

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Erläuterungen.....	IX
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand.....	3
2.1 Allergie.....	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Ätiologie und Prävention von Lebensmittelallergien.....	4
2.1.3 Pathogenese IgE-vermittelter Allergien	6
2.1.4 Therapie.....	8
2.1.5 Lebensmittelallergene.....	9
2.1.5.1 Nomenklatur.....	10
2.1.5.2 Molekulare und biochemische Klassifizierung von pflanzlichen Lebensmittelallergenen.....	11
2.1.5.3 Haselnussallergene.....	12
2.1.5.4 Erdnussallergene	13
2.1.5.5 Walnussallergene	14
2.1.5.6 Pistazienallergene.....	15
2.2 Lebensmittelprozessierung	16
2.2.1 Verarbeitungsmethoden	16
2.2.2 Maillard-Reaktion	17
2.2.3 Einfluss auf die Struktur von Allergenen	18
2.2.3.1 Modifikation der Proteinfaltung	18
2.2.3.2 Chemische Modifikation.....	20
2.2.4 Einfluss auf die Verdaubarkeit von Allergenen	20
2.2.5 Einfluss auf das allergene Potential	21
2.3 Analytik von Nussallergenen	23
2.3.1 Isolierung und Aufreinigung	23
2.3.2 Massenspektrometrie	25
2.3.2.1 Grundlagen	25
2.3.2.2 Fragmentierung	27
2.3.2.3 Quantifizierung.....	28

2.3.2.4	Nachweismethoden für Nussallergene mittels Massenspektrometrie	30
3	Ergebnisse und Diskussion.....	31
3.1	Zielsetzung.....	31
3.2	Isolierung und Aufreinigung von Nussallergenen	32
3.2.1	Optimierung der Extraktionsbedingungen	33
3.2.1.1	Extraktionspuffer.....	33
3.2.1.2	Konzentration und pH-Wert des Extraktionspuffers	35
3.2.1.3	Extraktionszeit und -temperatur.....	36
3.2.1.4	Entfettung und Anwendung von Flüssigstickstoff	37
3.2.1.5	Salzgehalt	38
3.2.2	Aufreinigung von Cor a 11.....	40
3.2.2.1	Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	41
3.2.2.2	Aufreinigung mittels Chromatofocusing	42
3.2.2.3	Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC).....	44
3.2.3	Identifizierung allergener Proteine mittels Massenspektrometrie	45
3.3	Einfluss der Lebensmittelprozessierung auf Nussallergene	52
3.3.1	Thermostabilität von Cor a 11.....	52
3.3.2	Extrusion.....	56
3.3.3	Stabilität der Nussallergene gegenüber proteolytischen Prozessen	61
3.4	Untersuchungen verschiedener Haselnussorten	65
3.4.1	Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung	67
3.4.2	Allergene	68
3.5	Entwicklung einer massenspektrometrischen Nachweismethode für Nussallergene in Lebensmitteln.....	73
3.5.1	Auswahl geeigneter Marker.....	73
3.5.2	Methodenoptimierung.....	79
3.5.3	Isotopenmarkierte Peptidstandards	83
3.5.4	Nachweis der allergenen Proteine in Lebensmitteln	85
4	Material und Methoden	90
4.1	Material	90
4.1.1	Chemikalien.....	90
4.1.2	Enzyme	90
4.1.3	Nüsse	90
4.2	Puffer und Lösungen	91

4.3	Geräte.....	93
4.3.1	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (FPLC).....	93
4.3.2	Massenspektrometer	93
4.3.3	Weitere Geräte.....	93
4.4	Methoden.....	94
4.4.1	Proteinextraktion aus Nüssen	94
4.4.2	Proteinfällung.....	95
4.4.2.1	Fällung mit Trichloressigsäure (TCA)	95
4.4.2.2	Fällung mit Aceton.....	95
4.4.3	Gesamtproteinbestimmung	95
4.4.3.1	Bradford-Assay	95
4.4.3.2	NanoDrop	96
4.4.3.3	Kjeldahl	96
4.4.4	Bestimmung primärer Amine (<i>o</i> -Phthaldialdehyd-Assay).....	96
4.4.5	Gravimetrische Fettbestimmung	97
4.4.6	Elektrophoretische Trennung der Nussproteine.....	97
4.4.6.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	97
4.4.6.2	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)	98
4.4.7	Chromatographische Trennung der Nussproteine	99
4.4.7.1	Affinitätschromatographie	99
4.4.7.2	Chromatofocusing	100
4.4.7.3	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	101
4.4.8	Massenspektrometrische Methoden zum Nachweis der Nussallergene	101
4.4.8.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Fourier-Transformations-Massenspektrometrie (HPLC-FTMS/MS).....	101
4.4.9	Prozessierung von Haselnüssen	109
4.4.9.1	Extrusion.....	109
4.4.9.2	Erhitzen des Haselnussallergens Cor a 11	110
4.4.10	Modell für <i>in vitro</i> -Verdau von Haselnussproteinen.....	111
5	Zusammenfassung	113
6	Literatur	119
	Publikationsverzeichnis	i
	Lebenslauf	iii

Danksagung	v
------------------	---