

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Grundlagen der Proteinchemie

2.1.1 Aufbau, Struktur, Bindungen von Proteinen

Der immunologische Tierartennachweis erfolgt über die Bestimmung speziesspezifischer Antigene im Probenmaterial. In der Regel handelt es sich bei diesen Antigenen um Proteine. Proteine sind komplex aufgebaute Makromoleküle, die aus einer oder mehreren Peptidketten bestehen und zu denen auch nicht-proteinartige Anteile hinzutreten können, wie z. B. bei Glyko- und Lipoproteinen (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998).

Primärstruktur:

Die Peptidketten bestehen aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Zwanzig proteinogene Aminosäuren dienen quasi allen Lebewesen zum Aufbau von Proteinen. Die Reihenfolge der Aminosäuren in einer Polypeptidkette wird als Primärstruktur bezeichnet.

Sekundärstruktur:

Die Aminosäuresequenz gibt keine sichere Informationen über den räumlichen Aufbau, die Konformation, eines Proteins, die Voraussetzung für seine biologische Funktion ist. Die Peptidketten liegen nicht zufällig aufgekäuelt vor, sondern sind durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in bestimmter Weise regelmäßig gefaltet. Je nach Art der Auffaltung werden diese Strukturen als α -Helix, β -Faltblatt, Haarnadelbiegung oder Zufallskette bezeichnet. Alle Kettenanordnungen erlauben eine optimale Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.

Tertiär- und Quartärstruktur:

Nach der Auffaltung der Peptidketten in der Sekundärstruktur kommt es bedingt durch die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffseitenketten der Aminosäuren des Proteins zu einer weiteren räumlichen Organisationsstufe, der Tertiärstruktur. Diese kann durch die Ausbildung von zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen oder Disulfidbrücken stabilisiert werden. Proteine mit Molekulargewichten über 100 kDa bestehen häufig aus Untereinheiten mit eigener Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur und treten zu einer Funktionseinheit zusammen. Dieser noch höhere Organisationsgrad wird als Quartärstruktur bezeichnet (KARLSON et al., 1994).

2.1.2 Denaturierung und Veränderung von Proteinstrukturen

Bei der Denaturierung wird durch tiefgreifende, meist irreversible Konformationsänderungen die charakteristische native Struktur der Polypeptidketten aufgehoben. Die spezifischen Bindungen werden gelöst. Dadurch dissoziieren die Untereinheiten, und die Tertiär- und Sekundärstruktur lösen sich auf. Die Primärstruktur wird dabei jedoch nicht zerstört.

Denaturierungsvorgänge können durch extreme pH-Werte, Hitzeeinwirkung, organische Lösungsmittel, bestimmte Salze, durch Guanidin und Harnstoff, Ultraschall oder hohen Druck ausgelöst werden. Hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken werden aufgehoben. Die Anordnung der Polypeptidketten erfolgt nun mehr zufällig. Hieraus ergibt sich eine Verminderung der Hydratation und Löslichkeit der Proteine, die zur Bildung von Koagulaten führen kann. Mit diesen tiefgreifenden Veränderungen verlieren die Proteine auch ihre biologische Aktivität (BEYER, 1998).

Der Temperaturbereich, in dem die Denaturierung der Sarkoplasmaproteine stattfindet, beginnt bereits bei 40 °C (HAMM, 1966), bei Temperaturen über 50 °C ist der größte Teil der Proteine unlöslich, und zwischen 50 °C und 70 °C kommt es zur stärksten Wärme-koagulation (GRAU, 1969). Die myofibrillären Proteine erfahren zwischen 40 °C und 50 °C die stärksten Veränderungen, die zu einer Verdichtung des Netzwerkes der Eiweißstrukturen führen. Diese Vorgänge sind bei etwa 60 °C nahezu abgeschlossen (FOEGEDING, 1988). Die Hitzedenaturierung des Myoglobins beginnt bei etwa 65 °C (HAMM, 1977).

2.1.3 Ausblick auf Epitopveränderungen

Darüber hinaus bewirkt die Denaturierung durch die Konformationsänderung der Proteine auch eine Veränderung der antigenen Eigenschaften. Nur ein Epitop auf der Oberfläche eines Antigenmoleküls ist für die Bindung des Antikörpers verantwortlich. Diese Epitope haben meist eine Größe von ca. 16 bis 20 Aminosäuren (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998), die bedingt durch die räumliche Auffaltung aus verschiedenen Abschnitten einer Polypeptidkette oder verschiedenen Untereinheiten eines Proteins stammen können. Daneben können aber auch kontinuierliche Epitope, die aus einer Peptidkette oder einem Segment bestehen, vorhanden sein. Ein Makromolekül kann wie ein Protein deshalb auf seiner Oberfläche eine Vielzahl von Epitopen besitzen und als polyvalentes Antigen im Organismus auch eine Vielzahl von Antikörpern induzieren.

Daraus wird deutlich, dass durch den Verlust der räumlichen Organisationsstruktur infolge einer Hitzedenaturierung viele Epitope zerstört werden. Das Maß der Zerstörung ist dabei unter anderem abhängig von der Höhe und Dauer der Temperatureinwirkung. Gleichzeitig können sich durch den Zerfall von Untereinheiten eines Proteins und Zufallsknäuelung auch neue Epitope ausbilden.

Die Antigenität der strukturell veränderten Proteine muß dabei aber nicht vollständig verloren gehen. So gelang die Herstellung von Antiseren mit Fleischextrakten, die teilweise bis auf 125 °C erhitzt worden waren (SINELL u. MENTZ, 1969; HAYDEN, 1981). Auch wurde vermutet, dass es zu einer relativen Anreicherung der mehr hitzeresistenten Muskelproteine bzw. Epitope kommt (SINELL, 1968). Die mit der Hitzedenaturierung von Proteinen einhergehende

Bildung eines Zufallsknäuels (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998) erklärt auch die Beobachtung, dass denaturierte Eiweiße oft immunologische Kreuzreaktionen zeigten (SINELL u. MENTZ, 1969; HAYDEN, 1981).

2.2 Grundlagen der Immunologie

2.2.1 Bedeutung, Aufbau und Funktionsprinzip des Immunsystems

Das Immunsystem ist ein diffuses Organ, das in den meisten Geweben des Organismus aktiv ist. Die Funktion des Immunsystems liegt im Schutz des Organismus vor fremden Zellen (z. B. Bakterien oder transformierte Körperzellen), anderen Krankheitserregern wie Viren oder vor fremden Molekülen. Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen, aber unspezifischen Abwehrsystem und einem Abwehrsystem, das zu einer adaptiven (spezifischen) molekularen und zellulären Immunantwort in der Lage ist.

Ersteres dient einer schnellen Reaktion auf eindringende Krankheitserreger. Im Mittelpunkt dieses Systems steht das Komplementsystem, das zur Lyse von Bakterien führen kann und außerdem die Aktivierung von polymorphkernigen Granulozyten bewirkt. Auch Makrophagen sind durch die Freisetzung von Zytokinen und durch Phagozytose an diesem Geschehen beteiligt (ZUBAY, 1993).

Das adaptive Immunsystem besteht aus einem zellulären und einem humoralen Anteil.

Der zelluläre Teil des adaptiven Immunsystems wird hauptsächlich durch die Lymphozyten gebildet. Diese sind durch ein kompliziertes Selektionsverfahren in der Lage, die Eliminierung körperfremder Substanzen gewissermaßen zu „erlernen“. Dadurch kann der Organismus auf eine außerordentlich große Zahl von Fremdstoffen spezifisch reagieren. Die Lymphozyten kommen in zwei Subtypen, den B- und den T-Lymphozyten, vor. Beide Subtypen besitzen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, mit denen sie Fremdstoffe hochspezifisch erkennen können. Die Lymphozyten müssen erst eine funktionelle Reifung von der Knochenmarkstammzelle hin zum B- bzw. T-Lymphozyten durchlaufen. Diese beginnt bei den T-Lymphozyten im Thymus und bei den B-Lymphozyten im Knochenmark (JANEWAY u. TRAVERS, 1995).

Bei der T-Zellreifung erfolgt zunächst eine starke Proliferation der Zellen. Es schließt sich die Differenzierung an, in deren Verlauf quantitativ und qualitativ unterschiedliche Oberflächenmoleküle exprimiert werden. Jeder T-Lymphozyt entwickelt dabei eine individuelle Struktur des T-Zellrezeptors. Auf diese Weise entsteht ein großes Repertoire von T-Lymphozyten, die jeweils ein Antigen spezifisch erkennen. Am Ende dieses Prozesses stehen im wesentlichen drei verschiedene T-Lymphozytentypen:

- Zytotoxische T-Lymphozyten, sie enthalten zytotoxische Proteine und können nach Erkennen eines Antigens gezielt Zellen, die im Zytosol Pathogene enthalten, zerstören.

- Inflammatorische T-Lymphozyten, sie bilden Zytokine, die Makrophagen aktivieren oder infizierte Zellen abtöten.
- T-Helfer-Lymphozyten, sie sind zur Aktivierung von B-Lymphozyten erforderlich.

Die Reifung der B-Lymphozyten erfolgt in mehreren Stufen, in deren Verlauf es auch hier zu Veränderungen der Oberflächenmoleküle kommt. Als Antigenrezeptor wird ein vollständiges Antikörpermolekül verwendet, das in der schweren Kette eine zusätzliche Domäne aufweist, über die es in der Zellmembran verankert ist. Die Aktivierung von B-Lymphozyten erfolgt durch die Bindung des Antigens an den Rezeptor. In Abhängigkeit von der Art des Antigens kann die B-Lymphozytenaktivierung aber auch erst nach Hinzutreten einer T-Helferzelle, die das gleiche Antigen erkannt hat, durch Freisetzung von Zytokinen erfolgen.

Eine weitere Differenzierung findet dann über das Centrozytenstadium in B-Gedächtniszellen und in Plasmazellen statt. Im Gegensatz zu den Plasmazellen können die Gedächtniszellen noch keine Antikörper sezernieren, sind dazu aber nach einem erneutem Kontakt mit dem Antigen sofort in der Lage (ABBAS et al., 1997).

Die sezernierten Antikörper wirken auf verschiedene Weise:

- Sie neutralisieren Krankheitserreger oder Toxine, indem sie die Oberfläche durch Bindung so verändern, dass sie nicht mehr in eine Zielzelle eindringen können.
- Sie machen durch Anbindung auf der Oberfläche von Krankheitserregern diese auch für phagozytierende Zellen kenntlich.
- Sie können zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen.

2.2.2 Antikörper und Antikörpervielfalt

Antikörper sind Proteine, die aus vier Peptidketten aufgebaut sind. Die Untereinheiten werden über nicht-kovalente Bindungen und Disulfidbrücken zusammengehalten. Die Peptidketten werden aufgrund ihres Molekulargewichtes in leichte und schwere Ketten unterteilt. Das Molekül hat y-förmige Gestalt, wobei die kurzen Schenkel durch einen Teil je einer schweren Kette und durch eine leichte Kette gebildet werden. Zudem wird zwischen einem variablen und einem konstanten Abschnitt der leichten und der schweren Peptidkette unterschieden. Der variable Teil befindet sich am Ende der kurzen Schenkel (Fab-Fragment) und ist für die Bindung des Antigens verantwortlich. Der lange Schenkel (Fc-Fragment) wird aus einem Teil des konstanten Abschnitts der schweren Ketten gebildet. Durch Unterschiede im Bereich des Fc-Fragmentes lassen sich die Antikörper in fünf Typen klassifizieren (ROITT et al., 1991):

IgG Sie neutralisieren Toxine und Krankheitserreger bzw. verbessern deren Phagozytose.

- IgA Sie befinden sich vor allem im Schleim der Schleimhäute und verhindern die Anlagerung von Bakterien oder Toxinen an die Schleimhautepithelien.
- IgE Sie werden durch Mastzellen gebunden, die spezifische IgE-Rezeptoren haben, und führen zur Freisetzung von vasoaktiven Aminen, Prostaglandinen und Leukotrienen.
- IgM Sie liegen als Pentamere vor, agglutinieren stark und wirken als stärkster Aktivator des Komplementsystems.
- IgD Die genaue Funktion dieses Antikörpers, der nur in geringer Konzentration vorliegt, ist noch unbekannt.

Die Variabilität der möglichen Antikörper und B-Zellrezeptoren wird auf $10^7 - 10^8$ geschätzt (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998). ABBAS et al. (1997) gehen sogar von 10^9 bis 10^{11} möglichen Varianten aus. Die Bindung des Antigens erfolgt in einem trichterförmigen Spalt in der variablen Domäne der leichten und schweren Peptidketten des Antikörpers. Die Wand dieses Spaltes wird durch Aminosäuren gebildet, deren Kodierung in der DNA eine besonders hohe Mutationsrate aufweist. Die Mutationen in den variablen Abschnitten sind nicht gleichmäßig verteilt, sondern zeigen Bereiche von Hypervariabilität. Bei den leichten Ketten finden sich in ca. 25 von 110 Aminosäurepositionen im variablen Teil hypervariable Regionen, bei den schweren Ketten in ca. 30 von 120 Positionen. Da jeder B-Lymphozyt in der Lage ist, nur einen identischen Antikörper zu bilden, erfolgt die Umlagerung der embryonalen Gene bereits während der Reifung der Stammzellen im Knochenmark zum B-Lymphozyten. Die genetische Information für den variablen und konstanten Abschnitt der leichten und schweren Ketten liegt auf verschiedenen Genen (JANEWAY u. TRAVERS, 1995). Die Umlagerung erfolgt durch Deletion von DNA-Abschnitten. Der variable Teil der leichten Kette wird durch drei Segmente kodiert. Die Leadersequenz steht der Sequenz für die variable Region voran. Sie kodiert das Signalpeptid, das während der Kettenbiosynthese wieder abgespalten wird. Ihr folgt eine von ca. 100 bis 200 verschiedenen variablen Regionssequenzen. Die letzten Aminosäuren des variablen Kettenteils, der die Verbindung zum konstanten Kettenabschnitt herstellt, werden durch die sogenannte J-Sequenz codiert. Die fünf verschiedenen J-Sequenzen ergeben mit den ca. 100 verschiedenen variablen Regionssequenzen bis zu 500 verschiedene Gene für die variable Region der leichten Peptidkette. Die Kodierung der variablen Region der schweren Kette erfolgt in ähnlicher Weise. Zwischen der Sequenz für den variablen Abschnitt und der J-Sequenz befindet sich jedoch noch eine D-Sequenz. Sie codiert ca. 10 Aminosäuren. Die 50 verschiedenen D-Sequenzen ergeben mit den ca. 100 verschiedenen variablen Sequenzen und den 6 J-Sequenzen 30.000 verschiedene Genkombinationen für den variablen Abschnitt der schweren Ketten. Darüber hinaus können durch Kreuzungspunktvariationen in jedem einzelnen Bereich Hunderttausende von Genkombinationen gebildet werden. Auf diese

Weise entsteht die Vielfalt der Antikörper, sogar solcher, die gegen künstliche, in der Natur nicht vorkommende Antigene gerichtet sind (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998).

2.2.3 Wechselwirkungen von Antikörper und Antigen

Der Grund, dass Antigen und Antikörper miteinander reagieren, liegt in der Komplementarität von Epitop und Bindungsstelle. Antikörper erkennen normalerweise Epitope auf der Oberfläche eines Proteins. Im Inneren des Moleküls versteckte Peptidsegmente werden nicht erkannt, es sei denn, mit ihnen wurde immunisiert. Obwohl die Oberfläche nativer Proteine viele potentielle Epitope enthalten kann, scheint nur eine geringe Zahl von Epitopen immundominant zu sein. Wahrscheinlich hängt die Antigenität eines Epitops von dessen Erreichbarkeit für den Antikörper auf der Oberfläche des Antigens ab. Von großer Bedeutung für die Antigenität eines Moleküls ist auch dessen Größe. Um als Antigen zu wirken, muß ein Molekül eine Masse von mindestens 4 kDa haben. Ein gut wirksames Antigen besitzt in der Regel eine Masse von mehr als 10 kDa und ein hochpotentes Antigen von über 100 kDa. Kleinere Moleküle (Haptene) wirken erst nach der Bindung an eine größere Trägersubstanz als Antigen (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998).

Durch die Komplementarität der interagierenden Moleküle wird gewährleistet, dass ausreichend große Regionen für die nur über kurze Strecken wirksamen Bindungskräfte zusammenkommen. Folgende Bindungskräfte sind an der Reaktion zwischen Epitop und Antikörper beteiligt (KLEIN, 1991):

Wasserstoffbrückenbindungen stellen die stärkste Bindungsvariante dar. Dabei handelt es sich um elektrostatische Anziehungskräfte, die zwischen einem Wasserstoffatom, das an ein stark elektronegatives Atom kovalent gebunden ist und dadurch positiv polarisiert wird, und einem weiteren elektronegativen Atom wirken. Die Bindungsenergie beträgt ca. 10 % einer einfachen kovalenten Bindung.

Die hydrophoben Wechselwirkungen treten zwischen unpolaren, hydrophoben Bereichen eines oder mehrerer Moleküle auf. Die polarisierten Wassermoleküle sind sehr kohäsiv, so dass unpolare Moleküle Raum einnehmen, die Wassermoleküle trennen und so eine energetisch ungünstige Situation entsteht. Apolare Moleküle werden durch das Bestreben der Wassermoleküle, ihre Kohäsion zu bewahren, zusammengezwungen.

Die Van der Waals-Kräfte entstehen durch die ständige Bewegung der Elektronen, die zur kurzfristigen Dipolbildung von Atomen führen, und es so zur Anziehung zwischen zwei schnell fluktuierenden Dipolen kommen kann. Sie stellen die schwächste Bindungsform, die an der Antigen-Antikörperreaktion beteiligt ist, dar.

Durch die Komplementarität und die auftretenden Bindungskräfte wird die unterschiedliche Spezifität und Affinität der Antikörper bedingt (KLEIN, 1991). Selbst ein hochgereinigtes Antigen führt im Organismus immer zur Bildung eines polyklonalen Antiserums mit vielen

verschiedenen Antikörpern, die eine unterschiedliche Spezifität und Affinität zum Antigen aufweisen. Die unterschiedliche Spezifität von Antikörpern wird durch Konformationsänderungen der Bindungsstelle, bedingt durch die genetische Variabilität während des Reifungsprozesses der B-Lymphozyten, hervorgerufen. Genetische Veränderungen, die nicht zu einer Konformationsänderung der Bindungsstelle, aber zu einer Ladungverschiebung in diesem Bereich führen, beeinflussen dagegen die Affinität des Antikörpers zum Antigen (ABBAS et al., 1997).

2.2.4 Hybridomatechnologie

KÖHLER und MILSTEIN etablierten 1975 eine Methode zur in vitro Produktion monoklonaler Antikörper mit genau definierter Spezifität und Affinität. Grundlage dieser Methode ist die Immortalisation von antikörperbildenden Plasmazellen durch die Fusion mit Myelomzellen. Normale Plasmazellen sterben in der Zellkultur bereits nach wenigen Zellteilungen ab und eignen sich daher nicht für die in vitro Gewinnung von Antikörpern. Erst durch die Hybridisierung mit Myelomzellen konnten die Plasmazellen immortalisiert werden. Diese Myelomzellen weisen noch zwei weitere wichtige Eigenschaften auf. Sie produzieren selbst keine Antikörper oder Antikörperteile mehr und sie besitzen einen Enzymdefekt. Die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), die wichtig für den Purinstoffwechsel ist, wird von den Myelomzellen nicht mehr gebildet (MASSEYEFF et al., 1993). Dieser Enzymdefekt ermöglicht erst die Selektion von erwünschten Hybridzellen. Zur Gewinnung eines antikörperbildenden Hybridoms wird einer immunisierten Maus die Milz entnommen, homogenisiert und durch Zugabe eines Fusionsmediums mit Myelomzellen hybridisiert. Nichtfusionierte Plasmazellen sterben nach wenigen Zellteilungen. Die Myelomzellen würden jedoch in kurzer Zeit die Hybridzellen überwuchern, wenn deren Vermehrung nicht durch die Zugabe eines speziellen Selektionsmediums, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält, gehemmt wird. Durch das Aminopterin wird die endogene Purinsynthese gehemmt. Ein Ersatzstoffwechselweg über das HPRT-Enzym fehlt, und die Myelomzellen sterben ab. Die fusionierten Hybridzellen können jedoch Hypoxanthin und Thymidin aufnehmen und den Purinstoffwechsel aufrechterhalten. So können in der Zellkultur die Hybridzellen zu Klonen heranwachsen, und das Medium kann auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Antigen getestet werden. Positiv identifizierte Hybridome können durch Subklonierung stabilisiert und als antikörperbildende Klone etabliert werden (FRIEMEL, 1991).

Als entscheidender Vorteil dieser Hybridomatechnologie gilt, dass auf diese Weise hochgereinigte, standardisierte Antikörper auch gegen nicht gereinigte Antigene hergestellt werden können. Je komplexer das Antigengemisch zur Immunisierung der Maus ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, einen spezifischen monoklonalen Antikörper zu erhalten.

2.3 Immunologische Untersuchungsverfahren

Alle serologischen Untersuchungsverfahren beruhen auf der spezifischen Reaktion von Antikörpern mit entsprechenden Antigenen. Dieser ursprünglich biologische Teil eines Abwehrsystems körperfremder Substanzen kann für die immunchemische Identifizierung von verschiedenen Tierarten genutzt werden. Hierbei kommt es zu Reaktionen von Antigenen des Muskelfleisches (i. d. R. bestimmte Proteine) mit spezifischen Antikörpern aus der Zellkultur oder eines Serumspendertieres.

Die Antikörper können mit Oberflächenstrukturen (Epitopen) auf Antigenen in der Größenordnung eines Oligopeptids mit 15 bis 20 Aminosäureresten reagieren (LÖFFLER u. PETRIDES, 1998). Gegen solche Epitope wird aber nicht nur ein Antikörper gebildet, sondern eine Vielzahl verschiedener Antikörper aus verschiedenen Zelllinien, die sich in der Spezifität und der Affinität zum Epitop unterscheiden. Auf diese Weise entstehen polyklonale Antikörper. Die Verwendung polyklonaler Antikörper kann in einem Testsystem die Empfindlichkeit erhöhen, aber gleichzeitig auch die Spezifität durch Kreuzreaktionen verringern und zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Da jeder B-Lymphozyt nur einen bestimmten Antikörper produzieren kann, wäre es durch Selektion und Vermehrung eines B-Lymphozyten möglich, einen reinen, monoklonalen Antikörper mit spezifischen Eigenschaften zu gewinnen. Diese Art der Antikörpervermehrung gelang erstmalig KÖHLER und MILSTEIN (1975) durch die Fusion eines B-Lymphozyten mit einer Myelomzelle. Dieses Hybridom vereinigte die Fähigkeiten beider Zellen, unbegrenztes Wachstum und Bildung eines spezifischen Antikörpers, in einer Zelle. Dieses Verfahren ist finanziell und zeitlich sehr aufwendig, kann jedoch zu hochspezifischen Antikörpern führen, die in beliebiger Menge herstellbar und genügend haltbar sind. So können auch zu unterschiedlichen Zeiten an verschiedenen Orten konstante und reproduzierbare Untersuchungsergebnisse erzeugt werden, wie es bei der Verwendung von polyklonalen Antiseren aus Versuchstieren kaum möglich ist. Eine große Bedeutung für die Sensitivität und die Spezifität eines immunchemischen Verfahrens hat außerdem die Auswahl der Antigene bzw. der Antigenaufbereitungen sowohl zur Antikörpergewinnung (Immunisierung) als auch der Testantigene (Proben).

Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Antigenmaterial zur Immunisierung ist der Fleischsaft mit den Sarkoplasmproteinen als Gesamtextrakt, nur eine Proteinfraction daraus oder einzelner isolierter Proteine, wie z. B. das Myoglobin (HAYDEN, 1979). Darüber hinaus ist es von großer Wichtigkeit, ob es sich um rohes oder erhitztes Material handelt. Antiseren, die unter Verwendung von nativem Material hergestellt wurden, eignen sich nicht zum Nachweis von erhitztem Probenmaterial, weil bei einer Erhitzung auf ca. 70 °C die Fleischproteine weitgehend denaturiert sind. Mit Höhe der Temperatur und Dauer der Hitzedenaturierung geht ein Verlust von spezifischen Antigenen einher. Durch Verwendung von hitze-

behandelten Fleischproben zur Antigengewinnung können „Thermoantisera“ hergestellt werden, die auch den Nachweis der Tierart bei erhitzten Fleischproben noch ermöglichen (SINELL u. MENTZ, 1969). Die „Thermoantisera“ sind jedoch nicht zur Speziesidentifizierung von rohen Fleischproben geeignet, es sei denn, diese werden vor der Untersuchung einer Hitzebehandlung unterzogen.

2.3.1 Agargel-Präzipitations-Test

Vorläufer der Agargel-Präzipitation war die Ringpräzipitation, die von UHLENHUTH (1901) zum Nachweis des Fleisches von heimischen Tierarten eingeführt wurde. Dabei wurde eine antikörperhaltige Lösung in einem englumigen Röhrchen mit einer antigenhaltigen Probe vorsichtig überschichtet, so dass im Fall einer Antikörper-Antigenreaktion eine interfaciale Präzipitationsscheibe sichtbar wurde. Die Ringpräzipitation verlor aufgrund mangelnder Unterschiede im spezifischen Gewicht der Lösungen, durch Ausbleiben der Präzipitation oder durch trübe Probenextrakte zunehmend an Bedeutung und wurde von Präzipitationsreaktionen im Agargel abgelöst.

Bei der Durchführung von Präzipitationsreaktionen im Agargel bilden sich beim Zusammentreffen der frei beweglichen Antigen- und Antikörpermoleküle Immunaggregate, die aufgrund ihrer Größe in den Maschen des Gernetzes ausfallen. In der Zone optimaler Massenverhältnisse der Reaktanten bilden sich dabei deutliche Präzipitationslinien.

Nachdem OUDIN (1949) die eindimensionale Einfachdiffusion und OAKLEY u. FULTHORPE (1953) die eindimensionale Doppeldiffusion einführen, entwickelte OUCHTERLONY (1958, 1962) die nach ihm benannte zweidimensionale Doppeldiffusion. Bei dieser Methode wandern die Reaktionspartner aus verschiedenen Richtungen im Agargel aufeinander zu und reagieren und präzipitieren in einem ursprünglich reagentenfreien Gel. Die Präzipitationsbanden können zur Verdeutlichung mit Proteinfarbstoff angefärbt werden. Auch halbquantitative Aussagen sind nach Bestimmung des Eiweißgehaltes einer Probe und Herstellung von Verdünnungsreihen möglich (HOFMANN, 1997a).

Diese Methode wurde in zahlreichen Arbeiten zur immunologischen Tierartendifferenzierung verwendet. Sie unterscheidet sich dabei in der Auswahl und Aufbereitung des Antigenmaterials zur Immunisierung, des Probenmaterials, der Extraktionsverfahren und der verwendeten Tierarten zur Antiserumgewinnung.

So wurde z. B. zur Immunisierung von Kaninchen der mit einer 6 M Harnstofflösung gewonnene Extrakt einer auf 110 °C erhitzten Muskulatur eingesetzt (SINELL, 1968). In späteren Versuchen wurde die für 30 Minuten auf 70 °C erhitzte Muskulatur von Rind, Pferd bzw. Schwein verwendet, die lyophilisiert und mit 6 M Harnstofflösung extrahiert wurde (SINELL u. MENTZ, 1969). Die so gewonnenen Antiseren reagierten sogar noch mit auf 120 °C erhitzten Harnstoffextrakten, während Extrakte von Proben mit physiologischer

Kochsalzlösung negative Ergebnisse brachten. Bei Erhitzungsstufen über 100 °C waren die Ergebnisse jedoch nicht zweifelsfrei und für forensische Fragestellungen nicht heranzuziehen.

Mit rohem isolierten Hühner-Troponin als Antigen zur Serumherstellung gelang der Nachweis von bis zu 1% Hühnerfleisch in Testwürsten mit Schwein-, Rind- und Lammfleisch, die auf 70 °C erhitzt worden waren (HAYDEN, 1977). Später zeigte dieses Antiserum jedoch Kreuzreaktionen mit Rind. In einer weiteren Untersuchung mit isoliertem Myoglobin von Lamm, Schwein und Pferd, das für 15 Minuten auf 90 °C erhitzt worden war, ließen sich nur teilweise spezifisch reagierende Kaninchenantiseren herstellen (HAYDEN, 1979). Das Anti-Lamm-Serum zeigte Kreuzreaktionen mit Rindermuskulatur, und erst nach Absättigung ließen sich bis zur 3% Lamm in Rindfleisch nachweisen. Mit dem Anti-Schwein-Serum konnten in Fleischgemischen mit Rind Schweineanteile > 3% in rohen Proben und > 10% in erhitzten Proben ermittelt werden. Pferd wurde in Anteilen über 1% in erhitztem Rindfleisch wiedergefunden.

Die Verwendung von Schaf- bzw. Rinderserum als Immunisierungsantigen führte in Tests mit nativen Muskulatur-Barbiturat-Extrakten nur zu unspezifischen Reaktionen (MANZ, 1979). Erst nach Absättigung der Antiseren mit dem jeweiligen Schaf- bzw. Rinderserum konnten spezifische Reaktionen festgestellt werden. Schaf und Ziege ließen sich dabei jedoch nicht unterscheiden. Auch die Untersuchungen mit Hühner-Antiserum gegen Kaninchenserum bzw. Feldhasenserum mit Extrakten aus roher Kaninchen- bzw. Feldhasenmuskulatur brachte keine anderen Ergebnisse (MANZ, 1980). Erst nach Absorption der Antiseren mit den jeweiligen Antigenen konnten Kreuzreaktionen vermieden werden.

Extrakte aus autoklaviertem Nebennierenmaterial von Büffel, Rind, Schaf, Ziege und Schwein wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (SHERIKAR et al., 1988). Die so gewonnenen Antiseren brachten erst nach Absättigung befriedigende Ergebnisse und konnten in auf 70 °C und 121 °C erhitzten Fleischmischungen Fleischgehalte verschiedener Tierarten > 5% nachweisen. Die Immunisierung mit auf 70 °C erhitzten und mit physiologischer Kochsalzlösung extrahierten Antigenen von Büffel, Rind, Schwein, Schaf, Ziege und Geflügel brachte dagegen keine Antiseren für eine Tierartendifferenzierung bei auf 100 °C erhitzten Proben hervor (SHERIKAR et al., 1988).

Untersuchungen mit Antiseren, die durch Immunisierung mit Extrakten von roher (DOBERSTEIN u. GREUEL, 1992) und auf 60 bis 90 und 120 °C erhitzter (SEVERINI et al., 1986) Kängurumuskulatur gewonnen worden waren, führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während sich bei dem Antiserum gegen rohe Kängurumuskulatur im Test gegen verschiedene Nutz- und Wildtierarten (native Proben) keine Kreuzreaktionen zeigten, wies nur das Serum gegen Harnstoffextrakte aus erhitzter Kängurumuskulatur spezifische

Reaktionen mit einer Nachweisgrenze von 5% auf. Antiseren, die mit Bicarbonat- bzw. physiologischer Kochsalzlösung-Extrakten hergestellt wurden, waren dazu nicht in der Lage. Es gelang auch die Gewinnung eines spezifischen Antiserums zum Nachweis von Geflügel (Huhn und Pute) in Fleischerzeugnissen (BREHMER, 1998). Als Immunisierungsantigen diente ein Nativextrakt, der auf 70, 80 und 95 °C erhitzt und anschließend gepoolt wurde. Das Verfahren der doppelten Geldiffusion nach Ouchterlony wurde zum Nachweis von Proteinen in Fleischerzeugnissen in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (L.06.00-17(12/1988)) aufgenommen. Dieser Test ist jedoch nicht auf erhitzte Produkte anwendbar, da durch die Hitzedenaturierung die spezifischen Bindungsstellen zerstört werden, der Test dann falsch-negativ ausfällt und käufliche Thermoantiseren nicht zur Verfügung stehen (HOFMANN, 1997a).

2.3.2 Enzyme-linked-immunosorbent-Assay (ELISA)

Bei Enzymimmunoassays handelt es sich um immunologische Testverfahren, bei denen die Konzentration eines Analyten über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt wird. Als Analyt fungieren bei der Tierartenbestimmung speziesspezifische Antigene, die jedoch nicht direkt, sondern indirekt über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Der Nachweis solcher spezifischer Antikörper erfolgt im ELISA durch die Verwendung von enzymmarkierten Anti-Antikörpern und wird auch als Sandwich-ELISA bezeichnet. Das Antigen oder der spezifische Antikörper können dabei an die Festphase gebunden sein. Der ELISA kann auch in Form eines kompetitiven Tests durchgeführt werden. Hier limitiert generell ein Reaktionspartner durch seine geringe Konzentration die Immunkomplexbildung (FRIEMEL, 1991). Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Tierartendifferenzierung mit dieser Methode wurden sowohl mit festphasengebundenen Antigenen als auch Antikörpern und als kompetitiver bzw. nichtkompetitiver ELISA durchgeführt. In den eigenen Untersuchungen wurde zum Nachweis spezifischer monoklonaler Antikörper ein indirekter nichtkompetitiver ELISA mit festphasengebundenen Antigenen verwendet.

Ähnlich wie bei der Agargel-Präzipitation unterscheiden sich die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen in der Auswahl und Aufbereitung des Antigenmaterials, des Probenmaterials, der Extraktionsverfahren und der verwendeten Tierarten zur Antiserumgewinnung. Darüber hinaus unterscheiden sich die ELISA in der Art der Durchführung, kompetitiv – nichtkompetitiv, Antigen oder Antikörper an der Festphase gebunden und in der Verwendung polyklonaler Antiseren - gereinigt durch Absättigung oder Affinitätschromatographie bzw. nicht gereinigt - oder Verwendung monoklonaler Antikörper.

In der Regel wurden die polyklonalen Antiseren vom Kaninchen gewonnen (MANZ, 1983; MARTÍN et al., 1988; SINELL et al., 1991). Daneben wurden auch Ziegen (KANG'ETHE u. GATHUMA, 1987), ein Schaf (JONES und PATTERSON, 1986) sowie eine jeweils phylogenetisch

verwandte Tierart (PATTERSON und SPENCER, 1985) zur Immunisierung (z. B. Rind mit Büffelserumalbumin oder Ziege mit Schafserumalbumin) verwendet. Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden ausschließlich Mäuse eingesetzt (GOERLICH u. GREUEL, 1986; MARTÍN et al., 1989; MORALES et al., 1994). Da die polyklonalen Antiseren häufig Kreuzreaktionen zeigten, wurden sie entweder durch Absättigung mit dem Kreuzreaktanten (JONES u. PATTERSON, 1985a, 1985b, 1986) oder durch Adsorptionschromatographie (PATTERSON u. SPENCER, 1985; KANG'ETHE u. LINDQVIST, 1987; MARTÍN et al., 1988) von kreuzreagierenden Antikörpern gereinigt, um diese unerwünschten Reaktionen zu verhindern bzw. zu verringern. Andere Autoren arbeiteten mit Antiseren, ohne diese vorher einer Prozedur zur Verringerung von Kreuzreaktionen zu unterziehen (MANZ, 1983; BERGER et al., 1988; RING et al., 1990; SINELL et al., 1991).

Als Impfantigene dienten entweder rohe, nicht thermisch behandelte Muskelextrakte (MARTÍN et al., 1988, 1989), Serum (WHITTAKER et al., 1982) bzw. Serumalbumin (PATTERSON u. SPENCER, 1985; JONES u. PATTERSON, 1986; DINCER et al., 1987) oder Extrakte aus erhitzter Muskulatur (MANZ, 1983, 1985; RING et al., 1990; SINELL et al., 1991). Darüber hinaus wurden einzelne Impfantigene weiter aufbereitet, z. B. durch Kationaustauscher-Chromatographie von rohem Muskelextrakt (BERGER et al., 1988), Immunadsorptions-Chromatographie rohen Muskelextrakts vom Schwein (MORALES et al., 1994) oder Gelfiltration nach Ethanol-fällung und Wiederauflösung eines Extraktes autoklavierter Muskulatur (KANG'ETHE u. LINDQVIST, 1987).

Die zur Tierartenidentifizierung angewendeten kompetitiven ELISA (MANZ, 1983, 1985; RING et al., 1990; SINELL et al., 1991) wurden nach der von HITCHCOCK und CRIMES (1982, 1985) zum Nachweis von Sojaprotein beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wird in einem ersten Versuchsansatz das Probenmaterial mit einem Überschuß von Antiserum versetzt. Im zweiten Versuchsansatz wird eine bestimmte Menge aus den jeweiligen Reaktionsgefäßen des ersten Versuchsansatzes auf eine mit dem Standardantigen beschichtete ELISA-Testplatte verbracht. Die im ersten Versuchsansatz nicht „verbrauchten“ Antikörper werden über die Bildung eines Immunkomplexes an die Festphase gebunden und über die Reaktion eines Substrates mit einem enzymkonjugierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Eine hohe Extinktion bedeutet viele freie Antikörper, also wenig oder kein Antigen im Probenmaterial.

Die in der Literatur beschriebenen ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper bzw. spezifischer Antigene sind überwiegend nicht-kompetitive ELISA mit festphasengebundenem Antigen (MANZ, 1983, 1985; KANG'ETHE u. GATHUMA, 1987; MORALES et al., 1994). Nur wenige arbeiteten mit festphasengebundenen Antikörpern (PATTERSON et al., 1984; PATTERSON u. SPENCER, 1985; MARTIN et al., 1988, 1991). Für die Sensibilisierung der ELISA-Platten wurden in der Regel Natriumbicarbonatpuffer verwendet, aber auch PBS (JONES u. PATTERSON, 1985a) oder Tris-HCl-Puffer (BERGER et al., 1988) kamen zur

Anwendung. Die Dauer und Umgebungstemperatur zur Sensibilisierung variierten dabei von 2 bis 24 Stunden bei 4 °C bis 37 °C.

Während die eigenen Untersuchungen durchgeführt wurden, brachte die Firma Cortecs Diagnostics (Vertrieb: Firma Transia GmbH, Gießen) einen kommerziellen ELISA zum Tierartennachweis in erhitzten Lebensmitteln auf den Markt. Hierbei handelt es sich um einen indirekten Sandwich-ELISA mit festphasengebundenen spezifischen Antikörpern. Die Extraktion der Antigene aus dem Probenmaterial erfolgt mit physiologischer Kochsalzlösung, wobei nicht erhitzte oder nicht ausreichend erhitzte Proben durch Extraktion für 15 Minuten im kochenden Wasserbad nachträglich erhitzt werden müssen, weil es sonst zu Kreuzreaktionen kommen kann. Der Test ist für den Nachweis von Rind, Schwein, Schaf und Geflügel erhältlich. Untersuchungen mit diesem kommerziellen ELISA wurden u. a. von HOFMANN (1994a, 1994b, 1999), STENGEL (1992), HAFKE (1994) und HOFMANN et al. (1995) veröffentlicht.

2.4 Elektrophoretische Untersuchungsmethoden

2.4.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Proteine sind amphotere Substanzen. Sie tragen an ihren Aminosäuren saure Gruppen, z. B. COOH, und basische, z. B. NH₂. In Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums, in dem sie sich befinden, bilden sich daraus negativ geladene COO⁻ bzw. positive geladene NH₄⁺ Gruppen. Die Anzahl der nach außen wirksamen sauren und basischen Gruppen und damit die Gesamtladung des Proteins bei einem bestimmten pH-Wert ist abhängig von der Primär- und Tertiärstruktur der Proteine. Da sie komplexe Moleküle sind, entwickelt sich die Ladungsverteilung bei kontinuierlicher pH-Verschiebung natürlich nicht sprunghaft, sondern fließend. Dieses macht man sich bei der isoelektrischen Fokussierung zunutze. Hier wird in einem Gel (Polyacrylamidgel oder Agarosegel) durch Zugabe eines Ampholyten im elektrischen Feld ein pH-Gradient aufgebaut. Proteine wandern entsprechend ihrer Ladung bis zu ihrem isoelektrischen Punkt und können mit geeigneten Färbemethoden sichtbar gemacht werden.

Wässrige Extrakte von rohen oder erhitzten Fleischproben oder Fleischerzeugnissen können so aufgetrennt und untersucht werden. Die Trennergebnisse der IEF sind von zahlreichen inneren und äußeren Einflüssen abhängig. Selbst bei sorgfältigster Konstanthaltung aller Bedingungen können die erhaltenen Proteinbandenmuster von Versuch zu Versuch variieren. Daher ist es geboten, Proben und Referenz auf ein und demselben Gel nebeneinander aufzutragen (HOFMANN, 1997b).

Bei der Untersuchung von rohen Fleischextrakten und Coomassieblue-Färbung erhält man eine Vielzahl von Sarkoplasmproteinbanden (KIM u. SHELEF, 1986), die jedoch von vielen Faktoren, z. B. Alter, Geschlecht, Haltung der Tiere (HOFMANN u. BLÜCHEL, 1986) oder durch

unterschiedliche Stoffwechselintensitäten (rote und weiße Muskulatur, Warm- und Kaltblüter) beeinflusst werden (REHBEIN, 1990). Als sicherer für den Tierartennachweis bei der IEF hat sich die Myoglobinuntersuchung erwiesen, die zur Bildung von zwei speziesspezifischen Hauptbanden führt, und so zahlreiche Spezies von einander unterschieden werden können (HOFMANN u. BLÜCHEL, 1986; BAUER u. HOFMANN, 1987a, 1989; JEMMI u. SCHLOSSER, 1991). Sicher nachweisen ließ sich zerkleinertes Hühnerfleisch in rohen Fleischgemischen. Als schwieriger erwies sich jedoch der Nachweis von Hühnerfleisch in erhitzten Fleischerzeugnissen (KÄUFFER et al., 1990). Die Banden bei erhitzten Gemischen von Rind, Reh, Hirsch, Gemse und Springbock ließen sich nur schwer identifizieren, während die rohen Gemische dieser Tierarten sich mit der IEF gut differenzieren ließen (JEMMI u. SCHLOSSER, 1991). Bei marinierten Produkten war eine Identifizierung nicht mehr möglich. Eine sichere Differenzierung von Banden gelang bei auf 80 °C und hitzesterilisierten bzw. auf 100 °C erhitzten Fleischproben von Rind, Schwein, Schaf und Känguru bzw. Rind und Schwein (DLABKA, 1985; BAUER u. HOFMANN, 1987b). In weiteren Untersuchungen an erhitzten Fleischgemischen und Fleischerzeugnissen von Rind, Schwein, Pferd, Hirsch, Kaninchen und Huhn wurde eine starke Abhängigkeit der Bandenmuster von den Erhitzungsbedingungen nachgewiesen, die eine Identifizierung der Tierarten bei solchen Erzeugnissen ohne Kenntnisse dieser Bedingungen schwierig bis unmöglich macht (BAUER u. HOFMANN, 1989). Mit Einführung der empfindlichen Silberfärbung und der Verwendung von Gelen mit engeren pH-Gradienten (6 bis 9) gelang die Tierartenbestimmung auch bei hochehitzten Proben (HOFMANN u. BLÜCHEL, 1992). Diese Methode wurde in die Amtliche Sammlung nach § 35 LMBG zur Tierartenidentifizierung für erhitztes Fleisch aufgenommen. Für erhitzte Fleischgemische ist diese Methode jedoch nur geeignet, wenn der jeweilige Anteil einer Tierart mindestens 10 % beträgt (BAUER u. HOFMANN, 1987b).

2.4.2 SDS-Elektrophorese

Durch die SDS-Behandlung von Proteinen werden individuelle Ladungsunterschiede überdeckt, unter reduzierenden Bedingungen Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben, die Aggregatbildung von Proteinen verhindert sowie die Polypeptidfäden gestreckt und zu Mizellen geformt. Alle Mizellen erhalten eine negative Ladung, die proportional zur Masse ist. Da die Radien dieser Mizellen auch proportional zum Molekulargewicht sind, erhält man bei der Elektrophorese eine Auftrennung entsprechend den Molekulargewichten (LÄMMLI, 1970).

Die Auftrennung der so behandelten Proteine erfolgt im elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel. Im großporigen Sammelgel ist die Mobilität der Proteine ausschließlich durch die Ladung bestimmt. So werden sie in Zonen gleicher Ladung gewissermaßen vorsortiert. Beim Auftreffen auf das engporige Trenngel werden die Proteine retardiert, und

es bildet sich ein Proteinstau. Die Mobilität ist jetzt von der Ladung und der Molekülgröße abhängig. Es erfolgt nun die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Diese können durch Färbung oder durch den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Oberfläche einer Blotfolie, wo sie für größere Liganden, wie z.B. Immunglobuline, zugänglich sind, sichtbar gemacht werden.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Methode nur bei Versuchen zum Nachweis roher Muskulatur verschiedener Tierarten befriedigende Ergebnisse erbrachte. Es gelang der Nachweis von rohem Rind- bzw. Schweinefleisch über die gleichzeitige Auftrennung von Referenzproben (HEINERT u. KLINGER, 1978). Später gelang den Autoren auch der Tierartennachweis nahe verwandter Tierarten wie Reh und Hirsch (HEINERT u. KLINGER, 1980). Hier ließ das Proteinmuster der rohen Muskulatur kaum einen Unterschied erkennen, und erst durch die Esterase-Bestimmung war die Identifizierung der nahe verwandten Tierarten möglich.

KAISER et al. (1980a) untersuchten rohes Fleisch von 14 Warmblütern und 17 Kaltblütern mit der SDS-PAGE und der IEF. Die IEF stellte sich insbesondere wegen der wesentlich höheren Auflösung als leistungsfähiger heraus. Die densitometrische Auswertung von Proteinphorogrammen in der PAGIF erlaubte bei binären Fleischmischungen eine quantitative Analyse bis herab zu einem Anteil von 2 – 5 Prozent einer Komponente (KAISER et al., 1980b). In weiteren Untersuchungen von rohem Wurstbrät mit der PAGIF zeigte sich, dass auch der Zusatz von rezepturüblichen Mengen an Speck, Kochsalz, Natriumdiphosphat, Natriumcitrat und Gewürzmischungen die Proteinmuster nicht veränderte (KAISER et al., 1980c).

Bei Proben von Rind, Schwein, Pferd, Schaf, Pute, Huhn, Gans, Ente und Kaninchen sowie binären Mischungen, die für 30 Minuten auf 80 und 100 °C erhitzt wurden, gelang der Tierartennachweis. Bei dieser Untersuchung war selbst im erhitzten Fleisch noch die Tierart bis zu einem Anteil von 10 % nachzuweisen (ZERIFI et al., 1991).

Insgesamt zeigte sich jedoch, dass diese Methode für einen sicheren und reproduzierbaren Tierartennachweis in erhitzten Proben wenig geeignet ist.

2.5 Kombinierte Untersuchungsverfahren

2.5.1 Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese ist eine kombinierte Methode, bei der nach elektrophoretischer Trennung des Probenmaterials eine Immundiffusion mit Antiseren im gleichen Gel erfolgt. Das Antiserum wird parallel zur Trennrichtung zugegeben. Die Auftrennung des Probenmaterials in verschiedene Proteinfractionen vor der Durchführung der Immundiffusion führt zu einer oder mehreren Präzipitationslinien, die eine differenziertere Betrachtung der Ergebnisse zulassen als bei alleiniger Immundiffusion.

Diese Methode verwendete schon SINELL (1968) zum Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in Brühwusterzeugnissen. Es wurden Versuche mit den Extrakten von Schweine-Myoglobin und einer Mischung aus 75 % Rind- und 25 % Schweinefleisch durchgeführt (HAYDEN, 1979). Nach der Elektrophorese wurden zur Immundiffusion Antiseren gegen das Schweine-Myoglobin bzw. gegen Schweine-Serum verwendet. Dabei zeigte sich, dass das Anti-Serum gegen Schweine-Serum nicht mit dem Schweine-Myoglobin, aber mit der Fleischmischung aus Rind und Schwein reagierte, während das Schweine-Myoglobin in beiden Proben nachgewiesen werden konnte.

Die Muskelextrakte von Kaninchen und Feldhase konnten differenziert werden, obwohl das Anti-Kaninchen-Serum im Ouchterlony-Test auch mit dem Feldhasen-Muskelextrakt reagierte. Durch die elektrophoretische Auftrennung gelang es nach der Immundiffusion, in der albuminartigen Fraktion zwei Teilantigene zu unterscheiden, wobei eines spezifisch für Kaninchen war (MANZ, 1980).

2.5.2 Elektroimmunodiffusion

Im Gegensatz zur Immunelektrophorese erfolgt die Zugabe des Antiserums nicht nach der elektrophoretischen Auftrennung der Probe, sondern davor. Das entsprechende Antiserum wird dem Trenngel beigemischt, dann wird das Probenmaterial aufgebracht, die Elektrophorese durchgeführt und schließlich das getrocknete Gel angefärbt. Enthält die Probe homologe Antigene, bilden sich raketenförmige Präzipitationslinien aus. BREHMER (1998) hat diese Methode zum Nachweis von Geflügelfleischzusätzen in Brühwusterzeugnissen eingesetzt. Es war ihm sogar möglich, auch quantitative Aussagen über den Geflügelfleischzusatz zu machen, da die Höhe der Präzipitationslinien von der Antigenmenge in der Probe abhängig ist.

2.6 DNA-Analysemethoden

2.6.1 PCR-Analyse (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäuren, die als Träger der Erbinformation fungieren. Spezifische DNA-Sequenzen können dabei in einem Reaktionsgefäß in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute angereichert werden. Das Prinzip entspricht dem Vorgang der Verdoppelung bei der Zellvermehrung. Um diesen Prozeß in Gang zu setzen, werden ein geeignetes Puffersystem, Desoxynucleotide, die zu kopierende DNA-Matrize, die DNA-Polymerase als Vervielfältigungsenzym und spezifische Oligonucleotid-Primer als Starter benötigt. In drei sich ständig wiederholenden Teilschritten - Aufschmelzen der DNA bei $> 90\text{ °C}$, Hybridisieren der Oligonucleotid-Primer mit den DNA-Matrizensträngen bei ca. $37\text{ bis }72\text{ °C}$ und Polymerisation der DNA-Matrizenstränge (72 °C) -

werden die DNA-Stränge bei jedem Zyklus verdoppelt. So kommt es zur spezifischen Anreicherung der Zielsequenz trotz eines hohen Hintergrunds an anderen DNA-Molekülen (SCHWÄGELE, 1999).

Bei der Verwendung eines Universalprimerpaares erfolgt die eigentliche Tierartidentifizierung erst durch Analyse der sogenannten Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP). Dazu werden die PCR-Produkte in tierartspezifische Bruchstücke mittels Restriktions-Endonukleasen gespalten und die DNA-Fragmentmuster nach elektrophoretischer Auftrennung verglichen (REHBEIN, 1997; RÜGGERBERG et al., 1997). Die DNA-Produkte, die dabei entstehen, müssen jedoch hinreichend groß sein, um artspezifische Sequenzunterschiede aufzuweisen. Durch Hitzeeinwirkung wird die DNA degradiert, wobei unterschiedlich kurze Bruchstücke entstehen (SCHWÄGELE, 1999). Bei Erhitzung für 30 Minuten auf 75 °C treten kleinere DNA-Bruchstücke auf. Temperatureinwirkungen von 100 °C für 30 Minuten führten bereits zum Verlust hochmolekularer DNA (< 1000 Basenpaare), und bei Temperaturen von 121 °C für 20 Minuten lag die DNA überwiegend in Bruchstücken unterhalb einer Länge von 500 Basenpaaren vor (BEHRENS et al., 1999). Mit universellen Primern ist bei hocheerhitzten Proben oder Fleischprodukten, in denen mehrere Tierarten verarbeitet wurden, eine exakte Untersuchung oft nicht möglich (BENEKE u. HAGEN, 1998). Speziespezifische Primer zur Amplifikation von kurzen spezifischen DNA-Fragmenten (146 bis 182 Basenpaare) lassen einen Nachweis der Tierart in Konserven zu, welche auf 130 °C erhitzt wurden und einen Fc-Wert bis 373 aufwiesen (BEHRENS et al., 1999; POSER et al., 2000).

2.6.2 Hybridisierungstechnik (DNA-Sonden)

Bei dieser Untersuchungstechnik werden markierte (z. B. mit Radioaktivität, Fluoreszenz), arttypische Nucleotidsequenzen als Testsonden mit der isolierten, an eine feste Phase gebundenen DNA der Probe zusammengebracht. Handelt es sich um DNA der gleichen Spezies, kommt es durch Hybridisierung zur Bindung der DNA-Sonde. Diese kann mit dem entsprechenden Verfahren nachgewiesen werden. DNA-Sonden können sowohl bei erhitzten wie bei rohen Proben eingesetzt werden (CHIKUNI et al., 1990; EBBEHØJ und THOMSEN, 1991a, 1991b; MEYER et al., 1993,1994). Die hitzedenaturierten Fleischproben (haushaltsmäßig gebratene Fleischscheiben) von Schwein, Huhn und Rind waren ebenso wie rohe Fleischproben mittels radioaktiv markierter DNA-Sonden eindeutig zu bestimmen (BAUR et al., 1987). Auch bei der DNA-Sondentechnik gilt, dass es wie bei der PCR-Methode durch sehr starke Erhitzung des Fleisches (121 °C und höher) und durch längere Lagerung zum Abbau der DNA in kleinere Bruchstücke kommt, die den Nachweis schwieriger oder unmöglich machen können (CANDRIAN, 1994; REHBEIN, 1994).

2.7 Andere Methoden zur Speziesidentifizierung

2.7.1 Fettanalyse

Die Fettanalyse zur Bestimmung der Tierart ist nur für rohes Untersuchungsmaterial geeignet. Bei erhitzten Produkten sowie bei Zubereitungen, die pflanzliche Fette enthalten, kann diese Methode nicht angewendet werden.

Die unterschiedlichen Gehalte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Cholesterin im Fett der verschiedenen Tierarten werden bei dieser Methode zur Tierartidentifikation herangezogen (FROMM et al., 1964; HUBBARD u. POCKLINGTON, 1968). Das Fettsäuremuster der verschiedenen Spezies ist jedoch nicht konstant und variiert in Abhängigkeit von der Fütterung, der Haltungsart und auch der Lokalisation am Schlachttierkörper (KÜHNE et al., 1985, 1986). Auch neuere, spezifischere Methoden zur Fettanalyse, wie die Kapillargaschromatographie (MATTER, 1992) und die Fettstrukturanalyse (BRABANDER u. van HOOF, 1991) unterliegen den gleichen oben genannten Einschränkungen.

2.7.2 Anserin/Carnosin-Verhältnis

Die beiden Dipeptide Anserin und Carnosin kommen in der Muskulatur relativ selten vor. Das Mengenverhältnis dieser beiden Dipeptide unterscheidet sich bei den verschiedenen Spezies. Während dieses Verhältnis bei Rind und Schwein dicht beieinander liegt (Rind 0,06 – 0,2 und Schwein 0,02 – 0,1), unterscheidet es sich deutlich stärker bei Huhn, Schaf, Pferd und Känguru, so dass dieses in Verbindung mit der SDS-Elektrophorese (Myoglobinmuster) zum Tierartnachweis herangezogen werden kann (CARNEGIE et al., 1985). Zuverlässige Aussagen wären allerdings nur bei Reinsubstanzen, nicht aber bei Mischungen möglich.