vakuum bei RT getrocknet und anschließend in 30 µl Fluka-Wasser gelöst.

### **5.10. Peptidsynthese**

Anhand der erhaltenen Sequenzinformationen konnte die Aminosäuresequenz des bindenden Heptapeptids festgestellt werden. Für eine anschließende Peptidsynthese durch die Firma Biosyntan (Berlin) musste bedacht werden, dass während der Panning-Experimente der N-Terminus des Heptapeptids frei war, während der C-Terminus am Hüllprotein pIII gebunden vorlag und somit keine negative Carboxyl-Gruppe aufwies. Liegt allerdings das Peptid ungebunden vor, so wird der C-Terminus eine negative Ladung aufweisen, was veränderte Bindungseigenschaften nach sich ziehen könnte. Deshalb wurde, nach Empfehlungen des Herstellers, der C-Terminus amidiert, um eine Negativladung zu verhindern. Da das Heptapeptid über eine Linkersequenz (Gly-Gly-Gly-Ser) mit dem Hüllprotein pIII verbunden war, wurde dem C-Terminus außerdem diese Linkersequenz zugefügt. Um das Peptid später auch chemisch konjugieren zu können, wurde zusätzlich ein zweites Peptid generiert, welches über Cystein am C-terminalen Ende verfügt. Die vorhandene Thiol-Gruppe des Cysteins ermöglicht beispielsweise eine einfache Kopplung mit verschiedenen Enzymen.

### **5.11. Einsatz der synthetisierten Peptide im ELISA**

Um die synthetisierten Peptide im ELISA einsetzen zu können war es nötig, die Peptide mit einem Enzym zu markieren. Dafür mussten zunächst die synthetisierten lyophilisierten Peptide in PBS gelöst und auf eine Konzentration von 1 mg / ml eingestellt werden. Für die Enzym-Markierung wurden zwei unterschiedliche Systeme genutzt.

### ***Markierung des Peptids mit Maleimide-activated HRP***

Für die Konjugation mit Maleimide-activated HRP (Innova Biosciences, Cambridge, UK) wurden 200 µl des Peptids (Konzentration: 1 mg / ml), welchem zusätzlich die Aminosäure Cystein angehängt wurde, zu dem lyophilisierten HRP gegeben, vorsichtig mit einer Pipette durchmischt, für 3 h bei RT inkubiert und dann bei 4 °C gelagert.

### ***Markierung des Peptids mit Lightning-Link<sup>TM</sup> HRP***

Nach Rücksprache mit dem Hersteller (Innova Biosciences, Cambridge, UK) wurden 10 µg des amidierten Peptids in einem Volumen von 100 µl verwendet. Pro 10 µl des eingesetzten Peptids wurde 1 µl LL-Modifier (also 10 µl) hinzugegeben und danach der Peptid-Modifier-Mix in das Vial mit dem lyophilisierten HRP gegeben, zur Resuspension 2 x das komplette Volumen mit der Pipette aufgenommen und wieder abgelassen und über Nacht bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden noch 10 µl LL-Quencher hinzu pipettiert und nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit war das Konjugat einsatzbereit.

### **5.11.1. Sandwich-ELISA**

Um die Bindungseigenschaften der synthetisierten Peptide zu verifizieren, wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Hierfür diente das synthetisierte amidierete Peptid als Fänger-AK und der generierte AK gegen die AS-Sequenz 1-9 bovinen Osteocalcins als Detektions-AK. Das Protokoll wurde wie folgt durchgeführt. Waschschrte wurden in der Regel viermal mit 380 µl PBS-Tween 20 unter Verwendung eines automatischen ELISA Washers durchgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden in einem Volumen von 50 µl / Well durchgeführt. 1, 2 und 10 µg / ml des Peptids wurden auf einer Mikrotiterplatte für 24 h bei 4 °C gebunden. Parallel dazu wurde auch der ursprüngliche Fänger-AK OC4-30 (Takara Bio Inc., Otsu / Shiga, Japan) an die Platte gebunden, um bei der Auswertung einen Vergleich zu ermöglichen. Die Platte wurde gewaschen und dann durch Zugabe von 200 µl / Well Blocklösung über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Platte wurde gewaschen und mit reinem bovinen Osteocalcin oder unverdünnten Probenextrakten für 2 h bei RT inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrte wurde die Mikrotiterplatte mit dem Detektions-Antikörper inkubiert (pAK-OC1-9-STV, 1:500 in PBS) für 2 h bei RT, dann gewaschen und 1 h bei RT mit biotinyliertem HRP inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und der Assay mit TMB-Lösung entwickelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Well gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm gegen Luft in einem Mikroplattenreader (Mithras LB 940, Berthold Tech. GMBH & Co. KG, Bad Wildbad) bestimmt. Alle Proben und Standards wurden in dreifacher Ausführung gemessen.

### 5.11.2. Direkter ELISA

Ein direkter ELISA wurde durchgeführt, um die Peptide auf ihre Bindungseigenschaften zu überprüfen. Dafür wurden 50 µl reines bovines OC bzw. ein Extrakt für 24 h bei 4 °C auf eine Mikrotiterplatte gebunden, die Platte anschließend gewaschen und über Nacht bei 4 °C geblockt. Anschließend wurde die Platte gewaschen und mit 50 µl der HRP-markierten Peptide für 2 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde der Assay mit TMB-Lösung entwickelt, nach 20 min bei RT im Dunkeln die Reaktion durch Zugabe von 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Well gestoppt und die optische Dichte bei 450 nm gegen Luft in einem Mikroplattenreader (Mithras LB 940, Berthold Tech. GMBH & Co. KG, Bad Wildbad) bestimmt. Alle Proben und Standards wurden in dreifacher Ausführung gemessen.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Identifizierung möglicher Gewebemarker

Die Eignung potenzieller Marker für den Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln ergibt sich insbesondere durch die Erfüllung folgender Anforderungen: Hitzestabilität sowie Resistenz gegenüber den gesetzlich vorgeschriebenen Behandlungen (133 °C, 20 min, 300 kPa), das Vorhandensein ausreichender Mengen im tierischen Organismus, um immunologisch nachweisbar zu sein, die Abgrenzbarkeit zu anderen Spezies bzw. Speziesgruppen, adaptierbare in der Literatur beschriebene Nachweisverfahren bzw. Extraktionsmethoden sowie das Vorhandensein von Sequenzinformationen verschiedener Spezies. Auf diese Weise wurden für verschiedene Gewebetypen potenzielle Marker ausfindig gemacht.

##### 1.1. Osteocalcin

Osteocalcin (OC) ist ein kleines extrazelluläres Knochenmatrix-Protein, welches durch Osteoblasten produziert wird und einen gemeinsamen Bestandteil in verkalkten Knochengewebe in der ganzen Wirbeltier-Gruppe inklusive Knochenfischen darstellt (Hauschka *et al.* 1989; Nishimoto *et al.* 2003; Laizé *et al.* 2005). Das reife Peptid, welches von 45 - 49 Aminosäuren gebildet wird, hat eine Größe von ca. 5800-5900 Da. Bis zu 90 % des OC wird in die Knochenmatrix abgesondert, wo es, abgesehen von Kollagen, mit bis zu 2 mg / g Knochenmatrix oder 1 bis 5 % der gesamten Knochenproteine beziehungsweise 10 bis 20 % der nicht-kollagenen Knochenproteine das am häufigsten vorkommende Knochenprotein ist (Hauschka *et al.* 1989). Nur ein kleiner Anteil von OC (10 bis 40 %) zirkuliert im Blut, wo er rasch in Niere und Leber abgebaut wird (Lee *et al.* 2000). Die Funktion von OC ist noch nicht vollständig verstanden, aber das Molekül scheint eine Rolle in der molekularen Organisation des Hydroxylapatit-Skeletts sowie im Knochenumbau zu spielen (Ducy *et al.* 1996; Dowd *et al.* 2003). Drei Glutaminsäurereste, lokalisiert an der Aminosäureposition 17, 21 und 24, bilden ein hoch konserviertes Motiv des Peptids. Diese Glutaminsäuren werden in posttranslationalen Carboxylierungsschritten in  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäuren transformiert und fungieren als Präzipitationsorte für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abb. 10).

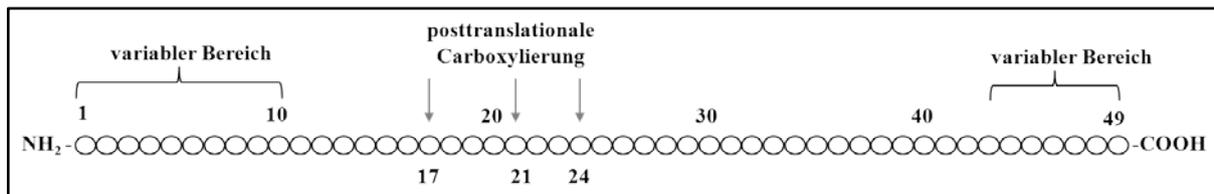


Abb. 10: Schematische Darstellung von OC und Kennzeichnung der Glutaminsäurereste an den Aminosäurepositionen 17, 21 und 24, die posttranslational in  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäuren transformiert werden. Sowohl der N-Terminus ( $-\text{NH}_2$ ) als auch der C-Terminus ( $-\text{COOH}$ ) weisen einen variablen Bereich auf.

### III. ERGEBNISSE

In Anwesenheit von Calcium bildet das Molekül eine kompakte Struktur, bestehend aus zwei  $\alpha$ -Helix-Regionen und einem hydrophoben Kern in der Nähe des C-Terminus (Dowd *et al.* 2003). Sowohl Sequenzen des N- als auch des C-terminalen Endes von OC weisen artspezifische Unterschiede auf (Abb. 11).

Spezies	Mittelfragment		NCBI-Zugangsnr.
	1	43	
<i>Bos taurus</i>	YLDH--WLGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYGPV--	43	ABU88822.1
<i>Ovis aries</i>	YLDP--GLGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYGPV--	49	ABD83814.1
<i>Capra hircus</i>	YLDP--GLGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYG <b>IA</b> --		I005180A
<i>Sus scrofa</i>	YLDH--GLGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYG <b>IA</b> --		Q8HY9.2
<i>Equus caballus</i>	YLDH--WLGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYGPV--		P83005.1
<i>Gallus gallus</i>	HYAQDSGVAGA--PPNPLEAQREVCELSPDCCDELADQIGFQEAYRRFYGPV--		AAA78809.1
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	-SFAVGSSYGA--APDPLEAQREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYGPV--		P15504.1
<i>Rattus norvegicus</i>	YLNN--GLGAPAPYPDPLEPHREVCELNPNCCDELADHIGFQDAYKRIYGTTV-		AAA53280.1
<i>Mus musculus</i>	-----YLGASVPSFDPLEPTREQCELNPFACDELSQYGLKTAYKRIYGITI-		AAA39856.1
<i>Canis familiaris</i>	YLDS--GLGAPVPPYPDPLEPKREVCELNPNCCDELADHIGFQEAYQRFYGPV--		AAB27444.1
<i>Felis sylv. catus</i>	YLAP--GLGAPAPYPDPLEPKREICELNPDCCDELADHIGFQDAYRRFYGTV--		P02821.1
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	QLIN--GQGAPAPYPDPLEPKREVCELNPDCCDELADQVGLQDAYQRFYGPV--		P39056.1
<i>Xenopus laevis</i>	--SYGNNVGQGAAVGSPLESQREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYGPV--		AAB36024.1
<i>Salmo salar</i>	AGTALADLSL-----TQLESREVCELNWCENMMDTAGIIAAYTEFYGPPIPY		NP_001130023.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ASTALADLYL-----TQLESREACELNWCENMMDTAGIIAAYTEFYGPPIPY		AAP04487.1
<i>Scophthalmus maximus</i>	---AAGELSL-----TQLESREVCELNFACEEMDDTTGIIAAYNAFYGPPIQ		AAV80230.1
<i>Diplodus puntazzo</i>	---AAGQLSL-----TQLESREVCELNFACEHMDTEGIIAAYTAYYGPPIPY		AAV17284.1
<i>Sparus aurata</i>	---AAGQLSL-----TQLESREVCELNFACEHMDTEGIIAAYTAYYGPPIPY		AAK66568.1
<i>Pagrus auriga</i>	---AAGQLSL-----TQLESREVCEANLACEDMMDTEGIIAAYTAYYGPPIPY		AAV80232.1
<i>Halobatrachus didactylus</i>	---AAELSL-----VQLESREVCELNFACEHMDTEGIIIVAYTAYYGPPIPF		AAQ13575.1
<i>Argyrosomus regulus</i>	---AAKELTL-----AQTESREVCELNFACEHMDTEGIIIVAAAYQAFYGPPIPF		AAO48725.1
<i>Macropus eugenii</i>	--YLYQTLGFFAPYPDPQENKREVCELNPDCCDELADHIGFQEAYRRFYGTA--		POC226.1
<i>Lepomis macrochirus</i>	---AAGELTL-----TQLESREVCEANLACEDMMDAQGIIAAYTAYYGPPIPY		AAB22263.1

**Abb. 11: Vergleich von veröffentlichten Osteocalcin-Sequenzen für Nutztiere, Haustiere, Nagetiere, Amphibien und Knochenfische. Die carboxylierten Glutaminsäurereste an Position 17, 21 und 24 sind mit Sternchen gekennzeichnet. Schwarze Pfeile zeigen auf die tryptischen Spaltstellen. Aminosäure-Austausche zwischen *Bos taurus* und anderen Nutztieren sind in Fettschrift hervorgehoben. Die Zielsequenz eines generierten Detektions-Antikörpers pAK-OC1-9 und das Mittelfragment (1-43) sind durch schwarze Linien gekennzeichnet.**

OC ist bekannt dafür, hitzestabil zu sein. OC aus humanen oder Rinderknochen, welches bei 120 °C über Nacht extrahiert, lyophilisiert und bei 110 °C für 5 Stunden decarboxyliert wurde, behält seine Substratspezifität gegenüber einer enzymatischen Vitamin-K-abhängigen Carboxylase bei (Vermeer *et al.* 1984). Osteocalcin konnte in 75.000-Jahre alten Neandertalerknochen durch MALDI-TOF/TOF-MS (Nielsen-Marsh *et al.* 2005) und in fossilen Knochen und Zähnen durch eine auf Immunoassay basierenden Untersuchung identifiziert werden (Ulrich *et al.* 1987; Collins *et al.* 2000). Aufgrund der extremen Stabilität und Hitzeresistenz, der artspezifischen Sequenzunterschiede, welche die Möglichkeit erlauben, über speziesspezifische Determinanten (Epitope) tiergruppenspezifische Antikörper zu generieren und des reichlichen Vorhandenseins in FKM eignet sich Osteocalcin für den Nachweis hoch prozessierter tierischer Proteine in Futtermitteln und stellt ein bislang für diesen Zweck noch nicht eingesetztes neues Zielprotein dar.

## 1.2. Kollagen und Hydroxyprolin

Das Glykoprotein Kollagen stellt, mit 55-95 % der Trockenmasse die wichtigste strukturelle Komponente des Bindegewebes dar (Tornberg 2005). Im Knochen gehört es neben OC zu den beiden am häufigsten vorkommenden Proteinen (Collins *et al.* 2002). Dabei ist es nicht nur im Knochen sondern auch im Dentin das vorherrschende Protein (Hauschka *et al.* 1975). In der Archäologie wird Kollagen wegen seines reichhaltigen Vorkommens, seiner Persistenz und seiner Umsatzrate routinemäßig für die Radiokarbon-Datierung und Isotopenanalyse genutzt (Collins *et al.* 2010). Dabei besteht der besondere Vorteil des Knochen-Kollagens darin, dass es ein stark unlösliches Protein ist, da die Mineralisierung stabilisierend auf Kollagen wirkt (Collins *et al.* 2002). Kollagen ist ein bemerkenswert robustes Protein und kann selbst hohen Temperaturen widerstehen. Es dient der Identifizierung von Knochen und scheint ein hervorragender Marker sowohl für verarbeitete tierische Gewebe, wie FKM, als auch Geweihe und Elfenbeine zu sein (Collins *et al.* 2010). Daher ist es nicht überraschend, dass Kollagen aus fossilen Knochenproben verschiedener Organismen isoliert werden konnte (Ajie *et al.* 1991; Cattaneo *et al.* 1992 a). Auch im Muskelgewebe ist Kollagen, als typisches Faserprotein neben Aktin und Myosin vorhanden. Kollagen existiert in mehreren genetischen Formen (I-V) (Tornberg 2005) und besteht aus drei Ketten, die zusammen gewickelt eine Tripel-Helix ergeben (Collins *et al.* 2010). Für Kollagen sind außerdem hohe Gehalte an Glycin, Prolin, 5-Hydroxylysin und Hydroxyprolin charakteristisch (Matissek *et al.* 1989; Amtliche Sammlung 2010). Dabei wird für Hydroxyprolin in tierischen Organismen angenommen, dass es exklusiv in Bindegewebsprotein, Kollagen und Elastin vorkommt. Aufgrund dieser eingeschränkten Verteilung wird Hydroxyprolin in großem Umfang als ein Indikator für die Anwesenheit von Kollagen verwendet (Woessner 1961). 4-Hydroxyprolin wird, aufgrund seines beschränkten Vorkommens im Bindegewebe, zur Bestimmung des Bindegewebsanteils in Fleischerzeugnissen herangezogen. Dabei wird es durch Säurehydrolyse aus dem Bindegewebsprotein freigesetzt und nach Abtrennung des Fettanteils unter Verwendung von Chloramin T oxidiert. Das Oxidationsprodukt des Hydroxyprolins bildet mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd ein rot gefärbtes Kondensationsprodukt, dessen Extinktion bei 558 nm photometrisch bestimmt wird (Matissek *et al.* 1989; Amtliche Sammlung 2010). In eigenen Untersuchungen war es möglich, Hydroxyprolin in Anlehnung an die Methode der Amtlichen Sammlung nach §64 LFGB in verschiedenen FKM zu detektieren. Dabei ergaben die Untersuchungen von FKM, die sogar bei bis zu 145 °C erhitzt wurden, bezogen auf einen Hydroxyprolin-Standard, ein stark positives Extinktionssignal, wohingegen u.a. Maisschrot, Roggen, Hafer, Weizen, Hühnervollei und Vollmilchpulver in negativen Signalen resultierten. Inwiefern Hydroxyprolin für die Detektion von TP in FM eingesetzt werden kann, soll in weiterführenden Untersuchungen am BfR verifiziert werden. Aufgrund der genannten Fakten wird allerdings vermutet, dass sowohl Kollagen, als auch Hydroxyprolin geeignet sein könnten, um Bindegewebeinmischungen tierischer Herkunft in Futtermitteln zu detektieren.

### 1.3. Myoglobin

Myoglobin (Mb) ist ein 17 kDa großes, monomeres, Sauerstoff-bindendes Hämoprotein, das typischerweise in Herz- und Skelettmuskulatur von Wirbeltieren vorkommt und für die Lagerung und den Transport von Sauerstoff zuständig ist (Berenbrink 2010). Muskulatur besteht zu 75 % aus Wasser, 20 % aus Proteinen, 3 % aus Fett und 2 % aus löslichen Nicht-Proteinen-Substanzen. Dabei können die Muskelproteine in drei Gruppen unterteilt werden: myofibrilläre, sarkoplasmatische und Bindegewebsproteine, wobei das globuläre Protein Mb zu den sarkoplasmatischen gezählt wird (Tornberg 2005). In einer Studie wurde gezeigt, dass Mb Fleischallergien bedingen kann. Dabei zeigten SDS und Immunoblotting mit erhitzten Fleischextrakten Banden bei 17 kDa. Außerdem wurde ein hitzeresistentes Fleischallergen bei einem Patienten mit allergischen Reaktionen nach dem Fleischverzehr festgestellt. Dieses Allergen hatte eine Größe von 17 kDa und die Analyse der Aminosäuresequenz des N-Terminus ergab folgende Sequenz: GLSDGEWQLVLNAWGK, welche der Aminosäuren 2-17 des bovines Mb zuzuordnen ist. Trotz des hohen Homologiegrades in der Aminosäuresequenz des Mb von Säugetieren, tolerierte der Patient Schweinefleisch, dessen Sequenz sich in nur 11 Aminosäuren von humanen Mb unterscheidet, während bovines Mb 23 Variationen aufweist und zu einer Reaktion führte. Gleichzeitig unterscheiden sich Schweine- und Rinder-Mb in 19 Aminosäuren (Fuentes *et al.* 2004).

Obwohl Proteine in Lebensmitteln durch Verarbeitungsprozesse, insbesondere durch Erhitzen, aggregiert werden, wählten Kotoura *et al.* Mb als Zielprotein zur immunologischen Bestimmung des Rindfleischgehaltes in verarbeiteten Nahrungsmitteln. Dies begründeten sie damit, dass Mb in Rindfleisch relativ reichhaltig vorhanden ist (4 - 10 mg / g) und der Homologiegrad der Aminosäuresequenz verschiedener Spezies relativ niedrig ist, verglichen mit Skelettmuskel-Proteinen wie Myosin und Aktin. Für die Entwicklung eines Sandwich-ELISA für die Detektion bovines Myoglobins wurden zwei polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt. Da spekuliert wurde, dass ein polyklonaler Antikörper gegen das vollständige denaturierte Rindfleisch-Mb-Molekül (D-Mb) mit Schweine- und Hühnerfleisch-Mb kreuzreagieren könnte, wurde auch ein AK gegen ein Peptid mit einer spezifischen Aminosäuresequenz für Rindfleisch-Mb generiert. Dafür wurde die für bovines Mb spezifische Aminosäuresequenz Ala<sup>84</sup> bis Asn<sup>95</sup> ausgewählt und ein Peptid (Cys-Ala<sup>84</sup> - Asn<sup>95</sup>) synthetisiert. Der Antikörper gegen das D-Mb reagierte mit Rind- und Schweinefleisch-Mb, nicht aber mit Huhn-Mb. Im Gegensatz dazu reagierte der gegen das Peptid generierte Antikörper nur mit Rindfleisch-Mb, ohne Kreuzreaktivität zu zeigen. Der entwickelte Sandwich-ELISA wies ebenfalls keine Kreuzreaktivität gegen Ei, Milch, Weizen, Buchweizen, Erdnüsse, Garnelen und Krabben auf. Kotoura *et al.* konnten Mb auch in Proben nachweisen, die bei 120 °C erhitzt wurden. Das LOD lag bei 29,4 ng/ml (Kotoura *et al.* 2009). Diese Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass das hitzeresistente Muskelprotein Mb auch in prozessierten FKM eine tierartspezifische Detektion ermöglichen könnte.

#### 1.4. Albumin

Albumin ist das häufigste im Blutplasma vorkommende Protein und macht etwa 60 % des gesamten Proteins und 80 % des kolloidosmotischen Blutdrucks aus. Bovines Serumalbumin (BSA) weist eine Molekularmasse von 66.500 Da auf und wird aus 583 Aminosäuren zusammengesetzt (Barreca *et al.* 2010).

Mittels ELISA und Immunoblot wurde BSA als starkes Allergen in Rindfleisch identifiziert. Dafür wurden Seren von Patienten mit einer Fleischallergie genutzt. Die Patienten reagierten nicht mit Schweine- oder Hühnerextrakten, zeigten aber eine spezifische Reaktion gegen Rindfleisch (Han *et al.* 2000). Es ist bekannt, dass die meisten Fälle von Fleischallergien durch Albumin verursacht werden und BSA somit eines der wichtigsten Allergene, die im Rindfleisch vorhanden sind, darstellt (Fuentes *et al.* 2004). Bei fleischallergischen Kindern war selbst bei erhitztem Fleisch bzw. BSA noch eine allergische Reaktion feststellbar (Fiocchi *et al.* 2000). Auch konnte BSA mittels polyklonaler Antikörper in Hackfleischfrikadellen, welche bei unterschiedlichen Temperaturen gekocht wurden, im Western Blot detektiert werden (Wang *et al.* 1996).

In einer weiteren Studie wurde mit Hilfe eines Dot-ELISA, basierend auf Kaninchen-Antiseren gegen Albumin verschiedener Tierarten, die artspezifische Detektion in kommerziellen Hamburgerproben getestet. Dabei konnten die verschiedenen Spezies (Rind, Huhn, Schwein, Pferd) anhand von Antiseren gegen das jeweilige Albumin in Fleischextrakten bzw. in Hamburgern nachgewiesen werden (Macedo-Silva *et al.* 2000). Es wurde auch festgestellt, dass BSA im Vergleich zu gefriergetrocknetem Rindfleischextrakt das geeignetere Antigen für die Herstellung von Antiseren für die Identifizierung von Rindfleisch ist (Prince Devadason *et al.* 2005).

In weiteren Studien wurde die Identifikation von Albumin in Knochen untersucht. Dabei konnte Albumin mittels Inhibitions-ELISA, basierend auf monoklonalen Antikörpern, in altem Skelettmaterial nachgewiesen werden, wobei bereits eine Detektion von 10 ng Albumin möglich war und keine Kreuzreaktionen zwischen menschlichen und tierischen Materialien auftraten. Im Vergleich zu dem ebenfalls untersuchten IgG scheint Albumin für diese Zwecke besser geeignet zu sein, was sich mit dem größeren Vorkommen im Blut (35-50 g/l im Vergleich zu 5-15 g/l) erklären lässt (Cattaneo *et al.* 1992 b).

Studien von alten Skelettresten ergaben, dass Tierarten ohne weiteres identifiziert werden könnten und Albumin selbst in eingeäschertem Material noch nachweisbar ist. Mittels Inhibitions-ELISA, basierend auf monoklonalen Antikörpern gegen Albumin, gelang es sogar, das Blutprotein Albumin in menschlichen Knochen aus der Bronzezeit von 2200-1700 v. Chr. zu identifizieren. Es wurden auch monoklonale Antikörper gegen Albumin anderer Spezies produziert. Dabei war die Methode spezifisch und sensitiv genug, um die sichere Identifizierung der Arten aus kleinen Knochenfragmenten zu ermöglichen und so konnte Rinderalbumin bereits in Knochen aus der Römerzeit detektiert werden. Albumin scheint

resistent gegenüber rauen Umweltbedingungen zu sein, wobei unterschiedliche pH-Werte nicht in Relation zur Überlebensrate von Albumin zu stehen scheinen. Es wird außerdem vermutet, dass Albumin oder ein signifikantes Epitop hohe Temperaturen wie Osteocalcin überleben kann. Albumin kann speziesspezifisch in sehr altem Material detektiert werden und es wird angedacht, dass die Methode auch auf andere Spezies übertragen werden könnte, um die Herkunft von nicht identifizierbaren Knochenfragmenten zu bestimmen (Cattaneo *et al.* 1992 a).

Aufgrund der genannten Fakten scheint Albumin als Marker für den Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln geeignet zu sein.

#### **1.5. Perilipin**

Perilipine sind Phosphoproteine, die an den Oberflächen von Triacylglycerol-Tröpfchen in Adipozyten lokalisiert sind, wo sie die Rate der Lipolyse regulieren (Wang *et al.* 2003; Souza *et al.* 1998). Sie werden in den Adipozyten hoch exprimiert (Souza *et al.* 1998) wobei zwei Isoformen, Perilipin A und B unterschieden werden (Marcinkiewicz *et al.* 2006). Dabei ist Perilipin A das hauptsächlich exprimierte Perilipin im Fettgewebe (Wang *et al.* 2003). Perilipin A ist ein wichtiger Regulator der Triacylglycerol-Lagerung und Hydrolyse in Adipozyten. Das wird in Perilipin-Null-Mäusen deutlich, die, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, eine drastisch reduzierte Masse an Triacylglycerol im Fettgewebe aufweisen. Es wird vermutet, dass die Proteinkinase-A-vermittelte Phosphorylierung von Perilipin A den Umbau der Fettröpfchen auslöst und die maximale Lipolyse erleichtert (Marcinkiewicz *et al.* 2006).

Im Hinblick auf den Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln spielt auch der Nachweis von Fetten eine Rolle, da laut §18 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch das Verfüttern von Fetten aus Geweben warmblütiger Landtiere und von Fischen sowie von Mischfuttermitteln, die diese Einzelfuttermittel enthalten, an Nutztiere, soweit es sich um Wiederkäuer handelt, verboten ist. In diesem Bezug sei erwähnt, dass Lipide auch aus archäologischen und paläontologischen Knochen extrahiert werden konnten (Collins *et al.* 2002) und dass Perilipin, durch sein weitreichendes Vorkommen dieser Gesetzgebung entsprechend als potentieller Marker betrachtet werden könnte.

## **2. Entwicklung eines Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins**

Um einen Sandwich-ELISA für den Nachweis von prozessiertem Rinder-Osteocalcin (OC) zu entwickeln, wurden polyklonale Antikörper (pAK) gegen die OC-Aminosäuresequenz OC 1-9 (YLDHWLGGAP) in Kaninchen durch ein Service-Labor (BioGenes, Berlin) hergestellt und auf ihre Eignung hin verifiziert. Das Serum, welches in einem Vortest das beste Ergebnis erzielte, wurde durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierte Sepharose gereinigt, um eine monospezifische IgG-Fraktion zu isolieren, die im Sandwich-ELISA als sekundärer Antikörper verwendet werden sollte.

### **2.1. AK-Generierung gegen bovines Osteocalcin**

Um für den Knochengewebsmarker Osteocalcin (OC) ein immunologisches Detektionssystem für den speziesspezifischen Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln zu entwickeln, wurden speziell gegen bovines OC gerichtete Antikörper generiert. Dabei wurden ausgehend von der Sequenzdatenanalyse tierartspezifische Unterschiede in den Aminosäuresequenzen beachtet, welche eine Diskriminierung bovinen Osteocalcins gegenüber dem anderer Spezies erlauben (Abb. 11). Bei einem Vergleich der relevanten Nutztierarten werden besonders im Aminosäurebereich 1-9 Unterschiede deutlich. Dabei unterscheidet sich bovines OC von dem vom Schwein in einer (AS 5), vom Schaf in zwei (AS 4 und AS 5) und von der Ziege in drei Aminosäuren (AS 4, AS 5, AS 9). Die Aminosäuresequenz 1-9 ist bei Pferd und Rind identisch, jedoch ist ein Unterschied an AS 19 vorhanden. Eine Abgrenzung bovinen Osteocalcins zu dem vom Huhn und Fisch wird durch starke AS-Abweichungen deutlich. Auch Maus und Ratte scheinen gut gegen bovines OC abgrenzbar zu sein.

Auf diese Sequenzanalyse aufbauend wurden polyklonale Antikörper (pAK) gegen die synthetischen und LPH- (Limulus polyphenus Hämocyanin) gekoppelten Osteocalcin-Aminosäuresequenzen OC 1-9 und OC 16-22 in Kaninchen durch ein Service-Labor (BioGenes, Berlin) hergestellt.

### **2.2. Auswahl geeigneter AK für den Nachweis bovinen Osteocalcins**

Einer oder mehrere der vier gegen die Aminosäuresequenz OC 1-9 und OC 16-22 generierten AK sollte im ELISA für die BFKM-Erkennung in Futtermitteln eingesetzt werden. Um eine Auswahl treffen zu können wurden die generierten Antikörper zunächst anhand eines Titrierungsschemas (Grid-Experimente) plattiert und somit die optimale AK-Konzentration im direkten ELISA ermittelt. Dies ist notwendig, da suboptimale Konzentrationen zu unspezifischen Bindungen und somit zu hohen Hintergrundsignalen führen können.

Anschließend wurden die optimalen Verdünnungen für die AK dokumentiert, welche für die generierten AK bei 1:1000 und für den Detektions-AK bei 1:20.000 lagen.

Daran anschließend wurde der beste AK anhand der optimalen AK-Konzentrationen im direkten ELISA bestimmt. Wie in Abb. 12 sichtbar wird, zeigten die beiden gegen die OC-Aminosäuresequenz 1-9 generierten AK (pAK-OC1-9 A, pAK-OC1-9 B) bei optimaler Konzentration gute Korrelation zu Osteocalcin. Im Vergleich dazu war für die beiden AK, welche gegen die AS-Sequenz 16-22 (pAK-OC16-22 A, pAK-OC16-22 B) bovinen Osteocalcins generiert wurden, nur ein schwaches positives Signal detektierbar.

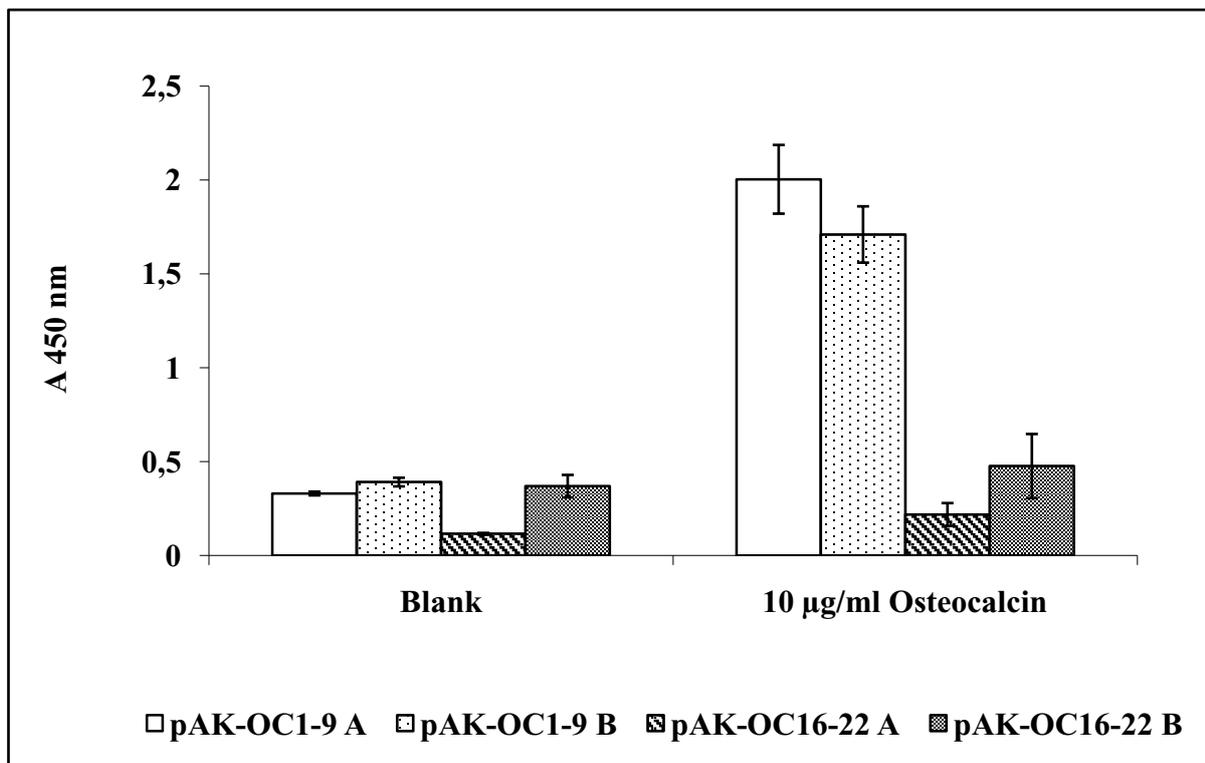


Abb. 12: Auswahl des geeigneten Antikörpers für den Nachweis bovinen Osteocalcins. Die beiden gegen die OC-Aminosäuresequenz 1-9 generierten AK (pAK-OC1-9 A, pAK-OC1-9 B) ergeben im direkten ELISA ein starkes Positivsignal, bei schwachen Werten für die Negativkontrolle (Blank). Im Vergleich dazu war für die beiden AK, welche gegen die Aminosäuresequenz 16-22 (pAK-OC16-22 A, pAK-OC16-22 B) bovinen Osteocalcins generiert wurden, nur ein schwaches positives Signal detektierbar. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Die Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Osteocalcin.

Für die Fortführung der Arbeit wurde der AK mit dem stärksten positiven Signal und schwächsten Hintergrundrauschen gewählt (pAK-OC1-9 A). Dieser wurde durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierte Sepharose durch das Service-Labor gereinigt, um monospezifische IgG-Fractionen zu isolieren. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden abermals Titrierungsexperimente durchgeführt um so die optimalen Konzentrationen für die monospezifische IgG-Fraktion zu bestimmen, welche bei 1:500 bis 1:1000 lagen. Wie in Abb. 13 sichtbar wird, zeigt der monospezifisch aufgereinigte AK bei steigendem OC-Gehalt einen proportionalen Anstieg in der Signalstärke. Ebenfalls positiv zu bewerten ist das sehr niedrige Hintergrundrauschen. Der AK wurde als geeignet bewertet, um als sekundärer Antikörper im zu entwickelnden Sandwich-ELISA eingesetzt zu werden.

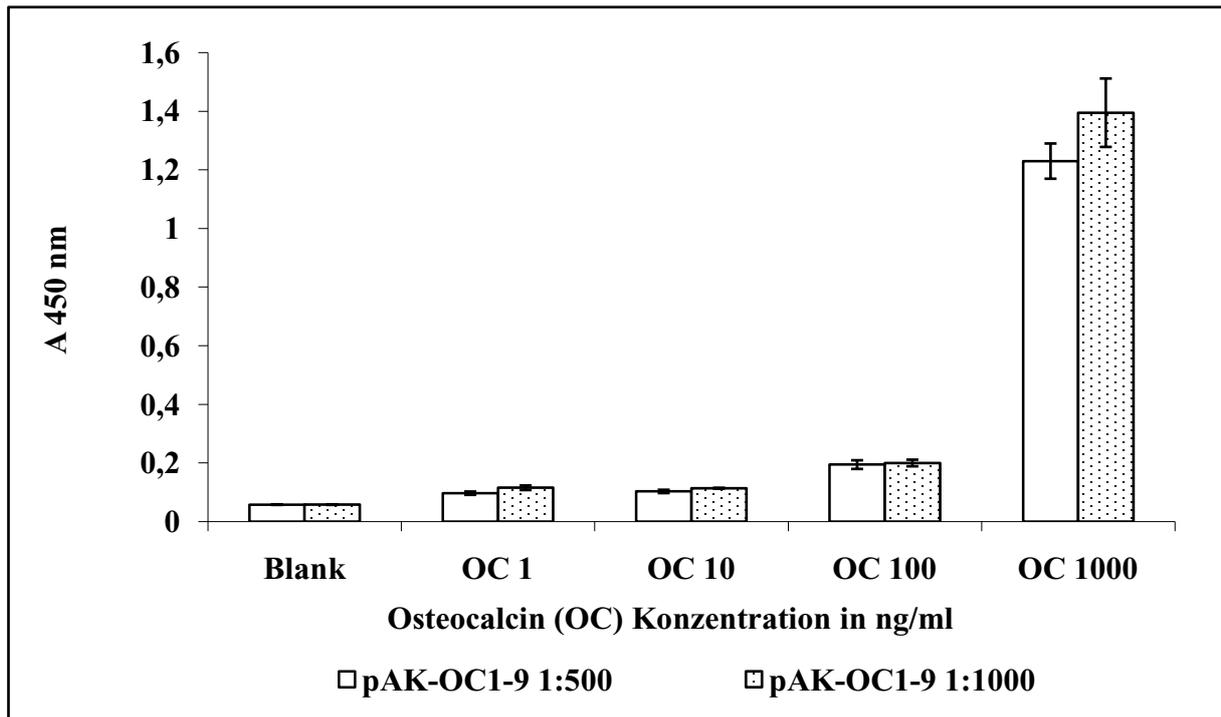


Abb. 13: Direkter ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins. Der spezifisch gegen die AS-Sequenz OC-1-9 gerichtete pAK-OC1-9 wurde mit dem Detektions-Antikörper (Goat-anti-Rb-HRP, 1:20000, AnaSpec) nachgewiesen. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Die Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Osteocalcin.

### 2.3. SDS-Page und Western Blot

Das Serum, welches in einem Vortest das beste Ergebnis erzielte, wurde durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierte Sepharose gereinigt, um eine monospezifische IgG-Fraktion zu isolieren, die im Sandwich-ELISA als sekundärer Antikörper verwendet werden sollte. Zu diesem Zweck wurde pAK-OC1-9 unter Verwendung eines kommerziellen Kits nach den Anweisungen des Herstellers mit Streptavidin markiert (pAK-OC1-9-STV) und ein Immunoblot mit einem EDTA-Proteinextrakt aus reinem Rinderknochen durchgeführt, um die Reaktivität der isolierten monospezifischen IgG-Fraktion zu bestätigen. Als Ergebnis war lediglich eine große niedermolekulare Protein-Bande (~ 5,8 kDa) entsprechend der Größe des intakten Referenz-Proteins nachweisbar (Abb. 14). Im Rinderknochenextrakt traten keine signifikanten unspezifischen Bindungen an andere Knochenproteine auf, sodass der Antikörper pAK-OC1-9-STV verwendet werden konnte, um mit einem monoklonalen Fänger-Antikörper (OC4-30) ein Sandwich-ELISA-Paar zu etablieren.

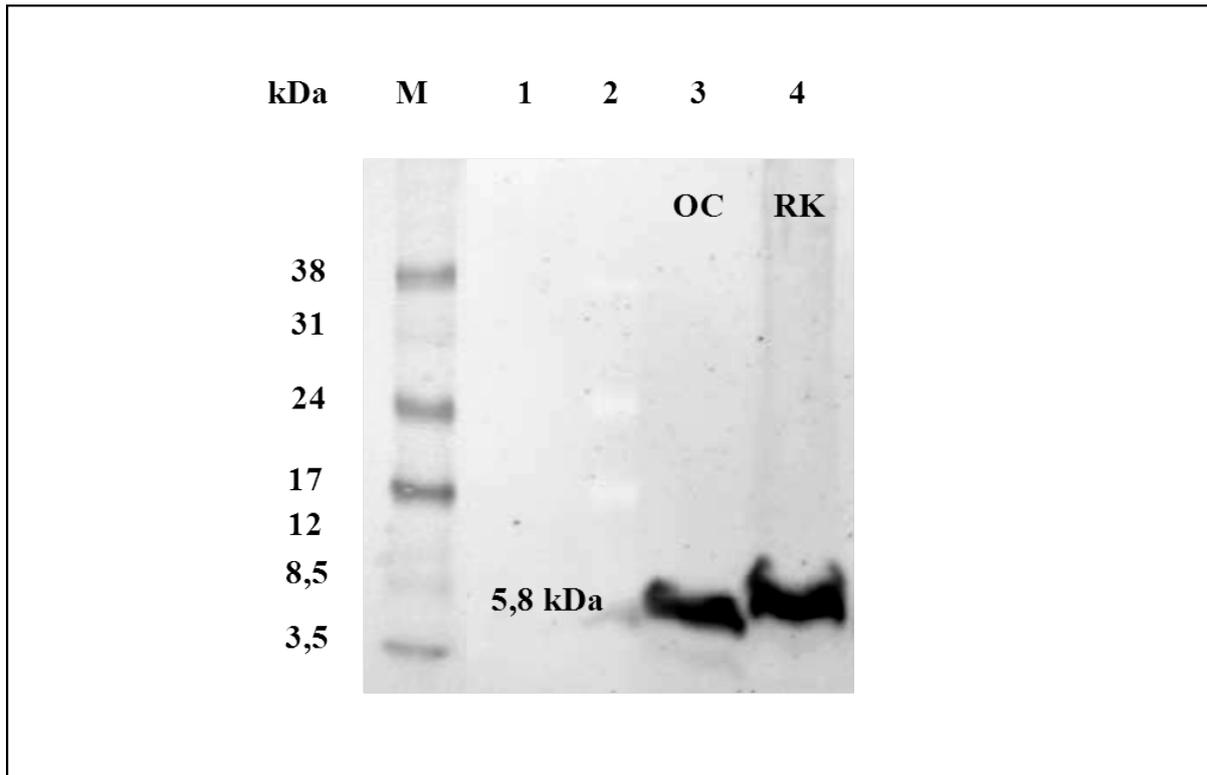


Abb. 14: Spezifität des pAK-OC1-9 (polyklonale Anti-Osteocalcin-IgG-Fraktion) gegenüber nativem Rinderknochenprotein im Western-Blot. M, Linie 2: Low-Range Molecular Weight Marker (3,5-40 kDa; Amersham, GE Healthcare); Linie 1: NTC (Wasser statt Protein); Linie 3: OC = Positivkontrolle (bovinen Osteocalcin, 1,3 µg / Kavität); Linie 4: RK = Rinderknochen EDTA-Extrakt (7,2 µg / Kavität).

#### 2.4. Im Sandwich-ELISA eingesetzte Antikörper

Ein kommerzieller monoklonaler Maus-Antikörper, welcher an das Epitop um AS17 von bovinem Osteocalcin bindet (OC4-30) und spezifiziert ist, Kreuzreaktionen mit Mensch, Rind, Kaninchen, Schaf, Hund, Affe und Ziege, aber nicht mit Ratte oder Maus aufzuweisen, wurde als Fänger-Antikörper in einem Sandwich-ELISA verwendet.

Aufbauend auf eine OC-Sequenzanalyse wurden polyklonale Antikörper (pAK) gegen die synthetischen und LPH- (Limulus polyphenus Hämocyanin) gekoppelten Osteocalcin-Aminosäuresequenzen OC 1-9 und OC 16-22 in Kaninchen durch ein Service-Labor hergestellt. Das Serum, welches in einem Vortest im direkten ELISA zum Nachweis bovinen OC das beste Ergebnis erzielte, wurde durch Affinitätschromatographie an CNBr-aktivierte Sepharose durch das Service-Labor gereinigt, um eine monospezifische IgG-Fraktion zu isolieren, die im Sandwich-ELISA als sekundärer Antikörper verwendet wurde. Zu diesem Zweck wurde der pAK-OC1-9 sowohl mit Streptavidin (pAK-OC1-9-STV) als auch mit HRP (pAK-OC1-9-HRP) konjugiert, unter Verwendung kommerzieller Kits nach den Anweisungen des Herstellers. Der Vorteil einer HRP-Markierung liegt dabei darin, dass ein weiterer Detektionsantikörper entfällt, da das Enzym direkt an den Antikörper gebunden vorliegt. Allerdings entfallen auch weitere Waschschritte, welche eventuell unspezifische Bindungen begünstigen könnten. Der Vorteil einer Antikörpermarkierung mit Streptavidin

### III. ERGEBNISSE

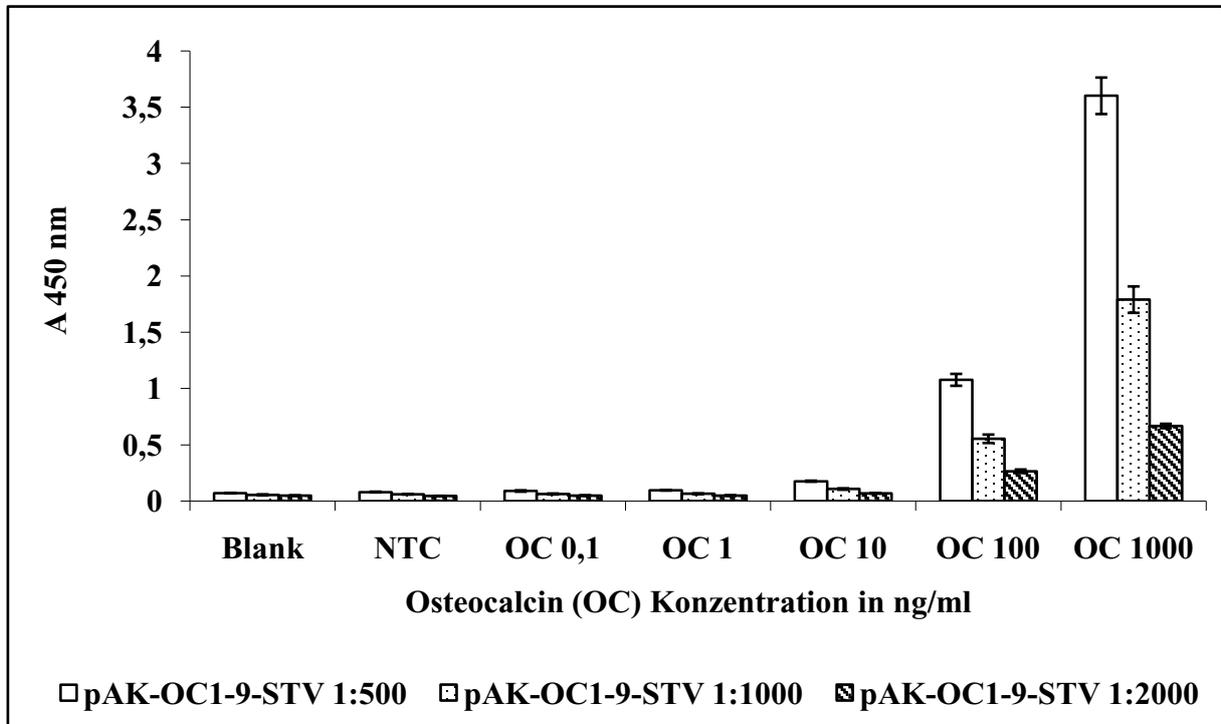
liegt darin, bei der Detektion mit HRP-markiertem Biotin eine Signalverstärkung zu erlangen, da Streptavidin über vier Bindungsstellen für Biotin verfügt. Ebenfalls könnten die zusätzlichen Waschschrte zu weniger unspezifischen Bindungen führen.

Um sowohl die optimalen Konzentrationen der Antikörperpaare, die Inkubationszeiten und -temperaturen, sowie die geeignetere Markierung des sekundären AK zu ermitteln, wurden Grid-Experimente durchgeführt (Abb. 15 -17).

pAK-OC-1-9	1:500				1:1000				1:2000			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OC 4-30	1 µg/ml				1 µg/ml				1 µg/ml			
A	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
B	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
C	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1*
D	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*
E	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*	10*
F	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*	100*
G	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*

Detektion: Biotin-HRP (1:10000)

**Abb. 15: Darstellung eines Kreuzungsschemas (Grid-Experiment) zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentrationen. \*= Osteocalcinkonzentration in ng/ml.**



**Abb. 16: Sandwich-ELISA zur Ermittlung der optimalen Konzentration des streptavidinierten pAK-OC1-9. Der mAK OC4-30 (Takara) fungiert als Fänger-, der pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Die Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Fänger-Antikörper; NTC= PBS anstatt Osteocalcin.**

Wie in Abb. 17 sichtbar, resultierte die Markierung des pAK-OC1-9 mit HRP, wie vermutet, in höheren Hintergrundsignalen. Für die weitere Entwicklung und Validierung wurde daher der streptavidinierte pAK-OC1-9 favorisiert.

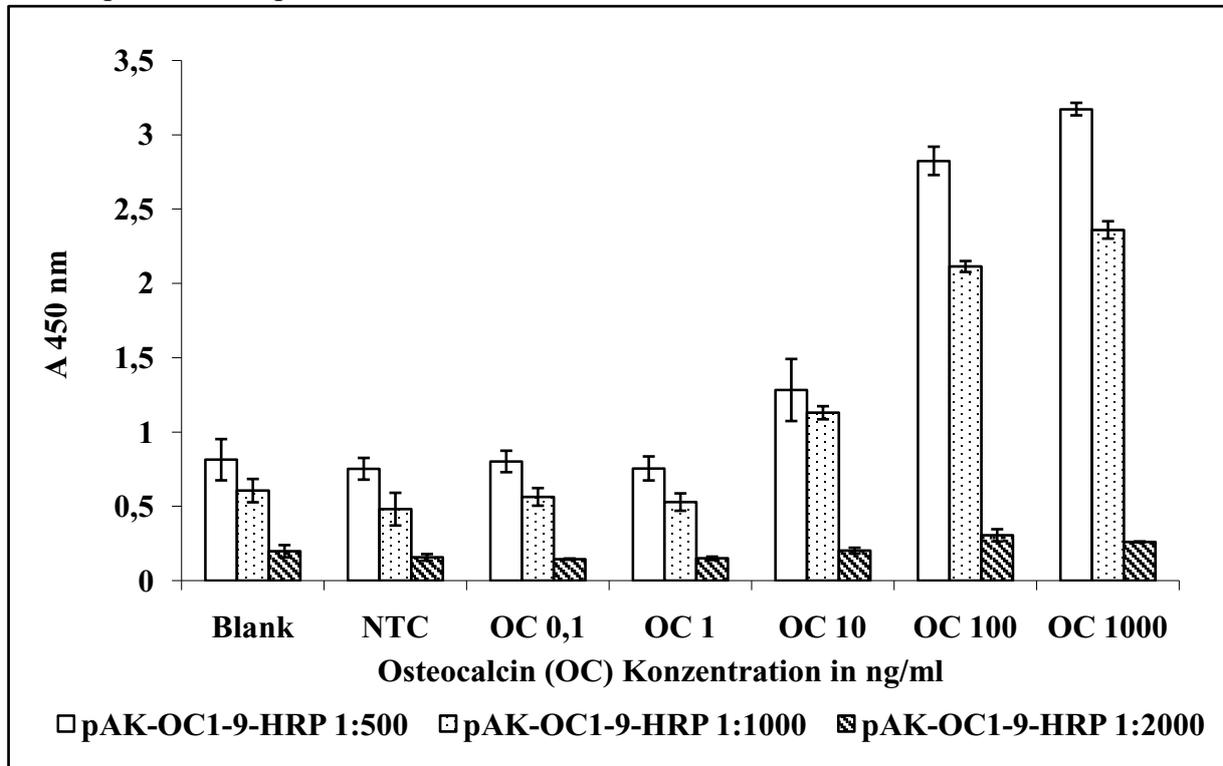


Abb. 17: Sandwich-ELISA zur Ermittlung der optimalen Konzentration des mit HRP markierten pAK-OC1-9 zum Nachweis bovinen Osteocalcins. Der mAK OC4-30 (Takara) fungiert als Fänger-, der pAK-OC1-9-HRP als Detektions-Antikörper. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Die Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Fänger-Antikörper; NTC= PBS anstatt Osteocalcin.

### 2.5. Arbeitsprotokoll des Sandwich-ELISA für den Osteocalcinnachweis

Die Konzentrationen des Fänger-, sekundären und Detektions-Antikörpers sowie die Inkubationszeiten und -Temperaturen wurden in Grid-Experimenten optimiert. Das endgültige Protokoll wurde wie folgt durchgeführt: Waschschrte wurden in der Regel viermal mit 380 µl PBS-Tween 20 unter Verwendung eines automatischen ELISA Washers durchgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden in einem Volumen von 100µl / Well durchgeführt. 1 µg / ml des Fänger-Antikörpers (OC4-30) wurde auf einer Mikrotiterplatte für 48 h bei 4 °C gebunden. Die Platte wurde gewaschen und dann durch Zugabe von 200 µl / Well Block-Lösung mit 1,5 % Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA) in 10 mM PBS (pH 7,4) über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Platte wurde gewaschen und mit Standard-Verdünnungen in PBS (1, 10, 100 und 1000 ng / ml Osteocalcin) oder unverdünnten Probenextrakten (Tab. 4) für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und mit dem Detektions-Antikörper (pAK OC1-9-STV, 1:500 in PBS) für 2 h bei RT inkubiert, dann gewaschen und 1 h bei RT mit biotinyliertem HRP (1:10.000 in PBS) inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und der Assay, mit einer chromogenen Lösung wie

folgt hergestellt, entwickelt: 15 ml Citratpuffer und 4,95 µl frisch zugesetztes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt mit 750 µl fertigem TMB-Reagenz (0,13 g TMB gelöst in 2,5 ml Aceton und auf 25 ml mit Methanol aufgefüllt). Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Well gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 450 nm gegen Luft in einem Mikroplattenreader bestimmt. Alle Proben und Standards wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Die statistische Relevanz zwischen zwei Datensätzen wurde mittels zwei-seitigem ungepaarten Student's t-Test berechnet.

### ***Extraktionsmethoden***

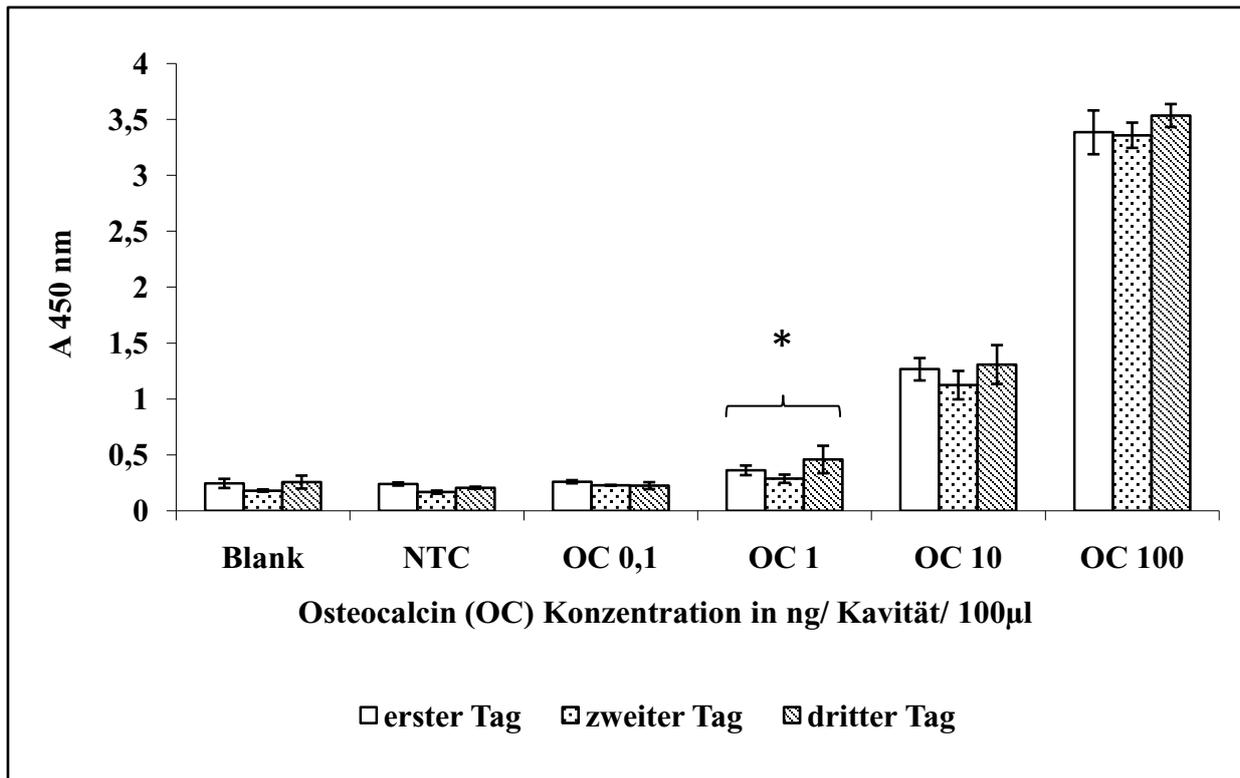
Anhand des beschriebenen Arbeitsprotokolls wurden verschiedene Extraktionsmethoden für BFKM verifiziert. Dabei lieferten sowohl die EDTA- als auch die BaCl<sub>2</sub>-Extraktionsmethode gleich gute Ergebnisse, die den anderen beiden Methoden überlegen waren. Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit wurde die EDTA-Extraktionsmethode für die Validierung des entwickelten Sandwich-ELISA ausgewählt.

**Tab. 4: Proteinkonzentration der EDTA-Extrakte.**

Probe	Proteinkonzentration der unverdünnt eingesetzten Extrakte je Well [mg]
BFKM 145 °C	0,278
BFKM 133 °C	0,283
BFKM Hundefutter	0,124
pflanzl. Futter 0,1 % BFKM	0,094
pflanzl. Futter 0 % BFKM	0,068
Fischmehl	0,193
Schweine-FKM	0,124
Schaf-FKM	0,182
Geflügelmehl	0,098
Rinderknochen	0,055
Schafknochen	0,163
Ziegenknochen	0,267
Schweineknochen	0,242
Hühnerknochen	0,182
Kaninchenknochen	0,117
Pferdeknochen	0,075
Pferdeserum	0,878
Hühnerei	0,406
Vollmilchpulver	0,231

### **2.6. Eignung des Sandwich-ELISA für die Osteocalcindetektion**

Um die generelle Eignung des Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins in Futtermitteln zu verifizieren, wurde zunächst die Sensitivität und die Intra- und Inter-Assay-Variabilität des ELISA mit Standard-Verdünnungen bovinen Osteocalcins in dreifacher Ausführung an drei verschiedenen Tagen (Abb. 18) validiert.



Standard	erster Tag		zweiter Tag		dritter Tag		Intraassay Variation CV (%)			Interassay Variation CV (%)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	erster Tag	zweiter Tag	dritter Tag	
Blank	0,246	0,041	0,182	0,01	0,258	0,058	16,6	5,5	22,6	17,9
NTC	0,241	0,014	0,168	0,014	0,207	0,01	5,6	8,5	4,6	17,8
OC 0,1 ng	0,261	0,014	0,229	0,004	0,226	0,031	5,4	1,5	13,7	8,1
OC 1 ng	0,363	0,043	0,288	0,037	0,46	0,123	11,8	12,9	26,8	23,3
OC 10 ng	1,267	0,1	1,125	0,127	1,309	0,174	7,9	11,3	13,3	7,8
OC 100 ng	3,386	0,196	3,36	0,113	3,536	0,103	5,8	3,4	2,9	2,8

Abb. 18: Osteocalcin-spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Empfindlichkeit mit gereinigtem bovinen Osteocalcin. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Die Messungen wurden jeweils in dreifacher Ausführung an drei verschiedenen Tagen erhoben. Blank = PBS anstelle des Fänger-Antikörpers; NTC = PBS anstelle der Probe; \* signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) gegen NTC und Blank.

### 2.6.1. Sensitivität

Bei diesem Validierungsexperiment konnten sowohl für die NTC (PBS anstelle der Probe) als auch für die Blank-Kontrolle (PBS anstelle des Fänger-AK) durchschnittliche Hintergrundsignale charakterisiert werden, welche im Bereich von  $A_{450 \text{ nm}}$  0,170 bis  $A_{450 \text{ nm}}$  0,260 lagen (Abb. 18). Ein signifikantes Signal über der NTC und dem Blank wurde, mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  im zweiseitigen Student's t-Test, ab einer OC-Menge von 1 ng pro Well erhalten. Die Empfindlichkeit des Assays liegt somit bei 1 ng OC.

### 2.6.2. Intra- und Inter-Assay-Variabilität

Die Intra- und Inter-Assay-Variabilität des ELISA wurde mit Standard-Verdünnungen bovinen Osteocalcins an drei verschiedenen Tagen jeweils in dreifacher Ausführung validiert (Abb. 18). Mit zunehmender Signalstärke ist gleichzeitig ein Anstieg der Standardabweichung detektierbar. Die berechneten Inter-Assay-Variationskoeffizienten lagen bei 2,8 bis 23,3% und wurden als zufriedenstellend für alle Konzentration und weitere Untersuchung bewertet.

### 2.6.3. Spezifität

Nachdem der Assay in Bezug auf die Sensitivität und Variabilität als zufriedenstellend befunden wurde, sollte die Spezifität für bovines OC in Futtermitteln verifiziert werden. EDTA-Extrakte nativer Knochen der wichtigsten Nutztiere sowie Ei- und Milcheiweiß und ein pflanzliches FM wurden gemessen, um die Spezifität des Assays zu beurteilen. Alle EDTA-Extrakte wurden unverdünnt im ELISA verwendet, um auch stark verarbeitete Materialien mit geringem FKM-Gehalt zu erfassen. Die Proteinkonzentrationen der Extrakte lagen in der Regel zwischen 0,6 - 2,8 mg / ml (Tab. 4). Der EDTA-Extrakt mit dem höchsten Proteingehalt wurde aus Ei-Pulver mit etwa 4 mg / ml gewonnen. Die Nachweisgrenze (LOD) wurde als Mittelwert der Absorption  $A_{450\text{ nm}}$  plus dreifache Standardabweichung von 13 verschiedenen negativen Proben (gemessen in dreifacher Ausführung) berechnet. Diese Proben beinhalteten sowohl typische Futtermischungen (pflanzliches FM, Vollmilchpulver, Hühnerei) als auch mögliche Kontaminanten mit anderen Spezies als Rind (Fischmehl, Geflügelmehl, Schaf-FKM, Schafknochen, Schweine-FKM, Schweineknochen, Hühnerknochen, Ziegenknochen, Kaninchenknochen) und die NTC. Pferd wurde aus der Berechnung aufgrund der 100 %igen Aminosäure-Identität mit bovinem OC ausgeschlossen und konnte daher nicht als eine negative Probe berücksichtigt werden. In allen folgenden Versuchen stellt das LOD den Ausgangswert dar, um richtig positive von negativen Ergebnissen zu diskriminieren.

Die Ergebnisse der Spezifitäts-Tests sind in Abb. 19 zusammengefasst. Die stärksten ELISA-Signale ( $A_{450\text{ nm}} > 3$ ) wurden für Rinder- und Pferdeknochenextrakte detektiert. Absolute Proteinmengen von 55 bis 75  $\mu\text{g}$  / Reaktion waren für diese Proben ausreichend, um starke ELISA-Signale zu ergeben, welche schnell außerhalb der oberen Detektionsgrenze lagen, wenn mit höheren Eingangsmengen gearbeitet wurde. Mit 100 % nativem Schweineknochenextrakt wurden schwächere, aber signifikante ELISA-Signale gemessen, welche auf eine offensichtliche Kreuzreaktion hindeuten. Darüber hinaus wurde auch für 100 % native Schafknochenextrakte eine schwache Kreuzreaktion festgestellt. Knochenextrakte von Huhn, Ziege oder Kaninchen sowie EDTA-extrahierbare Proteine aus Hühnerei, Vollmilchpulver oder pflanzlichem FM lieferten alle negative Ergebnisse unter dem LOD. EDTA-Extrakte aus Gänse- oder Lachsknochen, Federmehl, sowie Roggen, Mais und Sojabohnen wurden ebenfalls als negativ getestet.

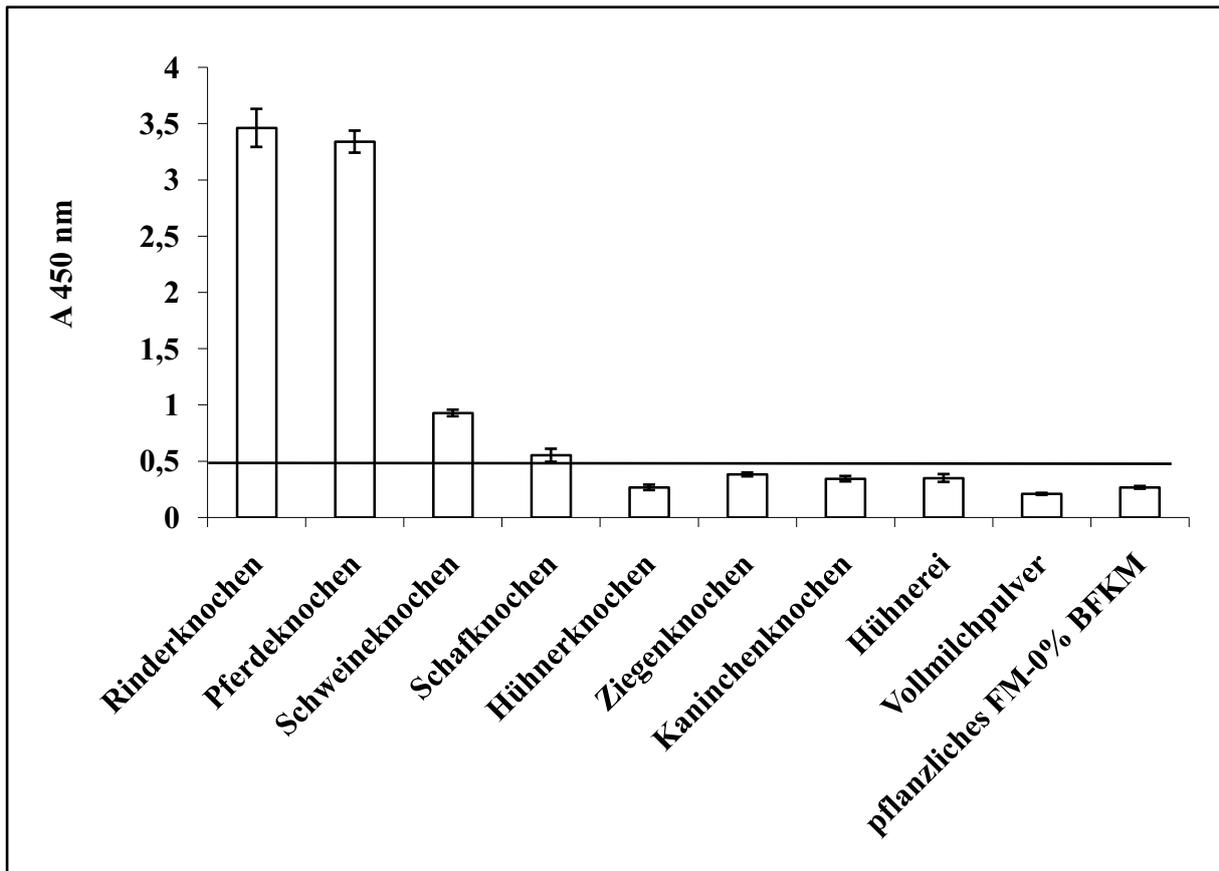


Abb. 19: Osteocalcin-spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Spezifität mit EDTA-Extrakten aus nativen Knochen und Futtermittelkomponenten. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Unverdünte EDTA-Extrakte wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Horizontale Linie = LOD = Mittelwert + 3x SD von 13 negativen Proben wie im Abschnitt 2.6.3. erläutert.

#### 2.6.4. Anwendbarkeit mit realen FKM

Im nächsten Schritt wurde die Kapazität des Immunoassays im Hinblick auf die Detektion von OC in wärmebehandelten FKM-Extrakten untersucht, um die Anwendbarkeit des ELISA für echte Proben zu testen. Da kein Pferde-FKM verfügbar war, wurde Pferdeserum als eine beispielhafte Matrix, welche nur Spuren von Osteocalcin enthält, verwendet. Die Gesamtproteinmenge aller getesteten unverdünnten FKM-Extrakte pro Well lagen in einer vergleichbaren Größenordnung zwischen ca. 100 µg (Geflügel-FKM) - 280 µg (BFKM). Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt. Alle BFKM-Proben zeigten eine ausgeprägte Immunantwort, auch wenn das Material bis zu 145 °C erhitzt wurde, während Fisch-, Geflügel- und Schafmehl ein negatives Testresultat ergaben. Aus diesem Grund wird die Kreuzreaktion mit nativen Schafknochen als vernachlässigbar beurteilt. Eine positive Reaktion wurde nur für unverdünntes Pferdeserum und, im Gegensatz zu Schafmehl, für Schweinemehlextrakt nachgewiesen. Obwohl die Immunantwort gegen Schweine-FKM im Vergleich mit BFKM eher schwach war, überschritten die erhaltenen Schweine-FKM-Signal die LOD.

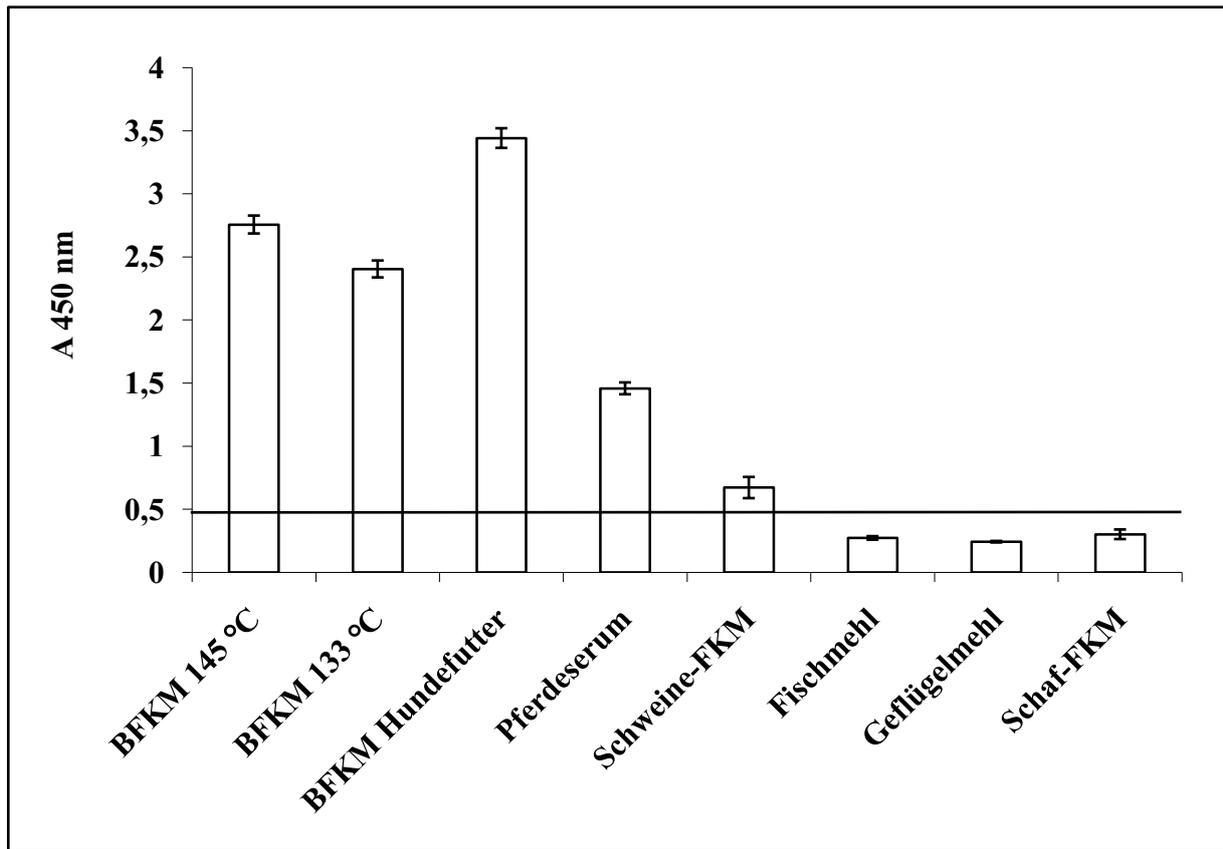


Abb. 20: Osteocalcin spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Leistungsmerkmale der Methode mit Fleisch- und Knochenmehl-Extrakten (FKM). Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Unverdünnte EDTA-Extrakte wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Horizontale Linie = LOD = Mittelwert + 3x SD von 13 negativen Proben wie im Abschnitt 2.6.3. erläutert.

### 2.6.5. Selektivität

Die Selektivität des Tests wurde mit Extrakten aus einem pflanzlichen FM, welches mit 0,1 % BFKM versetzt war, im Vergleich zu dem nativen pflanzlichen FM evaluiert. Darüber hinaus wurden Verdünnungen von 0,1 % BFKM in Fischmehl-Extrakten hergestellt, da kein validiertes homogenes Material zur Verfügung stand. Der Assay detektiert 0,1 % BFKM in pflanzlichem FM oder Fischmehl, wobei sowohl das native pflanzliche FM als auch das Fischmehl in negativen Signalen resultieren (Abb. 21). Die quantitative Menge von Osteocalcin in pflanzlichen FM mit 0,1 % BFKM entspricht ca. 6,7 ng, berechnet in Bezug auf die Standardkurve.

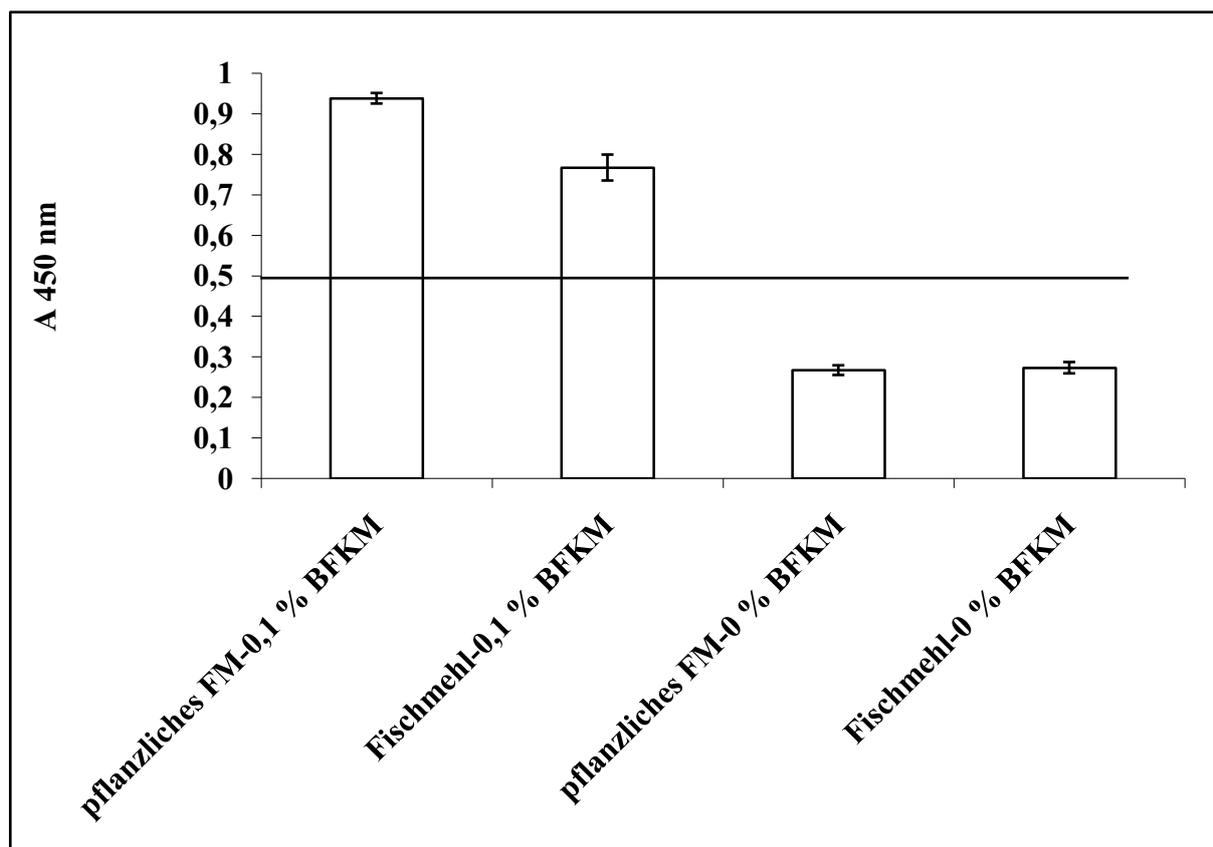


Abb. 21: Osteocalcin spezifischer Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Selektivität in Mischungen mit 0,1 % bovinem FKM (BFKM). Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Unverdünnte EDTA-Extrakte wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Horizontale Linie = LOD = Mittelwert + 3x SD von 13 negative Proben wie im Abschnitt 2.6.3. erläutert.

Aufgrund der beobachteten Kreuzreaktion des ELISA mit Schweinemehl wurde ein separates Selektivitätsexperiment durchgeführt. 0,1 %, 1 % und 10 % BFKM-Extrakt in Schweinemehl-Extrakten wurden an drei Tagen gemessen (Tab. 5). Eine signifikant positive Reaktion war für 10 % BFKM in Schweinemehl messbar, nicht aber für die mit 1 % dotierte Probe. Die Absorption, die bei 100 % Schweinemehl-Extrakt gemessen wurde, überschreitet nicht die Werte die für 10 ng bovines OC pro Well detektiert wurden.

Tab. 5: Selektivität im Osteocalcin-spezifischen Sandwich-ELISA mit mAK OC4-30 (Takara) als Fänger- und pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper, für BFKM-Hintergrund unterschiedlicher Konzentrationen in Schweinemehl in drei unabhängigen Messungen.

Extrakt	erster Tag	zweiter Tag	dritter Tag	MW	SD
BFKM	3,469	3,352	3,501	3,441	0,078
Schweinemehl	0,677	0,753	0,586	0,672	0,084
10% BFKM in Schweinemehl	0,887	1,116	1,232	1,078	0,176
1% BFKM in Schweinemehl	0,525	0,561	0,595	0,560	0,035
0,1% BFKM in Schweinemehl	0,476	0,524	0,514	0,505	0,025

### 3. Entwicklung einer RT-iPCR für den Nachweis bovinen Osteocalcins

Das Prinzip der Protein-Detektion mittels RT-iPCR beinhaltet neben dem immunologischen Nachweis eines gesuchten Antigens Reaktionsschritte für eine Signal-Amplifikation mittels einer RT-PCR. Dieses Prinzip der RT-iPCR sollte für die vorliegende Arbeit für den Nachweis von Osteocalcin angewandt werden. Dabei sollte insbesondere verifiziert werden, ob eine Sensitivitätssteigerung im Vergleich zu dem entwickelten ELISA möglich ist. Als Basis für die zu entwickelnde RT-iPCR sollte das ELISA-System genutzt werden, wofür ein Detektions-AK generiert wurde, welcher spezifisch gegen bovines Osteocalcin gerichtet ist und mit Streptavidin markiert wurde. Für die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung sollte eine Ziel-DNA generiert werden, welche an das Streptavidinmolekül des Detektions-AK binden konnte. Dafür wurde eine chimäre biotinylierte DNA aus einem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vector-Plasmid mit integriertem Mandelgen (Amandin Gen) mittels Endpunkt-PCR gewonnen und zwei zugehörige real-time PCR-Systeme, basierend auf SYBR<sup>®</sup>Green und TaqMan<sup>®</sup>-Sonde entwickelt. Für die Durchführung der RT-iPCR wurden Mikrotiter-Streifen (NukleoLink<sup>™</sup>Strips) gewählt, welche sowohl für eine Immobilisierung der AK geeignet, als auch RT-PCR-kompatibel waren.

#### 3.1. Funktionsprinzip der RT-iPCR für die Osteocalcin-Detektion

Die Immuno-PCR (iPCR) ist eine Methode aus dem Bereich der Proteinanalytik und wurde 1992 von Sano *et al.* entwickelt. Dabei wird die immunologische Detektion eines Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) mit dem exponentiellen Amplifikationsvermögen und der Sensitivität der PCR kombiniert, was eine 100 bis 10000fach höhere Sensitivität der Protein-Detektion im Vergleich zum ELISA erlaubt (Niemeyer *et al.* 2005; Barletta 2006). Der grundsätzliche Aufbau der iPCR gleicht dem eines ELISA, jedoch erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Bindung nicht durch eine Enzym-vermittelte Substrat-Umsetzung, sondern durch eine PCR-Reaktion, bei der eine Ziel-DNA vervielfältigt und quantifiziert wird. In Abb. 6 wird das Funktionsprinzip des entwickelten ELISA mit dem der real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) schematisch verglichen.

Als Grundlage der RT-iPCR für den Osteocalcinnachweis dient der im vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit entwickelte Sandwich-ELISA, wobei ein spezifisch gegen Osteocalcin gerichteter Fänger-Antikörper (OC4-30) auf Protein-bindungsfähige und PCR-geeignete Mikrotiterstreifen immobilisiert wird. Anschließend werden eventuell frei gebliebene Bindungsstellen geblockt und die zu untersuchende Probe inkubiert. Hiernach bindet der Detektions-Antikörper spezifisch das ihm präsentierte Epitop. Für die darauffolgende AK-DNA-Bindung wurde in dieser Arbeit eine Strategie gewählt, bei der der Detektions-AK direkt mit STV markiert wurde. Da STV ein tetrameres Protein ist, welches über vier Bindungsstellen für Biotin verfügt (Niemeyer & Blohm 1996; Kuczius *et al.* 2009), konnte eine biotinylierte Ziel-DNA generiert werden, die direkt, ohne die Notwendigkeit

eines weiteren Kopplungsmoleküls, an den AK bindet. Im Anschluss an die AK-DNA-Bindung wird, nach gründlichem Waschen um unspezifische Bindungen zu entfernen, die gebundene Ziel-DNA mittels RT-PCR amplifiziert und so die immunologische Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht.

#### **3.2. Arbeitsbeschreibung der RT-iPCR für die Osteocalcin-Detektion**

Die mit dem Fänger-AK beschichteten, geblockten Platten wurden mit einem OC-Standard bzw. der zu untersuchenden Probe inkubiert, anschließend wurde der streptavidinierte Detektions-AK zugegeben und zuletzt mittels biotinylierter Ziel-DNA die AG-AK-Bindung detektiert. Zwischen allen genannten Inkubationsschritten erfolgten jeweils 4 Waschschrte, um unspezifische Bindungen zu minimieren bzw. ungebundene Reagenzien zu entfernen. Bei allen Versuchen wurden zusätzliche Blank- (PBS anstatt Fänger-AK) als auch NTC- (PBS anstatt Probe) Kontrollen mitgeführt. Alle Proben und Kontrollen wurden in dreifacher Ausführung bestimmt. Bevor in jede Vertiefung 20 µl des vorbereiteten Mastermixes gegeben wurden, erfolgten 10 Waschschrte, um unspezifisch gebundene Ziel-DNA-Moleküle zu entfernen. Alle RT-iPCR-Analysen wurden mit dem real-time PCR-Gerät Mx3005P (Stratagene) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tab. 3 aufgeführt. Nach der Zugabe des Mastermixes wurden die Platten mit einer für die Real-Time PCR geeigneten Klebefolie verschlossen und anschließend eine real-time PCR-Analyse durchgeführt. Nach jedem RT-iPCR-Lauf wurden die Daten mit der Gerätesoftware analysiert. Der Threshold wurde auf 100 festgelegt, um einen direkten Vergleich der absoluten Ct-Werte aus verschiedenen Versuchen zu ermöglichen.

#### **3.3. Ziel-DNA**

Um die iPCR realisieren zu können, musste eine Ziel-DNA generiert werden, über die später die Antigen-Antikörper-Bindung visualisiert werden konnte. Dabei war es von besonderer Relevanz, dass es sich dabei um eine künstliche DNA handelt, um eventuell falsch positive Ergebnisse bei der Überprüfung von Futtermitteln zu verhindern. Aus diesem Grund wurde ein chimäres 202 Basenpaar (bp) langes DNA-Fragment aus einem pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-Vector-Plasmid mit integriertem Mandelgen (Amandin Gen) mittels Endpunkt-PCR gewonnen. Dabei wurde ein mit Biotin markierter Forward-Primer eingesetzt, wodurch eine künstliche biotinylierte chimäre DNA generiert werden konnte, welche sowohl über Plasmid- als auch Mandel-DNA-Informationen verfügt und somit einzigartig ist.

Um die Ziel-DNA detektieren zu können, wurde ein weiteres Primerpaar sowie eine TaqMan-Sonde entwickelt, welche innerhalb der Ziel-DNA binden und in der RT-PCR die Amplifizierung eines 86 bp langen Abschnittes der Ziel-DNA ermöglichen konnten.

### 3.3.1. Generierung der biotinylierten Ziel-DNA mittels Endpunkt-PCR

Für die verwendeten Primerpaare wurden die optimalen Annealing-Temperaturen in einem Bereich von 56 - 62 °C verifiziert. Für die Herstellung der Ziel-DNA wurden somit folgende Temperaturen verwendet:

1. Denaturierung: 95 °C
2. Annealing: 56 - 62 °C
3. Polymerisation (Elongation): 72 °C.

In einem Gradientencycler, welcher das programmierte Temperaturprogramm durchläuft, wurden diese Temperaturzyklen 40 mal wiederholt. Nach dem Ende der Reaktion erfolgte der Nachweis der amplifizierten DNA im Agarosegel mittels elektrophoretischer Auftrennung. Durch Mitführung eines Längenstandards während der Auftrennung konnte über die Größe des Amplifikates verifiziert werden, ob die gewünschte Zielsequenz amplifiziert werden konnte.

In Abb. 22 ist das Ergebnis der Gradienten-PCR für die Ziel-DNA dargestellt, wobei ersichtlich wird, dass alle Temperaturen zur Bildung eines Produktes mit der erwarteten Fragmentgröße von 202 bp führten.

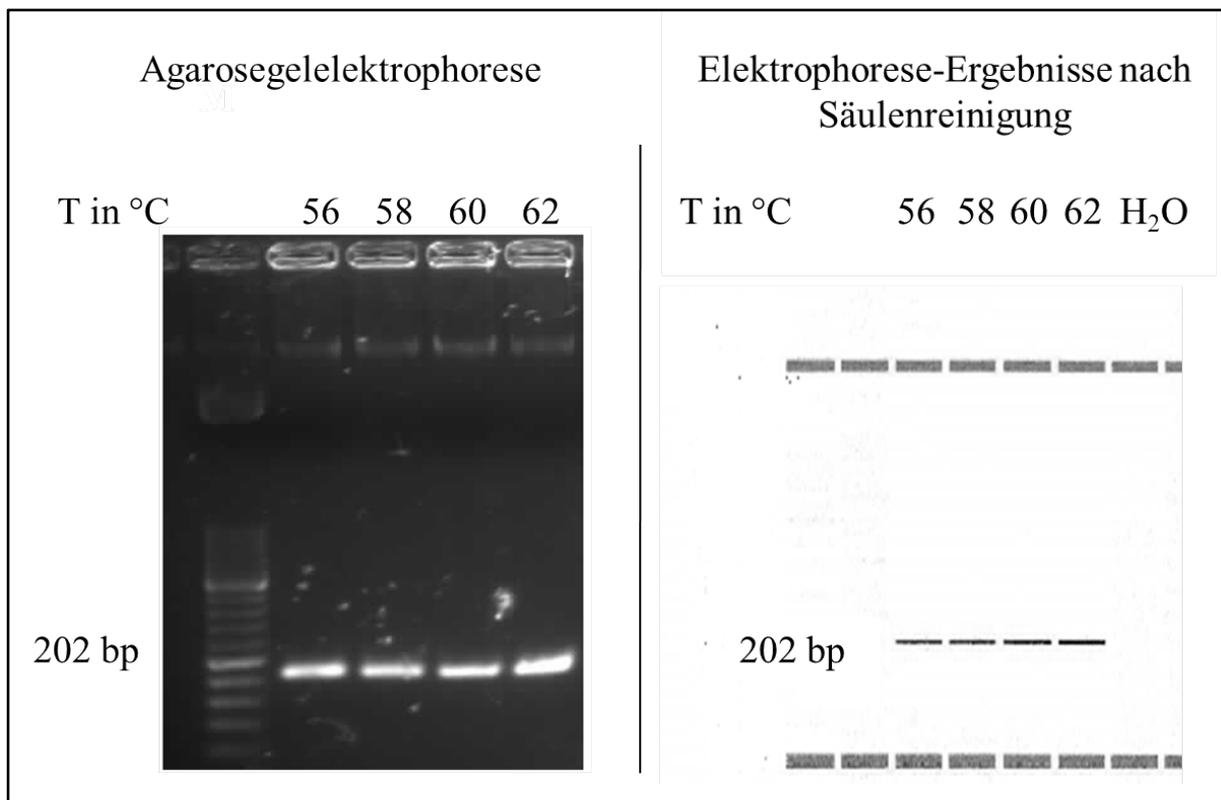


Abb. 22: Optimierung des PCR-Systems zum Nachweis der Ziel-DNA. Auftrennung der bei unterschiedlichen Anhealingtemperaturen amplifizierten PCR-Produkte in der Agarosegelelektrophorese (links) und nach der Säulenreinigung im Agilent 2100 Bioanalyzer (rechts). M= 50 bp Marker; T= Temperatur; bp= Basenpaare.

Die amplifizierte Ziel-DNA wurde mit MicroSpin™S-300HR Säulen aufgereinigt und anschließend mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer auf Vorhandensein überprüft (Abb. 22). Hiernach wurde die DNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie bestimmt. Die Konzentration der biotinylierten Ziel-DNA, welche bei einer Annealingtemperatur von 60 °C amplifiziert wurde, lag bei 14,1 ng/µl bei einem  $A_{260\text{ nm}} / A_{280\text{ nm}}$ -Wert von 1,9. Um wiederholte Gefrier- / Auftau-Zyklen zu vermeiden, wurde die biotinylierte Ziel-DNA aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

### **3.3.2. Detektion der biotinylierten Ziel-DNA**

Um das Vorhandensein der 202 bp großen Ziel-DNA und damit die Antigen-Antikörper-Bindung bei der zu entwickelnden RT-iPCR detektieren zu können, ist ein weiteres Primerpaar nötig, welches einen Abschnitt innerhalb der Ziel-DNA amplifiziert. Hierfür wurde abermals ein nested Primerpaar gewählt, wobei der Forward-Primer innerhalb des Mandel-Abschnittes und der Reverse-Primer an dem Plasmidanteil der Ziel-DNA bindet, wodurch ein 86 bp großer Abschnitt der Ziel-DNA vervielfältigt und diese somit detektiert werden kann. Um die generelle Eignung der Primer zu testen, wurde zunächst eine Endpunkt-PCR durchgeführt und anschließend das Ergebnis mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese verifiziert. Dabei war ein 86 bp großes Amplifikationsprodukt sichtbar, was dem gesuchten DNA-Abschnitt entsprach. Sowohl die Primer, als auch der nachzuweisende DNA-Abschnitt wurden als generell geeignet für den Einsatz in der real-time PCR bewertet.

### **3.3.3. Eignung der biotinylierten Ziel-DNA für die Protein-Analyse**

Die biotinylierte Ziel-DNA wurde vor ihrem Einsatz in der RT-iPCR auf ihre Eignung in der real-Time PCR überprüft. Dafür war es nötig sowohl das Detektionslimit (LOD), als auch die Effizienz des PCR-Systems zu validieren. Zwei Systeme sollten dabei untersucht werden: SYBR®Green und TaqMan®. Die dafür eingesetzten Mastermixe können der Tab. 3 entnommen werden.

#### ***Effizienzbestimmung der RT-PCR mit SYBR®Green und TaqMan-Sonde***

Um eine RT-iPCR zu realisieren, musste neben dem immunologischen Detektionssystem auch ein geeignetes RT-PCR-System entwickelt werden. Für diesen Zweck wurde ein chimäres 202 bp langes biotinyliertes DNA-Fragment generiert, welches durch die Amplifikation eines 86 bp langen Abschnittes in der RT-PCR nachgewiesen werden sollte. Als Detektionsmethode wurden sowohl SYBR®Green als auch TaqMan-Sonden verifiziert, und die Effizienz beider Systeme in der RT-PCR bestimmt. Die Effizienz wurde bestimmt, um die theoretisch zu erwartende Verdopplung der PCR-Amplifikate je Zyklus zu charakterisieren. Dazu musste die eingesetzte Genom-Kopienzahl der Ziel-DNA berechnet werden. Dabei wurden für die Größe des chimären Genoms 202 bp angenommen. Mit diesem

Wert konnte berechnet werden, dass  $4,517 \cdot 10^9$  Moleküle je ng vorhanden waren. Da in der RT-PCR jeweils 5  $\mu\text{l}$  DNA eingesetzt wurden, musste spektrophotometrisch ermittelt werden, wie viel DNA in 1  $\mu\text{l}$  enthalten war. Der ermittelte Wert lag bei 14,1 ng/ $\mu\text{l}$ . Anhand dieser Werte konnte die Kopienzahl/ $\mu\text{l}$  berechnet und durch Verdünnung auf die gewünschte Menge gebracht werden. Für die Bestimmung der Effizienz wurde das nachzuweisende DNA-Molekül in einem Konzentrationsbereich von  $10^8$  - 0 Genomkopien logarithmisch verdünnt, in die RT-PCR jeweils in Dreifachbestimmung eingesetzt und jeweils mit SYBR<sup>®</sup>Green oder einer spezifischen TaqMan-Sonde fluorometrisch detektiert (Abb. 23).

Zusätzlich wurden die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt, um zu überprüfen, ob es sich um das gewünschte Zielprodukt handelt. Anschließend wurden die PCR-Effizienzen berechnet, indem die Mittelwerte der Ct-Werte gegen den Logarithmus der Genomkopien aufgetragen und eine Regression durchgeführt wurde. Anhand der Steigung der Regressionsgeraden konnte dann die Effizienz durch Einsetzung in die Formel  $E = 10^{-1/\text{Steigung}} - 1$  errechnet werden (Vaerman *et al.* 2004). Für die Effizienzbestimmung ergaben sich folgende Gleichungen:

$$\text{SYBR}^{\text{®}}\text{Green:} \quad y = -3,2829x + 32,316$$

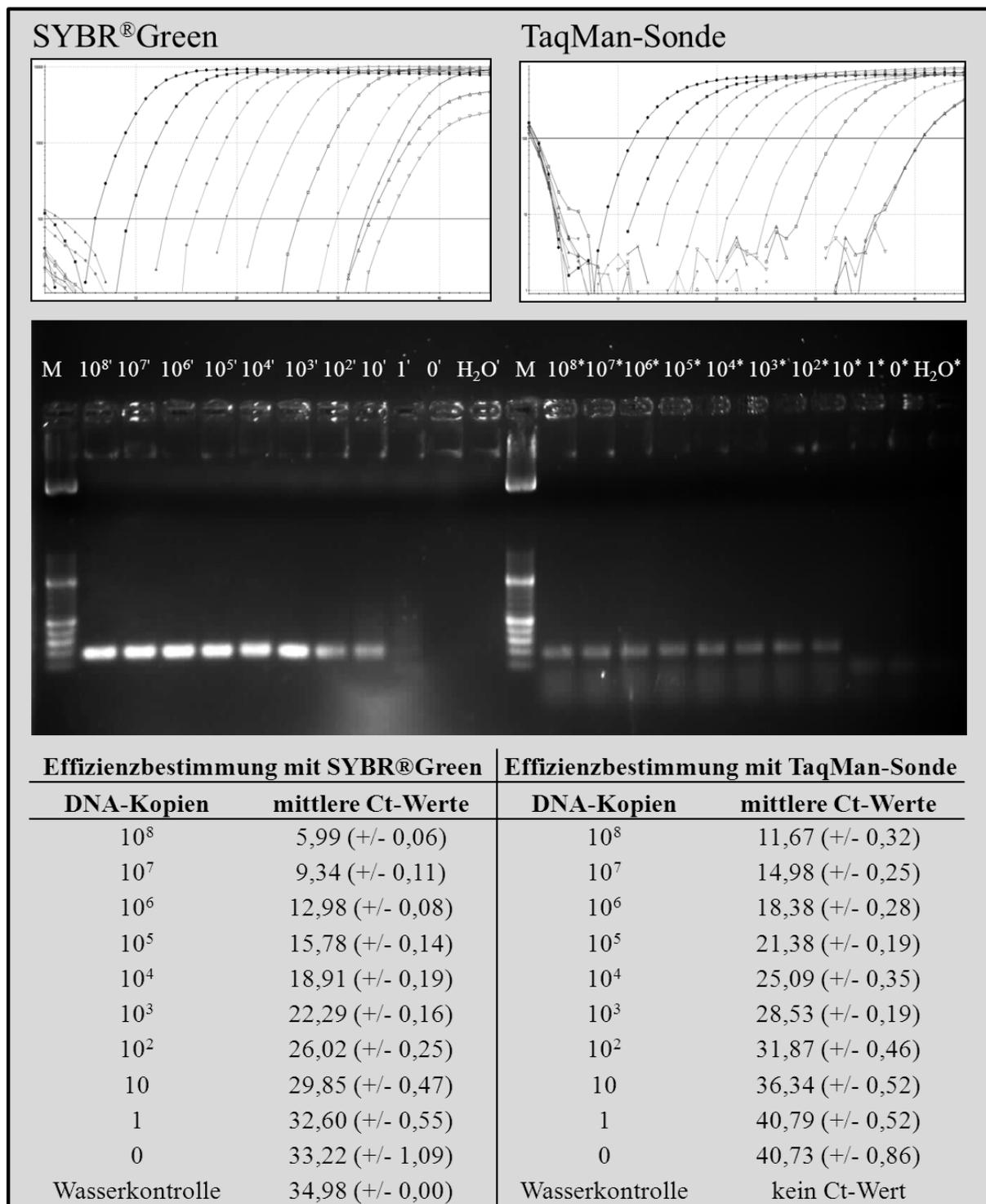
$$\text{TaqMan-Sonde:} \quad y = -3,3718x + 38,559.$$

Die errechneten Effizienzen lagen für SYBR<sup>®</sup>Green bei 102 % und bei der TaqMan-Sonde bei 98 % und somit in dem empfohlenen Effizienzbereich. Die Regressionskoeffizienten von 0,9989 (SYBR<sup>®</sup>Green) bzw. 0,9996 (TaqMan-Sonde) weisen auf eine sehr gute Linearität der Ct-Werte innerhalb der einbezogenen Quantifizierungsbereiche.

#### **LOD**

Das LOD gibt Auskunft über die Sensitivität des Systems, auch geringste Spuren noch zu detektieren. Statistisch waren 1 bzw. 10 DNA-Moleküle bei Reaktionsbeginn ausreichend um innerhalb von 45 Zyklen eine detektierbare Fluoreszenz zu erzeugen, welche sich vom Hintergrundrauschen absetzt.

Anhand der erhobenen Daten schien die Ziel-DNA sowohl in Verbindung mit SYBR<sup>®</sup>Green als auch mit der TaqMan-Sonde für einen Einsatz in der RT-iPCR geeignet zu sein.



**Abb. 23:** Effizienzbestimmung des RT-PCR Systems zum Nachweis der Ziel-DNA mit SYBR®Green und TaqMan-Sonde. 10<sup>8</sup> - 0 Genomkopien der Ziel-DNA wurden logarithmisch verdünnt und jede Verdünnung in die real-time PCR eingesetzt. Die Amplifikationsprodukte wurden zusätzlich gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Wie erwartet konnte im Agarosegel ein 86 bp großes Amplifikationsprodukt bei dem Einsatz unterschiedlicher DNA-Kopien identifiziert werden. Sowohl beim Einsatz einer TaqMan-Sonde (E= 98%) als auch von SYBR®Green (E= 102%) lagen die Effizienzen im akzeptablen Bereich. E= errechnete Effizienz; M= 50 bp Marker; ' = Amplifikationsprodukt mit SYBR®Green; \* = Amplifikationsprodukt mit TaqMan-Sonde.

### 3.4. Arbeitsbeschreibung und Arbeitsprotokoll der entwickelten RT-iPCR

Für die Detektion von Osteocalcin mittels RT-iPCR musste der Fänger-AK OC4-30 auf proteinbindungsfähigen und real-time-PCR-geeigneten Mikrotiterstreifen (NukleoLink<sup>TM</sup>-Strips) immobilisiert werden. Anschließend konnten die Proben bzw. der Standard (OC) zu der beschichteten Oberfläche gegeben werden und dort, bei Vorhandensein von Osteocalcin, eine Bindung eingehen. Durch Zugabe des streptavidinierten Detektions-AK erfolgte eine Bindung an das präsentierte Epitop. Anschließend wurde die Antigen-Antikörper-Bindung durch die Zugabe der biotinylierten Ziel-DNA, welche an Streptavidin bindet und mittels RT-PCR detektiert wurde, und somit das Vorhandensein bovinen Osteocalcins sichtbar gemacht. Das Prinzip des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Verfahrens für die RT-iPCR ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

Um ein Arbeitsprotokoll zu entwickeln, wurden verschiedene Optimierungsschritte in Bezug auf DNA-Konzentration, Inkubationszeit, Blocken und Waschen durchgeführt. Dabei wurde der Grundaufbau des entwickelten Sandwich-ELISA mit seinen Reaktionsschritten übernommen. Die Herausforderung lag insbesondere darin, ein geeignetes Verhältnis von Detektions-AK zu Ziel-DNA zu finden, da beispielsweise eine zu hohe DNA-Konzentration zu einer Erhöhung der Hintergrundsignale führt. Ebenfalls wurde überprüft, ob die Inkubation eines AK-DNA-Detektionskonjugates, welcher aus dem streptavidinierten AK und biotinylierter DNA durch Selbstanordnung (*self-assembly*) modifiziert nach Niemeyer *et al.* (1999) hergestellt wurde, oder nacheinander folgende Inkubationsschritte des Detektions-AK und der Ziel-DNA vorteilhafter wären. Hierbei wurden für die separate Inkubation die besseren Ergebnisse erzielt, was sicherlich durch die vermehrten Waschschriffe bedingt ist.

Da die Empfindlichkeit der RT-iPCR durch Hintergrundsignale begrenzt wird, die durch unspezifische Adsorption von Assay-Reagenzien hervorgerufen werden, ist es wichtig, diese Adsorption durch das Blockieren der Oberfläche nach der Immobilisierung des Fänger-AK zu verringern. Lind und Kubista testeten verschiedene Blockierungsmittel einschließlich BSA, Milchpulver, Heringsperma-DNA und Detergenzien wie Tween 20 und fanden eine Kombination von 0,5 bis 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 am besten (Lind & Kubista 2005).

Darauf aufbauend wurden auch in der vorliegenden Arbeit Blockierungsschritte mit PBS einschließlich 1,5 % BSA eingebaut. Auch wurden Blockierungsschritte mit Heringsperma-DNA getestet, die allerdings, übereinstimmend zu den Ausführungen von Lind und Kubista, nicht zu besseren Ergebnissen führten.

Um die resultierenden Ergebnisse auswerten zu können, wurden RT-iPCR Standardkurven aus einer OC-Verdünnungsreihe gebildet. Die Threshold cycle (Ct)-Werte wurden durch Einstellen eines Fluoreszenz-Schwellenwerts in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurven bestimmt, bei der die Amplifikationskurve den Schwellenwert kreuzt. Neben den Standard-Proben wurden Hintergrundkontrollen (NTC) durchgeführt, die alle Komponenten mit Ausnahme von OC enthielten. Das Signal von der NTC ist auf unspezifische Bindung von

Assay-Komponenten (insbesondere der biotinylierten DNA und des Detektions-Antikörpers an das Reaktionsgefäß) zurückzuführen. Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung bestimmt.

#### ***Arbeitsprotokoll***

Waschschritte wurden in der Regel viermal mit 380 µl PBS-Tween 20 (pH 7,4) unter Verwendung eines automatischen ELISA Washers durchgeführt. Alle Inkubationsschritte wurden in einem Volumen von 50µl / Well durchgeführt. 1 µg / ml des Fänger-Antikörpers (OC4-30) wurde auf einer Mikrotiterplatte (NukleoLink<sup>TM</sup>Strips) für 48 h bei 4 °C gebunden. Die Platte wurde gewaschen und dann durch Zugabe von 200 µl / Well Block-Lösung mit 1,5 % BSA in 10 mM PBS (pH 7,4) über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Platte wurde gewaschen und mit Standard-Verdünnungen in PBS (1, 10, 100 und 1000 ng / ml OC) oder unverdünnten Probenextrakten für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und mit Detektions-Antikörper inkubiert (pAK-OC1-9-STV, 1:500 in PBS) für 2 h bei RT, dann gewaschen und 1 h bei RT mit biotinylierter Ziel-DNA inkubiert. Die Platte wurde gewaschen und der hergestellte Mastermix dazu pipettiert und die RT-iPCR gestartet. Alle Proben und Standards wurden in dreifacher Ausführung gemessen.

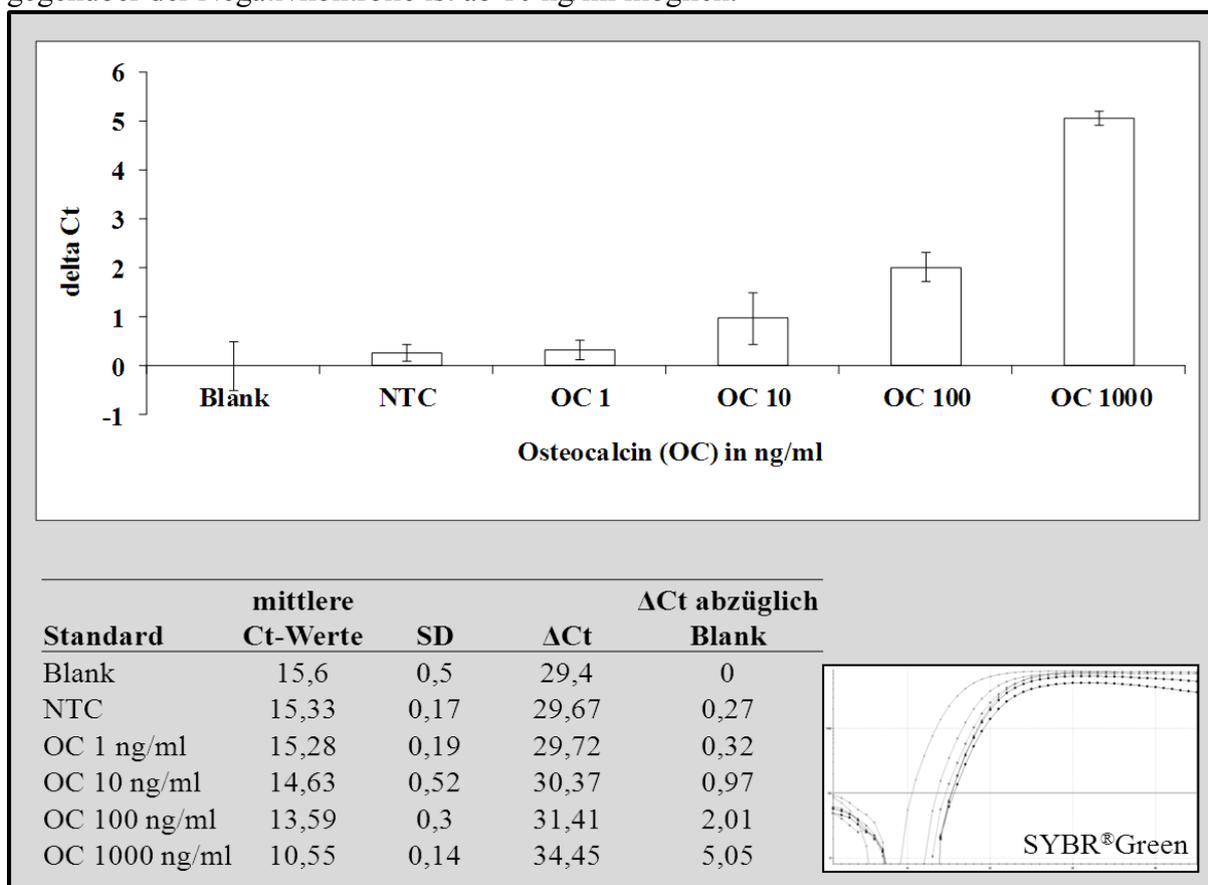
#### **3.5. Eignung der entwickelten RT-iPCR für die Detektion von bovinem Osteocalcin**

Der RT-PCR-Cycler zeichnet die Erhöhung der normalisierten Fluoreszenz (dR) für jeden Zyklus während der DNA-Amplifikation auf. Von diesen Signalen werden threshold cycle (Ct)-Werte festgestellt, bei denen die Fluoreszenzsignalintensität eine festgesetzte 'Schwelle' (Treshold) kreuzt. Die Ct-Werte, die in der RT-iPCR erhalten werden, sind umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration, das heißt, der Ct-Wert der Negativkontrolle hat den höchsten numerischen Wert. Im Gegensatz dazu sind die Signale des konventionellen ELISA-Assays direkt proportional zu den Antigen-Konzentrationen, die Negativkontrolle hat den kleinsten numerischen Wert. Um einen Vergleich der Ergebnisse, der von der absoluten Höhe der gemessenen Ct-Werte unabhängig ist, zu ermöglichen, werden im Folgenden neben den Ct-Werten auch die delta Ct-Werte ( $\Delta$ Ct) angegeben.  $\Delta$ Ct werden durch das Subtrahieren der Ct-Werte für einzelne Proben von der Gesamtanzahl von Zyklen in dem Experiment errechnet. Je größer ein  $\Delta$ Ct-Wert ist, umso besser lässt sich das positive Signal vom Signal der Negativkontrolle unterscheiden (Niemeyer *et al.* 2007).

##### **3.5.1. Sensitivität**

Um die generelle Durchführbarkeit der entwickelten RT-iPCR zu testen, wurde zunächst der Nachweis verschiedener Konzentrationen bovinen Osteocalcins verifiziert. Um die Sensitivität zu ermitteln, wurden für beide Methoden (SYBR<sup>®</sup>Green und TaqMan-Sonde) Osteocalcinkonzentrationen von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml eingesetzt, welche im Vergleich zu

den Negativkontrollen Blank (PBS anstatt des Fänger-AK) und NTC (PBS anstatt Osteocalcin) verifiziert wurden. Dabei wurden sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen jeweils in dreifacher Ausführung gemessen. Hierfür wurden zwei RT-iPCR-Systeme entwickelt, welche sich in der Messung des Fluoreszenzsignals zum Nachweis der gebundenen Ziel-DNA unterscheiden. Dabei wurde vorerst der Nachweis mittels SYBR<sup>®</sup> Green untersucht. Dies ist ein DNA-Farbstoff, der in die vorhandene DNA interkaliert, Licht bei Anregung emittiert und somit das Vorhandensein der gebundenen DNA visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt. Jede Säule zeigt die mittleren Fluoreszenzwerte im Verlauf der real-time PCR, gewonnen aus den drei separaten Messungen. Eine Abgrenzung gegenüber der Negativkontrolle ist ab 10 ng/ml möglich.



**Abb. 24:** Messung einer OC Standardreihe mit SYBR<sup>®</sup> Green. Für eine erleichterte Auswertung sind die Ergebnisse als neutralisierte delta Ct-Werte dargestellt (oben). Die Signalstärke nimmt mit steigender OC-Konzentration zu. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung (SD). Blank= PBS anstatt Fänger-Antikörper; NTC= PBS anstatt Probe.

Bei der zweiten Methode wurde eine TaqMan<sup>®</sup>-Sonde genutzt, welche zwischen den Primern innerhalb der Zielsequenz bindet und sequenzspezifisch für die nachzuweisende DNA ist. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff markiert, welcher während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal generiert und somit das Vorhandensein der gebundenen DNA visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 sichtbar. Auch bei dem TaqMan<sup>®</sup>-System beträgt die Sensitivität 10 ng/ml OC.

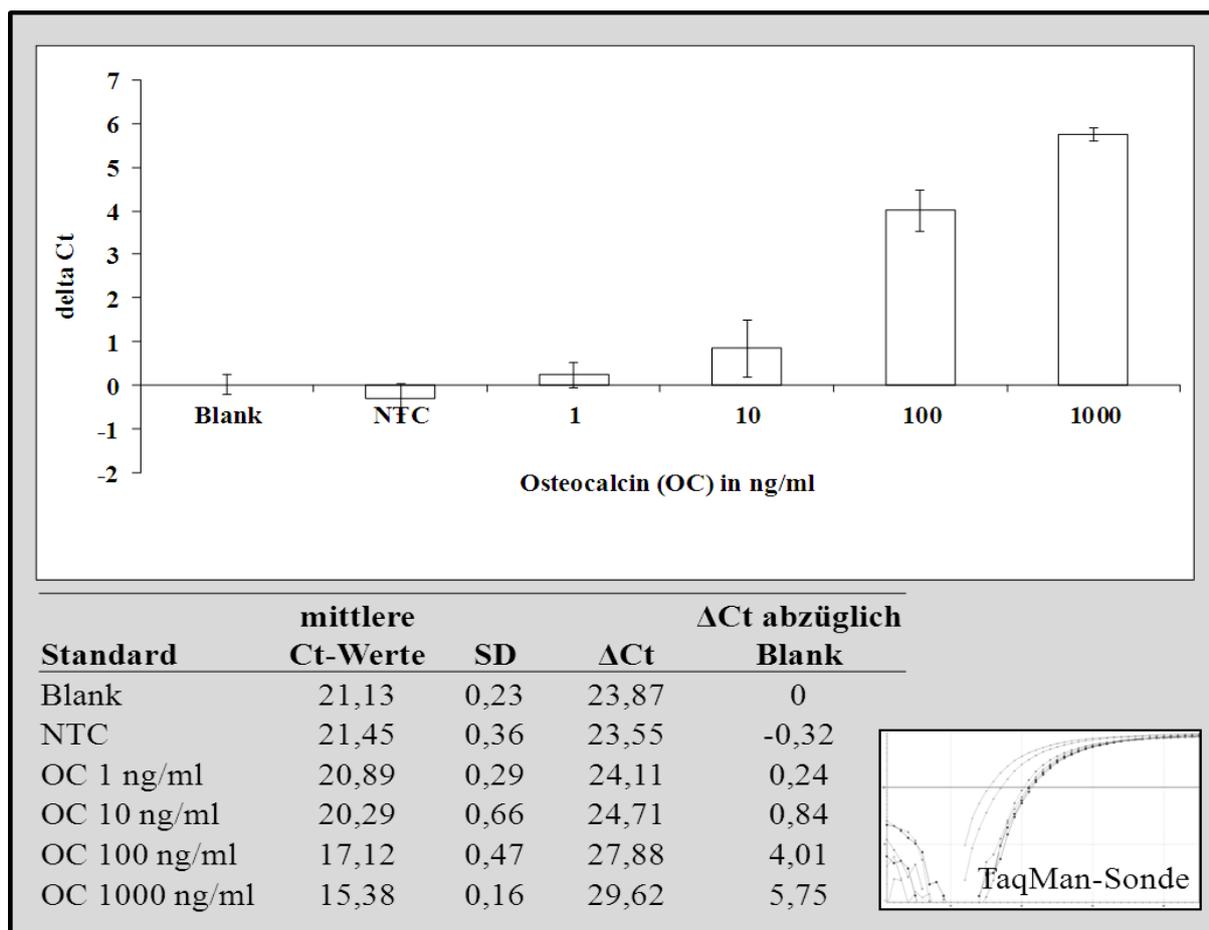


Abb. 25: Messung einer OC Standardreihe mit TaqMan-Sonde. Für eine erleichterte Auswertung sind die Ergebnisse als neutralisierte delta Ct-Werte dargestellt (oben). Die Signalstärke nimmt mit steigender OC-Konzentration zu. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung (SD). Blank= PBS anstatt Fänger-Antikörper; NTC= PBS anstatt Probe.

Für beide Systeme wurde ein Anstieg der Signalstärke bei steigender OC-Konzentration festgestellt. Beide Systeme scheinen demnach für den Nachweis bovinen Osteocalcins geeignet zu sein.

**LOD**

Um positive Signale von den Hintergrundsignalen abzugrenzen, wird in der Regel ein numerischer Vergleich mit den Werten der potenziell positiven Signale und der Negativsignale durchgeführt. Dafür wird die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) als der mittlere Ct-Wert der Negativkontrolle (NTC) zuzüglich dessen dreifacher Standardabweichung (SD) definiert. Positive Signale sind somit Signale, die größer sind als die LOD von  $NTC + 3 \times SD(NTC)$  (Niemeyer *et al.* 2007).

Um die Nachweisgrenze der RT-iPCR festzulegen, wurden die erzielten Ct-Werte der eingesetzten Osteocalcin-Konzentrationen und der Negativkontrolle von der maximalen Anzahl von 45 PCR-Zyklen subtrahiert. Der Grenzwert, ab dem ein Signal als positiv bewertet wurde, wurde nach DIN 32645 durch den mittleren Ct-Wert der Negativkontrolle

zuzüglich dessen dreifacher Standardabweichung definiert und ergab in beiden Systemen eine Nachweisgrenze von 10 ng/ml Osteocalcin.

Für die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) der RT-iPCR für die Osteocalcin-Detektion wurde jeweils der Ct-Wert, der bei Einsatz von 10 ng/ml Osteocalcin ermittelt wurde, bestimmt.

### 3.5.2. Intraassay-Variabilität

Die Messung mehrerer Replikate einer Probe unter identischen Bedingungen liefert Informationen über die Intraassay-Variabilität. Die Abweichungen der Messergebnisse zwischen den Replikaten werden als Variationskoeffizienten (CV) der mittleren Ct-Werte ausgedrückt. In Tab. 6 sind die Intraassay-Abweichungen anhand der Variationskoeffizienten der 3 Replikate in Prozent angegeben. Die Messabweichungen lagen bei der SYBR®Green-Methode bei 1,11 bis 3,55 % (Mittelwert 2,11 %) und bei der TaqMan-Methode im Bereich von 1,04 bis 3,25 % (Mittelwert 1,87 %).

**Tab. 6: Intraassay-Variation der entwickelten RT-iPCR-Systeme.**

Standard	Intraassay-Variation CV (%)	
	SYBR®Green	TaqMan-Sonde
Blank	3,21	1,09
NTC	1,11	1,68
OC 1 ng/ml	1,24	1,39
OC 10 ng/ml	3,55	3,25
OC 100 ng/ml	2,21	2,75
OC 1000 ng/ml	1,33	1,04

Anhand dieser Werte lässt sich eine geringe Intraassay-Variabilität feststellen, was auf eine hohe Präzision der RT-iPCR deutet. Dies zeigte sich an geringen Standardabweichungen der Ct-Werte für mehrere Replikate, die den gleichen Reaktionsbedingungen unterlagen. Die optimale Messpräzision für die Ct-Werte von real-time PCR-Analysen liegt zwar bei CV-Werten von < 1 % (Vaerman *et al.* 2004), aber die höhere Anzahl an Einzelschritten in der RT-iPCR führt Prozess-bedingt zu höheren Standardabweichungen im Vergleich zur RT-PCR, weshalb die Intraassay-Variabilität beider Systeme für gut bewertet wurde.

### 3.5.3. Selektivität

Nachdem die RT-iPCR auf ihre generelle Durchführbarkeit und Sensitivität überprüft wurde, sollte die Selektivität validiert werden. Auch hierfür wurde sowohl das RT-iPCR-System, welches auf SYBR®Green basiert, als auch jenes mit spezifischer TaqMan®-Sonde verifiziert. Dafür wurden Extrakte boviner Fleisch- und Knochenmehle (BFKM), welche bei

145 °C behandelt wurden, in pflanzlichen Futtermitteln in Konzentrationen von 0,1 bis 10 % hergestellt und in der RT-iPCR in dreifacher Ausführung eingesetzt. Dabei wurde überprüft, inwiefern eine Abgrenzung gegenüber der NTC-Kontrolle möglich ist. Die Ergebnisse sind für die SYBR®Green-Methode in Abb. 26 und für die TaqMan-Methode in Abb. 27 dargestellt.

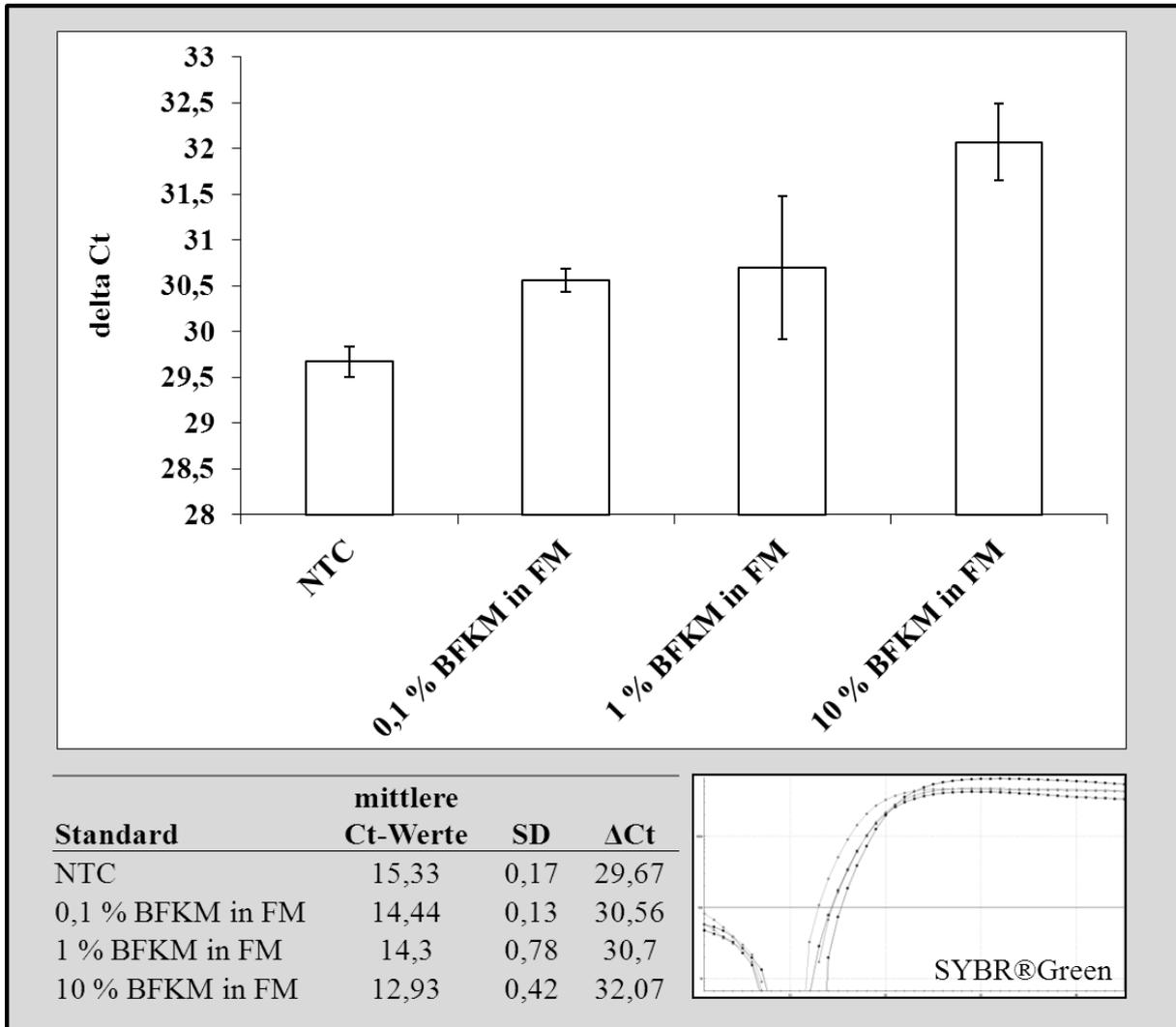
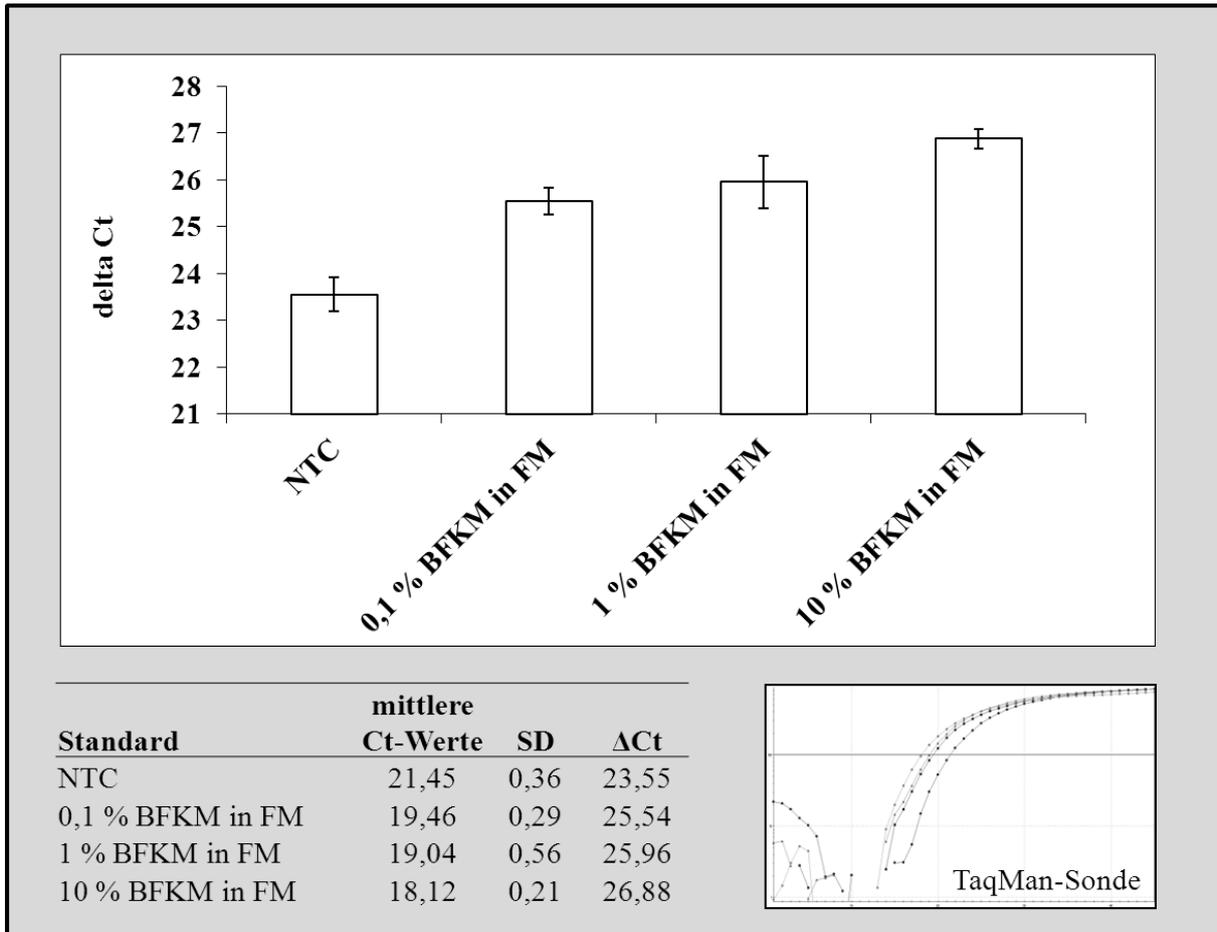


Abb. 26: Validierung der Selektivität der RT-iPCR mit SYBR®Green durch Messung eines Futtermittelextraktes (FM) mit bovinen FKM-Beimischungen. Für eine erleichterte Auswertung sind die Ergebnisse als delta Ct-Werte dargestellt (oben). Die Signalstärke nimmt mit steigender FKM-Konzentration zu. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung (SD). NTC= PBS anstatt Probe; BFKM= bovines Fleisch- und Knochenmehl.



**Abb. 27:** Validierung der Selektivität der RT-iPCR mit TaqMan-Sonde durch Messung eines Futtermittelextraktes (FM) mit bovinen FKM-Beimischungen. Für eine erleichterte Auswertung sind die Ergebnisse als delta Ct-Werte dargestellt (oben). Die Signalstärke nimmt mit steigender FKM-Konzentration zu. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung (SD). NTC= PBS anstatt Probe; BFKM= bovines Fleisch- und Knochenmehl.

Es wird deutlich, dass für beide Systeme eine Selektivität von 0,1 % BFKM in pflanzlichen Futtermitteln ermittelt werden kann. Dabei wurde ein BFKM genutzt, welches sogar bei 145 °C behandelt wurde, was über den gesetzlich festgelegten Forderungen liegt. Die Intraassay-Variationskoeffizienten für jeweils 3 Messreplikate waren durchgehend niedrig (Tab. 7). Sie lagen für das SYBR® Green-System bei 0,9 bis 5,45 % (Mittelwert 2,68 %) und für das TaqMan-System zwischen 1,16 und 2,94 % (Mittelwert 1,82 %).

**Tab. 7:** Intraassay-Variation der entwickelten RT-iPCR-Systeme bei der Detektion unterschiedlicher Konzentrationen boviner Fleisch- und Knochenmehle in pflanzlichen Futtermitteln.

Probe	Intraassay-Variation CV (%)	
	SYBR® Green	TaqMan-Sonde
NTC	1,11	1,68
0,1 % BFKM in FM (145 °C)	0,9	1,49
1 % BFKM in FM (145 °C)	5,45	2,94
10 % BFKM in FM (145 °C)	3,25	1,16

#### **4. Einsatz von Phage-Display-Methoden zum Nachweis bovinen Osteocalcins**

Mit der Entwicklung eines Sandwich-ELISA und einer RT-iPCR konnte gezeigt werden, dass der Knochengewebsmarker Osteocalcin sehr gut für den Nachweis von Fleisch- und Knochenmehlen (FKM) in Futtermitteln geeignet ist, da er eine ausgesprochen hohe Hitze- sowie Druckresistenz besitzt und selbst in hoch prozessierten Tiermehlen, welche bei bis zu 145 °C behandelt wurden, seine immunogenen Eigenschaften beibehält. Ziel der Anwendung von Phage-Display-Methoden war es zu verifizieren, ob ein Detektionssystem für bovines Osteocalcin *in vitro* generiert werden kann, ohne dabei auf die Immunisierung von Tieren zurück greifen zu müssen. Dafür wurde eine Phage-Display-Bibliothek genutzt, welche auf einem modifizierten M13-Phagen basiert. Die Bibliothek wurde eingesetzt, um Phagen mit positiven Bindungseigenschaften sowohl gegen bovines Osteocalcin, als auch bovine Fleisch- und Knochenmehle zu isolieren. Im Anschluss wurde die DNA einzelner positiver Phagenklone isoliert, aufgereinigt und sequenziert, um die spezifische Bindungsstelle zu charakterisieren. Abschließend wurde eruiert, ob das anhand dieser Sequenzinformation generierte Peptid für den Nachweis bovinen Osteocalcins eingesetzt werden kann.

##### **4.1. Funktionsprinzip des Phage Display**

Das Phage-Display basiert auf einer Selektionstechnik, bei der eine Ph.D.<sup>TM</sup> Phage-Display-Bibliothek von mehr als 2 Milliarden unabhängigen modifizierten M13- Phagen eingesetzt wird. Die Phagen weisen am N-Terminus des Hüllproteins pIII ein Heptapeptid auf, über das sie eine Bindung mit dem jeweils passenden Antigen eingehen können. Dabei präsentiert jeder der eingesetzten Phagen ein anderes Heptapeptid, welches im genetischen Material des jeweiligen Phagen kodiert wird, wodurch die Analyse des Genotyps einen direkten Rückschluss auf den Phänotyp und somit auf das Heptapeptid zulässt. Das nachzuweisende Antigen (Osteocalcin bzw. OC 16-22) wird an ein Immuno<sup>TM</sup>-Röhrchen gebunden und anschließend mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Die Phagen, die über ein passendes Heptapeptid verfügen, gehen mit OC eine Bindung ein und werden, nach dem Abwaschen ungebundener Phagen, eluiert und anschließend in *E. coli*-Bakterien amplifiziert. Diese *in vitro* Selektion namens „Panning“ wird mehrmals wiederholt, um spezifisch bindende Phagen anzureichern. Nach 3-4 Runden wird zunächst der Phagen-Pool mittels ELISA auf die spezifische Bindungsaffinität hin verifiziert. Hiernach werden einzelne Klone isoliert und durch ELISA und DNA-Sequenzierung charakterisiert, was Rückschlüsse auf das präsentierte Heptapeptid des jeweiligen Klons ermöglicht.

##### **4.2. Panning gegen OC 16-22 und Amplifizierung der selektierten Phagen**

Panning ist durch die Inkubation einer Phage-Display-Bibliothek an ein mit dem Antigen beschichtetes Immuno<sup>TM</sup>-Röhrchen, das Abwaschen der ungebundenen Phagen und Eluieren der spezifisch gebundenen Phagen gekennzeichnet. Die eluierten Phagen werden in

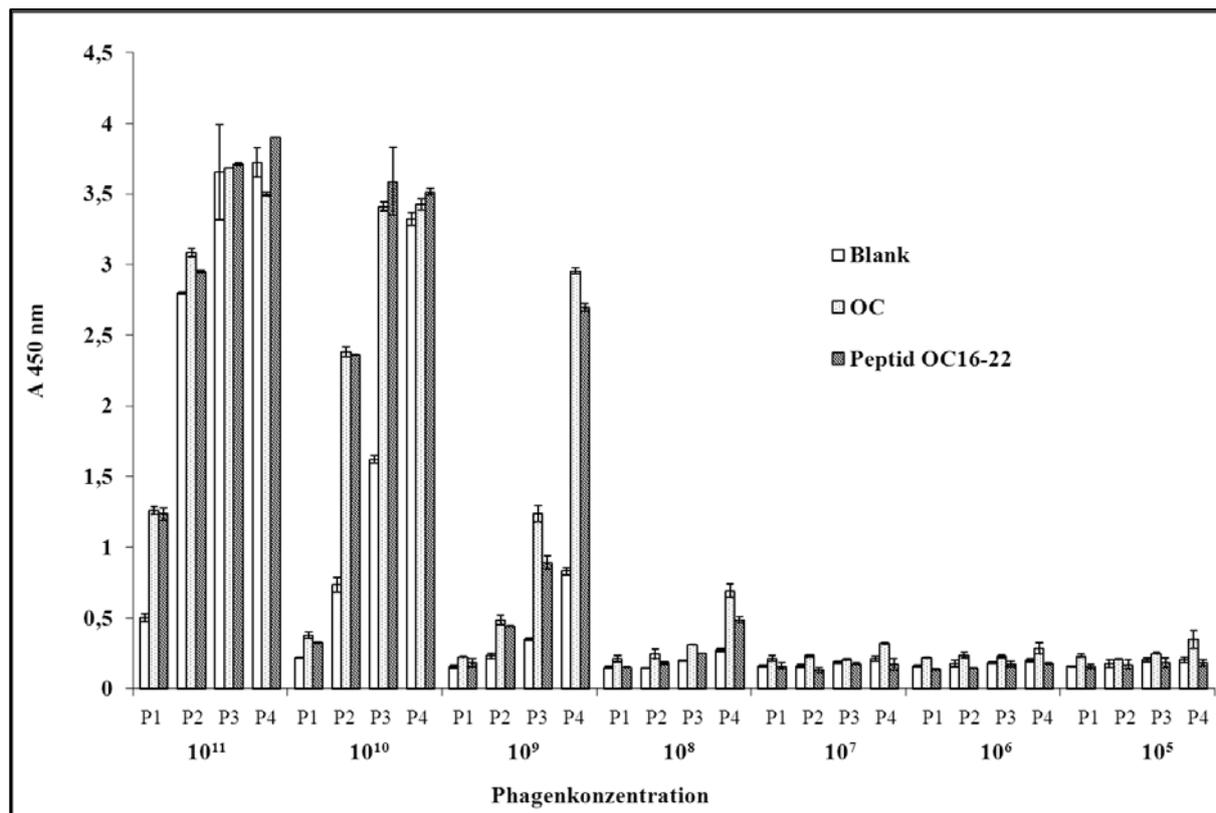
Tetrazyklin-resistenten *E. coli* amplifiziert und durch zusätzliche Bindungs- und Amplifikationszyklen wird der Pool mit bindenden Phagen angereichert. Auf diese Weise wurden 20 Phagen-Poole hergestellt, welche im Anschluss auf ihre Bindungseigenschaften gegen bovines Osteocalcin getestet wurden.

#### **Titrierung**

Um das Vorhandensein und die Konzentration bindender Phagen zu untersuchen und somit das Eingangsvolumen für die jeweils nächste Panningrunde berechnen zu können, mussten Titrierungen des jeweiligen Phagen-Pools durchgeführt werden. Dafür wurden spezielle LB / IPTG / Xgal-Platten mit *E. coli*, welche mit dem jeweiligen Phagen-Pool infiziert wurden, beimpft und am darauffolgenden Tag die Plaques (blau) auf den Platten gezählt, mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor der Platte multipliziert und so der Phagentiter bestimmt. Dieser lag für alle untersuchten amplifizierten Poole in der Größenordnung von  $10^{12-13}$  pfu / ml, was der empfohlenen Phagenmenge entspricht.

#### **4.3. Auswahl geeigneter Phagen-Poole**

Mittels ELISA wurde die Zielspezifität einzelner amplifizierter Phagen-Poole überprüft bzw. bestätigt. Dafür wurde nach jeder Panningrunde eine Mikrotiterplatte mit bovinem Osteocalcin bzw. dem Peptid OC 16-22 in hoher Konzentration (5 µg/ml) beschichtet und der zu untersuchende Phagen-Pool in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Gebundene Phagen wurden daraufhin mit einem anti-M13-Antikörper nachgewiesen. Ergebnisse sind exemplarisch für die Phagen-Poole 1-4 in Abb. 28 sichtbar. Auf diese Weise konnten zum einen die optimalen Konzentrationen der verschiedenen Phagen-Poole, zum anderen die geeignetsten Poole ermittelt werden. Es wird deutlich, dass die unterschiedlichen Phagen-Poole bei der für sie optimalen Konzentration ein detektierbares Signal für Osteocalcin bzw. das Peptid OC16-22 bedingen, welches deutlich über der Negativkontrolle (Blank= nur Blocking-Puffer) liegt. Beispielsweise liegt die optimale Konzentration für den Phagen-Pool 2 bei  $10^{10}$  und für den Phagen-Pool 4 bei  $10^9$ , da bei dieser Konzentration hohe Werte für die Positivkontrolle, bei niedrigen Signalen für die Negativkontrolle (Blank) detektiert werden. Dabei gilt zu beachten, dass einige Phagen-Poole eine so starke positive Reaktion zeigten, dass teilweise schon unmittelbar nach der TMB-Zugabe eine Färbung zustande kam und schnell Absorptions-Werte außerhalb der oberen Detektionsgrenze entstanden. Bei diesen Pools färbte sich allerdings auch der Blank recht schnell, weshalb höhere Blank-Werte nicht unbedingt auf eine schlechtere Bindungseigenschaft schließen lassen. Die Phagen-Poole mit geringen Signalen für die Negativkontrolle und starken Signalen für die Osteocalcin-Kontrolle wurden anschließend mit bovinen Fleisch- und Knochenmehlen (BFKM) auf ihre Bindungseigenschaften hin verifiziert und somit die Anwendbarkeit mit realen FKM überprüft.



**Abb. 28:** Auswahl geeigneter Phagen-Poole. Der jeweils zu untersuchende Pool (P1 bis P4) wurde in Phagen-Konzentrationen von  $10^5$  bis  $10^{11}$  im direkten ELISA eingesetzt, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank=Block-Lösung anstatt Osteocalcin (OC).

#### 4.3.1. Anwendbarkeit mit realen FKM

Um die geeigneten Phagen-Poole zu isolieren, wurde im nächsten Schritt die Kapazität des Phagen-Assays im Hinblick auf die Detektion von OC in wärmebehandelten FKM-Extrakten untersucht, um die Anwendbarkeit für echte Proben zu testen. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit BFKM-Extrakten beschichtet und die Poole mit den besten ELISA-Ergebnissen für reines bovines Osteocalcin in unterschiedlicher Konzentration zugefügt. Gebundene Phagen wurden daraufhin mit einem anti-M13-Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse sind exemplarisch für zwei Phagen-Poole in Abb. 29 sichtbar. Insgesamt waren 14 Phagen-Poole geeignet, sowohl reines bovines Osteocalcin, als auch BFKM, welches sogar bei  $145\text{ °C}$  behandelt wurde, nachzuweisen. Wie in Abb. 29 sichtbar wird, wurden außerdem Extrakte von Pferdeknochen, Schweineknochen, Lammknochen, Ziegenknochen, Kaninchenknochen, Geflügelmehl und Fischmehl getestet, welche Ergebnisse lieferten, die deutlich unter den BFKM-Signalen lagen.

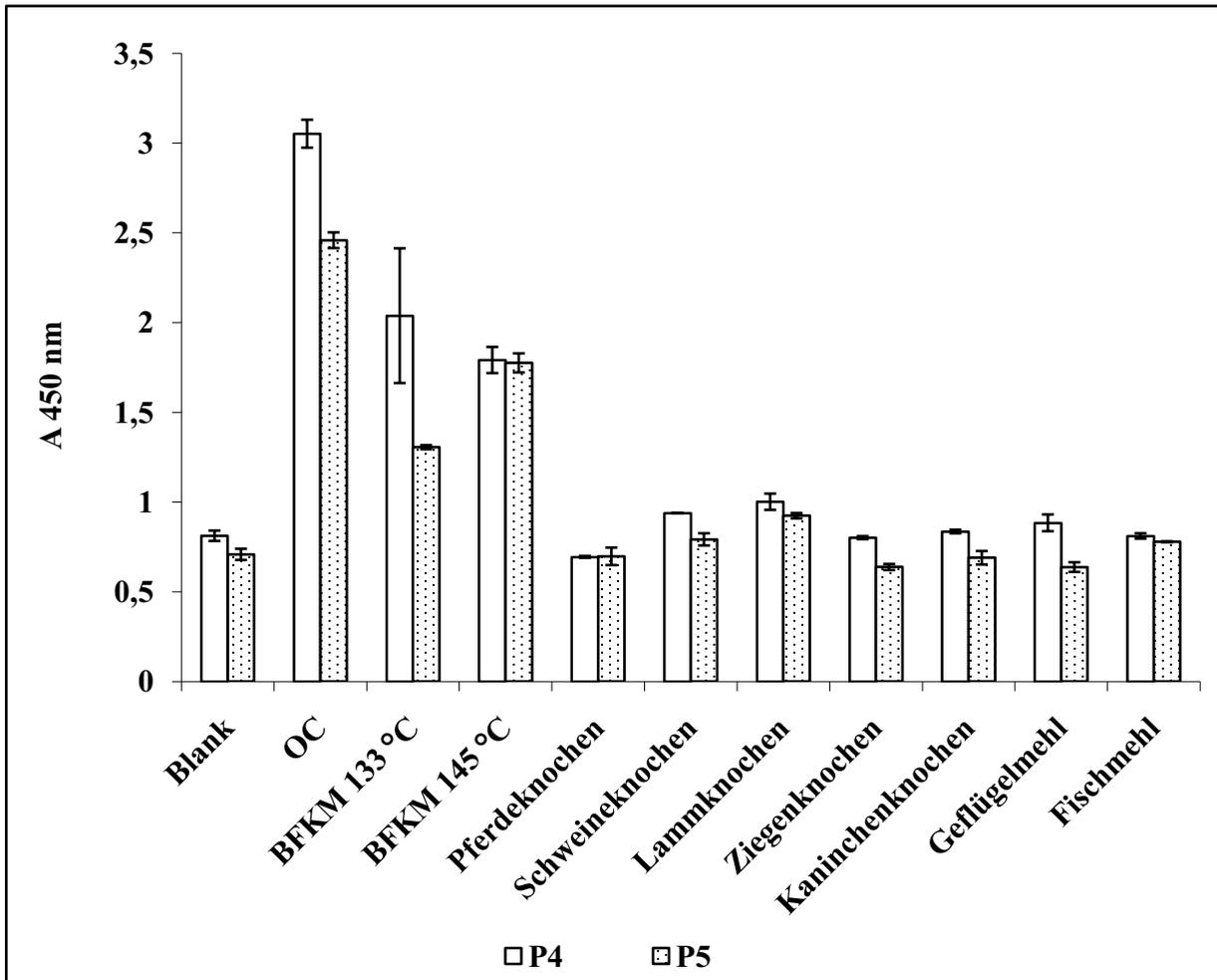


Abb. 29: Auswahl geeigneter Phagen-Pool für den Nachweis boviner Fleisch- und Knochenmehle (BFKM). Der jeweils zu untersuchende Phagen-Pool wurde in der für ihn optimalen Konzentration im direkten ELISA eingesetzt (P4:  $10^9$ ; P5:  $10^8$ ). Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= Block-Lösung anstatt Osteocalcin (OC).

#### 4.4. Isolierung und Amplifizierung individueller Phagen-Klone

Um Rückschlüsse auf das präsentierte Heptapaptid bindender Phagen ziehen zu können, war es nötig, aus Phagen-Poolen, die sich im ELISA als geeignet erwiesen haben, um bovines Osteocalcin nachzuweisen, individuelle Klone zu isolieren.

Dafür mussten zunächst geeignete Pools auf speziellen LB / IPTG / Xgal-Platten in unterschiedlichen Verdünnungsstufen titriert werden. Hiernach waren einzelne Klone als blaue Plaques auf den Platten sichtbar und konnten mit einer Pipette gepickt werden. Insgesamt wurden 49 individuelle Klone isoliert und anschließend in *E. coli* amplifiziert. Hiernach konnten diese mittels ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit gegen bovines Osteocalcin überprüft und somit eine Auswahl geeigneter individueller Klone getroffen werden.

#### 4.5. Auswahl geeigneter Klone mit ELISA

Nach der Amplifizierung einzelner Klone musste die Zielspezifität dieser mittels direktem ELISA überprüft werden, da innerhalb eines Phagen-Pools auch immer unspezifische Phagen

vorhanden sind, die gepickt worden sein könnten. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte mit bovinem Osteocalcin bzw. einem BFKM, welches bei 145 °C behandelt wurde, beschichtet und der jeweilige Phagen-Klon zugefügt. Gebundene Phagen wurden daraufhin mit einem anti-M13-Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse sind exemplarisch für die Klone 1-15 in Abb. 30 sichtbar. Insgesamt erwiesen sich 19 der 49 gepickten Klone als geeignet, um bovinen Osteocalcin und BFKM in einem direkten ELISA zu detektieren, wobei die resultierenden Signale deutlich über denen der Negativkontrolle lagen. Die Phagen-Klone, die nur ein schwaches Positivsignal bei gleich starkem Negativsignal aufwiesen, wurden für ungeeignet bewertet. Aus den für den Osteocalcin-Nachweis geeigneten 19 Klonen wurden 10 Klone für die DNA-Sequenzierung ausgewählt.

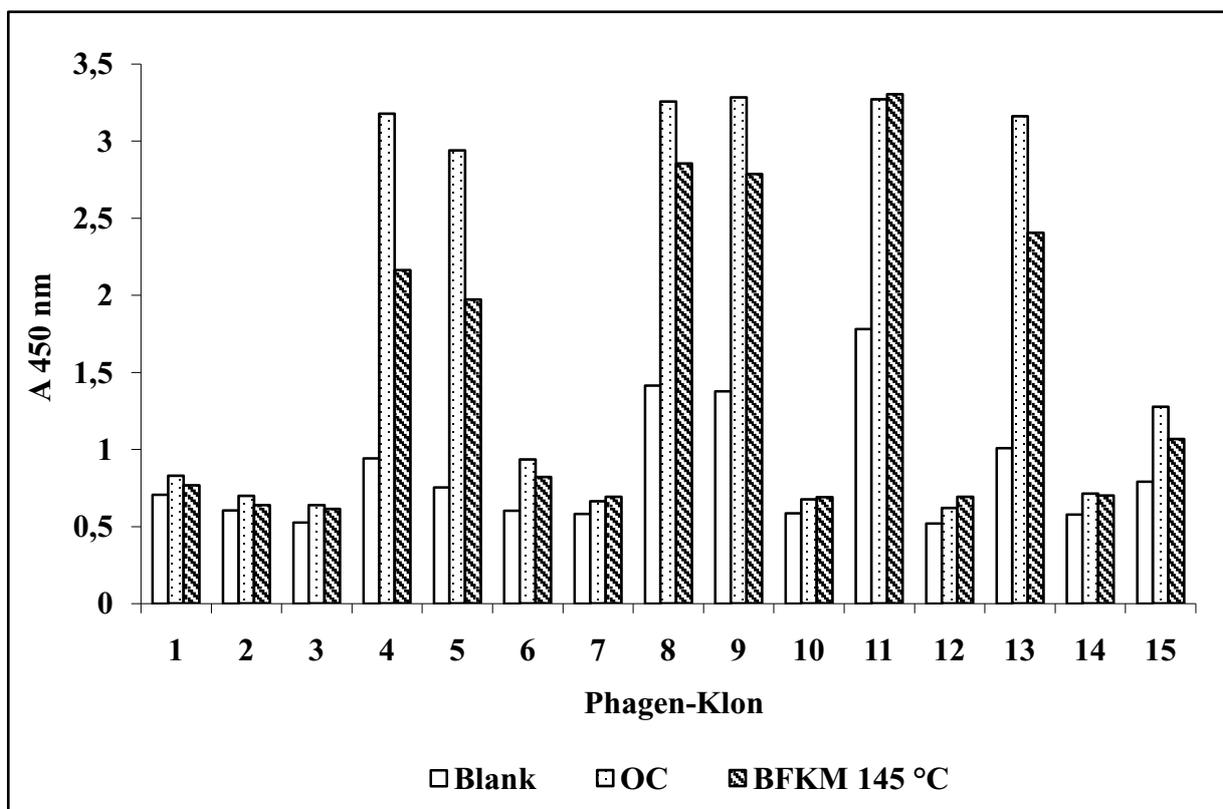
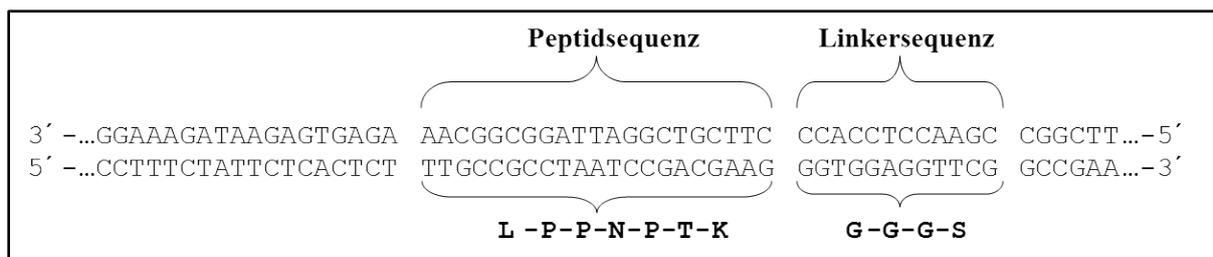


Abb. 30: Auswahl geeigneter Klone für den Nachweis bovinen Osteocalcins. Phagen-Klone wurden im direkten ELISA eingesetzt. Blank= Block-Lösung anstatt Osteocalcin (OC); BFKM 145 °C= bovines Fleisch- und Knochenmehl, welches bei 145 °C behandelt wurde.

#### 4.6. Sequenzierung einzelner Klone, um die codierte Peptidsequenz zu ermitteln

Um Informationen über das bindende Peptid einzelner Phagenklone mit einer nachgewiesenen positiven Bindungsaffinität zu bovinem Osteocalcin zu erhalten, wurde die Phagen-DNA von 10 Klonen, die sich im ELISA als geeignet erwiesen haben, extrahiert, aufgereinigt und anschließend durch die Firma Quiagen sequenziert.

Für alle eingeschickten DNA-Proben wurde die gleiche Nukleotidsequenz, die für das bindenden Heptapeptid kodiert, festgestellt. Das Sequenzierungsergebnis ist in Abb. 31 dargestellt.



**Abb. 31: Sequenzierungsergebnis für die Heptapeptidsequenz der Phagen-Klone, die sich im ELISA als geeignet erwiesen haben, um bovines Osteocalcin zu binden. L= Leucin, P= Prolin, N= Asparagin, T= Threonin, K= Lysin, G= Glycin, S= Serin.**

#### 4.7. Peptidsynthese

Anhand der erhaltenen Sequenzinformationen konnte eine Peptidsequenz von sieben Aminosäuren festgestellt werden. Dafür wurde die erhaltene Nukleotidsequenz anhand des genetischen Codes in die Aminosäuresequenz übersetzt. Die gesuchte Aminosäuresequenz des am Hüllprotein präsentierten Heptapeptids lautet somit: **Leucin (L) - Prolin (P) - Prolin (P) - Asparagin (N) - Prolin (P) - Threonin (T) - Lysin (K)**. Für die Peptidsynthese musste bedacht werden, dass während der Panning-Experimente der N-Terminus des Heptapeptids frei war, während der C-Terminus am Hüllprotein pIII gebunden vorlag und somit keine negative Carboxyl-Gruppe aufwies. Liegt allerdings das Peptid ungebunden vor, so wird der C-Terminus eine negative Ladung aufweisen, was eine veränderte Bindungseigenschaft nach sich ziehen könnte. Deshalb musste der C-Terminus amidiert werden, um eine Negativladung zu verhindern. Da das Heptapeptid über die Linkersequenz **Glycerin (G) - Glycerin (G) - Glycerin (G) - Serin (S)** mit dem Hüllprotein pIII verbunden war, wurde nach Empfehlungen des Herstellers diese Linkersequenz an den C-Terminus des Peptids angehängt. Um das Peptid später auch chemisch konjugieren zu können, wurde außerdem ein Peptid generiert, welches über Cystein (C) am C-terminalen Ende verfügt. Die vorhandene Thiol-Gruppe des Cystein ermöglicht beispielsweise eine einfache Kopplung mit verschiedenen Enzymen. Letztendlich wurden zwei Peptide generiert, die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:

**Peptid A: L - P - P - N - P - T - K - G - G - G - C - amid**

**Peptid B: L - P - P - N - P - T - K - G - G - G - S - amid.**

#### 4.8. Einsatz der synthetisierten Peptide im ELISA

Um die synthetisierten Peptide im ELISA einsetzen zu können, war es nötig, diese mit einem Enzym zu markieren. Dafür wurden zwei unterschiedliche Systeme genutzt, wobei Peptid A mit Maleimide-activated HRP und Peptid B mit Lightning-Link™ HRP konjugiert wurde und somit beide Peptide sowohl nativ als auch HRP-konjugiert vorlagen und im ELISA eingesetzt werden konnten.

**4.8.1. Sandwich-ELISA**

Um die Bindungseigenschaften der synthetisierten Peptide zu verifizieren, wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Hierfür diente das synthetisierte unkonjugierte Peptid B als Fänger und der generierte AK gegen die AS-Sequenz 1-9 bovinen Osteocalcins als Detektions-AK. Parallel dazu wurde auch der Fänger-AK OC4-30 nach dem in Kapitel 2 entwickelten ELISA-Verfahren getestet, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Wie in Abb. 32 sichtbar, bedingt der Einsatz des Fänger-AK OC4-30 ein starkes Positivsignal sowohl für reines bovines Osteocalcin, als auch für einen BFKM- und Rinderknochenextrakt, bei schwachen Absorptionswerten für die Negativkontrollen Blank und NTC. Im Vergleich dazu resultiert der Einsatz des synthetisierten Peptids als Fänger bei Konzentrationen von 1 und 2 µg / ml in negativen Signalen. Erst bei einer Peptid-Konzentration von 10 µg / ml wird ein positives Signal sowohl für den BFKM, als auch für den Rinderknochenextrakt sichtbar. Allerdings liegt dieses Signal deutlich unterhalb der Werte, die bei dem Fänger-AK OC4-30 erhalten werden und zeigt außerdem größere Standardabweichungen auf. Desweiteren war kein positives Signal für reines bovines OC detektierbar.

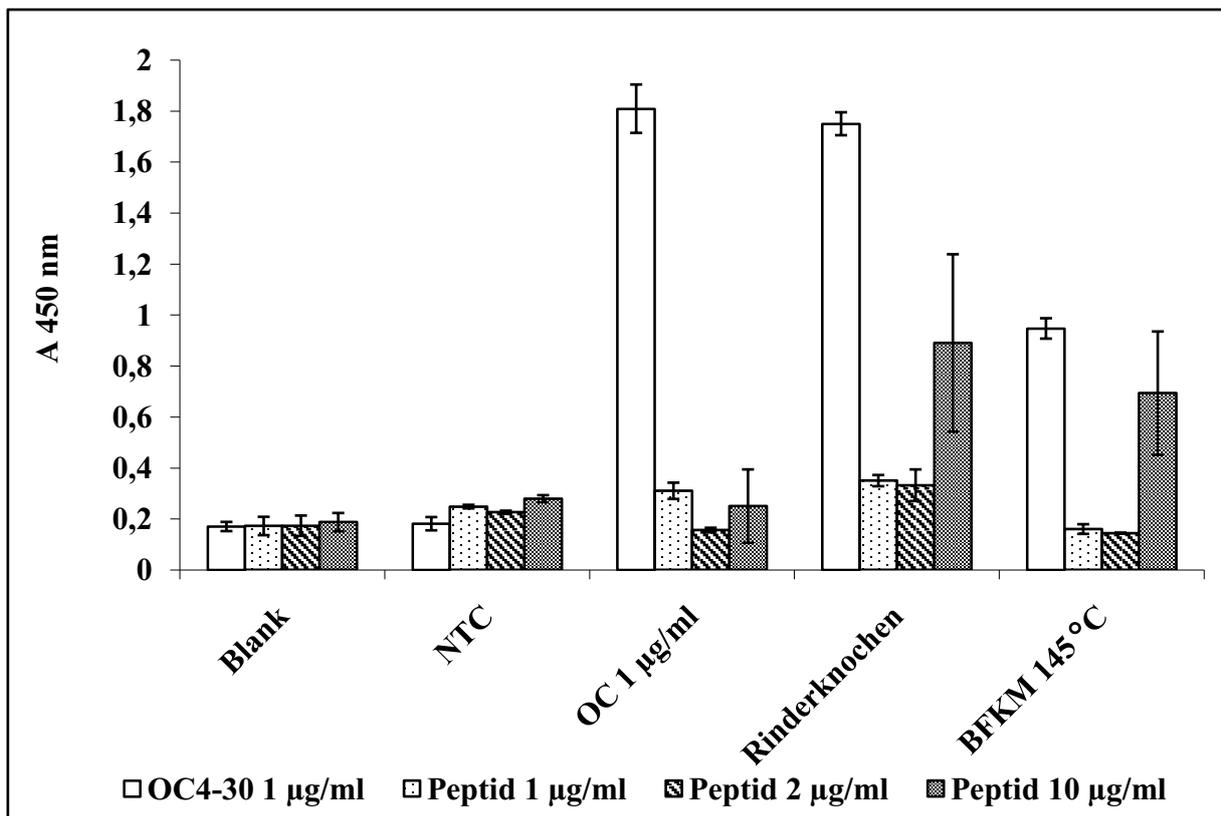


Abb. 32: Sandwich-ELISA zum Nachweis bovinen Osteocalcins. Als Fänger-Antikörper diente zum einen der kommerzielle mAK OC4-30 (Takara) und zum anderen das synthetisierte Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen. Der pAK-OC1-9-STV fungierte als Detektions-Antikörper. Ab einer Peptidkonzentration von 10 µg/ml ist ein positives Signal für bovines Fleisch- und Knochenmehl (BFKM) und Rinderknochen detektierbar. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Fänger-Antikörper; NTC= PBS anstatt Probe.

Um die Reaktivität des eingesetzten Peptids gegen bovines Osteocalcin zu untersuchen, wurde anschließend ein Sandwich-ELISA, basierend auf dem entwickelten Arbeitsprotokoll, durchgeführt, wobei allerdings das nachzuweisende bovine OC vor der Zugabe auf die beschichtete und geblockte Mikrotiterplatte für 30 min mit dem synthetisierten Peptid (10 µg / ml) inkubiert wurde. Die Ergebnisse dieses Versuchs belegen eine Reaktivität des Peptids gegen bovines OC, was in einer Signalabschwächung im Vergleich zu dem unbehandelten OC sichtbar wird (Abb. 33). Es konnte somit eine Reaktivität des synthetisierten Peptids sowohl gegen bovines OC, als auch BFKM und Rinderknochen festgestellt werden, welche allerdings im Vergleich mit dem Fänger-AK OC4-30 in schwächeren Signalen resultiert.

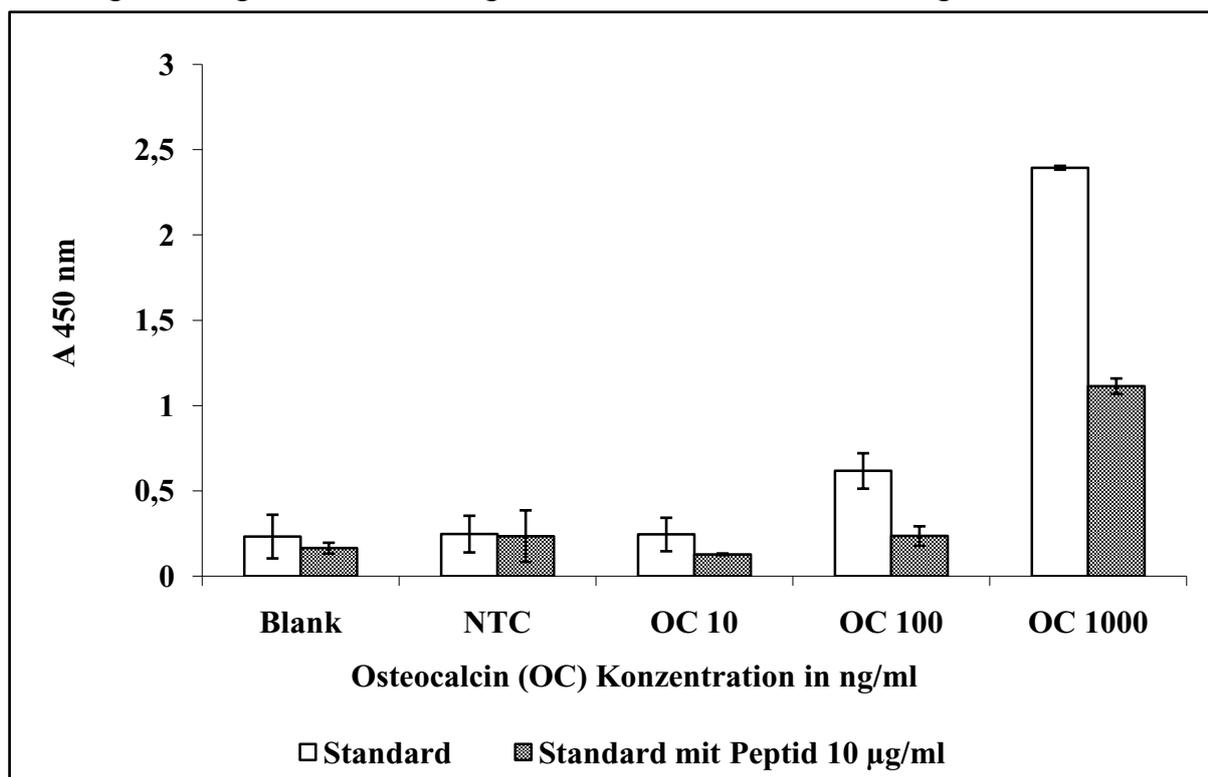


Abb. 33: Sandwich-ELISA zum Nachweis der Reaktivität des synthetisierten Peptids gegen bovines Osteocalcin. Der mAK OC4-30 (Takara) fungiert als Fänger-, der pAK-OC1-9-STV als Detektions-Antikörper. Das nachzuweisende OC wurde vor der Zugabe auf die Mikrotiterplatte für 30 min mit dem Peptid inkubiert. Da das Peptid an OC bindet und somit das Epitop besetzt, kommt es zu einer Signalabschwächung im Vergleich zum Standard-Sandwich-ELISA. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Fänger-Antikörper; NTC= PBS anstatt Probe.

#### 4.8.2. Direkter ELISA

Um die synthetisierten HRP-konjugierten Peptide auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber OC zu überprüfen, wurde zusätzlich ein direkter ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse sind für das Peptid A (mit Maleimide-activated HRP konjugiert) in Abb. 34 und für das Peptid B (Lightning-Link™ HRP konjugiert) in Abb. 35 grafisch dargestellt. Beide Peptide zeigen eine Reaktivität sowohl gegen bovines OC als auch gegen BFKM, wobei die erhaltenen Signale unter den Werten, die für den entwickelten Sandwich-ELISA detektiert werden konnten, liegen.

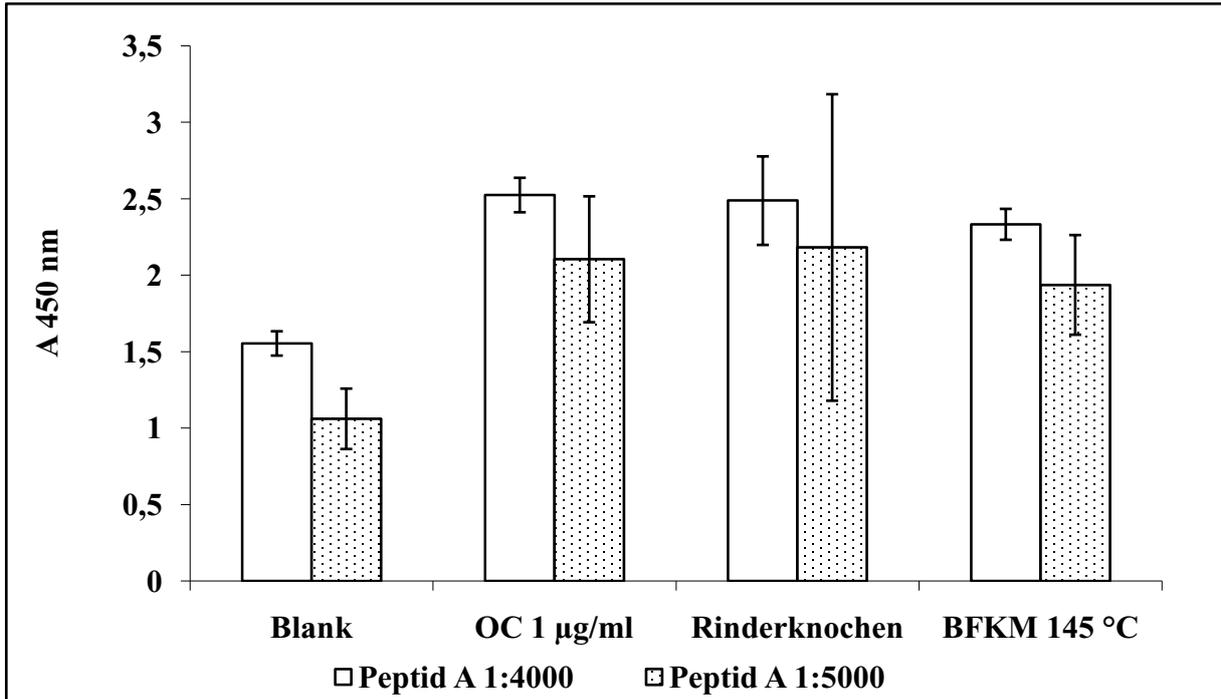


Abb. 34: Direkter ELISA zum Nachweis bovines Osteocalcins. Das synthetisierte und HRP-konjugierte Peptid A fungiert als Detektor. Bei Peptid-Konzentrationen von 1:4000 und 1:5000 sind sowohl für bovines Osteocalcin (OC), als auch für bovines Fleisch- und Knochenmehl (BFKM), welches bei 145 °C behandelt wurde, positive Signale detektierbar, welche über denen der Negativkontrolle (Blank) liegen. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Probe.

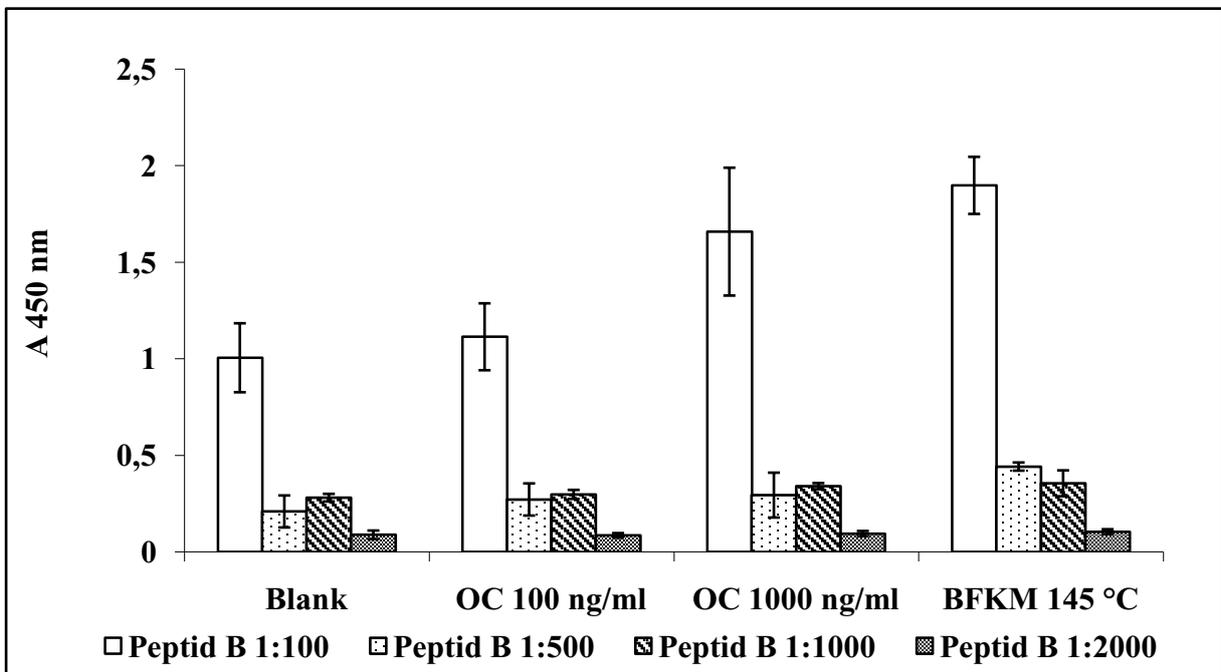


Abb. 35: Direkter ELISA zum Nachweis bovines Osteocalcins. Das synthetisierte und HRP-konjugierte Peptid B fungiert als Detektor. Sowohl für bovines Osteocalcin (OC), als auch für bovines Fleisch- und Knochenmehl (BFKM), welches bei 145 °C behandelt wurde, sind positive Signale detektierbar, welche über dem der Negativkontrolle (Blank) liegen. Die optimale Peptid-Konzentration liegt bei 1:100. Alle Werte wurden jeweils in dreifacher Ausführung erhoben. Fehlerbalken zeigen eine einfache Standardabweichung. Blank= PBS anstatt Probe.

## IV. DISKUSSION

### 1. Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln

Die Verfütterung tierischer Proteine an Nutztiere ist seit 2001 (Verordnung (EG) Nr. 999/2001) bis auf wenige streng definierte Ausnahmen wie z.B. die Verfütterung von Fischmehl an Schweine und Geflügel, der Zusatz von Fischmehl in Milchersatzfutter für junge Wiederkäuer sowie die unbeabsichtigte und unvermeidbare Kontamination mit Knochensplintern in pflanzlichen Futtermitteln verboten.

Lockerungen des Verfütterungsverbots oder die Einführung eines generellen Schwellenwertes für unbeabsichtigte Einträge von Fleisch- und Knochenmehl (FKM) in Futtermitteln hängen von der Verfügbarkeit artspezifischer Nachweissystemen ab. Die offizielle Methode zum Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln beruht derzeit auf der Mikroskopie (Verordnung (EG) Nr. 152/2009), diese erlaubt jedoch nicht die Differenzierung von Tierarten oder eine quantitative Bestimmung. Ein zweiter Test mit alternativen Methoden kann aber durchgeführt werden, um den Nachweis bestimmter Arten tierischer Bestandteile zu verbessern oder den Ursprung der tierischen Bestandteile weiter zu spezifizieren. Dies könnte beispielsweise durch ein immunologisches Detektionssystem realisiert werden, bei dem die tier- und gewebespezifische Antigen-Antikörper-Bindung durch einen enzymatischen Umsatz sichtbar gemacht wird. Die Absorption des entstehenden farbigen Produkts verhält sich dabei im Falle eines Sandwich-ELISA direkt proportional zur Proteinmenge im analysierten Futtermittlextrakt. Der Einsatz von Antikörpern (AK) setzt allerdings die Kenntnis über das jeweilige Antigen voraus. In vielen Literaturquellen sind jedoch die spezifisch nachgewiesenen Proteine, einschließlich ihrer Aminosäuresequenzen, unbekannt. Desweiteren kann es durch Erhitzung oder andere Verarbeitungsverfahren, wie sie für die Behandlung innerhalb der Tierkörperbeseitigungsanlagen (TBA) gefordert sind, relativ schnell zur Denaturierung der Epitope kommen. Daher ist eine Voraussetzung, um betrügerische Einmischung oder unbeabsichtigte Spuren von Tiermehlen in Futtermitteln (FM) zu erkennen, die sorgfältige Auswahl eines Proteins bzw. Peptids, welches sowohl eine außergewöhnliche Resistenz gegenüber prozessbedingten mechanischen Kräften, Druck und Temperaturen bis zu 140 - 150 °C (Garcia *et al.* 2006; Pérez-Calvo *et al.* 2010), als auch ein starkes allergenes Potential aufweist. Bisher wurden für die Entwicklung kommerzieller Kits zum Nachweis tierischer Proteine (TP) in FM Wiederkäuer- oder Schweine-spezifische AK, die an TP binden, entweder direkt gegen bovines Fleisch- und Knochenmehl (BFKM) (Kim *et al.* 2004; Muldoon *et al.* 2004), Muskelprotein-Mischungen (Ansfield 1994; Chen *et al.* 1998; Kim *et al.* 2005), gereinigtes Troponin I (Chen *et al.* 2002) oder h-Caldesmon (Kim *et al.* 2004) gerichtet. Die resultierenden vier kommerziellen TP-Detektions-Testkits (zwei DipStick-Tests und zwei ELISA), wurden wiederholt in Studien, die von offiziellen Institutionen in den USA oder Europa durchgeführt wurden, ausgewertet. Alle von ihnen

zeigten verschiedene Mängel in Bezug auf Spezifität, Selektivität oder Sensitivität. Insbesondere traten Kreuzreaktionen der Antikörper mit verschiedenen Komponenten in komplex zusammengesetzten Futtermitteln auf (Fumière *et al.* 2009). Darüber hinaus bleiben die genau angestrebten Epitope unbekannt. Als Folge können potentielle Kreuzreaktionen nicht im Voraus abgeleitet werden und die Wahrscheinlichkeit reproduzierbare Immunisierungsergebnisse zu erzielen wird als gering eingeschätzt. Im Gegensatz zu dieser Vorgehensweise wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst anhand von Sequenzanalysen und Literaturrecherchen potentielle tierische Marker identifiziert und auf ihre Eignung für den Nachweis hoch prozessierter FKM überprüft. Hierbei wurde insbesondere auf Hitzestabilität sowie Resistenz gegenüber den gesetzlich vorgeschriebenen Behandlungen in der TBA, als auch auf das Vorhandensein ausreichender Mengen im tierischen Organismus, die Abgrenzbarkeit zu anderen Spezies bzw. Speziesgruppen sowie das Vorhandensein von Sequenzinformationen verschiedener Spezies Wert gelegt. Dabei ergab sich, dass insbesondere das ~ 5,8 kDa (Hauschka *et al.* 1989) große Osteoblastenprodukt Osteocalcin optimal für den speziesspezifischen Nachweis tierischer Proteine in prozessierten Futtermitteln geeignet zu sein scheint, weshalb anhand diesen Markers exemplarisch die Entwicklung verschiedener Detektionssysteme aufgezeigt werden sollte.

## **2. Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins**

Für den Nachweis des hitzestabilen Knochenproteins Osteocalcin wurde zunächst ein Sandwich-ELISA entwickelt und verifiziert, welcher die Detektion bovinen Materials ermöglichen sollte.

Um dabei die Assay-Spezifität auf Rinder zu beschränken, wurde die synthetische N-terminale Aminosäuresequenz AS1-9 von bovinem Osteocalcin für die Immunisierung von Kaninchen verwendet, um andere wichtige Nutztiere auszuschließen. Die N-terminalen Sequenzen von Osteocalcin in den Gattungen Rind, Schwein, Schaf und Ziege unterscheiden sich in nur 1-3 Aminosäuren, während diese Sequenz bei Rind und Pferd völlig identisch ist (Abb. 11). Die durchgeführten Spezifitätstests bestätigten, dass leichte Sequenzunterschiede ausreichen, um die hauptsächliche Reaktivität der polyklonalen Antikörper auf Rind, mit der vorhersehbaren Ausnahme von Pferd, zu begrenzen. Allerdings ist eine zunehmende Tendenz zur Kreuzreaktion in Übereinstimmung mit der Anzahl ausgetauschter Aminosäuren in Bezug auf Rinder-OC AS1-9 beobachtet worden, beginnend bei Ziege (3 ausgetauschte Aminosäuren): keine Kreuzreaktion, Schaf (2 ausgetauschte Aminosäuren): sehr schwache Kreuzreaktion, Schwein (1 ausgetauschte Aminosäure): schwache Kreuzreaktion, Pferd (100 % Sequenzidentität): starke Kreuzreaktion. Der Austausch der voluminösen aromatischen Aminosäure Tryptophan an Position AS5 des bovinen OC gegen Glycin in Schweine-OC könnte ein Zielepitop für die Produktion monoklonaler Antikörper mit hoher Affinität darstellen, um Schweine-OC von bovinem OC zu diskriminieren.

Im Falle von Pferd und Rind ist ein Sequenzunterschied zwischen beiden Gattungen nur an Position AS19 gegeben, wo Lysin bei bovinem OC durch Arginin bei Pferd (Abb. 11) ausgetauscht ist. Deshalb könnte die Kreuzreaktion theoretisch durch einen Austausch des Fänger-AK beseitigt werden. Doch der Versuch, einen polyklonalen Kaninchen-Fänger-AK gegen das synthetische Mittelfragment AS16 - 22 des bovinen Osteocalcins herzustellen, war nicht erfolgreich (Abb. 12). Dies könnte auf die fehlende Carboxylierung der Glutaminsäurereste an Position 17, 21 und 24 des synthetischen Peptids, welches zur Immunisierung verwendet wurde, zurückzuführen sein, die eine entsprechende Faltung verhindert. Außerdem erfordert der hydrophobe Kern des Moleküls (Dowd *et al.* 2003) für eine Antikörper-Bindung wahrscheinlich eher ein Konformationsepitop anstatt eine Sequenzbasierte Erkennungsstelle. Diese Überlegung wird durch eine Studie mit monoklonalen und polyklonalen gegen OC gerichteten Antikörpern unterstützt, die mit unterschiedlich großen Fragmenten des Moleküls getestet wurden. Die Autoren zeigten eine im Allgemeinen schlechtere Affinität der Antikörper gegen OC-Fragmente bestehend aus AS11-29 oder AS21-43 (Gundberg *et al.* 1998). Dementsprechend könnte der Ausschluss von Pferd, sowie auch eine Reduzierung der Kreuzreaktivität gegen Schwein durch eine stringente Anti-Protein-Produktion, z. B. durch Phage-Display- oder monoklonale Selektion gegen native Rinder-Osteocalcin-Fragmente mit den Aminosäuren AS1-43, AS1-19, AS 4-19 oder intaktes Osteocalcin realisiert werden.

Zwei in dieser Arbeit verwendete definierten BFKM-Proben wiesen einen Knochenfragment-Anteil von etwa 54 und 80 % auf, welches der üblichen Spannbreite für Materialien aus Tierkörperbeseitigungsanlagen entspricht (Liu *et al.* 2011). Die guten Ergebnisse, die mit EDTA als Lösungsmittel aus Knochenmaterialien erzielt werden konnten, stehen im Einklang mit den veröffentlichten Ergebnissen für ein verbessertes Extraktionsverfahren für den Nachweis von Wiederkäuermaterial. Durch eine EDTA-basierte Extraktion konnte die Leistung eines kommerziellen DipStick-Tests von 2 % bis zu einer Nachweisgrenze von 0,1 % BFKM in Futtermitteln verbessert werden (Karanam 2011). Im Gegensatz zu der Extraktionsmethode dieser Arbeit beinhaltet die Methode zusätzlich einen Konzentrationsschritt der Knochenfraktion durch Sedimentation mit 100 ml Tetrachlorethylen (TCE), wie sie auch in der Probenvorbereitung für die Mikroskopie (Verordnung (EG) Nr. 152/2009) eingesetzt wird. Eine zusätzliche Aufkonzentrierung der Knochenfragmente ist für den hier beschriebenen ELISA nicht notwendig, was auch zur Vermeidung eines Agens führt, das krebserregend sein soll (IPCS INCHEM; <http://www.inchem.org/>). Der Verdauungsschritt der Knochen über Nacht wurde jedoch auch in dieser Arbeit angewandt, was eine schnelle Analyse von Proben innerhalb weniger Stunden nicht zulässt. Zur Beschleunigung der verwendeten Extraktionsmethode wären möglicherweise eine Wärme- und / oder Säure-Extraktion, ein größeres Probenvolumen oder eine höhere Homogenisierungsrate der Grobanteile denkbar.

Der Knochengehalt könnte eine wesentliche Rolle in Bezug auf die Sensitivität der Methode spielen. Die Frage, ob eine auf Osteocalcin basierende Methode auch in Proben mit Knochengehalten <54 % oder sogar mit 100 % Muskelmehl funktionieren würde, müsste mit geeigneten Materialien, die für diese Arbeit nicht verfügbar waren, geklärt werden. Im Hinblick auf die zu erwartende große Varianz der FKM aus verschiedenen Tierkörperbeseitigungsanstalten wäre es ohnehin ratsam, nicht nur ein einziges sondern eine Vielfalt von gut definierten Markerproteinen zu detektieren, um der großen Diversität von tierischen Nebenprodukten der Tierkörperverwertungsindustrie gerecht zu werden.

Obwohl die Sensitivität des entwickelten Assays mit 1 ng bovinen OC etwa eine Größenordnung unter kommerziellen OC ELISA-Tests für pharmazeutische Anwendungen liegt, sieht die Sensitivität mit FKM im Vergleich zu kommerziellen ELISA-Testkits, welche für die Arten-Erkennung in verarbeitetem Fleisch entwickelt wurden, ermutigend aus. Für diese wurden Empfindlichkeiten von 0,1, 0,5 bzw.  $\geq 2$  % FKM in Futtermitteln oder sogar ein komplettes Versagen für die Detektion von, nach rechtlich geltenden Anforderungen behandeltem, FKM in verschiedenen Validierungsstudien festgestellt (Boix *et al.* 2004; Gizzi & von Holst 2004; Love & Carey-Smith 2004; von Holst *et al.* 2006; Myers *et al.* 2007; Rao & Hsieh 2007; Karanam 2011). Die Sensitivität des ELISA-Verfahrens, welches in dieser Arbeit entwickelt wurde, könnte durch die monospezifische Aufreinigung verringert worden sein, da evtl. die Immunglobuline des polyklonalen Serums mit der stärksten Bindung an der Säule zurückgeblieben sind. Die Anbindung an das voluminöse Streptavidin-Molekül zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Empfindlichkeit verglichen mit einer HRP-Markierung, sondern im Gegenteil eine Verbesserung der Wirkung durch multiple Bindungsstellen für Biotin.

Abgesehen von Osteocalcin kommen  $\gamma$ -carboxylierte Glutaminsäuren z.B. auch in Proteinen vor, welche in der Blutgerinnungskaskade beteiligt sind, wie Prothrombin, konnten aber bisher nicht in der Hämolymphe von Anneliden, Krustentieren, Insekten, Soja-Blätter, *E. coli*-Extrakten oder Kuhmilch (Zytkovicz & Nelsestuen 1976) nachgewiesen werden. Dementsprechend weist der in dieser Arbeit entwickelte ELISA eine bemerkenswerte Selektivität für Osteocalcin in Pflanzen-Hintergrund auf. Ein Proteinextrakt aus einer klassischen rein pflanzlichen Futtermittelmischung, welche für die Herstellung von 0,1 % BFKM in pflanzlichen FM verwendet wurde, ergab ein Hintergrund-Signal vergleichbar mit dem Blank und der NTC. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 100 % Soja-, Weizen- oder Maisproteinextrakten und einem auf Pflanzen basierendem Milchaustauscher mit 12 % Zitrusfrüchten und 5 % Kakao-Hülse erhalten. Die Anwesenheit von Zuckerrüben oder Zitruspulpel stellen offensichtlich kein Problem dar, im Gegensatz zu Teststörungen, die in einer früheren Validierungsstudie mit kommerziellen Test-Kits für diese Zutaten beobachtet wurden (Boix *et al.* 2004). Die Selektivität des Tests war auch in Fischmehl-Hintergrund ausgezeichnet, was durch die ausgeprägten Sequenzunterschiede zwischen Osteocalcin von

Knochenfischen im Vergleich zu Landtieren (Abb. 11) erklärbar ist. Im Gegensatz dazu verringerte die beobachtete schwache, aber signifikante Kreuzreaktivität mit reinem Schweineknöchel oder Schweinemehl die Selektivität des Assays. Allerdings stand nur eine Probe aus reinem Schweinemehl zur Verfügung, sodass weitere Schweine-FKM sowie definierte Mischungen untersucht werden müssten, um dieses Ergebnis zu überprüfen. Aufgrund der Beschaffenheit des Materials konnte eine Kontamination mit bovinem Material nicht ausgeschlossen werden. Die Identifizierung von BFKM-Spuren in Gegenwart von anderen Spezies, z.B. BFKM in Schweine- oder Fischmehl, scheint ein sehr schwieriges Thema in Verbindung mit gegen FKM gerichtete immunologische Methoden zu sein, was auch für kommerzielle Kits beobachtet wurde. In Studien über die Leistung von zwei DipStick-Tests wurden zunehmend falsch-positive Ergebnisse in Gegenwart von 5 % Schweinemehl oder tierischem Fett oder Fischmehl in Höhe von 1,5 % beobachtet (Boix *et al.* 2004; Fumière *et al.* 2009).

Das hitzestabile Osteoblastenprodukt Osteocalcin hat sich als gut geeigneter FKM-Marker erwiesen, da selbst noch für BFKM, welches bei 145 °C verarbeitet wurde, ein starkes Signal nachweisbar war. Darüber hinaus erweist sich Osteocalcin als ein gewebe- und speziesspezifisches Markerprotein, da es ausschließlich im Knochengewebe oder Dentin bei allen Wirbeltieren einschließlich Knochenfischen (Hauschka *et al.* 1989) exprimiert wird. Obwohl es, am Hydroxylapatitskelett gebunden, ziemlich stabil ist, durchläuft Osteocalcin unter natürlichen Bedingungen einen schnellen Abbau in einem Umbauprozess im Blutplasma. Zwei Arginin-Arginin Spaltstellen sind an den Aminosäurepositionen 19 (Arg) - 20 (Arg) und 43 (Arg) - 44 (Arg) (Abb. 11) lokalisiert und führen durch tryptische Hydrolyse zu zwei bis drei Fragmenten (AS1-19, AS20-43, AS44-49). Die Spaltstelle in der Nähe des C-Terminus wird, durch Abtrennung der letzten sechs Aminosäurereste, schnell hydrolysiert, während das AS1-43-Fragment (Mittelfragment) weitaus stabiler ist (Lee *et al.* 2000). Betrachtet man die Bindungsstellen der Antikörper in dem entwickelten Sandwich-ELISA (AS1-9 und das Epitop um AS17), so unterstreichen die mit drei verschiedenen BFKM erhaltenen Ergebnisse, dass in hochprozessierten FKM zumindest in dem Mittelfragment (AS1-43) noch ein erheblicher Teil immunologisch zugänglich ist.

### **3. Real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) für den Nachweis bovinen Osteocalcins**

Eine Bestimmungsgrenze von wenigen Zielmolekülen, wie sie routinemäßig in der PCR-Analyse möglich ist, stellt auf dem Gebiet der Proteinanalytik eine Herausforderung dar. Die im ELISA verwendete enzymatische Signalverstärkung erlaubt Nachweisgrenzen im Bereich von ng/ml bis pg/ml (Adler & Wacker 2006). Im Gegensatz dazu verbindet die Immuno-PCR (iPCR) die Vorteile der robusten immunologischen Nachweisverfahren mit dem exponentiellen Amplifikationsvermögen der PCR und erlaubt eine 100 bis 10000fach höhere Sensitivität der Protein-Detektion im Vergleich zum ELISA (Niemeyer *et al.* 2005). Dabei

wird bei der iPCR, die ursprünglich 1992 von Sano *et al.* entwickelt wurde, das signalbildende Antikörper-Enzym-Konjugat des ELISA durch ein Antikörper-DNA-Konjugat ersetzt, welches mittels PCR detektiert wird. Die enorme Amplifikationsfähigkeit der PCR wird somit für die Visualisierung immunologischer Detektionssignale genutzt, wobei es zu einer Signalverstärkung kommt (Sano *et al.* 1992). Mit dieser neuen empfindlichen Methode gelingt es, Proteine ähnlich empfindlich wie Nukleinsäuren nachzuweisen (Niemeyer & Blohm 1996), weshalb die iPCR mittlerweile in vielfältigen Anwendungsgebieten, wie beispielsweise die Analyse von vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktoren, Mumps-Antigen, rViscumin, verschiedenen IgG, Gliadin, HIV-1 p24 Antigen, Rotavirus VP6, pathologischen und rekombinanten Prionen und Prostata-spezifischen Antigenen genutzt wird (Barletta 2006). Der in dieser Arbeit entwickelte Sandwich-ELISA ermöglicht den Nachweis boviner FKM in Futtermitteln mit einer Selektivität von 0,1 % und einer Sensitivität von 1 ng Osteocalcin. Durch die Entwicklung einer real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) sollte verifiziert werden, ob eine Steigerung der Sensitivität für den Nachweis tierischer Proteine bovinen Ursprungs erreicht werden könnte. Dabei sollte die zu entwickelnde RT-iPCR das Ziel-Protein Osteocalcin mit einer hohen Sensitivität und Selektivität detektieren, wobei zunächst die generelle Durchführbarkeit mit reinem bovinen OC verifiziert wurde. Darauf aufbauend wurde eruiert, ob und bis zu welchen Konzentrationen hoch prozessiertes bovines Tiermehl in pflanzlichen Futtermitteln mittels RT-iPCR detektiert werden kann.

Niemeyer *et al.* empfehlen, Assay-Parameter eines vorhandenen Immunoassay für die Entwicklung einer iPCR zu übernehmen (Niemeyer *et al.* 2007), weshalb auch in dieser Arbeit der entwickelte Sandwich-ELISA die Basis der zu entwickelnden RT-iPCR darstellt. Der mit Streptavidin markierte Detektionsantikörper, welcher gegen bovines Osteocalcin gerichtet ist, dient dabei als Kopplungsstellen für die mit Biotin konjugierte Ziel-DNA. Im Vergleich zum ELISA erfolgt dann die Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung bei der RT-iPCR anstatt mit enzymatischer Umsetzung mittels Amplifikationsmessung der Ziel-DNA. Für die AK-DNA-Bindung sind in der Literatur verschiedene Strategien beschrieben. Eine ist die von Sano *et al.* (1992) vorgeschlagene Verwendung einer Streptavidin / Protein A-Chimäre. Dabei wird der Detektions-Antikörper mit einer biotinylierten DNA verbunden, indem die drei Komponenten in einem stöchiometrischen Verhältnis gemischt werden. Dies verursacht aber vergleichsweise hohe Hintergrundsignale in der iPCR und kann nur bei direkten iPCR-Formaten genutzt werden, da das Reagent auch an dem Fänger-AK binden könnte und somit ein hohes Hintergrundsignal verursachen würde. Bei einer anderen Methode wird ein Biotin-modifizierter Detektions-Antikörper verwendet. Nach Zugabe von Streptavidin (STV) kann die ebenfalls biotinylierte DNA gebunden werden. Eine dritte Möglichkeit ist die Verwendung von Detektions-Antikörpern, die kovalent an eine DNA gekoppelt sind. Die Herstellung und notwendige Aufreinigung dieser Konjugate ist allerdings aufwendig und kompliziert und nur wenige Antikörper überstehen sie unbeschadet (Niemeyer

*et al.* 2005; Niemeyer *et al.* 2007). In den meisten Forschungsanwendungen wird die Antikörper-DNA-Bindung durch die Kopplung eines biotinylierten Antikörpers mit dem Biotin-bindenden Protein Streptavidin (bzw. Avidin) und biotinylierter DNA umgesetzt. Allerdings ist diese Vorgehensweise durch die Vielzahl der erforderlichen Schritte, möglicher Fehlerquellen und mangelnder Kopplungseffizienz für die Routineanwendung unbefriedigend (Adler & Wacker 2006). Daher wurde in dieser Arbeit eine vereinfachte Strategie der AK-DNA-Konjugation gewählt, bei der der Detektions-AK direkt mit STV markiert wurde. Da STV ein tetrameres Protein ist, welches über vier Bindungsstellen für Biotin verfügt (Niemeyer & Blohm 1996; Kuczius *et al.* 2009), konnte eine biotinylierte Ziel-DNA generiert werden, die direkt, ohne die Notwendigkeit eines weiteren Kopplungsmoleküls, an den AK bindet. Im Anschluss an die AK-DNA-Bindung wird, nach gründlichem Waschen um unspezifische Bindungen zu entfernen, die gebundene Ziel-DNA mittels PCR amplifiziert. Ursprünglich erfolgte die Visualisierung nach der Amplifizierung mittels gelelektrophoretischer Auftrennung, was jedoch die Quantifizierung erschwert und zusätzliche Arbeitsschritte erfordert. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Sichtbarmachung mittels RT-PCR die sichere Quantifizierung, was auch von Sims *et al.* erkannt wurde, die erstmals das Detektionsformat der real-time PCR auf die iPCR übertragen haben (Sims *et al.* 2000). Aufgrund der genannten Vorteile wurde die RT-PCR auch in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die immunologische Detektion der Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen.

Um die Antigen-Antikörper-Bindung detektieren und die RT-iPCR etablieren zu können, war es nötig, eine Ziel-DNA zu generieren, die weder in Tieren noch in Pflanzen vorkommt, um eventuell falsch-positive Signale durch die Detektion natürlich vorkommender DNA bei der Untersuchung von Futtermitteln auszuschließen. Hierfür wurde eine künstliche chimäre biotinylierte Ziel-DNA aus einem Plasmid mit integriertem Mandel-Gen mittels PCR hergestellt. Außerdem wurden zwei RT-PCR-Systeme entwickelt und verifiziert, welche aufgrund ihrer Validierungsergebnisse als geeignet bewertet wurden, um in der RT-iPCR eingesetzt zu werden.

Anhand einer Standardverdünnungsreihe bovinen Osteocalcins wurde die Sensitivität der entwickelten RT-iPCR bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml eingesetzt. Bovines Osteocalcin konnte sowohl mit der SYBR<sup>®</sup> Green-Methode als auch mit dem TaqMan-System in der RT-iPCR ab einer Konzentration von 10 ng/ml nachgewiesen werden, wobei ein Einsatzvolumen von 50 µl/Well ausreichend war.

Die Sensitivität des im Rahmen dieser Arbeit etablierten RT-iPCR-Systems ist somit vergleichbar mit der des entwickelten ELISA-Detektionssystems, was vor allem durch die recht hohen Hintergrundsignale bedingt wird. In der RT-iPCR ist es allerdings unmöglich, das Auftreten von Hintergrundsignalen vollständig zu vermeiden, was sich auch darin zeigt, dass bisher kein publiziertes Protokoll falsch-positive Ergebnisse eliminieren konnte (Barletta

2006). Da im Gegensatz zur Standard-PCR die Ziel-DNA im Laufe der RT-iPCR immer hinzugefügt werden muss, ist es selbst bei stringenten Waschverfahren unmöglich, unspezifisch gebundene Ziel-DNA vollständig zu entfernen, weshalb selbst das Vorhandensein von nur sehr geringen DNA-Mengen zu starken Hintergrundsignalen führen kann (Niemeyer *et al.* 2007). Die extreme Nachweisempfindlichkeit, die die Vorteile der RT-iPCR bedingt, führt dabei gleichzeitig zu extremer Störanfälligkeit (Niemeyer & Blohm 1996). Deshalb ist im Gegensatz zur Standard-PCR das Auftreten von Hintergrundsignalen in der RT-iPCR normal. Nicht die absolute Höhe des Hintergrundsignals sondern das Verhältnis des spezifischen Detektionssignals zum Hintergrundsignal bestimmt dabei die Qualität und Leistungsfähigkeit eines RT-iPCR-Verfahrens. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, ist es daher von enormer Wichtigkeit, eine Erhöhung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis anzustreben (Adler *et al.* 2008). Vor diesem Hintergrund sind die Waschschrte, welche für das Entfernen unspezifischer Ziel-DNA essentiell sind, von enormer Wichtigkeit.

Eine Reduktion der Hintergrundsignale und Verbesserung der Sensitivität könnte auch durch die Verwendung eines effizienteren Detektionskonjugats erzielt werden, wobei beispielsweise die Ziel-DNA direkt an dem Detektions-AK gebunden wird. Dadurch entstünden die Hintergrundsignale nur noch durch die unspezifische Bindung des Detektions-AK und nicht mehr durch zusätzlich unspezifisch gebundene Ziel-DNA-Moleküle. Außerdem könnte die Anwendung stringenterer Waschschrte zu einer Minimierung des Hintergrundsignals führen. Dabei würde ausgiebiges Waschen, um unspezifische Bindung zu entfernen, die molekulare Bindung des Streptavidin-Biotin-Komplexes nicht beeinträchtigen, welches die bisher stärkste bekannte molekulare Verbindung zwischen einem Protein und einem kleinen Ligand darstellt (Barletta 2006). Wie auch Adler und Wacker bereits erkannten, liegen die zentralen Punkte für einen erfolgreichen Einsatz der entwickelten RT-iPCR somit in der Minimierung unspezifischer Bindungen durch die Wahl geeigneter Antikörper, dem Blockieren sowie der Maximierung spezifischer Bindungen durch eine möglichst effiziente Antikörper-DNA-Kopplung (Adler & Wacker 2006).

Desweiteren hängen die Sensitivität und Spezifität der RT-iPCR von der Qualität der Antikörper ab. Wenn keine hochspezifischen Antikörper verfügbar sind, werden erhöhte Hintergrund-Signale gemessen und die Sensitivität des Tests ist deutlich beeinträchtigt (Niemeyer *et al.* 2007). So wäre beispielsweise die Generierung hochaffiner monoklonaler AK eine weitere Möglichkeit, die Sensitivität der RT-iPCR zu steigern.

Die Selektivität der RT-iPCR wurde anhand von Extrakten mit definierten Beimischungen von BFKM in pflanzlichen Futtermitteln in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 % verifiziert. Dafür wurden sowohl das RT-iPCR-System, welches auf SYBR<sup>®</sup>Green basiert, als auch jenes mit spezifischer TaqMan-Sonde angewandt. Es wurde überprüft, inwiefern eine Abgrenzung gegenüber der Negativkontrolle möglich ist. Die Festlegung einer Nachweisgrenze mittels eines Limit of Detection (LOD), der als mittlerer Ct-Wert der

negativen Kontrolle plus dreimal dessen Standardabweichung definiert ist, entspricht den Vorschriften gemäß DIN 32645.

Für beide Systeme konnte eine Selektivität von 0,1 % BFKM in pflanzlichen Futtermitteln bei durchgehend niedrigen Intraassay-Variationskoeffizienten ermittelt werden. Dabei wurde ein BFKM genutzt, welches sogar bei 145 °C behandelt wurde, was über den gesetzlich festgelegten Forderungen liegt.

Die typische Intraassay-Variabilität der Ct-Werte einer RT-iPCR für die Protein-Detektion liegt bei 1,2 - 4,4 % (Barletta 2006). In dieser Arbeit lagen die Abweichungen für das SYBR<sup>®</sup> Green-System zwischen 0,9 und 5,45 % und für die TaqMan-Methode bei 1,04 bis 3,25 %, wobei jeweils 3 Replikate gemessen wurden.

Bei der Beurteilung der Intraassay-Variabilität der RT-iPCR, beispielsweise im Vergleich zur real-time PCR, muss allerdings bedacht werden, dass zusätzlich zu dem ohnehin vorhandenen real-time PCR-Schritt in der RT-iPCR zusätzlich noch Plattenbeschichtung, Zugabe der Ziel-DNA und diverse Wasch- und Blockierungs-Schritte Einfluss auf die Präzision der Methode nehmen und somit viele Fehlerquellen bergen. Vor diesem Hintergrund ist die Intraassay-Variabilität beider Systeme als gut zu bewerten.

Um eine Methode für den Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln zu etablieren, bedarf es neben einer hohen Sensitivität, um auch geringste Spuren verbotener Bestandteile detektieren zu können, vor allem der Notwendigkeit, ohne größeren speziellen Aufwand in jedem Labor durchführbar zu sein. Dies trifft für die entwickelte RT-iPCR zu, da nur ein real-time PCR-Cycler und zwei ELISA-Washer nötig sind, welche mittlerweile zur Standardausrüstung gehören. Außerdem ermöglicht die Methode auch die Detektion anderer Antigene, da hierfür lediglich die eingesetzten Antikörper auf das neue Antigen adaptiert und streptavidiniert werden müssten, das real-time PCR-System aber einfach übernommen werden könnte, ohne nochmals aufwendig validiert werden zu müssen. So kann die entwickelte Methode an jegliche Zielantigene adaptiert werden, was eine breite Anwendbarkeit ermöglicht. Denkbar wäre beispielsweise auch der Nachweis anderer Tiermarker oder Osteocalcinsequenzen. Da alle Reaktionsschritte der Detektion in demselben Gefäß durchgeführt werden und für die Datenauswertung keine weitere Manipulation der Reaktionen notwendig ist, wird das Risiko für Kontaminationen und Pipettierfehler minimiert. Bezüglich der Anwenderfreundlichkeit der RT-iPCR gibt es vor allem bei den Waschschritten des PCR-Teils Verbesserungsbedarf, da diese in dieser Arbeit mit einem Handwasher durchgeführt wurden. Denkbar ist hier die Anwendung eines automatisierten Washers, wie er beispielsweise auch für die immunologischen Schritte genutzt wurde. Die Angabe der RT-iPCR-Ergebnisse als Ct-Werte macht die Daten-Auswertung von der Höhe des Hintergrundes und dem Fluoreszenz-Schwellenwert (Threshold) der real-time PCR unabhängig und erlaubt somit einen direkten Vergleich von Daten aus verschiedenen Versuchen und / oder verschiedenen real-time PCR-Geräten.

Prinzipiell ist die RT-iPCR außer für den qualitativen Nachweis auch für quantitative Analysen geeignet. Die Quantifizierung von OC in einer unbekannt Probe könnte wie folgt durchgeführt werden: Der  $\Delta C_t$  - Wert einer unbekannt Probe kann durch Subtraktion des gemessenen  $C_t$ -Wertes von der maximalen Anzahl durchgeführter PCR-Zyklen errechnet werden. Für eine Quantifizierung könnten dann die entsprechenden  $\Delta C_t$  -Werte einer im gleichen Versuch eingesetzten Standard-Verdünnungsreihe gegen ihren OC-Gehalt aufgetragen und durch lineare Regression könnte anschließend anhand des  $C_t$ -Wertes der Gehalt an OC in der unbekannt Probe errechnet werden.

#### 4. Phage-Display-Methoden

In dieser Arbeit wurde das hitzestabile Knochenprotein Osteocalcin verifiziert und hat sich als gut geeigneter Marker für den Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln erwiesen, da selbst noch für bovines Fleisch- und Knochenmehl, welches bei 145 °C verarbeitet wurde, ein starkes immunologisches Signal nachweisbar war. Durch die Anwendung von Phage-Display-Methoden sollte untersucht werden, ob es möglich ist, *in vitro* ein immunologisches Detektionssystem für den Nachweis bovinen Osteocalcins zu generieren, ohne dabei auf die Immunisierung von Tieren zurückgreifen zu müssen. Dabei basiert die 1985 von George P. Smith erfundene Methode auf einer Selektionstechnik, bei der eine Bibliothek unterschiedlicher Phagen eingesetzt wird, wobei auf der Außenseite eines jeden Phagen ein anderes Peptid exprimiert wird, welches wiederum im genetischen Material des jeweiligen Phagen kodiert wird (Wilson & Finlay 1998; Rodi & Makowski 1999; Sidhu 2000). Diese Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp ermöglicht es, eine schnelle Erkenntnis über die Bindungsaffinität zu einem bestimmten Zielmolekül durch eine *in-vitro*-Selektion namens „Panning“ zu erhalten (Parmley & Smith 1988). Seit Anfang der 90er Jahre findet die Methode weite Verbreitung, insbesondere da man bemerkt hat, dass sich aus Bibliotheken, welche zufällige Sequenzen aufweisen, sehr einfach Peptide und auch Proteine mit bestimmten Bindungseigenschaften isolieren lassen. Eine große Bedeutung liegt auch darin, dass sich mittels Phage-Display Antikörperfragment-Bibliotheken oder Peptide auf spezifische Bindung selektieren lassen. Rekombinante Antikörper, welche durch Fusion an andere Proteine bzw. Proteindomänen neue Eigenschaften besitzen, die in der Natur nicht vorkommen, sind insbesondere bei der Entwicklung proteinogener Therapeutika unverzichtbar geworden, wobei bisher eine Vielzahl klinisch nutzbarer Antikörper mittels Phage-Display hergestellt werden konnte (Schmiedl & Dübel 2004).

Da der in dieser Arbeit entwickelte Sandwich-ELISA auf einem Detektions-AK basiert, der gegen die AS-Sequenz OC 1-9 generiert wurde, konnte Rind von den wichtigsten Nutztieren, mit Ausnahme von Pferd, diskriminiert werden. Aufgrund eines Sequenzunterschiedes an Position AS19 zwischen beiden Gattungen, wo Lysin des bovinen OC durch Arginin des equinen OC (Abb. 11) ausgetauscht ist, könnte die Kreuzreaktion des Sandwich-ELISA

theoretisch durch einen Austausch des Fänger-AK beseitigt, und somit die Assay-Spezifität auf Rind beschränkt werden. Doch der Versuch, einen polyklonalen Kaninchen-Fänger-AK gegen das synthetische Mittelfragment AS16-22 des bovinen Osteocalcins herzustellen, war nicht erfolgreich (Abb. 12). Aus diesem Grund wurde die Aminosäuresequenz 16-22 bovinen Osteocalcins als Zielsequenz für die Isolierung spezifisch bindender Phagen gewählt, um zu verifizieren, ob mittels *in-vitro*-Methoden diese Problematik gelöst werden könnte. Für die Entwicklung des *in vitro* generierten Detektionssystems wurde eine Phagen-Bibliothek gewählt, welche auf modifizierten M13-Phagen basiert. Diese modifizierten Phagen weisen an dem Hüllprotein pIII ein lineares Heptapeptid auf, über welches sie eine Bindung mit dem für sie spezifischen Antigen eingehen können. Mit Hilfe dieser Bibliothek wurden Phagen isoliert und vermehrt, die eine positive Bindungsaffinität zu bovinem Osteocalcin aufweisen. Durch den Einsatz einzelner Phagenklone in einem direkten ELISA war es schließlich möglich, reines bovines Osteocalcin zu detektieren. Somit konnte gezeigt werden, dass es unter Anwendung von Phage-Display-Methoden möglich ist, *in vitro* ein immunologisches Detektionssystem für den Nachweis bovinen Osteocalcins zu generieren. Darüber hinaus konnten bovine Fleisch- und Knochenmehle (BFKM), welche sogar bei 145 °C behandelt wurden, mit den isolierten Phagen detektiert werden. Das *in vitro* entwickelte Detektionsverfahren erlaubt somit nicht nur den Nachweis reinen Osteocalcins, sondern schafft auch die Voraussetzung für die Detektion hoch prozessierter Fleisch- und Knochenmehle, die sogar über den gesetzlich geforderten Temperaturen behandelt wurden. Aus einzelnen Phagen mit positiver Bindungsaffinität gegen bovines OC wurde außerdem die DNA extrahiert, aufgereinigt und sequenziert, um das präsentierte Heptapeptid zu charakterisieren. Anhand dieser Information wurden zwei Peptide generiert, die sowohl im direkten, als auch im Sandwich-ELISA auf ihre Eignung für den Nachweis bovinen Osteocalcins verifiziert wurden. Allerdings waren sowohl im direkten, als auch im Sandwich-ELISA nur schwach positive Signale für bovines OC und BFKM detektierbar, wofür mehrere Ursachen denkbar wären. Zum Einen könnte die fehlende Carboxylierung der Glutaminsäurereste an Position 17, 21 und 24 des synthetischen Peptids OC16-22 Grund für die fehlende Bindung bei Einsatz des nativen OC sein, dessen hydrophober Kern für eine Bindung wahrscheinlich eher ein Konformationsepitop anstatt eine Sequenz-basierte Erkennungsstelle erfordert. Diese Überlegung wird durch eine Studie mit monoklonalen und polyklonalen gegen OC gerichteten Antikörpern unterstützt, die mit unterschiedlich großen Fragmenten des Moleküls getestet wurden. Die Autoren zeigten eine im Allgemeinen schlechtere Affinität der Antikörper gegen OC-Fragmente bestehend aus AS11-29 oder AS21-43 (Gundberg *et al.* 1998). In Übereinstimmung dazu war auch der Versuch, einen polyklonalen Kaninchen-Fänger-AK gegen das synthetische Mittelfragment AS16-22 des bovinen Osteocalcins herzustellen, nicht erfolgreich. Zum Anderen wäre es möglich, dass die Bindungseigenschaft nicht nur durch das präsentierte Heptapeptid, sondern auch durch den

gesamten Phagen, bzw. sein Hüllprotein beeinflusst wurde, da für die Untersuchungen, in denen mit den vollständigen Phagen gearbeitet wurde, gute Ergebnisse sowohl für OC, als auch für BFKM erzielt wurden. Auch kommt es in sehr seltenen Fällen vor, dass Phagen isoliert werden, die nicht nur ein, sondern mehrere verschiedene Peptide präsentieren, die dann gemeinsam zu der positiven Bindungseigenschaft beitragen. Wird in solch einem Fall nur eines der zur Bindung beitragenden Peptide isoliert und eingesetzt, so kommt es zu einer Abschwächung der Bindungsreaktivität, was sich in schwachen Signalen widerspiegelt. Dies würde darauf hin deuten, dass das nachzuweisende Antigen ein längeres Bindungspeptid bzw. eine andere Phagen-Bibliothek verlangt. Außerdem wäre denkbar, dass das generierte Peptid die Bindungseigenschaften des Detektions-AK negativ beeinflusst und so schwächere Signale generiert werden. Ein weiterer Grund für die schwächeren Positivsignale beim Einsatz der isolierten Peptide könnte sein, dass für die Peptidsynthese die Linkersequenzen einbezogen und für eine mögliche Enzymmarkierung die Aminosäure Cystein der Sequenz zugefügt wurde. Dies könnte durch eine Veränderung der Ladungseigenschaften auch veränderte Bindungseigenschaften nach sich gezogen und somit die Bindungsaffinität des Heptapeptids negativ beeinflusst haben.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass Phage-Display-Methoden vielversprechende Möglichkeiten bieten, um hoch prozessierte tierische Proteine nachzuweisen, ohne dass dabei Tiere immunisiert werden müssen. Durch den Einsatz einzelner, *in vitro* selektierter Phagenklone in einem direkten ELISA war es möglich, nicht nur reines Osteocalcin, sondern sogar ein bovines Fleisch- und Knochenmehl (BFKM), welches bei 145 °C behandelt wurde, zu detektieren. Desweiteren besticht die Methode durch die Möglichkeit, für jedes erdenkbare Antigen, *in vitro* passende Phagen zu isolieren, was eine sehr große Anwendbarkeit ermöglicht. Ein großer Vorteil der angewandten Methode liegt auch darin, dass die zeit- und kostenintensive Immunisierung von Tieren entfällt. Um eine vielseitige Anwendbarkeit zu erlauben, ist es möglich, das durch den Phagen präsentierte Peptid durch eine DNA-Sequenzierung zu charakterisieren, synthetisch herzustellen und für die Entwicklung von Detektionssystemen zu nutzen. Die in dieser Arbeit aufgetretene Signalabschwächung beim Einsatz der synthetisierten Peptide könnte sowohl durch den Einsatz anderer Phagen-Bibliotheken, die über ein längeres Bindungs- bzw. Konformationsepitop verfügen, als auch über die Synthese mit unterschiedlich langen Linkersequenzen eliminiert werden.

Die hier beschriebene *in vitro* Methode zur Herstellung spezifisch bindender Peptide könnte die Grundlage für ein vielseitiges Nachweisverfahren für die Sicherstellung des Verfütterungsverbot darstellen, wobei auch ein OC-Nachweis aller relevanten Nutztiere möglich wäre. Darüber hinaus könnte die Vorgehensweise auch auf andere Spezies und Sequenzen übertragen werden und so zu einer Verbesserung der Bekämpfung der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien führen.

## 5. Fazit

Das Verfütterungsverbot tierischer Proteine an lebensmittelliefernde Tiere ist wahrscheinlich die bedeutendste Maßnahme bei der Bekämpfung der Bovinen spongiformen Enzephalopathie und somit essentiell für die Eindämmung der Übertragung dieser Krankheit, sowohl auf andere Tierarten als auch auf den Menschen. Das offizielle Verfahren für den Nachweis tierischer Bestandteile in Futtermitteln basiert derzeit auf der klassischen Lichtmikroskopie (Verordnung (EG) Nr. 152/2009), die es allerdings nicht ermöglicht, zwischen Art oder Gattung in Proben, die hoch prozessierte tierische Proteine enthalten, zu unterscheiden. Darüber hinaus hängt die mikroskopische Untersuchung stark ab von individuellen Fähigkeiten, was mit verantwortlich gemacht wird für die großen Interlabordifferenzen, wie die bislang durchgeführten Ringversuche des gemeinschaftlichen Referenzlabors für tierische Proteine gezeigt haben. Fischmehle sind mittlerweile für die Verfütterung an Hühner und Schweine, als auch in Milchaustauschern wieder zugelassen. Weitere Lockerungen, wie beispielsweise die Verfütterung von Geflügelmehl an Schweine werden in Betracht gezogen, allerdings ohne das Intra-Spezies-Verfütterungsverbot aufzuheben. Die Mikroskopie allein kann diesen Aufgaben jedoch nicht gerecht werden, weshalb ein dringender Bedarf an alternativen Methoden besteht, um die derzeitigen Nachteile zu überwinden und eine rechtlich einheitliche Futtermitteluntersuchung sowie Strafverfolgung zu ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Identifizierung potentieller tierischer Marker, welche über Resistenzen gegenüber hohen Temperaturen und mechanischen Kräften verfügen, um die gesetzlich vorgeschriebenen Behandlungen in Tierkörperbeseitigungsanlagen zu überstehen. Desweiteren wurden das Vorhandensein ausreichender Mengen im tierischen Organismus sowie die Abgrenzbarkeit zu anderen Spezies bzw. Speziesgruppen anhand von Sequenzunterschieden gefordert. Anhand dieser Anforderungen wurden mehrere potentielle Marker identifiziert. Exemplarisch für das hitzestabile Knochenprotein Osteocalcin (OC) wurden verschiedene Detektionssysteme für den speziesspezifischen Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln entwickelt.

Um dies zu realisieren wurden, ausgehend von Sequenzdatenanalysen, speziell gegen bovines OC gerichtete sequenzspezifische polyklonale Antikörper (pAK) generiert und auf ihre Eignung getestet. Das durch Vortests ermittelte beste Serum wurde durch Affinitätschromatographie monospezifisch gereinigt. Anschließend wurde der pAK mit Streptavidin konjugiert und die spezifische Reaktivität gegen bovines Osteocalcin im Western Blot überprüft. In Verbindung mit einem kommerziellen gegen Osteocalcin gerichteten monoklonalen Antikörper wurde daraufhin zunächst ein Sandwich-ELISA entwickelt und validiert. Die Ergebnisse demonstrieren, dass OC ein vielversprechendes Gewebemarkerprotein für eine empfindliche immunologische Detektion tierischer Proteine in zusammengesetzten Futtermitteln ist. Dabei besticht der entwickelte Sandwich-ELISA durch eine exzellente Selektivität für BFKM, nämlich 0,1 % sowohl in pflanzlichen Futtermitteln als

auch in Fischmehl, bei einer Sensitivität von 1 ng Osteocalcin. Darüber hinaus wurde die Anwendbarkeit anhand reeller Proben getestet, wobei selbst ein BFKM als positiv getestet werden konnte, welches bei 145 °C behandelt wurde. Um die Spezifität zu beurteilen, wurden Extrakte nativer Knochen der wichtigsten Nutztiere sowie Ei- und Milcheiweiß als auch pflanzliche FM untersucht. Dabei wurden - erwartungsgemäß - die stärksten Signale für Rinder- und Pferdeknöchelextrakte detektiert, wobei die Kreuzreaktion auf identischen OC-Sequenzen basiert und, aufgrund der minderen Bedeutung equiner Bestandteile in Futtermitteln, als belanglos eingeschätzt wird.

Auf den Sandwich-ELISA aufbauend wurde eine weitere Strategie für den sequenzspezifischen Osteocalcin-Nachweis entwickelt, bei der die immunologische Detektion mittels Signal-Amplifikation in einer real-time PCR visualisiert wurde. Diese sogenannte real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) wird bereits in anderen Bereichen der Protein-Analytik erfolgreich für die ultra-sensitive Detektion angewandt. In der vorliegenden Arbeit sollte verifiziert werden, ob mittels RT-iPCR eine höhere Sensitivität der Detektion bovines Osteocalcins im Vergleich zu dem entwickelten Sandwich-ELISA erreicht werden könnte. Da der Detektions-AK mit Streptavidin konjugiert wurde, konnte eine Kopplung mit biotinylierten DNA-Molekülen realisiert werden. Die gebundene DNA wurde anschließend mittels RT-PCR amplifiziert und so das Vorhandensein des Antigens detektiert. Mit der entwickelten RT-iPCR lässt sich bovines OC sequenzspezifisch ab einer Konzentration von 10 ng/ml nachweisen bei einer Selektivität von 0,1 % BFKM in Futtermitteln. Dabei konnte die Sensitivität, die bei dem entwickelten Sandwich-ELISA erreicht wurde, nicht verbessert werden. Dies begründet sich insbesondere in dem starken Hintergrundsignal, welches allerdings bekanntermaßen für die RT-iPCR unvermeidbar ist und aussagekräftige Ergebnisse erschwert (Niemeyer *et al.* 2005). Dabei bedingen die einzelnen Schritte der RT-iPCR einen erheblichen Mehraufwand, verglichen mit dem ELISA-Verfahren. Vorteile liegen aber darin, dass theoretisch jede Antigen-Antikörper-Bindung mit derselben DNA nachgewiesen werden könnte, wobei bei einer Erweiterung der Anwendung kein zusätzliches PCR-System entwickelt werden müsste. Außerdem könnte beispielsweise eine direkte AK-DNA-Konjugation zu geringeren Hintergrundsignalen und somit einer Verbesserung der Sensitivität führen und gleichzeitig anwenderfreundlicher sein, da ein zusätzlicher Inkubationsschritt entfallen würde.

Abschließend wurde untersucht, ob es mit Hilfe von Phage-Display-Methoden möglich ist, *in vitro* ein immunologisches Detektionssystem für den Nachweis des Knochenproteins Osteocalcin zu generieren, ohne dabei auf die Immunisierung von Tieren zurückgreifen zu müssen. Dafür wurde, ausgehend von einer Sequenzanalyse, die Aminosäuresequenz 16-22 bovines Osteocalcins als Zielsequenz für die Isolierung spezifisch bindender Phagen gewählt, da der Nachweis dieser Sequenz es ermöglichen könnte, auch zwischen Rind und Pferd zu differenzieren. Anhand der DNA-Sequenzierung einzelner Phagen mit positiver

Bindungsaffinität gegen bovines OC konnte anschließend das interagierende Peptid charakterisiert und synthetisiert werden. Durch den Einsatz einzelner Phagenklone in einem direkten ELISA war es möglich, reines bovines Osteocalcin zu detektieren. Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, ein Detektionssystem für den Nachweis bovines Osteocalcins mittels Phage-Display-Methoden zu generieren. Darüber hinaus konnten bovine Fleisch- und Knochenmehle, welche sogar bei 145 °C behandelt wurden, mit den isolierten Phagen detektiert werden. Das *in vitro* entwickelte Detektionsverfahren erlaubt somit nicht nur den Nachweis reinen Osteocalcins, sondern schafft auch die Voraussetzung für die Detektion hoch prozessierter Fleisch- und Knochenmehle, die sogar über den gesetzlich geforderten Temperaturen behandelt wurden. Die beschriebene *in vitro* Methode zur Herstellung spezifisch bindender Peptide könnte die Grundlage für ein vielseitiges Nachweisverfahren für die Sicherstellung des Verfütterungsverbots darstellen.

Die Validierungsergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass OC ein vielversprechendes Gewebemarkerprotein für eine empfindliche immunologische Detektion von FKM in zusammengesetzten Futtermitteln oder Fischmehlen ist. Erstmals wurde der sequenzspezifische Nachweis bovines Osteocalcins in Fleisch- und Knochenmehlen demonstriert, wobei selbst umweltbedingte Kontaminanten von Knochenfragmenten, z.B. von Kaninchen, Ratten oder Mäusen einfach aufgrund der ausgeprägten Sequenzunterschiede von bovinem Osteocalcin diskriminiert werden können. Ebenfalls bietet das entwickelte Verfahren die Möglichkeit der quantitativen Analyse unbekannter Proben, basierend auf einer Standardkurve, die mittels kommerziell erhältlichem bovinem Osteocalcin generiert wird. Der hier beschriebene Osteocalcin-Assay könnte die Grundlage für ein validiertes Nachweisverfahren als Werkzeug für die Sicherstellung und Überprüfung der Einhaltung des Verfütterungsverbots werden und somit die bisher bestehenden Nachteile der Mikroskopie und des BSE-Monitorings überwinden. Dabei wäre auch ein direkter Einsatz in der mikroskopischen Untersuchung denkbar, wofür der spezifisch gegen bovines Osteocalcin gerichtete Antikörper beispielsweise fluoreszenzmarkiert werden könnte. Auch ein immunhistochemischer Nachweis, bei dem das Antigen anhand von sichtbaren Reaktionsprodukten, die bei der Spaltung eines farblosen Substrats durch an Antikörper gekoppelte Enzyme entstehen, unter dem Mikroskop sichtbar gemacht wird, könnte eine Verbesserung der mikroskopischen Untersuchung bewirken. Darüber hinaus könnte die Epitop-spezifische Vorgehensweise auch auf andere Spezies und Sequenzen bzw. andere potentielle Markerproteine übertragen werden und so zu einer Verbesserung der Bekämpfung der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien führen.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

### **Grit Kreuz: Identifizierung und Nachweis von tier- und gewebespezifischen Markern in tierischen Nebenprodukten und Futtermitteln zur Eindämmung der Übertragung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE)**

In der vorliegenden Arbeit werden neue analytische Methoden für den Nachweis von tierischen Proteinen in Nebenprodukten und Futtermitteln beschrieben. Aufgrund der Durchsetzbarkeit von Rechtsvorschriften zur Bekämpfung der transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE) der Europäischen Union und hinsichtlich geplanter Lockerungen dieser bedarf es dringend der Entwicklung speziesspezifischer Nachweismethoden, um insbesondere den Eintrag bovinen Materials in die Futtermittelkette zu verhindern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung immunologischer Methoden zum speziesspezifischen Nachweis prozessierter tierischer Proteine in Futtermitteln als Alternativmethoden zur Mikroskopie. Dafür wurden zunächst verschiedene mögliche Gewebemarker tierischen Ursprungs identifiziert und auf ihre potentielle Eignung anhand von Sequenzvergleichen und Literaturrecherchen überprüft. Aufgrund der extremen Stabilität und Hitzeresistenz, der artspezifischen Sequenzunterschiede und des reichlichen Vorhandenseins in Fleisch- und Knochenmehlen hat sich dabei das Knochenprotein Osteocalcin als besonders geeignet erwiesen und wurde daher als Zielprotein für die zu entwickelnden Nachweissysteme ausgewählt.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung und Optimierung eines Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), welcher die Detektion bovinen Materials ermöglichen sollte. Um dabei die Assay-Spezifität auf Rinder zu beschränken, wurden sowohl speziesspezifische als auch sequenzspezifische polyklonale Antikörper gegen bovines Osteocalcin generiert und auf ihre Eignung getestet. In Verbindung mit einem kommerziellen gegen Osteocalcin gerichteten monoklonalen Antikörper konnte daraufhin ein Sandwich-ELISA für den Nachweis bovinen Osteocalcins entwickelt werden.

Auf die Methodik des ausgearbeiteten ELISA aufbauend sollte hiernach eine real-time-immuno-PCR (RT-iPCR) als weitere Strategie für den sequenzspezifischen Osteocalcin-nachweis entwickelt werden. Dabei sollte verifiziert werden, ob eine höhere Sensitivität der Detektion bovinen Osteocalcins im Vergleich zu dem entwickelten Sandwich-ELISA erreicht werden könnte.

Abschließend wurde untersucht, inwiefern ein immunologisches Detektionssystem für bovines Osteocalcin mittels Phage-Display-Methoden generierbar ist. Dafür wurde, ausgehend von einer Sequenzanalyse, eine spezifische Aminosäuresequenz bovinen Osteocalcins für die Isolierung spezifisch bindender Phagen gewählt. Isolierte Phagen mit positiver Bindungsaffinität gegen bovines Osteocalcin konnten dann in einem ELISA zum

Nachweis bovinen Osteocalcins eingesetzt und anhand einer DNA-Sequenzierung das interagierende Peptid charakterisiert werden.

Nach der Optimierung einzelner Arbeitsschritte wurde die Leistungsfähigkeit für die genannten Systeme untersucht. Dabei wurden die Möglichkeiten und Grenzen der entwickelten Nachweismethoden anhand von Referenzmaterialien und handelsüblichen Proben aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der entwickelte ELISA, als auch die RT-iPCR den Nachweis bovinen Osteocalcins mit einer Sensitivität von 1 ng Osteocalcin bei ausgeprägter Spezifität ermöglichen. Für beide Systeme konnte außerdem eine bemerkenswerte Nachweisgrenze von 0,1 % bovines Fleisch- und Knochenmehls in pflanzlichen Futtermitteln ermittelt werden. Dabei wurde ein bovines Fleisch- und Knochenmehl genutzt, welches sogar bei 145 °C behandelt wurde, was über den gesetzlich festgelegten Forderungen liegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz einzelner *in vitro* selektierter Phagenklone in einem direkten ELISA sowohl reines bovines Osteocalcin, als auch ein hoch prozessiertes bovines Fleisch- und Knochenmehl detektiert werden konnte.

Die Ergebnisse belegen die Möglichkeit des speziesspezifischen, selektiven Nachweises von tierischen Proteinen in Futtermitteln, basierend auf bekannten Osteocalcinsequenzen. Der hier beschriebene Osteocalcin-Assay könnte die Grundlage für ein validiertes Nachweisverfahren als Werkzeug für die Sicherstellung und Überprüfung der Einhaltung des Verfütterungsverbots werden und somit zu einer Verbesserung der Bekämpfung der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien führen. Ein weitreichender Einsatz der entwickelten ELISA-Methode für den speziesspezifischen Nachweis tierischer Proteine in Futtermitteln anderer Spezies ist denkbar.

## VI. SUMMARY

### **Grit Kreuz: Identification and detection of animal- and tissue-specific marker in animal by-products and animal feed to reduce the transmission of transmissible spongiform encephalopathy (TSE)**

In this work, new analytical methods for the detection of animal proteins in animal feed and by-products are described. Due to the enforcement of legislation against transmissible spongiform encephalopathy (TSE) of the European Union and of the planned relaxation of this, it needs urgent development of species-specific detection methods, in particular to prevent the entry of bovine material in the feed chain.

The aim of this study was the development and validation of immunological methods for species-specific detection of processed animal proteins in feed as alternative methods of microscopy. Therefore, first a number of possible tissue markers of animal origin have been identified and tested for their potential suitability on the basis of sequence comparisons and literature searches. Due to the extreme stability and heat resistance, the species-specific differences in sequence and the abundant presence in meat and bone meal the bone protein osteocalcin has proved to be particularly suitable and was therefore selected as the target protein for the detection systems to be developed.

One focus of this work was the development and optimization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which should enable the detection of bovine material.

To limit the assay specificity on cattle, both species- and sequence-specific polyclonal antibodies have been generated against bovine osteocalcin and tested for their suitability. In combination with a commercial monoclonal antibody directed against osteocalcin a sandwich ELISA for the detection of bovine osteocalcin has been developed.

Based on the methodology of the elaborated ELISA, a real-time immuno-PCR (RT-iPCR) should be developed as another strategy for sequence-specific detection of osteocalcin. It should be verified whether a higher sensitivity of the osteocalcin-detection compared to the developed sandwich ELISA might be achieved.

Finally, it was investigated whether an immunological detection system for bovine osteocalcin is developable using phage display methodology. Therefore, based on a sequence analysis, a specific amino acid sequence of bovine osteocalcin was chosen for the isolation of specifically binding phage. Isolated phage with positive binding affinity against bovine osteocalcin were used in an ELISA for the detection of bovine osteocalcin and the interacting peptide was characterized by the use of DNA sequencing.

After optimization of individual work steps, the efficiency for those systems was verified. The possibilities and limitations of the developed detection methods based on reference materials and commercial samples were investigated. It could be demonstrated, that both the developed

ELISA, as well as the RT-iPCR enable the detection of bovine osteocalcin with a sensitivity of 1 ng osteocalcin with distinctive specificity. For both systems a remarkable detection limit of 0.1 % bovine meat and bone meal could be determined in plant feed. Therefore a bovine meat and bone meal was used, which was even treated at 145 °C, which is above the statutory requirements. Moreover, it was demonstrated that due to the use of individual *in vitro* selected phage clones in a direct ELISA both pure bovine osteocalcin, as well as a high processed bovine meat and bone meal could be detected.

The results demonstrate the possibility of species-specific, selective detection of animal proteins in animal feed, based on known osteocalcin sequences. The described osteocalcin assay could be the basis for a validated detection method for ensuring the compliance of the feed ban and therefore lead to an improvement in the fight against transmissible spongiform encephalopathy. A far-reaching application of the developed ELISA method for the species-specific detection of animal proteins in feed for other species is possible.

**VII. LITERATUR**

Adler, M. & Wacker, R. (2006) Maximale Nachweisempfindlichkeit für beliebige Zielverbindungen. *BIOSpektrum* 2/06:223-224

Adler, M., Wacker, R. & Niemeyer, C. M. (2008) Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *Analyst* 133:702-718

Aguzzi, A. & Calella, A. M. (2009) Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiological Reviews* 89:1105-1152

Ajie, H. O., Hauschka, P. V., Kaplan, I. R. & Sobel, H. (1991) Comparison of bone collagen and osteocalcin for determination of radiocarbon ages and paleodietary reconstruction. *Earth and Planetary Science Letters* 107:380-388

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (2010) Untersuchung von Lebensmitteln Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen. L 06.00-8

Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E. J., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R. E., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. M., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. & Wells, G. A. H. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382:779-788

Ansfield, M. (1994) Production of a Sensitive Immunoassay for Detection of Ruminant Proteins in Rendered Animal Material Heated to > 130 °C. *Food & Agricultural Immunology* 6:419-433

Arnold, M. & Wilesmith, J. (2003) Modelling studies on bovine spongiform encephalopathy occurrence to assist in the review of the over 30 months rule in Great Britain. *Proceedings of the Royal Society B* 270:2141-2145

Arnold, M. E. & Wilesmith, J. W. (2004) Estimation of the age-dependent risk of infection to BSE of dairy cattle in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine* 66:35-47

Arnold, M. E., Ryan, J. B. M., Konold, T., Simmons, M. M., Spencer, Y. I., Wear, A., Chaplin, M., Stack, M., Czub, S., Mueller, R., Webb, P. R., Davis, A., Spiropoulos, J., Holdaway, J., Hawkins, S. A. C., Austin, A. R. & Wells, G. A. H. (2007) Estimating the

temporal relationship between PrP<sup>Sc</sup> detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle. *Journal of General Virology* 88:3198-3208

Balkema-Buschmann, A., Eiden, M., Hoffmann, C., Kaatz, M., Ziegler, U., Keller, M. & Groschup, M. H. (2011 b) BSE infectivity in the absence of detectable PrP<sup>Sc</sup> accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle. *Journal of General Virology* 92:467-476

Balkema-Buschmann, A., Fast, C., Kaatz, M., Eiden, M., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hills, B. & Groschup, M. H. (2011 a) Pathogenesis of classical and atypical BSE in cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 102:112-117

Barletta, J. (2006) Applications of real-time immuno-polymerase chain reaction (rt-IPCR) for the rapid diagnoses of viral antigens and pathologic proteins. *Molecular Aspects of Medicine* 27:224-253

Barreca, D., Laganà, G., Ficarra, S., Tellone, E., Leuzzi, U., Magazù, S., Galtieri, A. & Bellocco, E. (2010) Anti-aggregation properties of trehalose on heat-induced secondary structure and conformation changes of bovine serum albumin. *Biophysical Chemistry* 147:146–152

Beekes, M. & McBride, P. A. (2007) The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Journal* 274:588-605

Berenbrink, M. (2010) Myoglobin's old and new clothes: from molecular structure to integrated function and evolution. *The Journal of Experimental Biology* 213:2711-2712

Béringue, V., Vilotte, J.-L. & Laude, H. (2008) Prion agent diversity and species barrier. *Veterinary Research* 39:47

Bhakdi, S. & Bohl, J. (2002) Prionen und der „BSE-Wahnsinn“: Eine kritische Bestandsaufnahme. *Deutsches Ärzteblatt* 99(17): A 1134–1137

Biacabe, A.-G., Laplanche, J.-L., Ryder, S. & Baron, T. (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO reports* 5(1):110-114

- Boix, A., Serano, F., Bellorini, S. & von Holst, C. (2004) Ruggedness study of immunoassays for processed animal proteins detection in feed: Neogen Reveal for Ruminant Feed Test System. European Commission, DG JRC-IRMM, Geel, Belgium GE/R/FSQ/03/2006/09/04
- Brownstein, M. J. (2004) PCR (Polymerase Chain Reaction). *Encyclopedia of Biochemical Chemistry* 3:208-2010
- Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G. & Fraser, H. (1994) Transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie to Mice: Strain Variation and the Species Barrier. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 343:405-411
- Buschmann, A. & Groschup, M. H. (2005) Highly bovine Spongiform Encephalopathy-Sensitive Transgenic Mice Confirm the Essential Restriction of Infectivity to the Nervous System in Clinically Diseased Cattle. *Journal of Infectious Diseases* 192:934-42
- Campbell, P. N. (1998) Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-Mad Cow Disease. *Medical Principles and Practice* 7:172-186
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S. & Caramelli, M. (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeld-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9):3065-3070
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P. & Sokol, R. J. (1992 a) Reliable Identification of Human Albumin in Ancient Bone Using ELISA and Monoclonal Antibodies. *American Journal of Physical Anthropology* 87:365-372
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K., Phillips, P. & Sokol, R. J. (1992 b) Detection of Blood Proteins in Ancient Human Bone using ELISA: a Comparative Study of the survival of IgG and Albumin. *International Journal of Osteoarchaeology* 2:103-107
- Chatzidaki, E. E. (2010) Bovine spongiform encephalopathy and Creutzfeld-Jakob's disease 15 years later, where do we stand? *Archives of Hellenic Medicine* 27(3):471-474
- Chen, F.-C., Hsieh, Y.-H.P. & Bridgman, R.C. (1998) Monoclonal Antibodies to Porcine Thermal-Stable Muscle Protein for Detection of Pork in Raw and Cooked Meats. *Journal of Food Science* 63(2):201-205

- Chen, F.-C., Hsieh, Y-H.P. & Bridgman, R.C. (2002) Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. *Meat Science* 62:405-412
- Collinge, J., Sidle, K. C. L., Meads, J., Ironside, J. & Hill, A. F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of „new variant“ CJD. *Nature* 383:685-690
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I. & Roberts, J. P. (2002) The Survival Of Organic Matter In Bone: A Review. *Archaeometry* 44(3):383–394
- Collins, M., Buckley, M., Grundy, H. H., Thomas-Oates, J., Wilson, J. & van Doorn, N. (2010) ZooMS: the collagen barcode and fingerprints. *Spectroscopy Europe* 22(2):6-10
- Collins, M.J., Gernaey, A.M., Nielsen-Marsh, C.M., Vermeer, C. & Westbroek, P. (2000) Slow rates of degradation of osteocalcin: Green light for fossil bone protein? *Geology* 28(12):1139–1142
- Comoy, E. E., Casalone, C., Lescoutra-Etcheagaray, N., Zanusso, G., Freire, S., Marcé, D., Auvré, F., Ruchoux, M.-M., Ferrari, S., Monaco, S., Salès, N., Caramelli, M., Leboulch, P., Brown, P., Lasmézas, C. I. & Deslys, J.-P. (2008) Atypical BSE (BASE) Transmitted from Asymptomatic Aging Cattle to a Primate. *PlosOne* 3(8):e3017
- Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. & Dower, W. J. (1990) Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(16):6378-6382
- Devlin, J. J., Panganiban, L. C. & Devlin, P. E. (1990) Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 249(4967):404-406
- d'Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagonistic des bacilles dysenterique. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 165:373-375
- Dowd, T.L., Rosen, J.F., Li, L. & Gundberg, C.M. (2003) The Three-Dimensional Structure of Bovine Calcium Ion-Bound Osteocalcin Using <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Biochemistry* 42:7769-7779
- Ducrot, C., Arnold, M., de Koeijer, A., Heim, D. & Calavas, D. (2008) Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Veterinary Research* 39:15

Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A. & Karsenty, G. (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452

Durchführungsbeschluss der Kommission vom 17. Juni 2011 zur Änderung der Entscheidung 2009/719/EG zur Ermächtigung bestimmter Mitgliedstaaten, ihr jährliches BSE-Überwachungsprogramm zu bearbeiten (2011/358/EU)

Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry Pergamon Press* 8:871-874

Entscheidung der Kommission vom 28. September 2009 zur Ermächtigung bestimmter Mitgliedstaaten, ihr jährliches BSE-Überwachungsprogramm zu überarbeiten (2009/719/EG)

Fiocchi, A., Restani, P. & Riva, E. (2000) Beef Allergy in Children. *Nutrition* 16(6):454-457

Fuentes, M. M., Palacios, R., Garcés, M. M., Caballero, M. L. & Moneo, I. (2004) Isolation and characterization of a heat-resistant beef allergen: myoglobin. *Allergy* 59:327-331

Fumière, O., Veys, P., Boix, A., von Holst, C., Baeten, V. & Berben, G. (2009) Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 13(S):59-70

Garcia, R.A., Rosentrater, K.A. & Flores, R.A. (2006) Characteristics of North American Meat and Bone Meal Relevant to the Development of Non-Feed Applications. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 22(5):729-736

Gašparič, M. B., Cankar, K., Žel, J. & Gruden, K. (2008) Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology* 8:26

Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M. & Anderson, R. M. (2002) The transmission dynamics of BSE and vCJD. *Comptes Rendus Biologies* 325:37-47

Gizzi, G. & von Holst, C. (2004) Determination of Processed Animal Proteins, Including Meat and Bone Meal, in Animal Feed. *Journal of AOAC International* 87(6):1334-1341

- Groschup, M. H., Selhorst, T., Buschmann, A., Mettenleiter, T. C. & Conraths, F. J. (2008) Bovine Spongiforme Enzephalopathie-gesundheitlicher Verbraucherschutz beginnt beim Tier. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 3:152-158
- Gundberg, C.M., Nieman, S.D., Abrams, S. & Rosen, H. (1998) Vitamin K Status and Bone Health: An Analysis of Methods for Determination of Undercarboxylated Osteocalcin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83(9):3258-3266
- Han, G. D., Matsuno, M., Ito, G., Ikeuchi, Y. & Suzuki, A. (2000) Meat Allergy: Investigation of Potential Allergenic Proteins in Beef. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64(9):1887-1895
- Hauschka, P. V., Lian, J. B. & Gallop, P. M. (1975) Direct identification of the calcium-binding amino acid,  $\gamma$ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(10):3925-3929
- Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E.C. & Gundberg, C.M. (1989) Osteocalcin and Matrix Gla Protein: Vitamin K-Dependent Proteins in Bone. *Physiological Reviews* 69(3):990-1047
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C. L., Gowland, I. & Collinge, J. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389:448-450
- Hoffmann, C., Eiden, M., Kaatz, M., Keller, M., Ziegler, U., Rogers, R., Hills, B., Balkema-Buschmann, A., van Keulen, L., Jacobs, J. G. & Groschup, M. H. (2011) BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Veterinary Research* 42:21
- Hoffmann, C., Ziegler, U., Buschmann, A., Weber, A., Kupfer, L., Oelschlegel, A., Hammerschmidt, B. & Groschup, M. H. (2007) Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology* 88:1048-1055
- Imran, M. & Mahmood, S. (2011) An overview of animal prion diseases. *Virology Journal* 8:493
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2002) Immunologie 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*

- Karanam, M. (2011) An improved protein extraction method for detecting ruminant material in feed using lateral flow device dipsticks. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 15(S1):25-29
- Kim, S.-H., Huang, T.-S., Seymour, T.A., Wei, C.-I., Kempf, S.C., Bridgman, C.R., Clemens, R.A. & An, H. (2004) Production of Monoclonal Antibody for the Detection of Meat and Bone Meal in Animal Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:7580-7585
- Kim, S.-H., Huang, T.-S., Seymour, T.A., Wei, C.-I., Kempf, S.C., Bridgman, C.R., Momcilovic, D., Clemens, R.A. & An, H. (2005) Development of Immunoassay for Detection of Meat and Bone Meal in Animal Feed. *Journal of Food Protection* 68(9):1860-1865
- Kotoura, S., Murakami-Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Miake, K., Sugiyama, M., Tanabe, S. & Narita, H. (2009) A Sandwich ELISA for the Determination of Beef Meat Content in Processed Foods. *Food Science and Technology Research* 15(6):613 – 618
- Kuczius, T., Becker, K., Karch, H. & Zhang, W. (2009) High sensitivity detection of the glial fibrillary acidic protein as indicator for TSE risk material in meat products using an immuno-PCR. *Molecular Nutrition and Food Research* 53(10):1329-1335
- Kupfer, L., Hinrichs, W. & Groschup, M. H. (2009) Prion Protein Misfolding. *Current Molecular Medicine* 9:826-835
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Laizé, V., Martel, P., Viegas, C.S.B., Price, P.A. & Cancela, M.L. (2005) Evolution of Matrix and Bone  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Proteins in Vertebrates. *Journal of Biological Chemistry* 280(29):26659-26668
- Lee, A.J., Hodges, S. & Eastell, R. (2000) Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry* 37:432-446
- Lewis, R. E. (2010) Overview of bovine spongiform encephalopathy and related events in Germany. *International Journal of Risk Assessment and Management* 14(½):121-132
- Lind, K. & Kubista, M. (2005) Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *Journal of Immunological Methods* 304:107-116

- Liu, X., Han, L., Veys, P., Baeten, V., Jiang, X. & Dardenne, P. (2011) An Overview of the Legislation and Light Microscopy for Detection of Processed Animal Proteins in Feeds. *Microscopy Research and Technique* 74(8):735-743
- Love, J.L. & Carey-Smith, G.V. (2004) Immunoassay Kit Used to Detect the Presence of Bovine Material in Processed Foods. *Journal of AOAC International* 87(5):1143-1147
- Macedo-Silva, A., Barbosa, S. F. C., Alkmin, M. G. A., Vaz, A. J., Shimokomaki, M. & Tenuta-Filho, A. (2000) Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Science* 56:189-192
- Manuelidis, L., Liu, Y. & mullins, B. (2009) Strain-specific Viral Properties of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) Are Encoded by the Agent and Not by Host Prion Protein. *Journal of Cellular Biochemistry* 106:220-231
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. & Brasaemle, D. L. (2006) The Phosphorylation of Serine 492 of Perilipin A Directs Lipid Droplet Fragmentation and Dispersion. *The Journal Of Biological Chemistry* 281(17):11901–11909
- Matissek, Schnepel & Steiner (1989) *Lebensmittelanalytik. Springer Verlag*
- Muldoon, M.T., Onisk, D.V., Brown, M.C. & Stave, J.W. (2004) Targets and methods for the detection of processed animal proteins in animal feedstuffs. *International Journal of Food Science and Technology* 39:851-861
- Myers, M.J., Yancy, H.F., Farrell, D.E., Washington, J.D., Deaver, C.M. & Frobish, R.A. (2007) Assessment of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Tests Marketed for Detection of Ruminant Proteins in Finished Feed. *Journal of Food Protection* 70(3):692-699
- Nelsestuen, G. L. & Suttie, J. W. (1973) The Mode of Action of Vitamin K. Isolation of a Peptide Containing the Vitamin K-Dependent Portion of Prothrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12):3366-3370
- New England BioLabs<sup>®</sup> Inc. Instruction Manual, Ph.D.<sup>™</sup> Phage Display Libraries Version 1.0

- Nielsen-Marsh, C.M., Richards, M.P., Hauschka, P.V., Thomas-Oates, J.E., Trinkaus, E., Pettitt, P.B., Karavanic, I., Poinar, H. & Collins, M.J. (2005) Osteocalcin protein sequences of Neanderthals and modern primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(12):4409-4413
- Niemeyer, C. M. & Blohm, D. (1996) Protein-Nachweis mit PCR (Immuno-PCR). *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* 44(5):481-482
- Niemeyer, C. M., Adler, M. & Wacker, R. (2005) Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *TRENDS in Biotechnology* 23(4):208-216
- Niemeyer, C. M., Adler, M. & Wacker, R. (2007) Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nature Protocols* 2(8):1918-1930
- Niemeyer, C. M., Adler, M., Pignataro, B., Lenhert, S., Gao, S., Chi, L., Fuchs, H. & Blohm, D. (1999) Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Research* 27(23):4553-4561
- Nishimoto, S.K., Waite, J.H., Nishimoto, M. & Kriwacki, R.W. (2003) Structure, Activity, and Distribution of Fish Osteocalcin. *Journal of Biological Chemistry* 278(14):11843-11848
- Okada, H., Iwamaru, Y., Iwamaru, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Murayama, Y., Mohri, S. & Yokoyama, T. (2011) Detection of Disease-Associated Prion Protein in the Posterior Portion of the Small Intestine Involving the Continuous Peyer's Patch in Cattle Orally Infected with Bovine Spongiform Encephalopathy Agent. *Transboundary and Emerging Diseases* 58:333-343
- Parmley, S. F. & Smith, G. P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: Affinity purification of target genes. *Gene* 73:305-318
- Pérez-Calvo, E., Castrillo, C., Baucells, M.D. & Guada, J.A. (2010) Effect of rendering on protein and fat quality of animal by-products. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94(5):e154-e163
- Prince Devadason, I., Thulasi, G. & Shanmugam, A. M. (2005) Determination of antiserum raised in rabbits and goats for serological identification of beef. *Journal of Food Science and Technology* 42(1):101-103

Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144

Prusiner, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522

Prusiner, S. B. (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13363-13383

Rao, Q. & Hsieh, Y-H.P. (2007) Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats. *Meat Science* 76:489-494

Redinbaugh, M. G., Turley, R.B. (1986) Adaptation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay for Use with Microtiter Plates and Sucrose Gradient Fractions. *Analytical Biochemistry* 153:267-271

Rodi, D. J. & Makowski, L. (1999) Phage-display technology - finding a needle in a vast molecular haystack. *Current Opinion in Biotechnology* 10:87-93

Rudy, W. & Dreusch, A. B. (2009) Problematik, Nachweis und neue Möglichkeiten für die Analyse versteckter Lebensmittelallergene. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 4(2):13-18

Russel, M., Linderoth, N. A. & Sali, A. (1997) Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene* 192:23–32

Sano, T., Smith, C. L. & Cantor, C. R. (1992) Immuno-PCR: Very Sensitive Antigen Detection by Means of Specific Antibody-DNA Conjugates. *Science* 258:120-122

Schmiedl, A. & Dübel, S. (2004) Rekombinante Antikörper & Phagen-Display. M. Wink (Hrsg.): *Molekulare Biotechnologie* Wiley-VCH

Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249(4967):386-390

Sidhu, S. S. (2000) Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11:610-616

- Sims, P. W., Vasser, M., Wong, W. L., Williams, P. M. & Meng, Y. G. (2000) Immunopolymerase Chain Reaction Using Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection. *Analytical Biochemistry* 281:230-232
- Smith, C. I., Craig, O. E., Prigodich, R. V., Nielsen-Marsh, C. M., Jans, M. M. E., Vermeer, C. & Collins, M. J. (2005) Diagenesis and survival of osteocalcin in archaeological bone. *Journal of Archaeological Science* 32:105-113
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 150:76-85
- Souza, S. C., Moitoso de Vargas, L., Yamamoto, M. T., Lien, P., Franciosa, M. D., Moss, L. G. & Greenberg, A. S. (1998) Overexpression of Perilipin A and B Blocks the Ability of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  to Increase Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal Of Biological Chemistry* 273(38):24665–24669
- Statistisches Bundesamt (2008) Vom Erzeuger zum Verbraucher, Fleischversorgung in Deutschland. [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- Tornberg, E. (2005) Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science* 70:493–508
- Twort, F. W. (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* 1241-1243
- Ulrich, M.M.W., Perizonius, W.R.K., Spoor, C.F., Sandberg, P. & Vermeer, C. (1987) Extraction Of Osteocalcin From Fossil Bones And Teeth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 149(2):712-719
- Vaerman, J. L., Saussoy, P. & Ingargiola, I. (2004) Evaluation of real-time PCR data. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 212-214
- Valasek, M. A. & Repa, J. J. (2005) The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29:151-159
- van Keulen, L. J. M., Bossers, A. & van Zijderveld, F. (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Veterinary Research* 39:24

Vermeer, C., Soute, B.A.M., Hendrix, H. & de Boer-van den Berg, M.A.G. (1984) Decarboxylated bone Gla-protein as a substrate for hepatic vitamin K-dependent carboxylase. *Federation of European Biochemical Societies* 165(1):16-20

Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 Des europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002

Verordnung (EG) Nr. 152/2009 Der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln

Verordnung (EG) Nr. 163/2009 Der Kommission vom 26. Februar 2009 zur Änderung des Anhangs IV der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien

Verordnung (EG) Nr. 357/2008 Der Kommission vom 22. April 2008 zur Änderung von Anhang V der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien

Verordnung (EG) Nr. 956/2008 Der Kommission vom 29. September 2008 zur Änderung von Anhang IV der Verordnung (EG) Nr. 999/2001 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien

Verordnung (EG) Nr. 999/2001 Des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2001 mit Vorschriften zur Verhütung, Kontrolle und Tilgung bestimmter transmissibler spongiformer Enzephalopathien

von Holst, C., Boix, A., Baeten, V., Vancutsem, J. & Berben, G. (2006) Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods. *Food Additives and Contaminants* 23(3):252-264

Wang, S. F., Abouzied, M. M. & Smith, D. M. (1996) Proteins as Potential Endpoint Temperature Indicators for Ground Beef Patties. *Journal of Food Science* 61(1):5-7

Wang, Y., Sullivan, S., Trujillo, M., Lee, M.-J., Schneider, S. H., Brolin, R. E., Kang, Y. H., Werber, Y., Greenberg, A. S. & Fried, S. K. (2003) Perilipin Expression in Human Adipose Tissues: Effects of Severe Obesity, Gender, and Depot. *Obesity Research* 11(8):930-936

Wells, G. A. H., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M. & Bradley, R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record* 121:419-420

Wilesmith, J. W., Wells, G. A. H., Cranwell, M. P. & Ryan, J. B. M. (1988) Bovine spongiform encephalopathy: Epidemiological studies. *Veterinary Record* 123:638-644

Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. & Smith, P. G. (1996) A new variant of Creutzfeld-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921-25

Wilson, D. R. & Finlay, B. B. (1998) Phage display: Applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Canadian Journal of Microbiology* 44:313-329

Woessner, J. F. (1961) The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of this Imino Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 93:440-447

Zweiter Fahrplan für die TSE-Bekämpfung, KOM(2010)384, Brüssel, SEK(2010)899

Zytkowicz, T.H. & Nelsestuen, G.L. (1976)  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid Distribution. *Biochimica et Biophysica Acta* 444:344-348

## VIII. ANHANG

## 1. Proteine, Antikörper, Enzyme und biochemische Farbreagenzien

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
10x PCR Buffer II	Applied Biosystems (Darmstadt)
Absolute SYBR Green ROX Mix	Thermo Fisher Scientific (UK)
Amersham Low Range Rainbow Molecular Weight Marker	GE Healthcare (Freiburg)
Ampli Taq <sup>®</sup> Gold	Applied Biosystems (Darmstadt)
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA)
biotinyliertes HRP	Invitrogen Corporation (Camarillo, CA, USA)
bovines Osteocalcin (OC)	Merck Calbiochem (Darmstadt)
HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody	GE Healthcare (Freiburg)
Lightning-Link <sup>™</sup> HRP Konjugation Kit	Innova Biosciences (Cambridge, UK)
Lightning-Link <sup>™</sup> Streptavidin Konjugation Kit	Innova Biosciences (Cambridge, UK)
Maleimide-Activated HRP	Innova Biosciences (Cambridge, UK)
MgCl <sub>2</sub> Solution 25 mM	Applied Biosystems (Darmstadt)
OC4-30	Takara Bio Inc. (Otsu / Shiga, Japan)
Oligonukleotide	Applied Biosystems (Darmstadt)
Peroxidase-Conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	AnaSpec Inc. (San Jose, CA, USA)
Rinderserum Albumin Fraktion V	Merck (Darmstadt)
Streptavidin	Roche Applied Science (Mannheim)
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Entwickler)	Thermo Scientific
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Roche (New Jersey, USA)
TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin)	BioChemica, AppliChem (Darmstadt)

**2. Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Agarose für die Gelelektrophorese	Eurogentech (Köln)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Citronensäuremonohydrat	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck Calbiochem (Darmstadt)
Fluka Wasser	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
IPTG	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
KCl	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
Längenstandard (50 bp)	Roche Diagnostics (Mannheim)
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
Petrolether	Merck (Darmstadt)
Phenol	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
Polyethylenglycol 8'000	Fluka (Neu-Ulm)
ReadyRed <sup>®</sup>	MP Biomedicals North America (USA)
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1) 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt)
Select-Agar für die LB-haltigen Platten	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg)
Tetrazyklin	Molekula (UK)
Tris	Merck Calbiochem (Darmstadt)
Tween 20	Merck Calbiochem (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)
X-Gal	AppliChem GmbH (Darmstadt)

## 3. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Citratpuffer	210 mM Citronensäure-Monohydrat, 300 mM KOH, pH 3,95
Elutionspuffer	0,2 M Glycin-HCl (pH 2,2), 1 mg/ml BSA
Iodid Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 4 M NaI
IPTG/Xgal Stammlösung	1,25 g IPTG und 1 g Xgal in 25 ml DMF lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern
LB Medium	20 g LB in 1 Liter H <sub>2</sub> O bidest. lösen und autoklavieren
LB/IPTG/Xgal Platten	1 Liter LB-Medium + 15 g/l Agar, autoklavieren und abkühlen, 1 ml IPTG/Xgal-Stammlösung dazu geben und Platten gießen (bei 4 °C im Dunkeln lagern)
LB+Tetrazyklin-Platten	LB medium + 15 g/l Agar, autoklavieren und abkühlen, 1 ml Tetrazyklin dazu geben
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl (pH 9,1)
PBS-Tween 20 (PBST)	154 mM NaCl, 7,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 % Tween 20, pH 7,4
PEG/NaCl	20 % (w/v) Polyethylenglycol 8000, 2,5 M NaCl; autoklaviert
Phage Display-Blocking Puffer	0.1 M NaHCO <sub>3</sub> (pH 8.6), 5 mg/ml BSA, steril filtriert
TBS	50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl
TBST	TBS + 0,1 % Tween-20
Tetrazyklin-Stammlösung	20 mg/ml in 1:1 Ethanol:Wasser lösen und bei -20 °C lagern
TMB-Reagenz	0,13 g in 2,5 ml Aceton gelöst und auf 25ml mit Methanol aufgefüllt
Top Agar	20 g LB + 7 g Agarose in 1 Liter H <sub>2</sub> O bidest gelöst und autoklaviert

## 4. Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage	BP 2105	Sartorius (Göttingen)
Analysenwaage	PM2000	Mettler Waagen GmbH (Giessen)
Blotting-Einheit	Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Electrophoretic Tranfer Cell	Bio-Rad, Laboratories Inc. (München)
Brutschrank	Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH
Elektrophorese-Dokumentationssystem	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA)
Elektrophorese Power Supply	Elektrophorese Power Supply	CARL ROTH GMBH & CO. KG (Karlsruhe)
Elektrophoresekammer	Elektrophoresekammer	Catalys AG (Wallisellen, Schweiz)
Elektrophorese-Zelle	Mini Protean <sup>®</sup> Tetra-Cell	Bio-Rad, Laboratories Inc. (München)
ELISA Washer	Wellwash	Thermo Fisher Scientific
Gel-Dokumentation	GeneGenius Bio Imaging System	SYNGENE (Cambridge, UK)
Gradienten-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Imaging System	VersaDoc MP 4000	Bio-Rad, Laboratories Inc. (München)
Labor-Pipetten	Labor-Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer	RCT basic	Janke & Kunkel IKA <sup>®</sup> Labortechnik (Staufen)
Mikroplattenreader	Mithras LB 940	Berthold Tech. GMBH & Co. KG (Bad Wildbad)
Mikrowelle	Mikrowelle	Bosch automatic (Gerlingen)
pH-Meter	CG 837	Schott Geräte (Hofheim)
Real-Time PCR-Gerät	Mx3005P	Stratagene Agilent Techn.
Soxhlet-Extraktionsanlage	Soxtec <sup>™</sup> 1045	FOSS GmbH (Rellingen)
Spektralphotometer	NanoDrop <sup>®</sup> ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Stahl-Kugelmühle	TissueLyser (Qiagen, Cat. No. 85220)	Retsch GmbH (Haan)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischschüttler	Max Q 4450	Thermo Fisher Scientific
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA <sup>®</sup>
Wascher	Immuno Wash 8	Thermo Scientific Nunc <sup>™</sup> (Roskilde, Dänemark)
Zentrifuge	Heraeus Multifuge <sup>®</sup> 3S + /3SR +	Thermo Scientific (Schwerte)
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Thermo Scientific

## 5. Software

Programm	Hersteller
ABI Primer Express®	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Chromas lite 2.01	Technelysium Pty Ltd
Gene Snap	SYNGENE (Cambridge, UK)
Mikrosoft® Office	Mikrosoft Corporation (Redmont, USA)
MultAlin	Florence Corpet
MXPro 4.0	Stratagene
Quantity One®	Bio-Rad Laboratories

## 6. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typenbezeichnung	Hersteller
96-Well PCR-Platte	96-Well optical Reaction Plate (code 128)	ABI PRISM™
96-Well Verschlussfolie	ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems (Darmstadt)
Falconröhrchen	Falcon™ -Röhrchen	Nerbe-Plus (Winsen an der Luhe)
Immunoröhrchen	Immuno™ Röhrchen	Nunc™ (Dänemark)
Laborhandschuhe	Laborhandschuhe	Kimberly-clark (Mainz)
Mikrotiterplatte	Maxisorp	Nunc™ (Dänemark)
Mikrotiterstreifen	NucleoLink™ Strips	Nunc™ (Dänemark)
Mikrozentrifugengefäße	Mikrozentrifugengefäße	Eppendorf (Hamburg)
Nitrocellulosemembran	Amersham™ Hybond™ -ECL	GE Healthcare
Parafilm	Parafilm	Amer. Can Company (Greenwich, USA)
PCR-Reaktionsgefäße	PCR-Tubes 0,2 ml	Thermo Scientific (Schwerte)
Petrischalen	Petrischalen (steril)	Becton Dickinson Labware Franklin Lake (USA)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen	Axygen Biosciences
Säulen zur DNA-Aufreinigung	illustra MicroSpin™S-300HR Säulen	GE Healthcare (München)
Ultrafiltrationsröhrchen	Amicon® Ultra Zentrifugal-Filter Ultracel-3K	Millipore (Irland)

**IX. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS**

*Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:*

Kreuz, G., Zagon, J., Broll, H., Bernhardt, C., Linke, B., Lampen, A. (2012) Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: a novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29(5):716-26

Kreuz, G., Zagon, J., Broll, H., Lampen, A. (2011) Entwicklung und Validierung einer immuno-RT-PCR zur Detektion von bovinem Osteocalcin. Veröffentlicht bei dem 40. Deutschen Lebensmittelchemikertag (GDCh, 12.-14. September 2011 in Halle) (Poster)

### X. DANKSAGUNG

Mein Dank geht im Besonderen an Frau Dr. Jutta Zagon, die mich während meines Schaffens mit ihrem umfangreichen Wissen unterstützt hat und mir in jeglicher Hinsicht zur Seite stand. Desweiteren möchte ich mich bei Almuth Spiegelberg, Almuth Leffke, Bettina Linke, Sandra Stempin und Hermann Broll für die Unterstützung und die schöne Zeit bedanken. Herrn Prof. Dr. Stenzel und Frau Bettina Sahrada danke ich für die Unterstützung in Hinblick auf die Hydroxyprolinbewertung. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Lampen für die mir gegebene Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Lebensmittelsicherheit am Bundesinstitut für Risikobewertung anzufertigen sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek für die Betreuung an der Freien Universität Berlin.

Mein unendlicher Dank geht selbstverständlich an meine beiden Schwestern Gudrun und Gesine sowie an meinen Freund Markus – ihr wisst wofür.

**XI. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

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 17.07.2012

Grit Kreuz