

Lipierungsreaktionen und deren Einfluss auf das  
allergene Potential von Erdnüssen  
(*Arachis hypogaea* L.)

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

**staatl. gepr. Diplom-Lebensmittelchemiker Martin Globisch**

geboren am 02.04.1985 in Schorndorf

Eingereicht am 28.01.2016

Verteidigt am 01.06.2016

Die Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2011 bis Januar 2016 an  
der Professur für Lebensmittelchemie angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle  
Prof. Dr. rer. nat. Harshadrai Rawel

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Hintergrund und Wissensstand</b> .....	<b>3</b>
2.1 Allgemeines zur Erdnuss.....	3
2.2 Die Erdnussallergie .....	5
2.2.1 Allergene der Erdnuss .....	9
2.2.2 Die Ausbildung der Erdnussallergie.....	12
2.2.2.1 Sensibilisierungsphase .....	12
2.2.2.2 Allergische Reaktion .....	15
2.2.3 Eigenschaften von Nahrungsmittelallergenen.....	17
2.2.4 Beeinflussung des allergenen Potentials von Erdnüssen.....	19
2.3 Die Lipidperoxidation .....	22
2.3.1 Bildung von Primärprodukten .....	22
2.3.2 Bildung von Sekundärprodukten.....	28
2.3.2.1 4-Hydroxynon-2-enal (4-HNE).....	30
2.3.3 Sekundärprodukte in Lebensmitteln.....	34
2.4 Lipierung - Reaktionen von Sekundärprodukten der Lipidperoxidation mit Nukleophilen.....	38
2.4.1 Bekannte Lipierungsprodukte des Hexanals .....	38
2.4.2 Bekannte Lipierungsprodukte des Acroleins.....	40
2.4.3 Bekannte Lipierungsprodukte des Malondialdehyds .....	42
2.4.4 Bekannte Lipierungsprodukte des 4-Hydroxynonenals .....	44
2.4.5 Lipierungsprodukte im physiologischen Kontext und in Lebensmitteln.....	46
<b>3 Materialien und Methoden</b> .....	<b>53</b>
3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte .....	53
3.1.1 Chemikalien .....	53
3.1.2 Materialien .....	56
3.1.3 Geräte .....	58
3.2 Probenmaterial .....	60
3.2.1 Handelsproben.....	60
3.2.2 Röst-, Erhitzungs- und Kochexperimente .....	60
3.3 Isolierung des Erdnussproteinextrakts.....	61
3.4 Isolierung des Erdnusshauptallergens Ara h 1 .....	62
3.5 Inkubationen von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Lipidperoxidationsprodukten ....	63

3.6	Inkubationen des Erdnussproteinextrakts mit ausgewählten Lipidperoxidationsprodukten.....	64
3.7	Inkubation von Ara h 1 mit 4-Hydroxynonenal .....	67
3.8	Inkubation von N <sup>ε</sup> -Acetyl-L-lysin mit Linolsäuremethylester unter oxidativen Bedingungen .....	67
3.9	Darstellungen von Analysenstandards .....	68
3.9.1	Darstellung von ( <i>E</i> )-1,1-Dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA).....	68
3.9.2	Darstellung von ( <i>E</i> )-5,5-Dideuterio-1,1-dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA-d <sub>2</sub> ) .....	69
3.9.3	Darstellung von 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure (N <sup>ε</sup> -Hexyllysin) .....	71
3.9.4	Darstellung von 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure und 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 1 und LHP 2)...	73
3.9.5	Darstellung von 2-Amino-6-[2,4-dideuterio-3,5-bis-(1,1,2,2,3,3,4,4,4-nona-deuterio-butyl)-6-(2,2,3,3,4,4,5,5,5-no-nadeuteriopentyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure (LHP 1-d <sub>29</sub> ).....	75
3.9.6	Darstellung von ( <i>Z</i> )- und ( <i>E</i> )-2-Amino-6-[4-butyl-3-(pent-1-enyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure (( <i>Z</i> )- und ( <i>E</i> )-BPP).....	76
3.9.7	Darstellung von 2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (MP-Lysin) .....	78
3.9.8	Darstellung von 2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PPL) .....	80
3.10	Analytische Methoden.....	83
3.10.1	Bestimmung des pH-Werts .....	83
3.10.2	Proteingehaltsbestimmung .....	83
3.10.2.1	Kjeldahl .....	83
3.10.2.2	BCA-Test .....	84
3.10.3	Elementaranalyse .....	84
3.10.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	85
3.10.5	Hydrolysen .....	85
3.10.5.1	Salzsaure Hydrolyse.....	85
3.10.5.2	Enzymatische Hydrolyse.....	86
3.10.6	Freie Aminosäuren .....	87
3.10.7	Aminosäureanalyse .....	87
3.10.8	Reduktion mit NaBH <sub>4</sub> .....	89
3.10.9	Fluoreszenzmessung.....	89
3.10.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	90
3.10.10.1	Gradientengele (5-15 % Acrylamid).....	90
3.10.10.2	Isokratische Gele (9 % Acrylamid).....	92
3.10.11	Identifizierung von Lipierungsprodukten mittels LC-ESI-MS/MS .....	93
3.10.12	Semiquantifizierung flüchtiger Sekundärprodukte in erhitztem Erdnussöl mittels GC-MS (EI).....	96
3.10.13	Quantifizierung von Malondialdehyd .....	97
3.10.14	Quantifizierung von Acrolein.....	99
3.10.15	Quantifizierung von 4-HNE .....	101
3.10.16	Quantifizierung von N <sup>ε</sup> -Hexyllysin.....	103

3.10.17	Quantifizierung von LHP 1 und LHP 2.....	104
3.10.18	Quantifizierung von (Z)- und (E)-BPP.....	106
3.10.19	Quantifizierung von MP-Lysin.....	107
3.10.20	Quantifizierung von 2-PPL.....	108
3.10.21	Quantifizierung von N <sup>ε</sup> -(2-Furoylmethyl)lysin (Furosin).....	110
3.10.22	Quantifizierung von 6-(2-Formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)-L-norleucin (Pyrralin).....	111
3.10.23	Quantifizierung von N <sup>ε</sup> -Carboxymethyl-L-lysin (CML).....	112
3.11	Methoden zur Beurteilung des allergenen Potentials.....	113
3.11.1	Western Blots.....	114
3.11.2	ELISA.....	117
3.11.3	Simulierter gastrointestinaler Verdau.....	119
3.12	Isolierung und <i>in vitro</i> Oxidation von LDL.....	120
3.12.1	Isolierung.....	120
3.12.2	<i>In vitro</i> Oxidation.....	121
3.13	Statistik.....	122
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>123</b>
4.1	Aminosäurezusammensetzungen und Ausmaß der Maillard-Reaktion der Erdnussproben.....	124
4.1.1	Aminosäurezusammensetzung.....	124
4.1.2	Maillard-Reaktionsprodukte.....	127
4.1.3	Fazit.....	130
4.2	Lipidperoxidationsprodukte in Erdnussöl- und Erdnussproben.....	130
4.2.1	Semiquantifizierung flüchtiger Verbindungen.....	130
4.2.2	Quantifizierung von Acrolein, Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal.....	133
4.2.2.1	Analytik.....	133
4.2.2.2	Quantifizierung.....	138
4.2.3	Fazit.....	144
4.3	Identifizierung reaktiver Aminosäurereste der Erdnussproteine gegenüber ausgewählten Sekundärprodukten.....	145
4.3.1	Hexanal.....	146
4.3.2	2-Heptenal und Acrolein.....	148
4.3.3	Malondialdehyd.....	151
4.3.4	4-Hydroxynonenal.....	153
4.3.5	Fazit.....	157
4.4	Identifizierung von Lipierungsprodukten in Modellansätzen.....	159
4.4.1	Lipierungsprodukte des Hexanals.....	161
4.4.2	Lipierungsprodukte des 2-Heptenals.....	166
4.4.3	Lipierungsprodukte des Acroleins.....	169
4.4.4	Lipierungsprodukte des Malondialdehyds.....	172
4.4.5	Lipierungsprodukte des 4-Hydroxynonenals.....	175

4.4.6	Fazit.....	179
4.5	Quantifizierung von Lipierungsprodukten in modifizierten Erdnussproteinen und in Erdnüssen.....	182
4.5.1	Analytik.....	183
4.5.2	Quantifizierung.....	188
4.5.2.1	Hexanal-Lipierungsprodukte: N <sup>ε</sup> -Hexyllysin <b>3'</b> , LHP 1 <b>2'</b> und LHP 2 <b>24'</b> .....	188
4.5.2.2	2-Heptenal-Lipierungsprodukte: ( <i>Z</i> )- und ( <i>E</i> )-BPP ( <b>25'</b> , <b>26'</b> ).....	192
4.5.2.3	Acrolein-Lipierungsprodukt: MP-Lysin <b>10'</b> .....	193
4.5.2.4	4-Hydroxynonenal-Lipierungsprodukt: 2-PPL <b>21'</b> .....	196
4.5.2.5	Diskussion.....	199
4.5.3	Heterogene Lipierungsprodukte.....	203
4.5.4	Lipierungsreaktionen des am Glycerol verbleibenden, oxidativ gespaltenen Fettsäurerests.....	207
4.5.5	Fazit.....	212
4.6	Lipierungsreaktionen im physiologischen Kontext.....	213
4.6.1	Einfluss der Lipierung von Erdnussproteinen auf das allergene Potential.....	213
4.6.1.1	ELISA und Western Blots.....	214
4.6.1.2	Simulierter gastrointestinaler Verdau.....	217
4.6.1.3	Fazit.....	226
<b>5</b>	<b>Ausblick und orientierende weiterführende Untersuchungen.....</b>	<b>230</b>
5.1	Lebensmittel.....	230
5.2	Physiologische Systeme.....	231
5.2.1	Lipierungsreaktionen am Low Density Lipoprotein (LDL).....	231
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>237</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>242</b>
	<b>Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen, Poster und Vorträge.....</b>	<b>263</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>266</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>267</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 (A) Zusammensetzung nativer Erdnüsse.....	4
Abb. 2 (A) Mikroskopischer Querschnitt eines Erdnussamens.....	5
Abb. 3 (A) Interaktion von M-Zelle und APC; (B) Interaktion von APC und T-Lymphozyt, jeweils nach Grevers & Röcken (2008).....	13
Abb. 4 Schematische Darstellung der Sensibilisierungsphase und der allergischen Reaktion .....	16
Abb. 5 Reaktion von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) mit einer ungesättigten Fettsäure zum Hydroperoxid in Anlehnung an Belitz et al. (2008). .....	23
Abb. 6 Reaktionen von Metallionen mit Fettsäurehydroperoxiden zu Radikalen .....	23
Abb. 7 Radikalkettenmechanismus der Fettsäureperoxidation .....	25
Abb. 8 Hydroperoxidbildung der Linolsäure .....	26
Abb. 9 Hydroperoxyepidioxidbildung .....	27
Abb. 10 Wirkung von Antioxidantien (A-H) .....	28
Abb. 11 Zwei Möglichkeiten der $\beta$ -Spaltung am Beispiel der 13-(Z,E)-HPODE.....	29
Abb. 12 Möglicher Bildungsweg des 4-HNE aus der 13-(Z,E)-HPODE.....	31
Abb. 13 Reaktionsmöglichkeiten des 4-HNE mit Biomolekülen .....	33
Abb. 14 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des Hexanals mit Nukleophilen ( $\text{Nu-R}^n$ ) .....	39
Abb. 15 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des Acroleins mit Nukleophilen ( $\text{Nu-R}^n$ ).....	41
Abb. 16 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des MDA mit Nukleophilen ( $\text{Nu-R}^n$ ).....	43
Abb. 17 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des 4-HNE mit Nukleophilen ( $\text{Nu-R}^n$ ).....	45
Abb. 18 Struktur von (E)-1,1-Dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA) .....	69
Abb. 19 Struktur von (E)-4,4-Dimethoxy-but-2-enal .....	69
Abb. 20 Struktur von (E)-5,5-Dideuterio-1,1-dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA-d <sub>2</sub> ).....	70
Abb. 21 Struktur von 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure (N <sup>ε</sup> -Hexyllysin).....	72
Abb. 22 Strukturen von (links) 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 1) und (rechts) 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 2).....	74
Abb. 23 Struktur von 2-Amino-6-[2,4-dideuterio-3,5-bis(1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonadeuteriobutyl)-6-(2,2,3,3,4,4,5,5,5-nonadeuteriopentyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure LHP 1-d <sub>29</sub> .....	75
Abb. 24 Strukturen von (links) 2-Amino-6-[4-butyl-3-[(Z)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((Z)-BPP) und (rechts) 2-Amino-6-[4-butyl-3-[(E)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((E)-BPP) .....	77
Abb. 25 Struktur von 2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (MP-Lysin).....	79
Abb. 26 Struktur von Nonan-1,4-diol .....	80
Abb. 27 Struktur von 4-Oxononanal .....	81
Abb. 28 Struktur von 2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PPL).....	82
Abb. 29 Durchführungsschema des simulierten gastrointestinalen Verdaus .....	119
Abb. 30 Vergleich der Aminosäurefreisetzungen .....	125

Abb. 31 Aminosäuregehalte nativer, bei 170 °C für 20 min und 40 min gerösteter Erdnüsse und der kommerziell gerösteten Handelsprobe .....	126
Abb. 32 Absoluter Lysinverlust und Summe der quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte in den bei 170 °C für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen bezogen auf die nativen Erdnüsse	128
Abb. 33 Reaktionen von Fettsäurehydroperoxy- und Fettsäurehydroxyradikalen mit Proteinen nach Gardner (1979).....	129
Abb. 34 GC-MS (EI)-Scan-Chromatogramm flüchtiger Verbindungen aus nicht erhitztem (grau, unten) und auf 170 °C für 20 min erhitztem (schwarzen, oben) raffiniertem Erdnussöl .....	131
Abb. 35 Relative Peakflächenanteile flüchtiger Verbindungen die als Folge der Erhitzung von Erdnussöl auf 170 °C für 20 min entstanden sind .....	131
Abb. 36 GC-MS (EI)-Massenspektren der (A) Acrolein- und (B) ( <i>E</i> )-But-2-enal-PFBO-Derivate...	134
Abb. 37 GC-MS (EI)-SIM-Lauf zur Quantifizierung von Acrolein in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe .....	134
Abb. 38 GC-MS (EI)-Massenspektren der (A) MDA- und (B) MDA-d <sub>2</sub> -PFPH-Derivate.....	135
Abb. 39 GC-MS (EI)-SIM-Lauf zur Quantifizierung von MDA in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe .....	136
Abb. 40 GC-MS (EI)-Massenspektren der (A) 4-HNE- und (B) 4-HNE-d <sub>2</sub> -PFBO-TMS-Derivate ...	136
Abb. 41 GC-MS (EI)-SIM-Lauf zur Quantifizierung von 4-HNE in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe .....	137
Abb. 42 Mittels GC-MS (EI) quantifizierte Gehalte an Acrolein in den auf 170 °C erhitzten (A) Erdnussöl- und (B) Erdnussproben .....	138
Abb. 43 Mittels GC-MS (EI) quantifizierte Gehalte an MDA in den auf 170 °C erhitzten (A) Erdnussöl- (n=2) und (B) Erdnussproben (n=3).....	140
Abb. 44 Mittels GC-MS (EI) quantifizierte Gehalte an 4-HNE in den auf 170 °C erhitzten (A) Erdnussöl- und (B) Erdnussproben .....	142
Abb. 45 Erdnussproteine inkubiert mit Hexanal; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid) .....	147
Abb. 46 Erdnussproteine inkubiert mit 2-Heptenal; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid) .....	148
Abb. 47 Erdnussproteine inkubiert mit Acrolein; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid) .....	149
Abb. 48 Erdnussproteine inkubiert mit MDA; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid) .....	151
Abb. 49 Erdnussproteine inkubiert mit 4-HNE; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid) .....	153
Abb. 50 Ara h 1 inkubiert mit 4-HNE; (A) Aminosäureabnahmen, (B) Fluoreszenzmessung der enzymatischen Hydrolysate und (C) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid).....	154
Abb. 51 SDS-PAGE der nativen und gerösteten Erdnüsse sowie der Handelsprobe (reduziert, isokratisch, 9 % Acrylamid).....	156
Abb. 52 Bildungswege der charakteristischen Lysin-Fragmentationen m/z 130,1, m/z 129,1, m/z 102,1 und m/z 84,1 in LC-ESI-MS/MS-CID-Experimenten.....	160
Abb. 53 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit Hexanal (oben) für 4 h bei 75 °C und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionsscans (unten) .....	161

Abb. 54 Erläuterungen der Fragmentierungswege der 2-Acetamido-6-(hexylamino)hexansäure (N <sup>ε</sup> -Hexyl-AcLys) mit m/z 273,2 (M+H <sup>+</sup> ) sowie der 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-2-pentylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (AcLHP 1) mit m/z 433,3 (M <sup>+</sup> ) in CID-Experimenten mittels LC-ESI-MS/MS (positiv mode) .....	162
Abb. 55 Strukturen von (A) N <sup>ε</sup> -Hexyllysin <b>3'</b> , (B) LHP 1 <b>2'</b> und (C) LHP 2 <b>24'</b> mit den beobachteten, relevanten HMBCs .....	165
Abb. 56 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit (Z)-2-Heptenal (oben) für 4 h bei 75 °C und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionenscans (unten) .....	166
Abb. 57 Struktur von (E)-BPP <b>26'</b> mit den beobachteten, relevanten HMBCs .....	168
Abb. 58 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit Acrolein für 4 h bei 75 °C (oben) und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionenscans (unten) .....	169
Abb. 59 Struktur von MP-Lysin <b>10'</b> mit den beobachteten, relevanten HMBCs .....	171
Abb. 60 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit Malondialdehyd für 4 h bei 75 °C (oben) und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionenscans (unten) .....	172
Abb. 61 Postulierter Reaktionsweg der Bildung der 2-Acetamido-6-(3-formyl-4-hydroxy-4H-pyridin-1-yl)hexansäure <b>27'</b> beziehungsweise 2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)hexansäure <b>27</b> .....	173
Abb. 62 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit 4-HNE für 4 h bei 75 °C (oben) und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionenscans (unten) .....	176
Abb. 63 Struktur von 2-PPL <b>21'</b> mit den beobachteten, relevanten HMBCs .....	179
Abb. 64 Übersicht über die mittels LC-ESI-MS/MS identifizierte Lipierungsprodukte .....	180
Abb. 65 LC-ESI-MS/MS-Produktionenspektren des (A) N <sup>ε</sup> -Hexyllysins-d <sub>12</sub> und (B) LHP 1-d <sub>29</sub> .....	183
Abb. 66 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von (A) N <sup>ε</sup> -Hexyllysin und (B) LHP 1 in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe.....	184
Abb. 67 LC-ESI-MS/MS-Produktionenspektrum des N-Benzoylglycyl-L-phenylalanins.....	185
Abb. 68 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von (Z)- und (E)-BPP in einer mit 2-Heptenal im Verhältnis 0,1:1 (2-Heptenal:Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren) modifizierten Erdnussproteinprobe .....	186
Abb. 69 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von MP-Lysin in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe.....	187
Abb. 70 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von 2-PPL in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe .....	187
Abb. 71 Mittels LC-ESI-MS/MS in den mit Hexanal inkubierten Erdnussproteinen quantifizierte Gehalte an (A) N <sup>ε</sup> -Hexyllysin, (B) LHP 1 und LHP 2 sowie (C) den jeweiligen berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert.....	189
Abb. 72 Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an (A) N <sup>ε</sup> -Hexyllysin (n = 3) und (B) LHP 1 (n = 4) in den nativen und bei 170 °C gerösteten Erdnussproben sowie der Handelsprobe.....	190
Abb. 73 (A) Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an (Z)- und (E)-BPP in den mit 2-Heptenal inkubierten Erdnussproteinen sowie (B) den jeweiligen berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert.....	192

Abb. 74 (A) Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an MP-Lysin in den mit Acrolein inkubierten Erdnussproteinen sowie (B) den jeweiligen berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert.....	194
Abb. 75 Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an MP-Lysin in den nativen und bei 170 °C gerösteten Erdnussproben sowie der Handelsprobe.....	195
Abb. 76 (A) Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an 2-PPL in den mit 4-HNE inkubierten Erdnussproteinen sowie (B) den berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Erdnussprotein-Inkubationsblindwert, (C) den quantifizierten Gehalten an 2-PPL in dem mit 4-HNE inkubierten Ara h 1 sowie (D) den berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Ara h 1-Inkubationsblindwert .....	196
Abb. 77 Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an 2-PPL in den nativen und bei 170 °C gerösteten Erdnussproben sowie der Handelsprobe (n = 3).....	198
Abb. 78 Prinzipieller radikalinduzierter Verlauf der Oxidation einer Aminosäure im Proteinverband nach Stadtman & Levine (2003) und Özben (1998).....	202
Abb. 79 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit Hexanal und Nonanal (oben) und der jeweiligen Fragmentmuster der Pyridiniumderivate aus den Produktionsscans (unten) .....	204
Abb. 80 Postulierte Reaktionsprodukte, die aus der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin, Hexanal und Nonanal in jeweils äquimolaren Stoffmengen hervorgingen.....	206
Abb. 81 GC-MS (EI)-Scan-Chromatogramm flüchtiger Verbindungen des Hexan-Extrakts der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin und Linolsäuremethylester .....	207
Abb. 82 Schematische Darstellung der Bildung von (a) Hexanal, (b) 9-Hydroxy-12-oxododec-10-ensäuremethylester, (c) 4-HNE und (d) 9-Oxononansäuremethylester als Folge der oxidativen Spaltung von Linolsäuremethylester in Anlehnung an Spickett (2013).....	208
Abb. 83 Mittels LC-ESI-MS/MS erhaltende Fragmentmuster der (A) nach Reduktion identifizierten 2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]hexansäure und (B) 2-Acetamido-6-[2-(8-methoxy-8-oxo-octyl)pyrrol-1-yl]hexansäure.....	209
Abb. 84 Mittels LC-ESI-MS/MS identifizierte Lipierungsprodukte als Folge der Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin und Linolsäuremethylester .....	210
Abb. 85 ELISA der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine .....	214
Abb. 86 Western Blots der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine und des mit 4-HNE modifizierten Ara h 1 .....	216
Abb. 87 Western Blots der simuliert gastrointestinal verdauten, mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine.....	219
Abb. 88 (A) SDS-PAGE (reduziert, isokratisch, 9 % Acrylamid), (B) Western Blot (reduziert) unter Verwendung des Erdnussallergikerserums US 6 und (C) Aminosäurezusammensetzungen der nativen, gekochten (100 °C, 20 min) und gerösteten (170 °C, 20 min) Erdnussproben .	222
Abb. 89 SDS-PAGE der simuliert gastrointestinal verdauten nativen, gekochten (100 °C, 20 min) und gerösteten (170 °C, 20 min) Erdnussproben .....	223
Abb. 90 LC-ESI-MS-MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von (A) MP-Lysin und (B) 2-PPL in nativem LDL (nLDL) und mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an (A) MP-Lysin (n = 3) und (B) 2-PPL (n = 2) in nLDL und oxidiertem LDL (oxLDL).....	233

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Gehalte an Protein und den Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin in ausgewählten Schalenfrüchten nach Souci et al. (2008), jeweils in g/100 g Schalenfrucht.....	4
Tab. 2	Übersicht über die 12 bekannten Erdnussallergene, modifiziert nach Becker et al. (2011) .....	9
Tab. 3	Gehalte an Sekundärprodukten aus der Lipidperoxidation ausgewählter Fettsäuren in nmol/mg Fettsäure nach Esterbauer et al. (1990a).....	30
Tab. 4	Gehalte an 4-HNE und MDA in Lebensmitteln.....	36
Tab. 5	Gehalte an Acrolein in Lebensmitteln.....	37
Tab. 6	Verwendete Chemikalien.....	53
Tab. 7	Verwendete Materialien.....	56
Tab. 8	Verwendete Geräte.....	58
Tab. 9	Trennprogramm zur Ara h 1-Isolierung mittels Anionenaustauscher.....	63
Tab. 10	Inkubationen von ausgewählten Sekundärprodukten mit N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin .....	64
Tab. 11	Aufarbeitung der mit ausgewählten Sekundärprodukten inkubierten Erdnussproteinextraktproben.....	66
Tab. 12	Arbeitsschritte zur Aufreinigung der 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure mittels Kationenaustauschchromatographie .....	71
Tab. 13	Trennprogramm LHP 1 und LHP 2 mittels semipräparativer RP-HPLC-UV .....	73
Tab. 14	Trennprogramm (Z)- und (E)-BPP mittels semipräparativer RP-HPLC-UV.....	76
Tab. 15	Trennprogramm der ersten (links) und zweiten Reinigung (rechts) des MP-Lysins mittels semipräparativer RP-HPLC-UV .....	79
Tab. 16	Trennprogramm 2-PPL mittels semipräparativer RP-HPLC-UV .....	82
Tab. 17	NMR-Spektroskopie, Referenzsignale der eingesetzten Lösungsmittel .....	85
Tab. 18	Einwaagen für die salzsaure Hydrolyse und weiterverwendete Aliquote.....	86
Tab. 19	Trennprogramm für die Aminosäureanalyse .....	88
Tab. 20	Aminosäureanalyse, Programm zur Derivatisierung mit Ninhydrin.....	89
Tab. 21	SDS-PAGE, Herstellung der Gellösungen.....	91
Tab. 22	Trennprogramm zur Identifizierung von Lipierungsprodukten mittels LC-ESI-MS/MS .....	94
Tab. 23	LC-ESI-MS/MS-Produktionenscanparameter zur Identifizierung von Lipierungsprodukten nach Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation.....	94
Tab. 24	LC-ESI-MS/MS-Produktionenscanparameter zur Identifizierung von Lipierungsprodukten nach Inkubation von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit Linolsäuremethylester unter oxidativen Bedingungen .....	95
Tab. 25	Semiquantifizierung flüchtiger Sekundärprodukte - Analyten und zugehörige interne Standards.....	97
Tab. 26	MDA-Quantifizierung - Quantifier- und Qualifier-Ionen.....	99
Tab. 27	Acrolein-Quantifizierung - Quantifier- und Qualifier-Ionen .....	100
Tab. 28	4-HNE-Quantifizierung - Quantifier- und Qualifier-Ionen.....	102

Tab. 29 Durchführungsschema für die Festphasenextraktion zur Quantifizierung von N <sup>ε</sup> -Hexyllysin.....	103
Tab. 30 Trennprogramm N <sup>ε</sup> -Hexyllysin mittels LC-ESI-MS/MS .....	104
Tab. 31 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von N <sup>ε</sup> -Hexyllysin.....	104
Tab. 32 Trennprogramm LHP 1 und LHP 2 mittels LC-ESI-MS/MS .....	105
Tab. 33 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von LHP 1 und LHP 2 .....	105
Tab. 34 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von (Z)- und (E)-BPP .....	106
Tab. 35 Trennprogramm MP-Lysin mittels LC-ESI-MS/MS .....	107
Tab. 36 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von MP-Lysin .....	108
Tab. 37 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von 2-PPL .....	109
Tab. 38 Durchführungsschema für die Festphasenextraktion zur Furosin-Quantifizierung .....	110
Tab. 39 Trennprogramm Furosin mittels HPLC-DAD .....	111
Tab. 40 Durchführungsschema für die Festphasenextraktion zur CML-Quantifizierung.....	112
Tab. 41 Trennprogramm CML mittels LC-ESI-MS/MS.....	113
Tab. 42 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von CML.....	113
Tab. 43 SDS-PAGE für Western Blot, Herstellung der Gellösungen.....	115
Tab. 44 Spezifikationen der eingesetzten Seren US 4 und US 6.....	117
Tab. 45 Verdünnungen der Seren und Antikörper für den ELISA.....	118
Tab. 46 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Maillard-Reaktionsprodukt-Analytik, jeweils angegeben in μmol/100 g Protein.....	127
Tab. 47 Gehalte der quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte in den Erdnussproben, jeweils angegeben in mmol/100 g Protein.....	127
Tab. 48 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der 4-HNE-, Acrolein- und MDA-Analytik, jeweils angegeben in nmol/100 g Öl beziehungsweise 100 g Protein.....	137
Tab. 49 Quantifizierte Gehalte an Acrolein, MDA und 4-HNE in den bei 170 °C für 20 min erhitzten Erdnussöl- und Erdnussproben sowie der Handelsprobe .....	144
Tab. 50 Zusammenfassung der Reaktivitäten der untersuchten Sekundärprodukte gegenüber Erdnussproteinen und Ara h 1 sowie deren proteinquervernetzende Eigenschaften;.....	157
Tab. 51 Übersicht der mittels LC-ESI-MS/MS identifizierten Lipierungsprodukte, die aus der Reaktion von N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation hervorgingen .....	181
Tab. 52 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der N <sup>ε</sup> -Hexyllysin-, LHP 1- und LHP 2-, (Z)- und (E)-BPP-, MP-Lysin- und 2-PPL-Analytik, jeweils angegeben bezogen auf 100 g Erdnussprotein und 100 g Erdnussprobe.....	188
Tab. 53 Lysinblockierungen und erklärable Anteile am Lysinverlust der bei 170 °C für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse durch die Maillard-Reaktionsprodukte Fru-Lys, Pyrralin und CML sowie die Lipierungsprodukte N <sup>ε</sup> -Hexyllysin, LHP 1, MP-Lysin und 2-PPL, jeweils bezogen auf die nach salzsaurer Hydrolyse erhaltenen Stoffmengen an Lysin .....	200
Tab. 54 Quantifizierte Gehalte der Lipierungsprodukte in den bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnüssen sowie der Handelsprobe.....	212

## Abkürzungsverzeichnis

(Z)-, (E)-BPP	(Z)- und (E)-2-Amino-6-[4-butyl-3-(pent-1-enyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure
2,4-DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
2-PPL	2-Pentylpyrrollysin (2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure)
4-HHE	4-Hydroxyhex-2-enal
4-HNE	4-Hydroxynon-2-enal
4-HNE-DMA	(E)-1,1-Dimethoxynon-2-en-4-ol
4-HNE-DMA-d <sub>2</sub>	(E)-5,5-Dideuterio-1,1-dimethoxynon-2-en-4-ol
Abb.	Abbildung
Ac	Acetylgruppe
AGE	<i>advanced glycation end product</i> , fortgeschrittenes Glykierungsprodukt
ALE	<i>advanced lipation endproduct</i> , fortgeschrittenes Lipierungsprodukt
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zellen
Apo B <sub>100</sub>	Apolipoprotein B <sub>100</sub>
ASA	Aminosäureanalyse
a <sub>w</sub>	Wasseraktivität
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BCR	<i>B-cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	bovines Serumalbumin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
BW	Blindwert
C	Quervernetzungsgrad des Acrylamids bei der Polyacrylamidgelelektrophorese
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CML	N <sup>ε</sup> -Carboxymethyllysin
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
cycl.	cyclisiert
-d <sub>n</sub>	n-fach deuteriert
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DBPCFC	<i>double-blind, placebo-controlled food challenge</i> , doppelt-blinder, placebokontrollierter Nahrungsmittelbelastungstest
DC	Dünnschichtchromatographie
DHN	1,4-Dihydroxynon-2-en
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eH	enzymatische Hydrolyse
EI	<i>electron impact</i> , Elektronenstoßionisation
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	<i>fast atom bombardment</i> Ionisierung
FDP-Lysin	N <sup>ε</sup> -(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)lysin
Fru-Lys	N <sup>ε</sup> -Fruktosyllysin
GC	Gaschromatographie
Glc	Glukose
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HEL	N <sup>ε</sup> -(Hexanoyl)lysin
Hex	Hexanal
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HNA	4-Hydroxynon-2-ensäure

HPETE, n- HPLC	Hydroperoxyeicosatetraensäure, n- <i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPODE, n- HRGC-O	Hydroperoxyoctadecadiensäure, n- <i>high resolution gas chromatography-olfactometry</i> , hochauflösende Gaschromatographie-Olfaktometrie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HS-SPME	<i>headspace-solid phase microextraction</i> , Dampfraum-Festphasenmikroextraktion
ID	Innendurchmesser
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IS	interner Standard
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Zürich, Schweiz)
Kap.	Kapitel
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> , Schlitzschnecken-Hämocyanin
KODE	Ketooctadecadiensäure
$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$	Extinktionswellenlänge / Emissionswellenlänge
LD <sub>50</sub>	lethale Dosis, die bei 50 % einer Population zum Tode führt
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LHP 1	2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure
LHP 2	2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure
LHP-d <sub>29</sub>	2-Amino-6-[2,4-dideuterio-3,5-bis (1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonadeuteriobutyl)-6-(2,2,3,3,4,4,5,5,5-nonadeuteriopentyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure
LM	3-(N <sup>ε</sup> -Lysino)propan-1-ol
LMCl	3-(N <sup>ε</sup> -Lysino)-1-chlorpropan
LML	1,3-Di(N <sup>ε</sup> -lysino)propan
LOX-1	<i>lektin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1</i>
Lys	Lysin
M	Molekül
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
Man	Mannose
MDA, -d <sub>2</sub>	Malondialdehyd, -d <sub>2</sub>
MHC-II	<i>major histocompatibility complex II</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex II
MP-Lysin	N <sup>ε</sup> -(3-Methylpyridinium)lysin (2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure)
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , molekulare Ausschlussgröße
n	Anzahl der Messungen
NFPA	<i>nonafluoropentanoic acid</i> , Nonafluorpentansäure
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Gaithersburg, Maryland, USA)
nLDL	<i>natives low density lipoprotein</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz (-spektroskopie)
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i> , Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
Non	Nonanal
OVA	Ovalbumin
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland)

Per	Ammoniumperoxodisulfat
PFBHA-HCl	o-(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)hydroxylaminhydrochlorid
PFBO-	o-(Pentafluorbenzyl)oxim-
PFPH	(Pentafluorphenyl)hydrazin
PITC	Phenylisothiocyanat
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
red.	reduziert
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
sH	salzsaure Hydrolyse
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
SR	<i>scavenger-rezeptor</i>
T	Acrylamidkonzentration der Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBA	<i>thiobarbituric acid</i> , Thiobarbitursäure
TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
T <sub>c</sub>	<i>cytotoxic cell</i> , zytotoxische Zelle
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEP-d <sub>2</sub>	1,1,3,3-Tetraethoxypropan-d <sub>2</sub>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
THF	Tetrahydrofuran
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMP	1,1,3,3-Tetramethoxypropan
TMS-	trimethylsilyl-
t <sub>Ret</sub>	Retentionszeit
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	<i>unified atomic mass unit</i> , atomare Masseneinheit
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i> , Ultrahochleistungsflüssigchromatographie
UV	ultraviolett
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VO	Verordnung
x	Zufallsvariable
Xyl	Xylose



# 1 Einleitung und Zielstellung

Die Erdnussallergie ist für 25-28 % der Lebensmittelallergien verantwortlich (Owusu-Apenten, 2002) und es wird angenommen, dass 0,6-1,0 % der Bevölkerung von Industrieländern allergisch gegenüber Erdnüssen reagiert (Al-Muhsen et al., 2003). In Deutschland tritt die Erdnussallergie bei 0,6 %, in Schweden bei 2,4 % und in den USA bei 1,1 % der Bevölkerung auf (EFSA, 2013; Östblom et al., 2008; Zuberbier et al., 2004; Sicherer et al., 1999). Dabei ist vor allem bei Kindern eine Zunahme zu beobachten (Sicherer et al., 2010; Grundy et al., 2002). Bereits geringe Mengen von 2 mg Erdnussprotein können zu objektiven allergischen Reaktionen führen (Hourihane et al., 1997b). Dies stellt im Gegensatz zu anderen Nahrungsmittelallergenen wie beispielsweise Milch (165 mg Protein), Sojabohnen (1000 mg Protein) oder Haselnüssen (168 mg Protein) eine sehr geringe Menge an benötigtem Allergen dar (Ortolani et al., 2000; Norgaard & Bindslev-Jensen, 1992; Bock et al., 1978). Weiterhin kommt es im Falle der Erdnussallergie im Vergleich zu anderen Nahrungsmittelallergien besonders häufig zu anaphylaktischen Schocks (Bock et al., 2007; Bock et al., 2001). Auffallend ist, dass Erdnüsse in westlichen Ländern, wie beispielsweise den USA ein Hauptnahrungsmittelallergen darstellen, wohingegen dies in asiatischen Ländern nicht der Fall ist (Beyer et al., 2001; Hill et al., 1997). Da die Verzehrsmengen an Erdnüssen und Erdnussprodukten in beiden Ländern mit jeweils 3 kg pro Einwohner und Jahr vergleichbar sind und die Ursache auch nicht auf einen eventuell unterschiedlichen Genpool zurückgeführt werden konnte (Beyer et al., 2001), wird angenommen, dass die jeweiligen Zubereitungsformen einen Einfluss haben könnten (Cong et al., 2008; Beyer et al., 2001). Der Verzehr erfolgt in den USA vor allem in gerösteter und in asiatischen Ländern überwiegend in gekochter oder frittierter Form (Cong et al., 2008; Beyer et al., 2001). Studien, die sich mit dem Einfluss der Zubereitungsart auf das allergene Potential beschäftigten, betrachteten das Immunglobulin E- (IgE-) Bindungsvermögen, wobei die Ergebnisse allerdings widersprüchlich sind (Blanc et al., 2011; Vissers et al., 2011; Mondoulet et al., 2003; Maleki et al., 2000a; Koppelman et al., 1999).

Anhand einer gezielten Glykierung der Erdnusshauptallergene Ara h 1 und Ara h 2 wurde gezeigt, dass die Maillard-Reaktion das IgE-Bindungsvermögen nicht signifikant beeinflusste (Wellner, 2012a). Interessanterweise war als Folge der Röstung von Erdnüssen eine Lysinmodifizierung von bis zu 42 % feststellbar, wovon allerdings nur 10 % durch bekannte Maillard-Reaktionsprodukte erklärt werden konnten (Wellner et al., 2012b). Erdnüsse weisen einen Fettgehalt von 48 % (Souci et al., 2008) und einen Anteil an ungesättigten Fettsäuren von 85 % (Maguire et al., 2004) auf. Aus diesem Grund kann als Folge der Erdnussröstung die Lipidperoxidation ablaufen, wodurch es zur Bildung reaktiver Sekundärprodukte kommt (Liu et al., 2011; Chetschik et al., 2008; Brown et al., 1972). Diese sind prinzipiell in der Lage,

Aminosäureseitenketten posttranslational zu modifizieren, was vor allem vor physiologischen Hintergründen untersucht wurde (Sayre et al., 2006). Übertragen auf Erdnüsse, könnten entsprechende Reaktionen einerseits einen Beitrag zu dem bisher nicht erklärbaren Lysinverlust leisten und andererseits einen Einfluss auf das allergene Potential unterschiedlich zubereiteter Erdnüsse haben. Da für entsprechende Reaktionen in der Literatur bisher keine einheitliche Bezeichnung existiert, wird in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung „Lipierungsreaktionen“ oder „Lipierung“ (engl. lipation) eingeführt. Erkenntnisse über Lipierungsreaktionen stammen bisher vor allem aus physiologischen Modelluntersuchungen. Über entsprechende, massenspektrometrisch abgesicherte Reaktionen in Lebensmitteln ist nur sehr wenig bekannt. Weiterhin sind bisher keine Daten bezüglich eines Zusammenhangs von Lipierungsreaktionen und dem allergenen Potential von Erdnüssen verfügbar.

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit war deshalb die Bildung ausgewählter und potentiell reaktiver Sekundärprodukte, die als Folge der Erdnussröstung entstehen können, zu verfolgen. In Modelluntersuchungen sollten nachfolgend die Reaktivitäten gegenüber Aminosäureseitenketten nativer Erdnussproteine untersucht und potentielle Lipierungsprodukte identifiziert werden. Hiervon als relevant erachtete Produkte waren als Referenzsubstanzen darzustellen und massenspektrometrische Quantifizierungsmethoden zu entwickeln, wodurch erstmalig eine direkte Quantifizierung in Erdnüssen ermöglicht würde.

Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war die Untersuchung physiologischer Konsequenzen der Lipierung vor dem Hintergrund einer Beeinflussung des allergenen Potentials von Erdnüssen. Hierzu sollten in Kooperation mit dem Paul-Ehrlich-Institut in Langen IgE-Bindungsstudien durchgeführt werden. Um den Einflussfaktor der Verdaubarkeit auf das allergene Potential zu untersuchen, sollten die Erdnüsse zudem simuliert gastrointestinal verdaut werden. Ausblickend war ein weiteres Ziel, in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden die Bildung von Lipierungsprodukten als Folge einer Oxidation des Low Density Lipoproteins (LDL) zu untersuchen.

## 2 Hintergrund und Wissensstand

### 2.1 Allgemeines zur Erdnuss

Die botanisch zur Familie der Leguminosen zählende Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.) stellt eine etwa 30 Arten umfassenden Gattung dar, die in einer Formenmannigfaltigkeit von mehreren hunderten Sorten angebaut wird. Unterschiede sind beispielsweise in der Wuchsform, Verzweigung und Anordnung der Blütensprossen oder der Größe und Form der Hülsen zu finden. Da es sich bei der Erdnuss um eine Kurztagespflanze handelt, ist der überwiegende Anbau auf tropische und subtropische Regionen beschränkt (Franke et al., 1988). Die Hauptanbauländer sind hierbei China, Indien, Nigeria und die USA. Für die Jahre 2015 und 2016 wurde eine weltweite Produktion von 41 Millionen Tonnen angenommen (USDA, 2015). Die Erdnusspflanze ist einjährig und erreicht eine Wuchshöhe von etwa 60 cm. Eine Besonderheit stellt hierbei die geokarpe Fruchtentwicklung dar (Bodenfrüchtigkeit). Nach einer Selbstbefruchtung bildet sich ein stielartiger, die Samenanlagen enthaltender, Fruchttträger in Richtung Erdboden aus. Die Fruchtentwicklung erfolgt daraufhin im Boden (Bickel-Sandkötter, 2001). Abweichend von anderen Leguminosen öffnet sich ihre Frucht bei der Samenreife nicht, weshalb sie morphologisch zu den Nüssen gezählt wird (Franke, 1992). Die ein bis sechs Zentimeter langen Früchte bestehen aus einer verholzten Schale, die eine netzartige Oberfläche aufweist. Im Inneren befinden sich ein bis fünf Samen, die von einer pergamentartigen, dunkelbraunen Samenschale umgeben sind. Zur Ernte wird die Pflanze von der Wurzel getrennt und zusammen mit den Früchten für einige Wochen zum Trocknen aufgehängt, wodurch der Wassergehalt der Erdnüsse von 40 % auf 10 % gesenkt wird (Bickel-Sandkötter, 2001, Franke et al., 1988). Alternativ kann die Trocknung durch Schwadentrocknung über zwei bis drei Tage und nachfolgender Heißlufttrocknung für 18-24 h realisiert werden (Vercellotti et al., 1995). Die erhaltenen nativen, geschälten und vom Samenhäutchen befreiten Erdnusssamen, nachfolgend als Erdnüsse bezeichnet, weisen einen Fettgehalt von etwa 50 % und einen Eiweißgehalt von etwa 25 % auf (Abb. 1A), (Souci et al., 2008).

Die Fettsäurezusammensetzung in Abb. 1B zeigt, dass prozentual die einfach ungesättigte Ölsäure (18:1) sowie die zweifach ungesättigte Linolsäure (18:2) dominieren. Insgesamt sind 85 % der enthaltenen Fettsäuren ungesättigt (Maguire et al., 2004). Vergleichend mit ausgewählten Schalenfrüchten zeigt sich, dass Erdnüsse die höchsten Gehalte an Protein sowie den Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin aufweisen (Tab. 1), (Souci et al., 2008). Die drei genannten Aminosäuren besitzen nukleophile Aminosäureseitenketten, die, beispielsweise im Proteinverband, Reaktionen mit Carbonylverbindungen eingehen können.

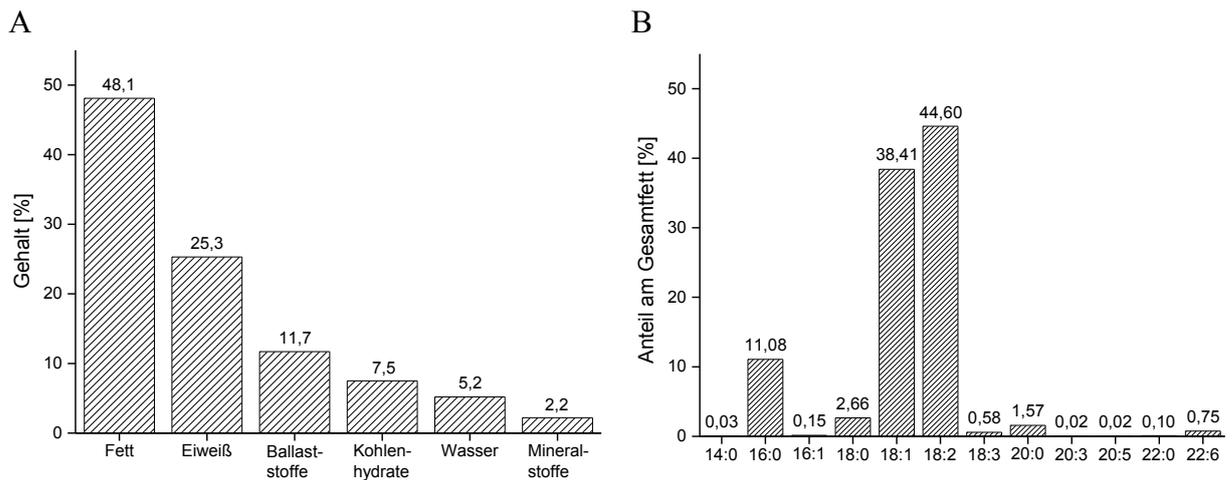


Abb. 1 (A) Zusammensetzung nativer Erdnüsse nach Souci et al. (2008), (B) Fettsäurezusammensetzung des Gesamtfetts nach Maguire et al. (2004)

Tab. 1 Gehalte an Protein und den Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin in ausgewählten Schalenfrüchten nach Souci et al. (2008), jeweils in g/100 g Schalenfrucht

Schalenfrucht	Proteingehalt [%]	Aminosäure		
		Histidin [%]	Lysin [%]	Arginin [%]
Erdnuss	25,3	0,71	1,10	3,46
Cashewnuss	17,5	0,39	0,75	1,98
Haselnuss	12,0	0,28	0,38	2,03
Mandel	18,7	0,52	0,58	2,75
Paranuss	13,6	0,35	0,42	2,12
Walnuss	14,4	0,36	0,44	2,09

Der Kohlenhydratgehalt ist, vergleichend mit dem Fett- oder Proteingehalt, mit 7,5 % als gering anzusehen. Die Anteile an Saccharose, Glukose und Fruktose betragen hierbei jeweils bis zu 4,4 %, 0,08 % und 0,03 % (Vercellotti et al., 1995). Somit kann abgeschätzt werden, dass im Zuge der beim Erdnussrösten ablaufenden Maillard-Reaktion, die Bildung von Frühphasenprodukten, wie beispielsweise Amadori-Produkten, limitiert, wohingegen die Weiterreaktion zu stabilen Endprodukten (AGEs) begünstigt ist. Tatsächlich konnten in gerösteten Erdnüssen Gehalte an Pyrralin quantifiziert werden, die größenordnungsmäßig den Gehalten an  $\epsilon$ -Fruktosyllysin entsprachen (Wellner, 2012a). Der Anteil an Reduktonen (Hydroxycarbonylverbindungen mit zwei bis fünf C-Atomen) liegt in den nativen Erdnüssen zwischen 0,7 und 1,3 % (Vercellotti et al., 1995), wodurch ein natürliches antioxidatives Potential in den Erdnüssen vorherrscht. Das Hauptspeicherorgan stellt bei der Erdnuss das Kotyledon dar (Bewley & Black, 1994; Jones, 1947). In Abb. 2A ist ein mikroskopischer Querschnitt eines Erdnussamens dargestellt. Hieran ist ersichtlich, dass in deren großzelligem Parenchym etwa 5  $\mu\text{m}$  große Aleuronkörner (unlösliche Kristalle der Samenspeicherproteine) sowie etwa 5-15  $\mu\text{m}$  große Stärkekörner enthalten sind, die in eine Fettmatrix eingebettet sind (Bömer et al., 1939). Abb. 2B zeigt eine stärker vergrößerte elektronenmikroskopische

Aufnahme eines Erdnusskotyledons, die ebenfalls die räumliche Nähe der Lipid- und Proteinkompartimente erkennen lässt (Morohashi et al., 1981).

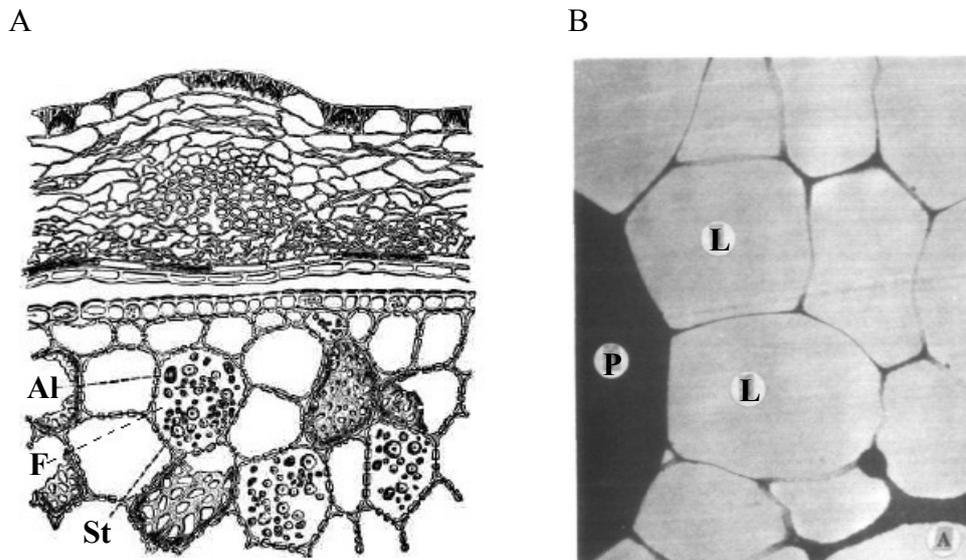


Abb. 2 (A) Mikroskopischer Querschnitt eines Erdnussssamens, modifiziert nach Bömer et al. (1939); Al - Aleuronkörner, F - Fettmatrix, St - Stärkeköerner; (B) vergrößerter, elektronenmikroskopischer Ausschnitt des Kotyledons einer Erdnuss nach Morohashi et al. (1981); L - Lipide, P - Proteine

Erdnüsse finden vielfältigste Einsatzgebiete im Lebensmittelbereich, wobei in westlichen Industrieländern vor allem die Sorten Runner, Virginia und Spanish verwendet werden (Woodroof, 1983). Unter anderem werden die Erdnüsse direkt nach der Röstung verzehrt. Die kommerzielle Erdnussröstung kann dabei kontinuierlich oder im batch-Verfahren erfolgen. Dazu werden die Erdnüsse auf 160 °C für 40-60 min erhitzt (Woodroof, 1983). Weiterhin werden sie zu Erdnussbutter verarbeitet, in Keksen und Backwaren als Zutaten eingesetzt und auf Grund ihres hohen Fettgehalts zu Erdnussöl verarbeitet. Hierzu werden die nativen Erdnüsse mechanisch bei 965 bar gepresst und das ablaufende Öl aufgefangen. Im Presskuchen verbleibendes Öl wird durch eine Lösungsmittlextraktion mit Hexan erhalten. Im Anschluss kann eine Raffination des Öls erfolgen (Woodroof, 1983; Franke, 1992).

## 2.2 Die Erdnussallergie

An Nahrungsmittelallergien leiden nach Schätzungen 4-8 % der Kinder und 1-2 % der Erwachsenen (Al-Muhsen et al., 2003), wobei bei US-amerikanischen Kindern unter 18 Jahren im Zeitraum von 1997 bis 2007 eine Zunahme um 18 % beobachtet wurde (Branum & Lukacs, 2009). Eine Ursache für das altersabhängige Auftreten könnte in den bei Kleinkindern noch nicht vollständig ausgereiften gastrointestinalen Schutzbarrieren liegen, wodurch größere Mengen an intakten Allergenen resorbiert werden können (Walker, 1985). Weiterhin hat

sowohl die regionale als auch die nationale Herkunft einen Einfluss auf die Allergieausbildung. So sind im Stadtbereich häufiger atopische Erkrankungen festzustellen als auf dem Land und Menschen aus Industriestaaten leiden häufiger an Allergien als Menschen aus Entwicklungsländern. Ursächlich wird diskutiert, dass eine Reduktion übertragbarer Krankheiten und hohe Hygienestandards in westlichen Ländern zu einem verstärkten Auftreten atopischer Krankheiten geführt haben könnte („Hygienehypothese“, Helm & Burks, 2000). Weiterhin wird schon länger ein Zusammenhang zwischen der Gabe von Antibiotika und dem Auftreten von Allergien vermutet (Blaser, 2011). Neuere Studien an Mäusen zeigen einen Zusammenhang zwischen der Darmmikrobiota und der Permeabilität der Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 aus dem Darmlumen (Stefka et al., 2014). Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine gezielte Besiedelung des Darmes mit Clostridien zu verringerten Serumgehalten an Ara h 2 und Ara h 6 führte. Ursächlich hierfür war die bakterielle Bildung des Interleukins IL-22, welches die epitheliale Permeabilität verringert (Stefka et al., 2014). Weiterhin scheint im Allgemeinen auch das Geschlecht einen Einfluss zu haben, da im Kindesalter vermehrt Jungen und im Erwachsenenalter vor allem Frauen von Allergien betroffen sind. Die Erdnussallergie nimmt hierbei allerdings eine Sonderrolle ein, da kein Zusammenhang zwischen dem Alter oder Geschlecht und der Allergiehäufigkeit zu beobachten ist (Owusu-Apenten, 2002). Zudem stellt die genetische Prädisposition einen Einfluss auf die Allergieentstehung dar. Beispielsweise liegt das Risiko eines Kindes an einer Atopie zu erkranken in Deutschland bei 5-15 %, wenn keines der Elternteile an einer Atopie leidet. Leidet ein Elternteil an einer Atopie, beträgt das Risiko bereits 20-40 % und wenn beide Elternteile an einer atopischen Erkrankung leiden 60-80 % (Grevers & Röcken, 2008). Im Falle der Erdnussallergie konnte bisher keine spezifische genetische Prädisposition festgestellt werden (Burks, 2008). Weiterhin hat die Allergenexposition einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung einer Allergie. Klinische Hinweise zeigen, dass die Quantität entscheidend sein könnte (Jäger et al., 2008). So kann durch ein Überangebot eines Allergens dessen Resorption gefördert werden. Erdnüsse werden immer populärer und auch zur Herstellung verschiedenster Lebensmittel eingesetzt. So wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verzehr von Erdnüssen oder erdnusshaltigen Lebensmitteln während der Schwangerschaft und der Ausbildung einer Erdnussallergie bei Kindern festgestellt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Allergieentwicklung höher ist, je früher Erdnüsse in die Kleinkindernahrung integriert werden (Frank et al., 1999).

Allgemein sind 8 Lebensmittel für über 90 % der auftretenden Lebensmittelallergien verantwortlich. Hierzu zählen Kuhmilch, Eier, Soja, Weizen, Erdnüsse, Schalenfrüchte (Walnüsse, Haselnüsse, Mandeln, Cashewnüsse, Pecannüsse, Pistazien), Fisch und Krustentiere. Vor allem Erdnüsse, Schalenfrüchte, Fisch und Krustentiere zählen in diesem

Zusammenhang zu denjenigen Lebensmitteln, die zu lebensbedrohlichen Reaktionen führen können (Al-Muhsen et al., 2003). Die Erdnussallergie als solche ist dabei für 25-28 % der Lebensmittelallergien verantwortlich (Owusu-Apenten, 2002). Allgemein wird angenommen, dass 0,6-1,0 % der Bevölkerung von Industrieländern allergisch gegenüber Erdnüssen reagiert (Al-Muhsen et al., 2003). In Deutschland trat die Erdnussallergie bei 0,6 % (EFSA, 2013; Zuberbier et al., 2004) und in Schweden bei 2,4 % der Teilnehmer einer Studie auf (EFSA, 2013; Östblom et al., 2008). In den USA sind 1,1 % der Bevölkerung Erdnussallergiker (Sicherer et al., 1999). Vor allem bei Kindern wurde eine Zunahme beobachtet. Im Untersuchungszeitraum von 2005 bis 2006 konnten bei 9 % der US-amerikanischen Kinder Antikörper gegenüber Erdnüssen nachgewiesen werden (Branum & Lukacs, 2009). Während sich im Zeitraum von 1997 bis 2008 die Anzahl an allergischen Erwachsenen nicht signifikant erhöhte, wurde bei Kindern mehr als eine Verdreifachung (von 0,4 auf 1,4 %) der Häufigkeit festgestellt (Sicherer et al., 2010). Analoge Zunahmen wurden auch in Großbritannien beobachtet. Im Zeitraum von 1989 bis 1994 waren 1,1 % und bis 1996 3,3 % der Kinder betroffen (Grundy et al., 2002). Als mögliche Ursache wird ein frühzeitiger Kontakt mit Erdnüssen im Kindesalter, beispielsweise durch Verzehr oder die Anwendung von Salben, die Erdnussprodukte enthalten, diskutiert (Sicherer et al., 2003). In der Regel verwachsen sich im Kindesalter auftretende Allergien (Becker et al., 2011). Im Falle der Erdnussallergie trifft dies allerdings nur auf 22 % der Betroffenen zu (Skolnick et al., 2001). Ursächlich wird hierfür diskutiert, dass ein Verwachsen vor allem dann eintritt, wenn die gebildeten IgE-Antikörper gegen Konformationsisomere gerichtet sind, die im Laufe der Entwicklung des Darmes weniger gut aufgenommen werden können (Berger, 1998).

Die benötigte Menge an Erdnussprotein, die im doppelt-blinden, plazebokontrollierten, oralen Provokationstest zu objektiven allergischen Reaktionen führte, betrug 2 mg (Hourihane et al., 1997b). Eine einzelne Erdnuss weist einen Proteingehalt von zirka 300 mg auf (Burks, 2008). Die allergieauslösende Menge ist im Vergleich zu anderen Lebensmitteln, die ebenfalls mittels doppelt-blindem, plazebokontrolliertem, oralem Provokationstest getestet wurden, sehr gering. So führen vergleichend 5000 mg Milch (Norgaard & Bindselev-Jensen, 1992), entsprechend 165 mg Protein (Souci et al., 2008), 1000 mg eines Sojabohnenproteinisolats (Bock et al., 1978) oder 1400 mg Haselnüsse (Ortolani et al., 2000), entsprechend 168 mg Protein (Souci et al., 2008) zu objektiven Allergiesymptomen (Souci et al., 2008). Die allergieauslösende Dosis kann hierbei innerhalb eines einzelnen Individuums variieren und von Faktoren, wie der Aufnahme von Alkohol, Medikamenten, dem Gesundheitszustand sowie der physischen und psychischen Verfassung abhängen (Hourihane & Knulst, 2005; BfR, 2009b).

Auf Grund der geringen Proteinmenge, die eine allergische Reaktion hervorrufen kann, ist im Falle der Erdnuss die Wahrscheinlichkeit einer durch unbeabsichtigte Aufnahme auftretenden

allergischen Reaktion erhöht. So zeigt eine amerikanische Studie, dass die jährliche Wahrscheinlichkeit einer allergischen Reaktion durch unbeabsichtigten Erdnussverzehr bei 33 % liegt. Innerhalb von fünf Jahren liegt die Wahrscheinlichkeit bei 58 % und innerhalb 10 Jahren bei 75 % (Vander Leek et al., 2000). Zu unbeabsichtigten Kontaminationen kann es beispielsweise durch aufeinanderfolgende Nutzung von Produktionslinien kommen (Lorenz et al., 2001). Vor allem stellt der Genuss von nicht selbst zubereiteten Mahlzeiten für Allergiker ein Risiko dar, wenn das allergene Lebensmittel unerwartet Bestandteil der Nahrung ist (Lorenz et al., 2001). Aus diesem Grund sieht die VO (EU) 1169/2011 (Lebensmittelinformationsverordnung) auch die Kennzeichnung von nicht vorverpackten Lebensmitteln vor, die Erdnüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse enthalten. Begründend liefert der Erwägungsgrund 48 der Verordnung, dass es sich gezeigt hat, [...] „dass die meisten Fälle von Lebensmittelallergien durch nicht vorverpackte Lebensmittel ausgelöst werden. Deshalb sollten die Verbraucher Informationen über potentielle Allergene immer erhalten“ (VO (EU) Nr. 1169/2011, 2011). Da Kreuzkontaminationen nicht in den Geltungsbereich der VO (EU) Nr. 1169/2011 fallen, erfolgen aus Gründen der Produkthaftung seitens der Industrie häufig freiwillige Angaben wie „kann Spuren von...enthalten“. Durch eine prophylaktische Verwendung dieser Hinweise wird die Auswahl an Lebensmitteln für Allergiker eingeschränkt (BfR, 2009a). Deshalb wurde für erste Schwellenwerte vorgeschlagen, Allergengehalte nur noch im Bereich von 0,01-0,001 % des allergenen Lebensmittels oder 10 mg bis 1 mg Allergenprotein/kg Lebensmittel zu kennzeichnen (BfR, 2009b). Im Falle von Erdnussspurenanteilen sollten auf Grund des hohen allergenen Potentials allerdings die niedrigeren Werte herangezogen werden (Vieths et al., 2006).

Typische Symptome einer Erdnussallergie sind ein Anschwellen des Gesichts, Ausschlag, Juckreiz, erschwertes Atmen, Erbrechen, Bauchschmerzen und -krämpfe, Zyanose und Kollaps/ Ohnmacht. Hierbei verlaufen die Symptome bei Kindern in der Regel milder als bei Erwachsenen (Hourihane et al., 1997a). Im Vergleich zu anderen Nahrungsmittelallergenen kann es im Falle der Erdnussallergie häufiger zu einem anaphylaktischen Schock kommen. So wurden in den Jahren 1994 bis 2006 in den USA 63 Todesfälle, ausgelöst durch Nahrungsmittelallergien registriert, wovon 37 (59 %) auf erdnusshaltige Lebensmittel zurückzuführen waren (Bock et al., 2007; Bock et al., 2001). Im Zeitraum von 1999 bis 2006 wurden in Großbritannien 48 tödlich verlaufende Nahrungsmittelallergien registriert, wovon 9 (19 %) durch Erdnüsse hervorgerufen wurden (Pumphrey & Gowland, 2007). Generell wird angenommen, dass es als Folge einer allergischen Reaktion gegenüber Erdnüssen in etwa 6 % der Fälle zu einem anaphylaktischen Schock kommt (Owusu-Apenten, 2002).

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass, vergleichend mit anderen Nahrungsmittelallergenen, im Falle der Erdnussallergie, bereits sehr geringe Proteinmengen

ausreichend sind, um allergische Reaktionen hervorzurufen. Dabei kann vor allem bei Kindern eine Zunahme der Allergiehäufigkeit beobachtet werden. Weiterhin führt die Erdnussallergie, im Vergleich zu anderen Nahrungsmittelallergien, besonders häufig zum Tod.

## 2.2.1 Allergene der Erdnuss

Bisher konnten in der Erdnuss 12 Allergene identifiziert werden (Mueller et al., 2014), die nach den ersten drei Buchstaben der Gattung *Arachis*, dem Anfangsbuchstaben der Art *hypogaea* und der Reihenfolge der Entdeckung benannt werden (Becker et al., 2011). Somit stellt das Ara h 1 das erste beschriebene Erdnussallergen dar. Tab. 2 gibt einen Überblick über die bisher bekannten Allergene (modifiziert nach Becker et al., 2011).

Tab. 2 Übersicht über die 12 bekannten Erdnussallergene, modifiziert nach Becker et al. (2011)

Allergen	Molekulargewicht, berechnet [kDa]	Proteinfamilie, Funktion	Erkennung
Ara h 1	68,76	Cupine <sup>7)</sup> , Speicherproteine	44 % <sup>1)</sup> - 94 % <sup>2)</sup>
Ara h 1 iso	61,88		
Ara h 2.01	18,00	Prolamine <sup>7)</sup> , Trypsin-	81 % <sup>1)</sup> - 85 % <sup>4)</sup>
Ara h 2.02	16,64	inhibitoren	
Ara h 3	58,70	Cupine <sup>7)</sup> , Speicherproteine	35 % <sup>3)</sup> - 53 % <sup>4)</sup>
Ara h 3 iso	56,24		
Ara h 4 <sup>*</sup> )	58,85		
Ara h 3/4	23,12		
Ara h 5	14,05	Profiline <sup>7)</sup>	13 % <sup>4)</sup>
Ara h 6	14,49	Prolamine <sup>7)</sup>	38 % <sup>4)</sup>
Ara h 7.0101	16,32	Prolamine <sup>7)</sup>	43 % <sup>4)</sup>
Ara h 7.0201	17,37		
Ara h 8.0101	16,96	Bet v-1-related protein <sup>7)</sup> ,	85 % der Patienten
Ara h 8.0201	16,28	Patogenesis-related 10-Protein	mit Birkenpollen- und Erdnussallergie <sup>5)</sup>
Ara h 9.0101	9,14	Prolamine <sup>7)</sup> , nsLTPs	45 % <sup>6)</sup>
Ara h 9.0201	9,05	(unspezifische Lipidtransport- proteine)	
Ara h 10.0101	15,60	Oleosine	n. b.
Ara h 10.0201	17,75		
Ara h 11	14,31	Oleosin	n. b.
Ara h 12 <sup>9)</sup>	5,19 <sup>8)</sup>	Defensin <sup>7)</sup>	n. b.
Ara h 13 <sup>9)</sup>	5,48 <sup>8)</sup>	Defensin <sup>7)</sup>	n. b.

<sup>1)</sup> Koppelman et al. (2004), <sup>2)</sup> Burks et al. (1995), <sup>3)</sup> Koppelman et al. (2003), <sup>4)</sup> Kleber-Janke et al. (1999), <sup>5)</sup> Mittag et al. (2004), <sup>6)</sup> Krause et al. (2009), <sup>7)</sup> Mueller et al. (2014), <sup>8)</sup> IUIS Allergen Nomenclature, <sup>9)</sup> Petersen et al. (2015), <sup>\*</sup>) - Isoform des Ara h 3 (Zhou et al., 2013), n. b. - nicht bekannt

Ara h 4 konnte dabei als Isoform des Ara h 3 identifiziert werden (Zhou et al., 2013). Als Hauptallergene werden das Ara h 1 und Ara h 2 angesehen (Burks, 2008), weshalb diese nachfolgend detaillierter beschrieben werden. Hauptallergene sind dadurch gekennzeichnet, dass sie von über 50 % der IgE-Antikörper von Allergikern erkannt werden (Mueller et al., 2014).

### **Ara h 1**

Das Ara h 1 existiert in zwei glykosylierten Isoformen, wovon die zuerst entdeckte Isoform 626 Aminosäuren (Burks et al., 1995) und ein berechnetes Molekulargewicht von 68,76 kDa ohne Glykosylierungsanteil aufweist (Becker et al., 2011). Das reife Protein ohne Signalpeptid beginnt ab Lys-26, wohingegen die verkürzte Isoform erst ab Aminosäure Gly-85 beginnt und ein berechnetes Molekulargewicht ohne Glykosylierungsanteil von 61,88 kDa aufweist (Becker et al., 2011). Durch Bandenverbreiterung zeigt sich auf der SDS-PAGE ein scheinbares mittleres Molekulargewicht von 63,5 kDa (Burks et al., 1991; Buschmann et al., 1996). Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,6 (Burks et al., 1991). Die sich im C-terminalen Bereich befindliche Glykosylierung ist über einen Asparaginrest verknüpft. Die konjugierten, heterogenen N-Glycane weisen dabei die Strukturen  $\text{Man}_{3-4}\text{XylGlcNAc}_2$  und  $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNAc}_2$  auf (Kolarich & Altmann, 2000). Bisher konnten mindestens 16 Isoallergene des Ara h 1 identifiziert werden (Buschmann et al., 1996). Das Ara h 1 wird von bis zu 94 % der Seren von Erdnussallergikern erkannt (Burks et al., 1995). Nach Burks et al. (1997) konnten 23 lineare Bindungsepitope identifiziert werden, die gleichmäßig über das Protein verteilt sind und aus 6-10 Aminosäuren bestehen. Wird die Tertiärstruktur betrachtet, so zeigt sich, dass die Epitope in zwei äußeren Clustern auf dem Protein lokalisiert sind (Shin et al., 1998). Shreffler et al. (2004) konnten ein zusätzliches lineares Epitop, bestehend aus 25 Aminosäuren und Bogh et al. (2012) fünf Konformationsepitope identifizieren. Vier der linearen Epitope konnten als immunodominant identifiziert werden, da sie von mehr als 80 % der Patientenserum erkannt wurden (Burks et al., 1997). Die Aminosäure Cystein ist insgesamt 7 Mal, Histidin 15 Mal, Lysin 36 Mal und Arginin 59 Mal vertreten (Burks et al., 1997). Cystein stellt dabei keinen Bestandteil eines Epitops dar, wohingegen Histidin in 4 Epitopen, Lysin in 10 Epitopen und Arginin in 13 Epitopen enthalten sind (Burks et al., 1997). Somit besteht die Möglichkeit, dass Aminosäureseitenketten in den Epitopen posttranslational modifiziert werden können. Interessanterweise kann schon die Veränderung einer einzelnen Aminosäure innerhalb eines Epitops das Antikörperbindungsvermögen von Allergikerserum beeinflussen (Shin et al., 1998). Ara h 1 bildet in nativem Zustand Trimere aus, die durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert sind (Maleki et al., 2000b). Nach einer neueren Studie wird auch die Bildung höherer Oligomere angenommen (van Boxtel et al., 2006). Da die Überlappung der Proteine an den Epitop-Clustern erfolgt, wird ein verminderter proteolytischer Abbau als Folge der

Oligomerisierung diskutiert (Maleki et al., 2000b). In Verdauungsansätzen konnte für die resultierenden Peptide teilweise noch eine Erkennung durch Antikörper nachgewiesen werden (Maleki et al., 2000b). Weiterhin wurde gezeigt, dass die fünf Konformationsepitope gegenüber einem Modellverdau resistent sind (Bogh et al., 2012). Zudem wurde festgestellt, dass Ara h 1, welches im Zuge der Maillard-Reaktion quervernetzt wurde, eine höhere proteolytische Stabilität aufweist als nicht modifiziertes Ara h 1 (Maleki et al., 2000a).

### **Ara h 2**

Das Ara h 2 existiert in zwei Isoformen. Die berechneten Molekulargewichte betragen für das Ara h 2.01 18,00 kDa und für das Ara h 2.02 16,64 kDa (Becker et al., 2011). Das Ara h 2.01 ist aus 160 und das Ara h 2.02 aus 172 Aminosäuren aufgebaut (Chatel et al., 2003), wobei die reifen Proteine ohne Signalpeptide bei Arg-22 beginnen (UniProt\_Ara h 2, 2014). Auf der SDS-PAGE erscheinen die Isoformen als Doppelbande und der mittlere isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,2 (Burks et al., 1992b). Im Gegensatz zum Ara h 1 weist das Ara h 2 keine Glykosylierung auf (Li et al., 2010). Insgesamt sind vier Isoallergene bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen (UniProt\_Ara h 2, 2014). Ara h 2 wird von bis zu 85 % der Erdnussallergikerseren erkannt (Kleber-Janke et al., 1999). Bisher wurden 10 lineare Epitope identifiziert, die gleichmäßig über das Protein verteilt sind und aus 6-10 Aminosäuren bestehen. Drei Epitope wurden dabei als immunodominant identifiziert (Stanley et al., 1997). Die Isoformen Ara h 2.01 und Ara h 2.02 unterscheiden sich durch 12 Aminosäuren, wodurch das Ara h 2.02 ein zusätzliches Epitop aufweist und deshalb das potentere Allergen im Vergleich zum Ara h 2.01 darstellen könnte (Chatel et al., 2003). Die Aminosäure Cystein ist insgesamt 8 Mal, Histidin 3 Mal, Lysin 3 Mal und Arginin 8 Mal vertreten (Chatel et al., 2003), wobei Cystein Bestandteil von 3 Epitopen ist und Histidin, Lysin und Arginin jeweils in 2 Epitopen enthalten sind (Stanley et al., 1997). Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer posttranslationalen Aminosäureseitenkettenmodifizierung allgemein auf das gesamte Protein bezogen und im Besonderen innerhalb der Epitope geringer als beim Ara h 1. Für alle Epitope des Ara h 2 konnte gezeigt werden, dass die Mutation einer Aminosäure dazu führt, dass das betreffende Epitop nicht mehr durch Antikörper erkannt wird (Stanley et al., 1997). Im Gegensatz zum Ara h 1 ist das Ara h 2 nicht in der Lage, mit sich selbst Oligomere zu bilden (Sen et al., 2002). Nach einem simulierten gastrointestinalen Verdau konnte analog zum Ara h 1 für die resultierenden Peptide eine IgE-Reaktivität nachgewiesen werden. Für die Verdauungsresistenz wurde hierbei das Vorhandensein von Disulfidbrücken verantwortlich gemacht (Sen et al., 2002). Des Weiteren wirkt Ara h 2 als Trypsininhibitor (Maleki et al., 2003), wodurch eine erhöhte Verdauungsresistenz resultieren könnte.

### 2.2.2 Die Ausbildung der Erdnussallergie

Die Reaktionen des menschlichen Immunsystems lassen sich in angeborene (unspezifische) und adaptive (spezifische) Immunitäten einteilen. Die angeborene Immunität führt innerhalb von 0 bis 4 Stunden zu einer ersten Immunantwort, die gefolgt von einer früh induzierten Reaktion unter Beteiligung erster Effektorzellen innerhalb von 4 bis 96 Stunden in die adaptive Immunantwort übergehen kann. Eine Vielzahl von Barrieren soll zunächst das Eindringen von unerwünschten, exogenen Substanzen in den menschlichen Körper verhindern. Hierzu zählen vor allem die Epithelien (Epidermis, Dermis, Hautanhangsgebilde, Schleimhäute) und der Mukus (Speichel, Schleimhautflüssigkeiten). Weiterhin sind die von Epithelien gebildeten Defensine und Cryptidine zu nennen, die in der Lage sind, Bakterien und Pilze zu lysieren. (Grevers & Röcken, 2008; Janeway et al., 2002)

Gelingt es einer potentiell für den Körper gefährlichen Substanz diese Schutzbarrieren zu überwinden, kommt es zum Eintreten der angeborenen Immunantwort. Diese Abwehrmechanismen werden durch Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten und natürliche Killerzellen realisiert (Jäger et al., 2008). Nachdem Makrophagen die eindringende Substanz erkannt haben, resultiert die Freisetzung von Cytokinen, wodurch es zu Entzündungsreaktionen kommt. Diese sind auf eine Vergrößerung des Blutgefäßdurchmessers, die Bildung von Adhäsionsmolekülen und damit verbundener Bindung zirkulierender Leukozyten sowie eine Erhöhung der Blutgefäßdurchlässigkeit zurückzuführen. Hierdurch kommt es zum Austritt von Flüssigkeit und Proteinen in das lokale Gewebe und somit zur Bildung von Ödemen. Die Körperzellen reagieren auf die Stresssignale durch Sezernierung von Chemokinen, wodurch Phagozyten angelockt werden, die eine erste Schadensbegrenzung versuchen. Weiterhin werden erste antigenpräsentierende Zellen (APC) angelockt, wodurch die spezifische Immunantwort eingeleitet wird. (Grevers & Röcken, 2008; Janeway et al., 2002)

Die Allergieentstehung lässt sich grundsätzlich in zwei Phasen einteilen. Hierbei wird in die Sensibilisierungsphase, die ohne allergische Symptome abläuft und die eigentliche allergische Reaktion unterschieden, die sich mit subjektiven und objektiven allergischen Symptomen äußern kann. Im Folgenden soll dies am Beispiel der Erdnussallergie erläutert werden.

#### 2.2.2.1 Sensibilisierungsphase

Nach dem Verzehr von Erdnüssen oder eines erdnusshaltigen Lebensmittels erfolgt zunächst durch Pepsin, welches im Magen aus Pepsinogen unter Einwirkung der Magensäure freigesetzt wird, die Proteolyse der Erdnussproteine, wobei Peptide entstehen. Aus den Azinuszellen des

Pankreas werden dann unter anderem inaktive Proteinasen und Peptidasen in Form von Proenzymen sezerniert, die im Dünndarmlumen durch die büstensaumständige Enterokinase in ihre aktiven Formen überführt werden. Besonders hervorzuheben ist die Freisetzung von Trypsin aus Trypsinogen, welches Chymotrypsin und Carboxypeptidasen aktiviert. Als Folge werden die im Magen entstandenen Peptide weiter zu Gemischen aus Oligopeptiden und Aminosäuren abgebaut, sekundär-aktiv über die Mucosa resorbiert und schließlich durch passive Diffusion an das Pfortaderblut abgegeben (Horn et al., 2005).

Für eine Sensibilisierung ist die Resorption von unvollständig verdauten Peptiden mit intakten Epitopen erforderlich. Die Resorption erfolgt dabei vornehmlich über sogenannte M-Zellen. Weitere, allerdings in ihrer Bedeutung untergeordnete Möglichkeiten bestehen in der Aufnahme über Pinozytose oder parazellulär. Die M-Zellen sind an der Oberfläche der Peyer-Plaques, welche auf den transzellulären Transport von Makromolekülen aus dem Darmlumen mittels Endozytose spezialisiert sind, lokalisiert. Basolateral weisen sie eine taschenartige Form auf, über welche sie in engem Kontakt mit den APC stehen (Abb. 3, A). Hierbei handelt es sich vor allem um Makrophagen und dendritische Zellen (Grevers & Röcken, 2008; Jäger et al., 2008).

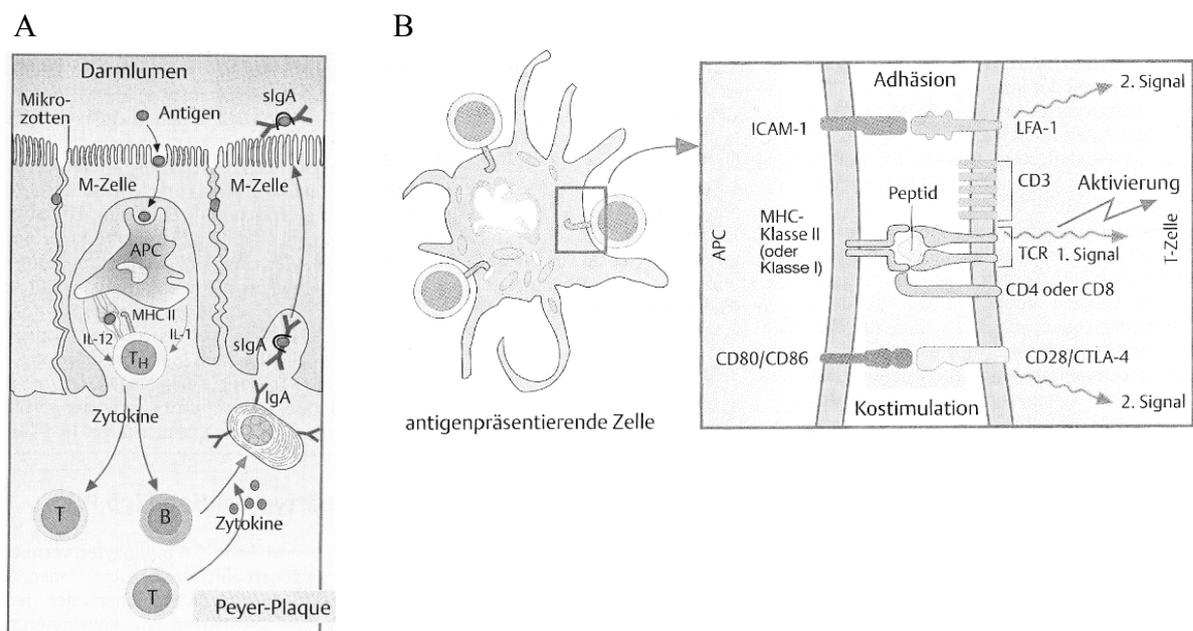


Abb. 3 (A) Interaktion von M-Zelle und APC; (B) Interaktion von APC und T-Lymphozyt, jeweils nach Grevers & Röcken (2008)

Bereits nach 10 bis 15 Minuten können die Antigene die basale Seite erreichen (Neutra et al., 1996), wonach sie durch APC phagozytiert und partiell proteolytisch abgebaut werden (Huby et al., 2000). Diese aus 10 bis 15 Aminosäuren bestehenden resultierenden Antigenfragmente (Huby et al., 2000) werden schließlich mittels des major histocompatibility complex class II (MHC-II) den nativen T-Lymphozyten (T-Zellen) präsentiert. Die T-Zellen stellen hierbei das Bindeglied zwischen der unspezifischen und der spezifischen Immunantwort dar und werden durch ihre membranständigen Corezeptoren charakterisiert. T-Helferzellen

(T<sub>H</sub>) tragen CD4<sup>+</sup>- und zytotoxische Zellen (T<sub>C</sub>) CD8<sup>+</sup>-Corezeptoren. Weiterhin weisen sie den membranständigen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf, über welchen sich die Spezifität der T-Lymphozyten definiert. Ein erwachsener Mensch weist hierbei 10<sup>12</sup> T-Zellen auf, die 10<sup>9</sup> unterschiedliche TCR-Erkennungssequenzen zeigen. Somit könnten theoretisch 10<sup>9</sup> unterschiedliche Antigenfragmente erkannt werden. Für die Erdnussallergie sind die T<sub>H</sub> entscheidend. Kommt es zur spezifischen Erkennung des präsentierten Antigenfragments, bildet sich ein sogenannter trimolekularer Erkennungskomplex aus dem TCR, dem präsentierten Antigenfragment und dem MHC-II-Molekül (Abb. 3, B). Die Zellaffinität ergibt sich gleichzeitig über Adhäsionsmoleküle (Grevers & Röcken, 2008; Janeway et al., 2002).

Zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle und einer hieraus resultierenden Proliferation und Differenzierung bedarf es noch eines zweiten, costimulierenden Signals. Dieses muss die T-Zelle von derselben APC erhalten. Hierfür sind vor allem die Glykoproteine CD80 und CD86 verantwortlich. Den entsprechenden Rezeptor auf der T-Zelle stellt das Molekül CD28 dar. Im weiteren Verlauf kommt es zur Sezernierung des Cytokins IL-2 durch die aktivierten T-Zellen, wodurch sie ihre eigene Proliferation und Differenzierung steuern. Auf diese Weise können aus einer T-Zelle mehrere Tausend Tochterzellen entstehen, die den gleichen Antigenrezeptor tragen. Diese differenzieren sich binnen vier bis fünf Tagen zu T-Effektorzellen. Hierbei besteht die Möglichkeit der Differenzierung zu T<sub>H1</sub>- oder T<sub>H2</sub>-Zellen. Die genauen Ursachen, die dazu führen, dass aus einer proliferierenden CD4-T-Zelle eine T<sub>H1</sub> oder T<sub>H2</sub> wird, sind noch unklar. Bekannt ist allerdings, dass sezerniertes IL-12 sowie eine hohe Anzahl an präsentierten Antigenfragmenten auf der APC zur T<sub>H1</sub>-Differenzierung führen (Huby et al., 2000). Die T<sub>H1</sub>-Differenzierung resultiert schließlich in einer zellvermittelten Immunantwort. Für die Entstehung der Erdnussallergie ist allerdings die humorale Immunantwort, welche durch eine T<sub>H2</sub>-Differenzierung unter dem Einfluss von IL-4 hervorgerufen wird, entscheidend. Somit kann geschlussfolgert werden, dass eine geringe Anzahl oder eine nur kurzzeitige Präsentation an Antigenfragmenten auf den APC eine T<sub>H2</sub>-Differenzierung begünstigen könnte (Huby et al., 2000; Grevers & Röcken, 2008; Janeway et al., 2002).

Damit es zur Sezernierung von Antikörpern gegen das Allergen kommen kann, sind zwei Vorgänge erforderlich. Erstens muss ein B-Lymphozyt (B-Zelle) das gleiche Antigen über seinen B-Zell-Rezeptor (BCR) binden, auf welches die T<sub>H2</sub> aktiviert wurde. Dieser Vorgang wird als gekoppelte Erkennung bezeichnet. Das gebundene Antigen wird anlog den APC internalisiert, proteolytisch abgebaut und als Antigenfragment über MHC-II den T<sub>H2</sub> präsentiert. Zweitens muss eine Aktivierung der B-Zelle durch T<sub>H2</sub> erfolgen. Hierzu muss die T<sub>H2</sub> das mittels MHC-II präsentierte Antigenfragment erkennen und zellgebundene als auch sezernierte Effektormoleküle synthetisieren. Hierzu gehören der CD40-Ligand (CD40L), welcher an das CD40-Oberflächenmolekül der B-Zelle bindet sowie die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-6, welche von der T<sub>H2</sub> gezielt an der Kontaktstelle mit der B-Zelle sezerniert werden.

Die B-Zelle wird hierdurch zur Proliferation angeregt und differenziert sich zur antikörpersezernierenden Plasmazelle. Jede B-Zelle beginnt hierbei zunächst mit der Sezernierung von Immunglobulinen M (IgM). Unter dem Einfluss von IL-4 und IL-13 durch die T<sub>H</sub>2, sowie der CD40L-CD40-Wechselwirkung kommt es zu einem Isotypenwechsel und als Folge zur IgE-Bildung. Die IgE-Bildung kann durch basophile Zellen, Mastzellen und eosinophile Zellen zusätzlich verstärkt werden. Die gebildeten und gegen das präsentierte Antigen spezifischen IgE werden schließlich über den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεR1 an die Oberflächen von Mastzellen, Basophilen oder aktivierten eosinophilen Zellen oder über den niedrigaffinen IgE-Rezeptor FcεR2 (CD23) auf den Oberflächen von B-Lymphozyten, Makrophagen oder Granulozyten gebunden (Janeway et al., 2002; Grevers & Röcken, 2008). Mit der Bindung der IgE an die Oberflächen von B-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, eosinophilen Zellen oder Basophilen ist die Sensibilisierungsphase abgeschlossen.

### 2.2.2.2 Allergische Reaktion

Nach Gell und Coombs werden allergische Reaktionen in vier Typen klassifiziert, wobei auch Reaktionen vorkommen, die Anteile mehrerer Typen zeigen (Pawankar et al., 2009). Da es sich bei Nahrungsmittelallergien in der Regel um Reaktionen nach Typ 1 (Soforttyp) handelt, wird im Folgenden dieser Reaktionstyp näher vorgestellt. Zur Auslösung allergischer Reaktionen kommt es, wenn Antigene, gegen die bereits spezifische IgE gebunden an den Oberflächen von beispielsweise Mastzellen vorliegen, erneut aufgenommen werden. Mastzellen sind in Schleimhaut- und Epithelgeweben in der Nähe von kleinen Blutgefäßen und postkapillären Venolen lokalisiert und enthalten cytoplasmatische Granula (Janeway et al., 2002). Zur Einleitung einer allergischen Reaktion muss eine Quervernetzung von FcεR1 auf der Mastzelloberfläche erfolgen. Somit muss das resorbierte Antigen mindestens zwei intakte Epitope aufweisen, woraus sich eine Mindestantigengröße von 30 Aminosäuren oder etwa 3 kDa ableiten lässt (Huby et al., 2000). Als Folge kommt es zur Degranulierung und damit zur Freisetzung von Mediatorsubstanzen. Hierzu zählt vor allem Histamin, das die lokale Durchblutung und Gefäßdurchlässigkeit erhöht. Weiterhin sezernieren die aktivierten Mastzellen Chemokine, Leukotriene, Prostaglandine, Tromboxane und weitere Lipidmediatoren sowie Cytokine (IL-4 und IL-13), welche die T<sub>H</sub>2-Reaktion aufrechterhalten. Die Mediatoren tragen zu akuten und chronischen Entzündungsreaktionen bei, die sich in eine Sofortreaktion und eine Spätreaktion einteilen lassen. Im Falle der Erdnussallergie tritt die Sofortreaktion innerhalb eines Zeitraums von Sekunden bis hin zu zwei Stunden mit klinischen Symptomen ein (Burks, 2008). Bei Nahrungsmittelallergien ist die Symptomatik besonders

durch Erbrechen, Durchfall, Hautjucken, Nesselsucht und Anaphylaxie gekennzeichnet. Bei der Erdnussallergie kommt es im Speziellen zum Anschwellen des Gesichts, Ausschlag, Juckreiz, erschwertem Atmen, Erbrechen, Bauchschmerzen und -krämpfen, Zyanose und Kollaps/ Ohnmacht (Hourihane et al., 1997a). Die Spätreaktion wird durch die Synthese und Sezernierung von Mediatoren wie Leukotrienen, Chemokinen und Cytokinen ausgelöst, die weitere eosinophile Zellen und  $T_H2$  zum Entzündungsherd locken. Hierdurch kommt es zu einer zweiten Kontraktionsphase der glatten Muskulatur und anhaltenden Ödemen. Im Falle einer schnellen Resorption der Allergene über den Darm kann es zu einer Aktivierung der Mastzellen des Bindegewebes an jedem Blutgefäß kommen. Die als systemische Anaphylaxie bezeichnete Reaktion hat lebensbedrohliche Auswirkungen, da es zu einem starken Blutdruckabfall, einem Zusammenziehen der Atemwege und Anschwellen des Kehlkopfes kommen kann. Dieses Syndrom wird als anaphylaktischer Schock bezeichnet. Wie bereits diskutiert, kommt es beim Auftreten der Erdnussallergie im Vergleich zu anderen allergieauslösenden Lebensmitteln besonders häufig zu anaphylaktischen Schocks (Bock et al., 2001; Bock et al., 2007; Owusu-Apenten, 2002; Pumphrey & Gowland, 2007). Abb. 4 zeigt zusammenfassend den Ablauf der Sensibilisierungsphase und der allergischen Reaktion (Grevers & Röcken, 2008; Janeway et al., 2002).

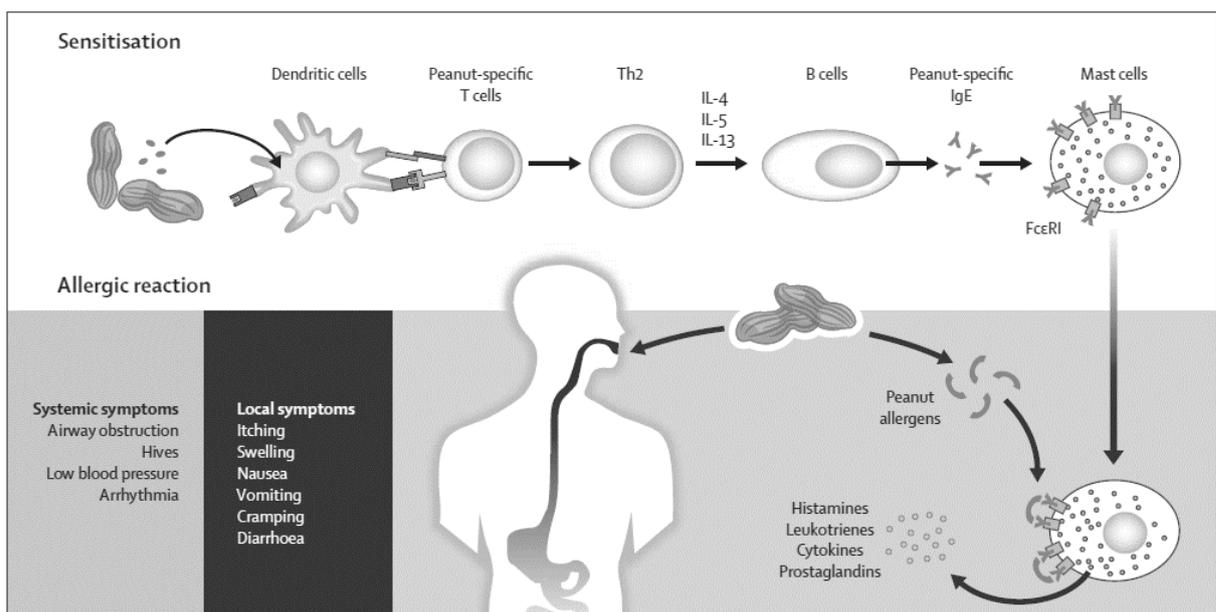


Abb. 4 Schematische Darstellung der Sensibilisierungsphase und der allergischen Reaktion (Burks, 2008)

Die Diagnose einer bestehenden Sensibilisierung kann mittels Pricktest erfolgen, wobei eine positive Reaktion vorliegt, wenn die entstehende Quaddel mindestens 3 mm länger als die der Negativkontrolle ist. Weiterhin kann mittels Bluttest eine Quantifizierung der IgE-Aktivität erfolgen. Allergische Symptome gegenüber Erdnüssen sind zu erwarten, wenn die IgE-Aktivität über 14 kU/L liegt. Das verlässlichste Testergebnis wird durch einen doppelt-

blinden, placebokontrollierten Nahrungsmittelbelastungstest (DBPCFC) erhalten, bei dem der Patient unter ärztlicher Beaufsichtigung geringe Antigendosen oral aufnimmt (Sampson, 2004).

### 2.2.3 Eigenschaften von Nahrungsmittelallergenen

Obwohl jedes Lebensmittelprotein ein potentiell Nahrungsmittelallergen darstellen kann, gibt es Lebensmittel, die besonders häufig zu einer Allergieentstehung führen (Burks, 2008). Daher ist die Frage interessant, welche Eigenschaften ein Nahrungsmittelprotein aufweisen muss, um eine Sensibilisierung zu bedingen. Grundlegend wird in Halbantigene (Haptene), die erst nach kovalenter Bindung an ein Trägerprotein zum Antigen werden und Vollantigene, die direkt als Antigen erkannt werden können, unterschieden (Janeway et al., 2002). Im Falle der Erdnussallergene handelt es sich um Vollantigene, weshalb im Folgenden die Charakteristika von Vollantigenen erläutert und vergleichend dazu die Eigenschaften des Erdnusshauptallergens Ara h 1 dargestellt werden. Da es keine generellen Charakteristika gibt, die dafür verantwortlich sind, dass ein beliebiges Nahrungsmittelprotein als Allergen erkannt wird, werden nachfolgend Proteineigenschaften vorgestellt, die bei bekannten Nahrungsmittelallergenen identifiziert wurden.

In der Regel handelt es sich bei Nahrungsmittelallergenen um Glykoproteine, die Molekülmassen von 5 bis 70 kDa aufweisen (Bredehorst & David, 2001; Petersen et al., 2013) und einen isoelektrischen Punkt im Sauren haben (Maleki et al., 2000b). Das Ara h 1 stellt ein Glykoprotein dar (Kolarich & Altmann, 2000), weist eine berechnete Molekülmasse ohne Glykosylierungsanteil von 68,76 kDa auf (Becker et al., 2011) und hat einen mittleren isoelektrischen Punkt bei pH 4,6 (Burks et al., 1991). Für Ara h 1 konnte gezeigt werden, dass es über den Glykosylierungsrest zur Bindung an den Mannoserezeptor von dendritischen Zellen kommt, wodurch die für die Allergieentstehung entscheidende  $T_H2$ -Polarisierung eingeleitet wird (Royer et al., 2010). Für eine Quervernetzung, der an den Mastzellenoberflächen gebundenen Antikörper, müssen mindestens zwei Epitope auf dem resorbierten Antigen vorliegen. Bei den Epitopen wird in lineare Epitope, die über die Primärstruktur des Proteins und Konformationsepitope, die über die Sekundär- und/oder Tertiärstruktur des Proteins definiert sind, unterschieden (Saloga et al., 2006). Da Konformationsepitope in der Regel einen gastrointestinalen Verdau auf Grund von Denaturierung und Proteolyse nicht überstehen, sind für Nahrungsmittelallergien vor allem lineare Epitope von Bedeutung (Bannon, 2004). Da lineare Epitope in der Regel aus 6 bis 15 Aminosäuren bestehen (Huby et al., 2000; Jäger et al., 2008; Bannon, 2004), wird eine Mindestantigengröße von 30 Aminosäuren, die zirka 3 kDa entsprechen, angenommen (Huby et al., 2000). Weiterhin kann eine große Anzahl an Epitopen, die in Clustern auf der Proteinoberfläche verteilt sind, zu einer stärkeren Mastzell-

degranulierung und damit zu schwereren klinischen Symptomen führen (Shin et al., 1998). Das Ara h 1 weist 24 lineare Epitope auf (Burks et al., 1997; Shreffler et al., 2004), die in zwei äußeren Clustern auf dem Protein lokalisiert (Shin et al., 1998) und jeweils durch 6-10 Aminosäuren definiert sind (Burks et al., 1997).

Die Menge eines Nahrungsmittelallergens und die Expositionsdauer scheinen zudem einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Allergieentstehung zu haben (Bredehorst & David, 2001). So sind die Hauptallergene von Milch, Eiern, Erdnüssen, Soja, Baumnüssen und Getreide in Gehalten von jeweils über einem Prozent der jeweiligen Lebensmittel enthalten (Bannon, 2004) und vor allem Erdnüsse werden in verschiedensten Lebensmitteln als Zutaten eingesetzt. Der Anteil an Ara h 1 beträgt 20 % des Gesamterdnussproteingehalts (Yolanda, 2007), wodurch sich bei einem Proteingehalt von 25 % (Souci et al., 2008) ein Anteil von 5 % in der Erdnuss ergibt. Allgemein hängt die Stärke der Immunantwort von der Allergenmenge ab. Unterhalb einer bestimmten Schwelle tritt keine Reaktion auf, oberhalb der Schwelle erfolgt sie proportional zur Menge und sinkt nach Erreichen eines Plateaus wieder ab (Janeway et al., 2002). Generell wurde festgestellt, dass Faktoren, welche die Dichte an präsentierten Antigenfragmenten auf den APC erhöhen, eher zu einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung und damit nicht zu einer Allergieentwicklung führen (Huby et al., 2000; Petersen et al., 2013).

Zur Ausbildung einer Allergie ist Voraussetzung, dass intakte Epitope die Immunzellen erreichen. Hierfür sind eine thermische und proteolytische Stabilität entscheidend. Die Nahrungsmittelallergene lassen sich hierbei in zwei Klassen einteilen. Bei Allergenen der Klasse II erfolgt die Sensibilisierung in der Regel durch Pollenantigene über den Atemtrakt und die Nahrungsmittelallergie wird dann über kreuzreaktive IgE-Epitope ausgelöst (Petersen et al., 2013). Hierzu zählen Allergien gegen Ara h 5 und Ara h 8. Diese Allergene lösen in der Regel milde Allergiesymptome aus und sind thermisch und proteolytisch instabil (Petersen et al., 2013). Bei den Allergenen der Klasse I erfolgt die Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt. Hierzu zählen Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3. Diese Allergene lösen in der Regel schwere Reaktionen aus und sind thermisch und proteolytisch stabil (Petersen et al., 2013). Die Allergenstruktur spielt hierbei für die proteolytische Stabilität eine entscheidende Rolle. Disulfidbrücken können in diesem Zusammenhang zu einer Stabilisierung der Allergenstruktur beitragen (Bannon, 2004; Breiteneder & Mills, 2005). Im Falle des Ara h 1 erhöht die Oligomerisierung die Verdauungsresistenz (Maleki et al., 2000b; van Boxtel et al., 2006; Bogh et al., 2012). Zudem wurde gezeigt, dass Ara h 1, welches im Zuge der Maillard-Reaktion quervernetzt wurde, eine höhere proteolytische Stabilität aufweist als nicht modifiziertes Ara h 1 (Maleki et al., 2000a). Weiterhin spielt die Allergenmatrix eine Rolle. So führt nach Petersen et al. (2013) eine Assoziation von Ara h 8 mit Lipiden zu einer erhöhten Verdauungsresistenz und das Vorhandensein einer Serinprotease in den Erdnüssen könnte zu einer Spaltung der tight junctions führen, wodurch Erdnussallergene besser aufgenommen

werden könnten. Weiterhin weist Ara h 2 trypsininhibitorische Eigenschaften auf, dessen Aktivität als Folge einer Röstung um das 3,6-Fache erhöht wird (Maleki et al., 2003). Hierdurch kann ein unvollständiger Verdau des Ara h 2 selbst und weiterer Erdnussallergene resultieren (Petersen et al., 2013).

Es kann somit generell festgehalten werden, dass es bestimmter Grundvoraussetzungen bedarf (Anzahl und Verteilung der Epitope, Prozessierungsresistenz, Verdauungsresistenz), damit überhaupt eine Sensibilisierung gegenüber einem bestimmten Protein erfolgen kann. Allerdings weisen viele Nahrungsmittelproteine diese Eigenschaften auf. Die tatsächliche Allergieentwicklung ist allerdings ein komplexer Prozess, bei dem unter anderem die genetische Prädisposition, die Nahrungsmittelmatrix, die Allergenexposition sowie die Antigenpräsentation und damit einhergehende Signale, die eine T<sub>H</sub>2-Polarisierung bewirken, eine entscheidende Rolle spielen (Bannon, 2004; Petersen et al., 2013).

## 2.2.4 Beeinflussung des allergenen Potentials von Erdnüssen

In den USA wird der Anteil an Erdnussallergikern an der Gesamtbevölkerung zu 1,1 % angenommen (Sicherer et al., 1999), wobei im Zeitraum von 1997 bis 2008 mehr als eine Verdreifachung der Anzahl an erdnussallergischen Kindern beobachtet wurde (Sicherer et al., 2010). Schon in den 1980er Jahren wurde festgestellt, dass ein Drittel der amerikanischen Kinder mit moderater bis schwerer atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelallergien gegenüber Erdnüssen sensibilisiert sind (Sampson & McCaskill, 1985). Aktuellere Studien zeigen, dass 17 % der durchschnittlich 7 Jahre alten, an Asthma erkrankten Kinder aus den USA gegenüber Erdnüssen sensibilisiert sind (Wang et al., 2005). In China sind 3,4-5,0 % der Bevölkerung allergisch gegenüber Nahrungsmitteln, wobei in einer Studie, unter Beteiligung von 29 chinesischen Kindern, die eine Nahrungsmittelallergie aufwiesen, keines gegenüber Erdnüssen sensibilisiert war (Hill et al., 1997). Von 130 chinesischen Kindern mit moderater bis schwerer atopischer Dermatitis waren nur 4 % Erdnussallergiker (Hill et al., 1997). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass bei 9 % der durchschnittlich 9 Jahre alten, an Asthma erkrankten, chinesischen Kindern eine Sensibilisierung gegenüber Erdnüssen vorlag (Leung et al., 2002). Allgemein sind die Hauptnahrungsmittelallergene in Asien Milch, Eier, Soja, Fisch und Seefisch und speziell auf China bezogen Fisch, Shrimps, Krabben und Algen, jedoch keine Erdnüsse (Beyer et al., 2001; Hill et al., 1997).

Diese Diskrepanz in der Häufigkeit, mit der die Erdnussallergie in den USA und China auftritt, liegt weder an den Verzehrsmengen von Erdnüssen und Erdnussprodukten, die in beiden Ländern mit jeweils 3 kg pro Einwohner und Jahr vergleichbar sind, noch an einem unterschiedlichen Genpool, da bei der chinesisch-amerikanischen Bevölkerung die

Erdnussallergie mit vergleichbarer Häufigkeit auftritt, wie bei der Gesamtbevölkerung der USA (Beyer et al., 2001). Cong et al. (2008) konnten zeigen, dass die Gehalte an Ara h 1 und Ara h 3 in den chinesischen Erdnussorten Baisha, Luhua und Huayu geringer sind, als bei den amerikanischen Sorten Runner, Virginia, Spanish und Valencia. Des Weiteren stellten sie fest, dass das Ara h 2 kein Hauptallergen in China darstellt, da dieses durch die verwendeten Patientenseren aus China nicht erkannt wurde. Mondoulet et al. (2003) zeigten in ihrer Studie, dass es als Folge des in China üblichen Kochens der Erdnüsse insbesondere zu einer Extraktion niedermolekularer Erdnussallergene, vor allem an Ara h 2, in das Kochwasser kommt. Analoge Extraktionen beobachteten auch Turner et al. (2014). Die als Folge des Erdnusskochens auftretende Allergenextraktion könnte zusammen mit den geringeren Allergengehalten in den chinesischen Erdnussorten zu einer niedrigeren Sensibilisierungsrate in China im Vergleich zu den USA beitragen. Allgemeine Faktoren, die das allergene Potential von Proteinen posttranslational beeinflussen können, sind nach Toda et al. (2014) unter anderem eine Hitzebehandlung, wodurch die Proteinstruktur verändert werden kann. Dies kann in einem Verlust an Konformationsepitopen, einer Maskierung, oder auch Freilegung von linearen Epitopen resultieren (Toda et al., 2014). Weiterhin können kovalente Modifizierungen die Ladung, Hydrophobizität und Strukturen der Proteine und damit auch die IgE-Affinität und Zugänglichkeit beeinflussen (Toda et al., 2014). Zudem kann es durch kovalente Modifizierungen ebenfalls zu Maskierungen von Epitopen kommen (Toda et al., 2014). Weitere Einflussfaktoren sind die Verdaubarkeit der Proteine, die beispielsweise durch Disulfidbrücken (Bannon, 2004; Breiteneder & Mills, 2005) oder Oligomerisierung (Bogh et al., 2012; van Boxtel et al., 2006; Maleki et al., 2000b) erhöht werden kann. Auf die Verdaubarkeit kann sich auch die Gabe von Antazida negativ auswirken, wodurch das allergene Potential von Nahrungsmittelproteinen erhöht werden kann (Untersmayr et al., 2003). Nach Becker et al. (2011) sollten die Nahrungsmittelallergene im Gegensatz zu Aeroallergenen im Kontext ihrer Matrix betrachtet werden, da Allergene im Zuge der Zubereitung oder Verarbeitung einer Vielzahl physikalischer und chemischer Reaktionen unterworfen sind.

In diesem Zusammenhang könnte bedeutsam sein, dass sich die Zubereitungsformen der Erdnüsse in den USA, in denen Erdnüsse überwiegend in gerösteter Form und China, wo sie in frittiert oder gekochter Form verzehrt werden, unterscheiden (Cong et al., 2008; Beyer et al., 2001). Somit könnten in Abhängigkeit der Zubereitungsart unterschiedliche Proteinmodifizierungen auftreten, die sich bezüglich ihrer Auswirkungen auf das allergene Potential unterscheiden könnten. Untersuchungen, die sich mit dieser Thematik beschäftigten zeigen allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Mondoulet et al. (2003) konnten zeigen, dass kein Unterschied des IgE-Bindungsvermögens von Patientenseren gegenüber Proteinextrakten aus rohen und gerösteten Erdnüssen bestand, wohingegen das Proteinextrakt der gekochten Erdnüsse ein um 50 % verringertes Bindungsvermögen zeigte. Aus ungerösteten und gerösteten

Erdnüssen (200 °C für 15 Minuten) isoliertes Ara h 1 unterschied sich in seinen IgE-Bindungsvermögen nicht (Koppelman et al., 1999). Allerdings konnte eine Verringerung des allergenen Potentials des isolierten Ara h 1 als Folge des Kochens beobachtet werden, was auf eine Oligomerisierung und eine damit einhergehende Maskierung der Epitope zurückgeführt wurde (Blanc et al., 2011). Demgegenüber zeigten Maleki et al. (2000a), dass Proteinextrakte aus gerösteten Erdnüssen ein um 90-fach höheres IgE-Bindungsvermögen aufwiesen als die Proteinextrakte aus rohen Erdnüssen. Analoge Ergebnisse beobachteten auch Cabanillas et al. (2015). Chung & Champagne (1999) stellten fest, dass ein nicht-allergenes Erdnusslektin als Folge einer Glykierung durch Glukose und Fruktose in eine allergene Form überführt werden konnte, die durch IgE von Erdnussallergikern erkannt wurde. Hierdurch wurde gezeigt, dass durch die Maillard-Reaktion ein Protein in ein Neoallergen überführt werden kann. Weiterhin wurde festgestellt, dass durch Glukose oder Xylose glykiertes Ara h 1 und Ara h 3 im Gegensatz zu den nativen Proteinen an den receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) binden können (Mueller et al., 2013). Hierdurch könnte eine verstärkte Sensibilisierung gegenüber Ara h 1 und Ara h 3 als Folge einer verbesserten Erkennung durch dendritische Zellen, die den RAGE-Rezeptor aufweisen, erfolgen. Vissers et al. (2011) zeigten, dass Erhitzen von Ara h 1 in der An- und Abwesenheit von Glukose zu einer verstärkten Degranulierung von Basophilen führte, wohingegen im Falle des Ara h 2 die Degranulierung verringert wurde. Am Beispiel von durch Glukose glykiertem Ovalbumin (AGE-OVA) konnte gezeigt werden, dass dieses verstärkt durch dendritische Zellen aufgenommen wird und auch zu einer verstärkten Expression des RAGE führt (Hilmenyuk et al., 2009). Des Weiteren wurde festgestellt, dass AGE-OVA im Vergleich zu nicht glykiertem OVA nach Bindung an den Scavenger-Rezeptor SR-AI/II durch dendritische Zellen aufgenommen wird, in dessen Folge eine gesteigerte Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet wurde (Ilchmann et al., 2010). Wellner (2012a) konnte mittels Western Blot zeigen, dass als Folge einer gezielten Glykierung der isolierten Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 2 mit Glukose und Fruktose das IgE-Bindungsvermögen nicht signifikant beeinflusst wurde. Allerdings wurde anhand von Histaminfreisetzungstests festgestellt, dass Extrakte aus gerösteten Erdnüssen im Vergleich zu den rohen Erdnüssen zu einer höheren Histaminfreisetzung führten (Wellner, 2012a). Hierdurch wurde geschlussfolgert, dass eine Glykierung der Erdnusshauptallergene Ara h 1 und Ara h 2 nicht zur Bildung von Neoepitopen führt. Dennoch blieb die Vermutung, dass weitere, während der Röstung ablaufende Reaktionen, das allergene Potential beeinflussen könnten. Interessanterweise konnte als Folge des Erdnussröstens eine Lysinmodifizierung von bis zu 40 % beobachtet werden, wovon allerdings nur 10 % durch die entstandenen Maillard-Reaktionsprodukte N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin, Pyrralin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin erklärt werden konnten (Wellner et al., 2012b). Ursächlich für die nicht erklärbare starke Lysinmodifizierung

wurden Reaktionen mit Carbonylverbindungen, die aus der Lipidperoxidation stammen, diskutiert (Wellner et al., 2012b).

Werden der hohe Fettgehalt der Erdnüsse von 48 % (Souci et al., 2008) und der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren von 85 % (Maguire et al., 2004) betrachtet, so ist naheliegend, dass es während der Erdnussröstung zum Ablaufen der Lipidperoxidation kommen kann. In deren Folge gebildete reaktive Sekundärprodukte könnten im weiteren Verlauf mit Aminosäureseitenketten von Proteinen Reaktionen eingehen. Schon in den 1960er Jahren konnten Roubal & Tappel, (1966) beobachten, dass eine wässrige Inkubation von peroxidiertem Ethylarachidonat mit  $\gamma$ -Globulin bei 37 °C zu einem Ausfällen des Proteins und einem Lysinverlust von 59 % führte. In der Literatur wurden bisher keine Untersuchungen zum Einfluss entsprechender Reaktionen auf das allergene Potential durchgeführt.

### 2.3 Die Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation beschreibt den oxidativen Abbau von Lipiden, wodurch es zur Bildung von flüchtigen und nicht flüchtigen Sekundärprodukten kommt. Diese stellen teilweise geruchsaktive Verbindungen mit niedrigen Geruchsschwellenwerten dar. In Lebensmitteln werden diese Aromaveränderungen häufig als ranzig, fischig, metallisch oder kartonartig wahrgenommen. Andererseits tragen diese Verbindungen zum typischen Aroma vieler Obst- und Gemüsearten bei und runden das Aroma fetthaltiger Lebensmittel ab (Belitz et al., 2008).

#### 2.3.1 Bildung von Primärprodukten

Die Lipidperoxidation lässt sich in die Autoxidation und die Lipoxygenase-Katalyse unterteilen. Bei letztgenannter Reaktion erfolgt die Übertragung des Sauerstoffs auf die Fettsäure enzymkatalysiert (Belitz et al., 2008). Da beim Erdnussrösten die Autoxidation relevant ist, wird nachfolgend nur auf diesen Reaktionstyp eingegangen.

Die Geschwindigkeit der Autoxidation ist unter anderem abhängig von der Fettsäurezusammensetzung, dem Vorhandensein von Pro- und Antioxidantien, dem Sauerstoffpartialdruck, der Oberfläche, der Temperatur, dem Lichtzutritt, dem Wassergehalt und der Position der betroffenen Fettsäure innerhalb des Triacylglyceridmoleküls. Der Zeitraum, bis es zu einer messbaren Sauerstoffaufnahme kommt (Induktionsperiode) und die Oxidationsgeschwindigkeit sind vor allem von der Anzahl an Doppelbindungen im Fettsäuremolekül abhängig. Je mehr Doppelbindungen enthalten sind, desto kürzer ist die

Induktionsperiode und desto schneller verläuft die Oxidation, da die zur Abstraktion eines Wasserstoffatoms benötigte Aktivierungsenergie herabgesetzt ist (Halliwell & Chirico, 1993). Der Start der Lipidperoxidation verläuft über die Bildung erster Radikale. Hierfür ist die Fotooxygenierung verantwortlich, die in zwei Typen eingeteilt werden kann. Bei der Typ-1-Fotooxygenierung reagiert ein durch Licht aktivierter Sensibilisator mit der Fettsäure, wohingegen beim Typ-2 Triplett-Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ) durch den angeregten Sensibilisator zu Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) aktiviert wird. Bei einer hohen Sauerstoff- und niedrigen Fettsäurekonzentration läuft bevorzugt die Typ-2-Fotooxygenierung ab. Es konnte gezeigt werden, dass der  $^3\text{O}_2$  im Gegensatz zum  $^1\text{O}_2$  mindestens 1500-fach schneller mit Methylolinoleat reagiert (Rawls & van Santen, 1970). Der Singulett-Sauerstoff kann nachfolgend direkt mit ungesättigten Fettsäuren reagieren (Abb. 5). Hierbei wird deutlich, dass doppelt so viele Hydroperoxide entstehen können, wie Doppelbindungen in der Fettsäure vorliegen (Belitz et al., 2008; Halliwell & Chirico, 1993; Frankel, 1984).

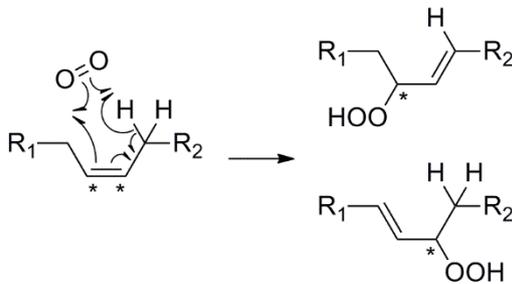


Abb. 5 Reaktion von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) mit einer ungesättigten Fettsäure zum Hydroperoxid in Anlehnung an Belitz et al. (2008). Die Reaktionsmöglichkeiten des  $^1\text{O}_2$  sind durch ein Sternchen (\*) markiert.

Durch Schwermetallionen (Fe, Cu und Co), die natürlicherweise im Lebensmittel vorkommen, oder die durch Verarbeitung oder Verpackung in das Lebensmittel gelangen können, wird die Autoxidation durch Zersetzung der Fettsäurehydroperoxide zu Radikalen gestartet (Abb. 6).



Abb. 6 Reaktionen von Metallionen mit Fettsäurehydroperoxiden zu Radikalen nach Ayala et al. (2014), Belitz et al. (2008) und Spitteller (1998)

Zusätzlich kann auch ein Abbau der Hydroperoxide durch UV-Licht erfolgen (Schieberle et al., 1985). Eine direkte Oxidation von Fettsäuren durch Metallionen spielt beim Start der Autoxidation keine Rolle, da diese Reaktion sehr langsam abläuft (Belitz et al., 2008).

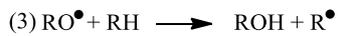
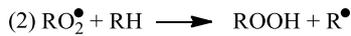
Das Metallion der niedrigeren Oxidationsstufe reagiert hierbei um den Faktor 10 schneller als das oxidierte Metallion, wobei ein Zusatz von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure den reduzierenden Zustand der Metallionen aufrechterhält und somit den Abbau der Fettsäurehydroperoxide beschleunigen kann. Das pH-Optimum der Zersetzungsreaktionen liegt

für Fe- und Cu-Ionen bei pH 5,5-6,0. Bei einem  $a_w$ -Wert von 0,3 wird hingegen ein Minimum der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Ursächlich werden eine geringere Hydratisierung der Metallionen bei niedrigeren  $a_w$ -Werten diskutiert und bei höheren  $a_w$ -Werten eine verbesserte Mobilität von Prooxidantien. Weiterhin können Radikale Häm- oder Hämin-katalysiert entstehen. Dies erfolgt vor allem in tierischen Geweben durch Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom c. Zusätzlich kann es durch Superoxidradikalanionen ( $O_2^-$ ) zur Radikalbildung kommen. Dessen Bildung erfolgt vor allem katalysiert über Flavinenzyme. Weiterhin können Hydroxyradikale durch eine Fenton-Reaktion mit  $H_2O_2$  über Fe-Komplexe entstehen (Belitz et al., 2008; Neyens & Baeyens, 2003).

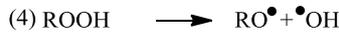
Bei den Erdnüssen dürfte allerdings vor allem die Radikalbildung über Schwermetallionen relevant sein. Hierbei betragen die jeweiligen Gehalte an Fe und Cu 1,8 und 0,8 mg/100 g Erdnuss (Souci et al., 2008). Nachdem in der Initialphase erste Radikale gebildet wurden, kommt es zu einer Radikalkettenreaktion, deren Anfangsstadium für Olefine durch Bolland (1949) beschrieben wurde (Abb. 7). Der Mechanismus lässt sich dabei in Kettenfortpflanzung, Kettenverzweigung und Kettenabbruch einteilen. Im weiteren Reaktionsverlauf entstehen Sekundärprodukte, die auch weiter zu Tertiärprodukten autoxidieren können (Belitz et al., 2008).

Der zweite in Abb. 7 dargestellte Reaktionsschritt, die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einer Fettsäure (RH) durch ein Peroxyradikal, ist geschwindigkeitsbestimmend für die Radikalkette (Belitz et al., 2008). Weiterhin ist ein Radikal bei Raumtemperatur in der Lage, die Bildung von bis zu 100 Hydroperoxiden zu initiieren, bis es zum Kettenabbruch kommt. In Gegenwart von Sauerstoff werden die Alkylradikale nach dem ersten abgebildeten Reaktionsschritt in Peroxyradikale überführt. Die im weiteren Verlauf gebildeten Fettsäurehydroperoxide stellen erste Produkte der Lipidperoxidation dar (Frankel, 1984), die allerdings sensorisch noch nicht wahrnehmbar sind (Belitz et al., 2008). Da das nach Reaktionsschritt (1) gebildete Peroxyradikal reaktionsträge ist, erfolgt die Abstraktion des am schwächsten gebundenen Wasserstoffatoms der Fettsäuren in Reaktionsschritt (2) selektiv.

## Kettenfortpflanzung



## Kettenverzweigung



## Kettenabbruch

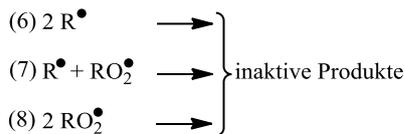


Abb. 7 Radikalkettenmechanismus der Fettsäureperoxidation nach Bolland (1949) und Belitz et al. (2008)

Im Gegensatz dazu sind die im späteren Reaktionsverlauf gebildeten Hydroxy- und Alkoxyradikale reaktiver. Die aus der H–O-Bindung frei werdende Energie beträgt 376 kJ/mol, sodass der benötigte Energieaufwand der H-Abstraktion niedriger liegen muss. Die Dissoziationsenergien liegen für eine R–CH<sub>2</sub>–H-Gruppe bei 422 kJ/mol, für eine CH<sub>3</sub>–CHR–H-Gruppe bei 410 kJ/mol, für eine Mono-Allylgruppe bei 322 kJ/mol und für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einem 1,4-Pentadiensystem auf Grund der höheren Resonanzstabilisierung bei 272 kJ/mol. Somit erfolgt die Abstraktion leichter aus ungesättigten Fettsäuren (Benzie, 1996). Bei Temperaturen über 60 °C nimmt allerdings die Selektivität der Autoxidation ab, da es vermehrt zur Bildung von Hydroxy- und Alkoxyradikalen kommt. Diese sind in der Lage, Wasserstoffatome auch aus gesättigten Fettsäuren zu abstrahieren (Belitz et al., 2008).

In Abb. 8 ist exemplarisch die Hydroperoxidbildung der Linolsäure dargestellt. Nach der Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch ein Peroxyradikal entsteht ein Pentadienylradikal, an welches molekularer Sauerstoff angreift, wodurch sich zunächst zwei Hydroperoxyoctadecadiensäuren (HPODE) am C<sub>9</sub> und C<sub>13</sub> ausbilden können. Diese weisen jeweils eine (*Z*)- und (*E*)-Doppelbindung auf (9-(*Z,E*)-HPODE und 13-(*Z,E*)-HPODE). Durch  $\beta$ -Fragmentierung und Bindungsrotation können direkt aus den Peroxyradikalen oder nach Wasserstoffabstraktion aus den Hydroperoxiden die entsprechenden (*E,E*)-konfigurierten Hydroperoxide entstehen (9-(*E,E*)-HPODE und 13-(*E,E*)-HPODE). Die Anteile an 9-HPODE und 13-HPODE an den Gesamtmonohydroperoxiden betragen jeweils 46,5 % und 49,5 % (Belitz et al., 2008; Yin & Porter, 2005; Gardner, 1989).

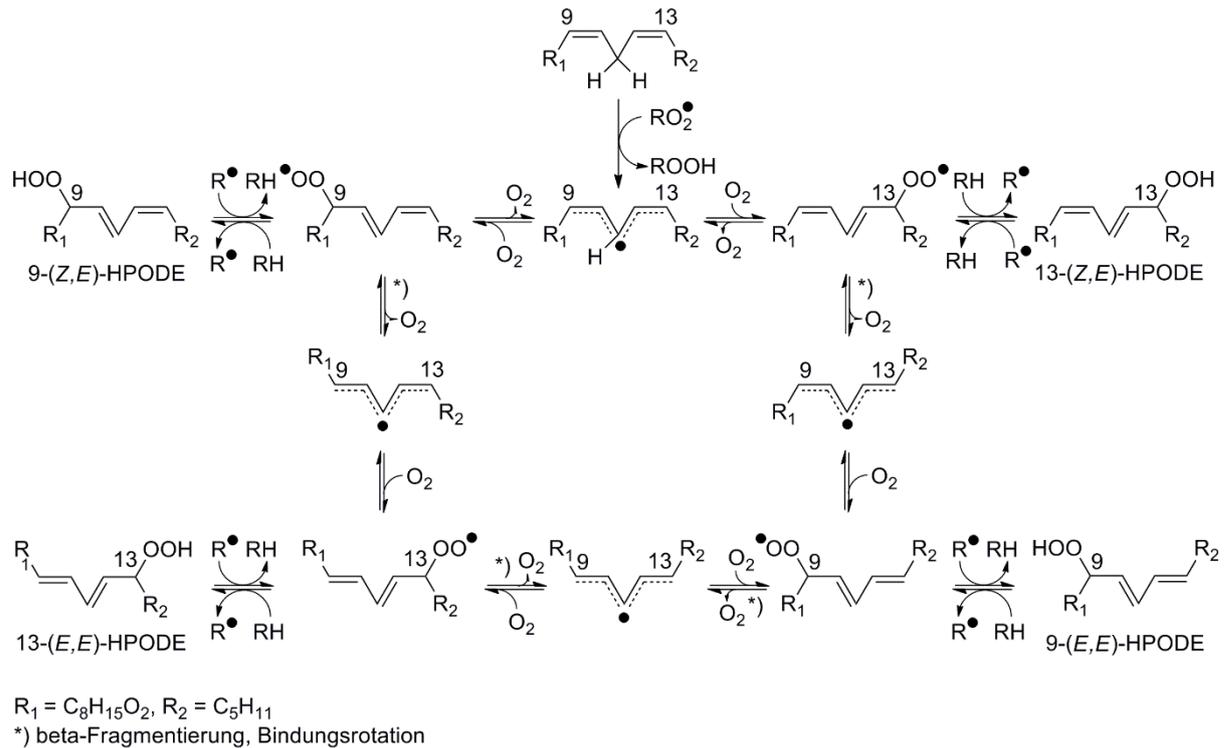


Abb. 8 Hydroperoxidbildung der Linolsäure, modifiziert in Anlehnung an Belitz et al. (2008), Yin & Porter (2005), Porter et al. (1995), Gardner (1989) und Chan et al. (1980)

Die Ausbildung eines Hydroperoxids an C<sub>11</sub> (11-(Z,Z)-HPODE) konnte in Gegenwart von  $\alpha$ -Tocopherol gezeigt werden (Brash, 2000). Bei Abwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol tritt allerdings eine schnelle Fragmentierung zu den thermodynamisch stabileren, konjugierten Dienperoxyradikalen ein, wodurch schließlich die 9- und 13-HPODE gebildet werden. Weitere Nebenprodukte aus der Autoxidation sind die Hydroperoxide an C<sub>8</sub> und C<sub>14</sub>, die jeweils 1,5 % des Monohydroperoxidanteils ausmachen sowie Hydroperoxide an C<sub>10</sub> und C<sub>12</sub>, die jeweils 0,5 % des Monohydroperoxidanteils ausmachen. Bei der Fotooxygenierung entstehen die Hydroperoxide 9-HPODE, 10-HPODE, 12-HPODE und 13-HPODE in den Anteilen 32 %, 17 %, 17 % und 34 %. Die Hydroperoxide an C<sub>8</sub> und C<sub>14</sub> entstehen hierbei nicht (Belitz et al., 2008; Frankel, 1984).

Generell können Hydroperoxide wie folgt weiter reagieren: (1) unter dem Einfluss von Wasserstoffabstraktoren oder Schwermetallionen zu den entsprechenden Peroxy- oder Hydroxyradikalen (Abb. 7. Gl. 4 und Gl. 5); (2) durch  $\beta$ -Spaltung des Sauerstoffs aus Peroxyradikalen (Abb. 8); (3) durch Reaktion von 2 Peroxyradikalen (Abb. 7, Gl. 8) und anschließendem Abbau zu Ketonen, Alkoholen und Sauerstoff, oder (4) Reaktion von Peroxyradikalen mit nicht peroxidischen Radikalen (Abb. 7, Gl. 7); (5) durch Addition von Peroxyradikalen an Olefine (Gardner, 1989).

Befinden sich die Peroxyradikale in Nachbarschaft zu einer isolierten  $\beta$ ,  $\gamma$ -Doppelbindung, kann es zu einer Cyclisierung (Porter et al., 1981) und als Folge unter Reaktion eines zweiten

Sauerstoffmoleküls zur Bildung von Hydroperoxyepidioxiden kommen (Abb. 9), (Belitz et al., 2008; Chan et al., 1980; Frankel, 1984; Yin & Porter, 2005).

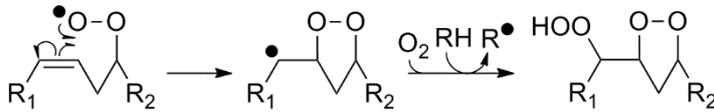


Abb. 9 Hydroperoxyepidoxidbildung, modifiziert nach Belitz et al. (2008), Yin & Porter (2005), Frankel (1984) und Chan et al. (1980)

Im Falle der Linolsäure sind hierfür die Peroxyradikale an C<sub>10</sub> und C<sub>12</sub> relevant. Werden diese als Folge der Autoxidation nur in sehr geringen Anteilen von jeweils 0,5 % der Gesamtmonohydroperoxide gebildet, ist deren Bildung bei der Fotooxygenierung mit jeweils 17 % relevanter. Unter thermischer Belastung kommt es zur Fragmentierung der Hydroperoxyepidioxide. So entstehen beispielsweise aus dem Hydroperoxyepidoxid des 12-Peroxyradikals der Linolsäure 2-Heptenal und 9-Oxononansäure (Belitz et al., 2008).

Die Radikalkettenreaktion beschleunigt sich in der 2. Stufe - der Kettenverzweigung - autokatalytisch, da durch einen unimolekularen Zerfall der Hydroperoxide Alkoxy- und Hydroxyradikale entstehen (Abb. 7, Gl. 4). Zum Kettenabbruch kann es schließlich durch Reaktion von zwei Radikalen kommen (Yin & Porter, 2005). Im Falle der Erdnüsse könnten die Abbruchreaktionen 6 und 7 der Abb. 7 relevant sein, da diese in fettreichen Lebensmitteln eine Rolle spielen, deren innere Bereiche an Sauerstoff verarmt sind (Belitz et al., 2008).

Um eine Fotooxygenierung zu verhindern und damit den Ablauf der Lipidperoxidation zu verzögern oder zu hemmen, sollten potentiell labile Produkte dunkel gelagert werden. Weiterhin sollte der Sauerstoffanteil möglichst minimiert und das Produkt bei tiefen Temperaturen gelagert werden, um hierdurch die Geschwindigkeit der Autoxidation herabzusetzen. Zudem kann ein Zusatz von Antioxidantien erfolgen (Belitz et al., 2008).

Antioxidantien sind in der Lage, Radikale aufzunehmen und dabei selbst stabile Radikale auszubilden, wodurch die Radikalkettenreaktion der Lipidperoxidation unterbrochen wird. Häufig in Lebensmitteln natürlicherweise vorkommende sowie zugesetzte Antioxidationsmittel stellen Tocopherole dar, von denen das  $\delta$ -Tocopherol die stärkste antioxidative Wirksamkeit zeigt. Generell sind diese in der Lage, mit zwei Radikalen zu reagieren, wodurch zwei Radikalketten gestoppt werden können (Abb. 10), (Belitz et al., 2008; Yin & Porter, 2005; Porter et al., 1995).

Auch im physiologischen Bereich wurde gezeigt, dass eine Kombination aus  $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbinsäure die Lipidoxidation von low density Lipoproteinen (LDL) und Plasmabestandteilen inhibiert (Niki et al., 2005).

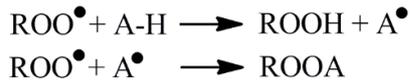


Abb. 10 Wirkung von Antioxidantien (A-H) nach Belitz et al. (2008), Yin & Porter (2005) und Porter et al. (1995)

Die bisher gebildeten Primärprodukte der Lipidperoxidation sind geruch- und geschmacklos, lassen sich allerdings, beispielsweise als Folge der Bildung von konjugierten Doppelbindungen, UV-spektroskopisch detektieren. Die UV-Maxima der konjugierten Doppelbindungen liegen im Falle von Dienen, Trienen und Tetraenen jeweils im Bereich von 230-240 nm, 250-280 nm und 300-316 nm (Matissek et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich die Hydroperoxidbildung somit in eine Induktions-, Bildungs- und Abbauphase einteilen, wodurch es schließlich zur Bildung von Sekundärprodukten kommt, die sensorisch relevant und auch in der Lage sein können, weitere Reaktionen einzugehen.

### 2.3.2 Bildung von Sekundärprodukten

Die Hydroperoxide können bei Anwesenheit von katalytischen Mengen an Schwermetallionen (Abb. 6) oder unter Einwirkung von UV-Strahlung zu den entsprechenden Alkoxyradikalen abgebaut werden (Belitz et al., 2008; Schieberle et al., 1985; Gardner, 1989). Diese sind nach Gardner (1989) in der Lage, im Anschluss folgende Reaktionen eingehen: (1) Abstraktion eines Wasserstoffatoms, beispielsweise aus einem Fettsäuremolekül; (2) Reaktion mit Radikalen unter Ausbildung von Etherbindungen; (3) Bildung von intramolekularen Epoxiden; (4)  $\beta$ -Spaltung der Alkoxyradikale, woraus eine C-C-Bindungsspaltung resultiert. Nachfolgend wird nur auf die  $\beta$ -Spaltung eingegangen, da vor allem diese zur Bildung von reaktiven Sekundärprodukten führt. Hierbei stellen viele der Sekundärprodukte, die keine Säuregruppe tragen, flüchtige, aromaintensive Verbindungen dar. In Abb. 11 ist beispielhaft die  $\beta$ -Spaltung der 13-(Z,E)-HPODE dargestellt.

Grundsätzlich bestehen hierbei zwei Möglichkeiten der  $\beta$ -Spaltung (Abb. 11, Weg 1 und Weg 2), wobei Weg 2 energetisch bevorzugt ist, da es hierbei zur Ausbildung eines resonanzstabilisierten Enons kommt (Belitz et al., 2008). Die entstehenden Radikale stabilisieren sich durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms, beispielsweise aus weiteren ungesättigten Fettsäuremolekülen. Als Folgeprodukt des Wegs 2 der Abb. 11 würde es zur Bildung von Pentan kommen. Geht man von der 9-HPODE aus, kommt es zur Bildung von 2,4-Decadienal, welches ebenfalls autoxidieren und somit zur Bildung des Tertiärprodukts Hexanal führen kann (Matthews et al., 1971). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Hexanal erst nach der Bildung von Pentan und 2,4-Decadienal auftritt (Belitz et al., 2008).



gebildet werden (Esterbauer et al., 1991; Frankel & Neff, 1983). Neuere Studien zeigen, dass MDA aus  $\omega$ -6-Fettsäuren über die Bildung des 4-Hydroperoxynon-2-enals gebildet werden kann, wobei der Reaktionsmechanismus noch nicht geklärt ist (Shimozu et al., 2011). Sowohl Acrolein als auch MDA sind Bestandteile von Zigarettenrauch (Fujioka & Shibamoto, 2006).

Tab. 3 Gehalte an Sekundärprodukten aus der Lipidperoxidation ausgewählter Fettsäuren in nmol/mg Fettsäure nach Esterbauer et al. (1990a)

Sekundärprodukt	Fettsäure				
	18:1 ( $\omega$ -9)	18:2 ( $\omega$ -6)	18:3 ( $\omega$ -3)	18:3 ( $\omega$ -6)	20:4 ( $\omega$ -6)
Pentanal	0,1	6,7	0,5	1,6	5,2
Hexanal	0,3	199,0	0,6	53,0	189,0
Heptanal	0,2	-	-	-	-
Octanal	0,4	-	-	-	-
Nonanal	0,5	-	-	-	-
Decanal	0,1	-	-	-	-
2-Pentenal	-	-	2,5	-	-
2-Hexenal	-	1,1	9,8	0,6	-
2-Heptenal	-	10,1	0	4,1	6,2
2-Octenal	-	13,1	0	7,7	15,4
2-Nonenal	0,1	1,5	-	11,7	9,3
2-Decenal	0,9	-	-	-	-
2-Undecenal	1,0	-	-	-	-
2,4-Heptadienal	-	-	4,6	-	-
2,4-Nonadienal	-	0,4	3,2	-	4,6
2,4-Decadienal	-	0,1	-	14,9	6,0
4-Hydroxynonenal	-	2,8	-	-	37,5

Da der Fokus der vorliegenden Arbeit unter anderem auf dem Sekundärprodukt 4-Hydroxynon-2-enal (4-HNE) liegt, wird nachfolgend beispielhaft auf die Bildung sowie Eigenschaften des 4-HNE eingegangen.

### 2.3.2.1 4-Hydroxynon-2-enal (4-HNE)

4-HNE kann aus  $\omega$ -6-Fettsäuren wie der Linol-,  $\gamma$ -Linolen- und Arachidonsäure gebildet werden und stellt eines der am meisten untersuchten Sekundärprodukte der Lipidperoxidation dar (Esterbauer et al., 1991; Spickett, 2013). Für die Bildung des 4-HNE werden mehrere Reaktionswege diskutiert (Ayala et al., 2014; Spickett, 2013), von denen in Abb. 12 beispielhaft die Bildung aus der 13-(Z,E)-HPODE dargestellt ist.

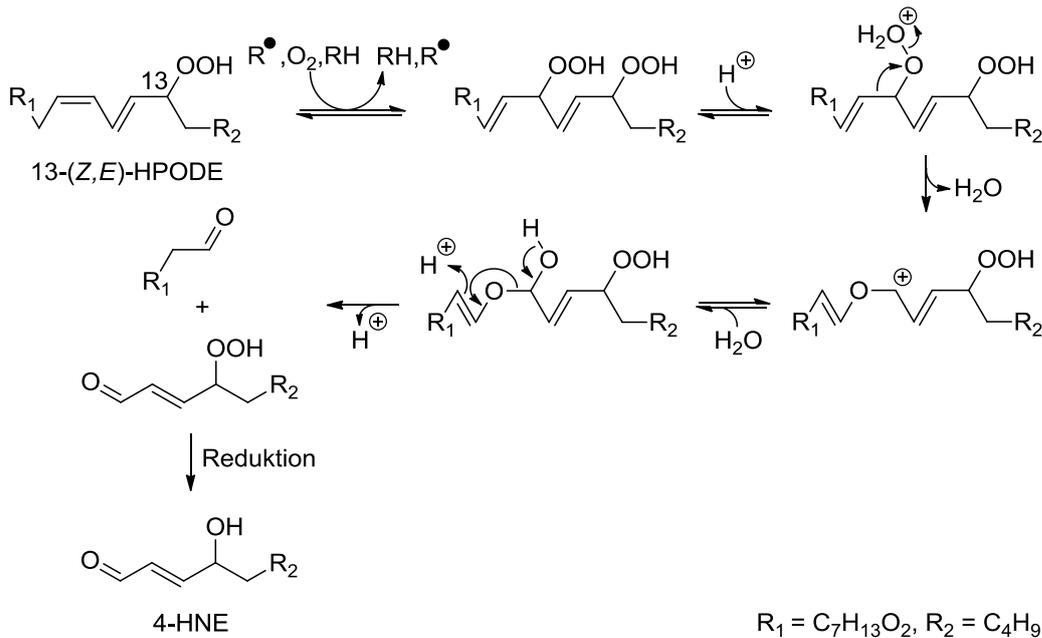


Abb. 12 Möglicher Bildungsweg des 4-HNE aus der 13-(Z,E)-HPODE, modifiziert in Anlehnung an Spickett (2013) und Schneider et al. (2001)

Hierbei erfolgt zunächst eine Wasserstoffabstraktion am C<sub>8</sub>, wodurch ein Radikal entsteht, welches an C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> und C<sub>12</sub> lokalisiert sein kann. Erfolgt die Oxygenierung an C<sub>10</sub>, so kann es zur Einführung einer zweiten Hydroperoxygruppe kommen. Auf Grund der dadurch entstehenden Instabilität kommt es unter dem Einfluss von protischen oder Lewissäuren zur Abspaltung von Wasser, einer damit einhergehenden Hock-Umlagerung und nach Anlagerung von Wasser schließlich zu einer Hock-Fragmentierung. Hierdurch kommt es zur Bildung der 9-Oxononansäure und 4-Hydroperoxynon-2-enal, welches schließlich nach Reduktion sowie Wasserstoffabstraktion zum 4-HNE weiterreagieren kann (Schneider et al., 2001).

Weitere Bildungswege des 4-HNE sind nach Ayala et al. (2014) und Spickett (2013) über (1) eine Reduktion des Hydroperoxids zu einem Alkoxyradikal durch Schwermetallionen und nachfolgender  $\beta$ -Spaltung; (2) eine Cyclisierung des Peroxyradikals zum Dioxetan, welches im Anschluss fragmentiert; (3) eine 13-Allyloxyradikalbildung aus einem 13-Hydroperoxyepoxid mittels  $Fe^{2+}$ , nachfolgender Diepoxycarbinyradikalbildung, welches zum 9-Hydroperoxyepoxid und im Anschluss unter  $\beta$ -Spaltung unter anderem zum 4-HNE reagieren kann (Gu & Salomon, 2012).

Die intestinale Resorption von 4-Hydroxyalkenalen wurde am Beispiel von 4-HNE und 4-Hydroxyhexenal (4-HHE) anhand einer *in vitro* Studie unter Verwendung von humanen Caco-2/TC7-Zellen untersucht. Die Bildung von 4-HHE resultiert als Folge der Lipidperoxidation von  $\omega$ -3 Fettsäuren, wie beispielsweise Linolensäure (Esterbauer et al., 1991). Hierzu wurden die Zellen auf ihrer apikalen Seite mit 1-100  $\mu$ M der jeweiligen 4-Hydroxyalkenale für 24 h inkubiert und im Anschluss die Gehalte an 4-HNE,

beziehungsweise 4-HHE auf der basalen Seite quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die basalen Gehalte an 4-Hydroxyalkenalen zwischen 0,2-1 % der apikal applizierten Gehalte lagen, wobei die Gehalte im Falle des polareren 4-HHE in Abhängigkeit der applizierten Konzentration zwei bis drei Mal höher als die des 4-HNE waren. Somit konnte gezeigt werden, dass eine humane intestinale Resorption des freien 4-HHE und 4-HNE in geringen Mengen erfolgen kann (Awada et al., 2012).

Über die tägliche Aufnahmemenge an 4-Hydroxyalkenalen existieren in der Literatur bisher nur Daten basierend auf einer in Korea üblichen Ernährung. Ohne den Verzehr frittierten Lebensmittel, wurde diese zu 14,0 nmol 4-HHE und 17,3 nmol 4-HNE abgeschätzt. Hierbei stellen der Verzehr von Sesamöl und Sojabohnenöl die Hauptzufuhrquellen dar. Durch den Verzehr frittierten Lebensmittel (Donuts, Kartoffelchips, Pommes frites und frittierten Hähnchen) können täglich zusätzlich 16,7 nmol 4-HHE und 63,4 nmol 4-HNE aufgenommen werden, wodurch sich eine Gesamtaufnahmemenge an 4-HHE von 30,7 nmol und an 4-HNE von 80,7 nmol pro Tag ergeben kann (Surh & Kwon, 2005).

Im menschlichen Körper kann 4-HNE, neben der nichtenzymatischen Bildung, auch enzymkatalysiert gebildet werden. Das Enzym 15-LOX-1, welches von Retikulozyten, Eosinophilen und Makrophagen exprimiert werden kann, ist in der Lage, Linolsäure zu 13-HPODE zu oxidieren. Durch 15-LOX-2, das von Zellen der Haut, Hornhaut, Prostata, Lunge und der Speiseröhre exprimiert wird, kann Arachidonsäure zu 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (15-HPETE) oxidiert werden. Sowohl 13-HPODE als auch 15-HPETE stellen Precursoren des 4-HNE dar (Ayala et al., 2014).

Physiologische, humane Gehalte an 4-HNE stehen schon länger im Fokus der Forschung und wurden für natives low density lipoprotein (LDL) zu 0,29 nmol/mg LDL und für oxidiertes LDL zu 0,59 nmol/mg LDL bestimmt (Esterbauer et al., 1987). In Plasma wurden Gehalte von 2,6-680 pmol/ml gefunden (Spies-Martin et al., 2002; Esterbauer et al., 1990a; Selley et al., 1989). In Monozyten wurde ein 4-HNE-Gehalt von 0,40 nmol/10<sup>7</sup> Zellen bestimmt (Selley et al., 1989). Generell werden in Zellen, die keinem oxidativen Stress ausgesetzt sind, 4-HNE-Konzentrationen von 0,1-0,3 nmol/g Gewebe (Esterbauer et al., 1991) und in Zellen unter oxidativem Stress 4-HNE-Konzentrationen von 10 µM bis 5 mM angenommen (Uchida, 2003a).

Auf Grund seiner Struktur stellt 4-HNE eine reaktive Verbindung dar, die vielfältige Reaktionen mit Biomolekülen eingehen kann (Abb. 13), (Poli & Schaur, 2000).

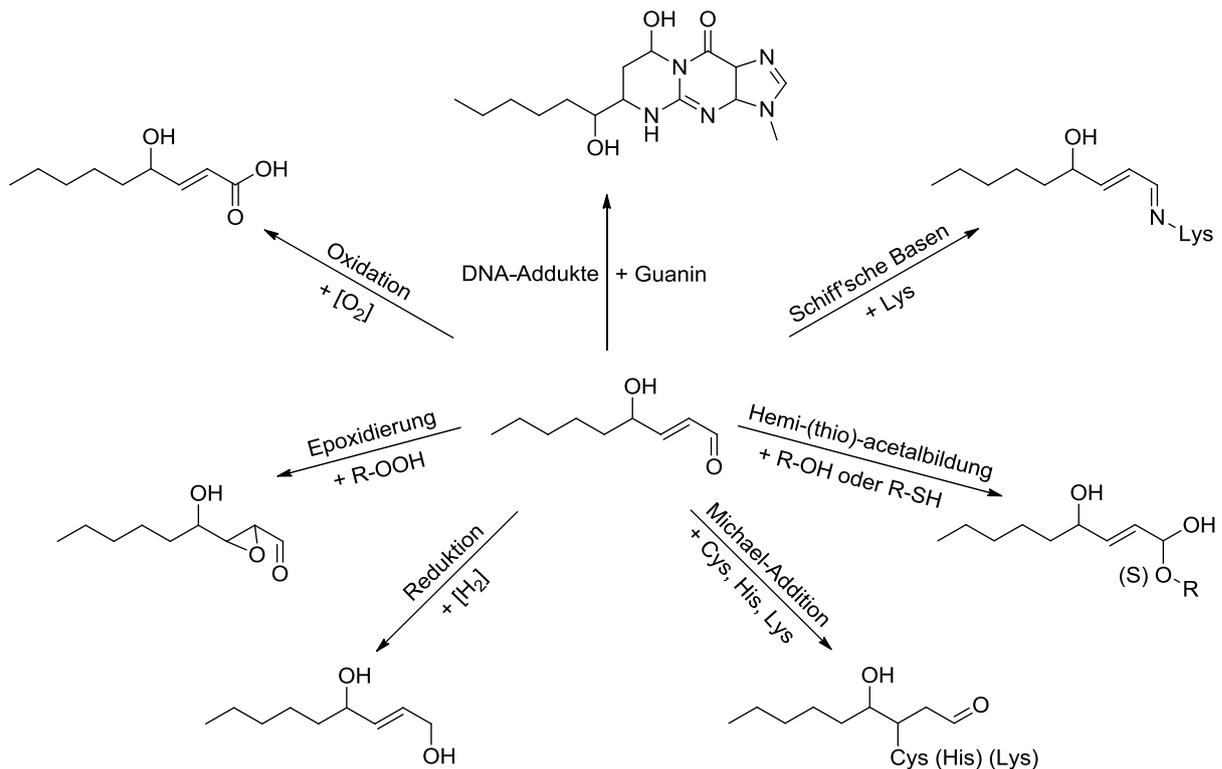


Abb. 13 Reaktionsmöglichkeiten des 4-HNE mit Biomolekülen, modifiziert nach Poli & Schaur, 2000

Allgemein werden Konzentrationen unter 0,1  $\mu\text{M}$  als basale, physiologische Konzentrationen angesehen, weshalb die alimentäre Zufuhr von 4-HNE kein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellt (Surh & Kwon, 2005). In Konzentrationen von 1-20  $\mu\text{M}$  kann es bereits zur Inhibierung der DNA- und Proteinsynthese kommen und Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  führen zu akuten zytotoxischen Effekten, da katabole und anabole Zellfunktionen beeinträchtigt werden, was in der Regel zum Zelltod führt. Die LD<sub>50</sub>-Konzentration für die meisten Zellen liegt bei 10-25  $\mu\text{M}$  (Esterbauer et al., 1991).

4-HNE wird unter anderem im Zusammenhang mit der Entstehung von Alzheimer (Sayre et al., 1997), Parkinson (Yoritaka et al., 1996), Arteriosklerose (Kumano-Kuramochi et al., 2012; Uchida et al., 1994) und Krebs (Hu et al., 2002) diskutiert. Neben pathologischen Effekten, werden dem 4-HNE in subletalen Konzentrationen auch positive Wirkungen auf die Zelldifferenzierung, Zellteilung, den Zellzyklus sowie die Expression von Stressantwortgenen zugeschrieben (Barrera et al., 2004; Awasthi et al., 2003).

Die Detoxifizierung von Sekundärprodukten erfolgt bei Säugetieren enzymkatalysiert in der Regel durch Reaktion mit Glutathion. Nachfolgend wird dies beispielhaft anhand der Detoxifizierung von 4-HNE beschrieben. Nach oraler Verabreichung radioaktiver und stabiler 4-HNE-Isotope an Ratten konnten jeweils 48 % und 15 % der verabreichten 4-HNE-Stoffmenge im Urin und in den Fäzes wiedergefunden werden (Keller et al., 2015). Ein Anteil von 1,5 % wurde in der Leber bestimmt. Glutathion S-Transferasen katalysieren die Konjugation von 4-HNE an Glutathion über eine Michael-Addition am C<sub>3</sub> (HNE-GSH). Eine Oxidation des

4-HNE in die unschädliche 4-Hydroxynon-2-ensäure (HNA) wird durch die Aldehyddehydrogenase realisiert und eine Reduktion zum 1,4-Dihydroxynon-2-en (DHN) kann mittels Alkoholdehydrogenase erfolgen. Die Metabolisierungsprodukte werden im Anschluss weiter verstoffwechselt und schließlich ausgeschieden (Siems et al., 2010; Uchida, 2003a).

### 2.3.3 Sekundärprodukte in Lebensmitteln

Die Analytik flüchtiger Lipidperoxidationsprodukte in Lebensmitteln wird in der Regel mittels GC-MS durchgeführt. Im einfachsten Fall werden die Analyten direkt mittels headspace solid phase microextraction (HS-SPME) erfasst (Liu et al., 2011). Weiterhin können sie auch in freier Form oder nach Derivatisierung mittels HPLC-UV detektiert werden. Die beim Erhitzen entstehenden flüchtigen Verbindungen können durch Anlegen eines Gasstroms in ein geeignetes Lösungsmittel überführt, aufkonzentriert und im Anschluss analysiert werden (Chung et al., 1993). Zudem ist auch eine direkte Extraktion aus Lebensmitteln unter Verwendung eines geeigneten Lösungsmittels, anschließender Aufkonzentrierung und Analytik möglich (Chetschik et al., 2008). Um Analyten zu stabilisieren, Verluste auf Grund niedriger Siedepunkte bei der Aufarbeitung zu minimieren und die Analytik selektiver und empfindlicher zu gestalten, erfolgt in der Regel eine Derivatisierung. Diese wird üblicherweise durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH), pentafluorbenzyloximierende (PFBO-) und silylierende Reagenzien realisiert (Spiteller et al., 1999).

Chung et al. (1993) erhitzen raffiniertes Erdnussöl auf 50-200 °C und überführten die flüchtigen Verbindungen mittels Stickstoffstrom in Wasser. Nach Extraktion mit Dichlormethan und Aufkonzentrierung durch Destillation, stellten sie Zunahmen der Peakflächen der Aldehyde, 2-Alkenale und 2,4-Alkadienale in Abhängigkeit der Erhitzungstemperatur mittels GC-MS fest (Chung et al., 1993). Chetschik et al. (2008) rösteten Erdnüsse bis zum Erreichen eines „kommerziellen Röstaromas“ und konnten nach Extraktion mittels Diethylether, Aufkonzentrierung und hochauflösender Gaschromatographie-Olfaktometrie (HRGC-O) im Vergleich zum Extrakt aus nativen Erdnüssen unter anderem Zunahmen der Lipidperoxidationsprodukte Hexanal, 2-Heptenal, Nonanal, 2-Nonenal, 2-Decenal und 2,4-Decadienal in Bereichen des 4- bis 64-Fachen feststellen. Auch in kaltgepressten, nicht erhitzten Erdnuss-, Haselnuss- und Kürbiskernölen konnten nach Diethyletherextraktion und nachfolgender Aufkonzentrierung neben weiteren Lipidperoxidationsprodukten Hexanal und Octanal sowie 2-Heptenal, 2-Octenal, 2-Nonenal und 2-Decenal mittels GC-MS nachgewiesen werden (Matsui et al., 1998). Als Folge der Röstung von Erdnüssen bei 170 °C bis zum Erreichen eines „akzeptablen Röstresultats“ konnte

im abgepressten Erdnussöl eine Zunahme an flüchtigen und nicht-flüchtigen Monocarbonylkomponenten von 8 auf 26  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  Erdnussöl nach 2,4-DNPH-Derivatisierung und Absorptionsmessung bestimmt werden (Brown et al., 1972). Dabei konnten im Öl aus den rohen Erdnüssen 23 und nach Röstung 27 Monocarbonylverbindungen nach dünnschichtchromatographischer Trennung identifiziert werden, bei denen es sich um Alkanale, 2-Alkanone, 2-Alkenale und 2,4-Alkadienale handelte (Brown et al., 1972). Allgemein wird angenommen, dass die Öle roher und gerösteter Erdnüsse Konzentrationen an flüchtigen Verbindungen jeweils in Bereichen von 20-30 und 50-60  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  Öl aufweisen (Brown et al., 1972). Weiterhin konnten als Folge der Röstung von Erdnüssen bei 200 °C bis zu 50 Minuten nach Abpressen des Öls mittels HS-SPME-GC-MS jeweils Zunahmen der Lipidperoxidationsprodukte Hexanal, Heptanal, 2-Octenal, 2-Decenal, 2-Undecenal und 2,4-Decadienal von 0,34 auf 0,67, 0,25 auf 1,06, 0,07 auf 0,20, 0,15 auf 0,60, 0,10 auf 1,59 und 0,20 auf 3,08 mg/kg Erdnussöl festgestellt werden (Liu et al., 2011). Somit kann festgehalten werden, dass als Folge der Erhitzung von Erdnussöl sowie der Röstung von Erdnüssen erhöhte Gehalte an Lipidperoxidationsprodukten nachgewiesen werden konnten, was Rückschlüsse auf eine abgelaufene Lipidperoxidation zulässt.

Da in der vorliegenden Arbeit Gehalte an 4-HNE, MDA und Acrolein in Erdnussöl und Erdnüssen quantifiziert wurden, werden nachfolgend bekannte Gehalte in Lebensmitteln vorgestellt (Tab. 4 und Tab. 5). In kommerziellen (gerösteten) Erdnüssen wurden, unter Verwendung eines isotope markierten Standards, Gehalte an 4-HNE mittels GC-MS von 0,8-3,8  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (Papastergiadis et al., 2014) und an MDA, in Form seines Thiobarbitursäurederivats, mittels HPLC-Fluoreszenz von 11,9  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Trockenmasse (Papastergiadis et al., 2012) bestimmt. Wird von einem Wassergehalt der gerösteten Erdnüsse von 1,6 % ausgegangen (Souci et al., 2008), entspricht dies einem Gehalt an MDA von 12,1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  Erdnuss. In kommerziellem Erdnussöl konnten unter Verwendung der gleichen Methode 12,8  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  MDA bestimmt werden (Papastergiadis et al., 2012). Gabbanini et al. (2015) konnten mittels UHPLC-MS/MS nach Derivatisierung mittels PFBHA unter Verwendung von Dipropylphthalat als internem Standard in frischem Erdnussöl kein 4-HNE nachweisen. Erst nach Erhitzung auf 180 °C konnten nach 1 h und 7 h Gehalte von jeweils 7,1 und 12,8  $\mu\text{mol}$  4-HNE /kg quantifiziert werden (Gabbanini et al., 2015). Acrolein konnte mittels HPLC und gepulster elektrochemischer Detektion erst nach einer Erhitzung des Erdnussöls auf 145 °C für 2 h in Gehalten von 2,7  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  nachgewiesen werden und war in nativem Erdnussöl nicht quantifizierbar (Casella & Contursi, 2004).

Tab. 4 Gehalte an 4-HNE und MDA in Lebensmitteln

Lebensmittel	4-HNE [μmol/kg]	MDA [μmol/kg]
Butteröl	n. n. - 11,2 <sup>1), *</sup>	
Erdnussöl	n. n. - 12,8 <sup>2), *</sup>	12,8 <sup>3)</sup>
Frittieröl (170 °C, 5 h)	0,02 <sup>4)</sup>	
Maiskeimöl	n. n. - 19,2 <sup>1), *</sup> n. n. - 16,6 <sup>2), *</sup>	16,2 <sup>3)</sup>
Natives Olivenöl Extra	0,4 - 0,8 <sup>4)</sup>	
Olivenöl		20,8 <sup>3)</sup>
Sojabohnenöl	n. n. - 19,2 <sup>1), *</sup> n. n. - 18,4 <sup>2), *</sup>	
Sonnenblumenöl	n. n. - 21,1 <sup>2), *</sup>	10,6 <sup>3)</sup>
Rapsöl		162,4 <sup>3)</sup>
Erdnüsse	0,8 - 3,8 <sup>4)</sup>	11,9 <sup>3), **</sup>
Erdnusspaste		5,0 <sup>3), **</sup>
Gouda		1,5 <sup>3), **</sup>
Kartoffelchips		7,1 <sup>3), **</sup>
Kekse	0,7 - 1,2 <sup>4)</sup>	
Säuglingsnahrung	1,3 <sup>4)</sup>	
Sojabohnen		30,3 <sup>3), **</sup>
Walnüsse	0,9 - 2,6 <sup>4)</sup>	45,0 <sup>3), **</sup>
Blaumakrele	7,4 <sup>5)</sup>	
Frankfurter	17,2 <sup>6)</sup>	321,5 <sup>6)</sup>
Hähnchenfleisch	0,3 <sup>5)</sup>	
Hering		32,3 <sup>3), **</sup>
Lachs, gekocht		21,2 <sup>3), **</sup>
Lachs, geräuchert		1,0 - 8,7 <sup>7)</sup>
Rindfleisch	0,4 <sup>5)</sup>	50,5 <sup>3), **</sup>
Schinken	3,8 - 95,2 <sup>6)</sup>	105,4 - 292,4 <sup>6)</sup>
Schweinefleisch		12,1 <sup>3), **</sup>
Schweinefleischwürstchen		5,6 <sup>3), **</sup>
Speck	8,2 - 8,9 <sup>6)</sup>	0,1 - 0,2 <sup>6)</sup>
Wiener Würstchen	3,8 - 44,7 <sup>6)</sup>	0,7 <sup>6)</sup>

n. n. - nicht nachweisbar, \* erst nach Erhitzung nachweisbar, \*\* bezogen auf Trockenmasse,

<sup>1)</sup> Han & Csallany (2008), <sup>2)</sup> Gabbanini et al. (2015), <sup>3)</sup> Papastergiadis et al. (2012),

<sup>4)</sup> Papastergiadis et al. (2014), <sup>5)</sup> Tanaka et al. (2013), <sup>6)</sup> Munasinghe et al. (2003b),

<sup>7)</sup> Munasinghe et al. (2003a)

Tab. 5 Gehalte an Acrolein in Lebensmitteln

Lebensmittel	Acrolein [µmol/kg, bzw. µmol/l]
Distelöl	447,7 <sup>8), **</sup>
Erdnussöl	n. n. - 24 <sup>9), *</sup>
Kokosnussöl	19,6 <sup>8), **</sup>
Leinöl	1528,7 <sup>8), **</sup>
Maiskeimöl	n. n. - 4,3 <sup>9), *</sup> 8039,0 <sup>10), ***</sup>
Olivenöl	n. n. - 9,3 <sup>9), *</sup> 210,5 <sup>8), **</sup> 10704,3 <sup>10), ***</sup>
Rapsöl	1892,6 <sup>8), **</sup>
Sesamöl	8767,4 <sup>10), ***</sup>
Sojabohnenöl	4392,6 <sup>10), ***</sup>
Sonnenblumenöl	1,1 <sup>9)</sup> n. n. - 2,9 <sup>9), *</sup> 5485,2 <sup>10), ***</sup>
Domjati (Weißkäse)	5,4 - 23,2 <sup>11)</sup>
Früchte (diverse)	< 0,2 - 0,9 <sup>12)</sup>
Gemüse (diverse)	bis zu 10,5 <sup>12)</sup>
alkoholische Getränke (diverse)	bis zu 67,8 <sup>12)</sup>
Cognac	25,3 - 26,8 <sup>13)</sup>
Vodka	< 0,5 <sup>14)</sup>
Whiskey	12,0 - 198,0 <sup>14)</sup>

n. n. - nicht nachweisbar, \* erst nach Erhitzung nachweisbar, \*\* Öle wurden zuvor auf 180 °C für 2 h erhitzt, \*\*\* Gehalte, die nach Erhitzen der Öle auf 300 °C für 2 h im Gasraum bestimmt wurden, <sup>8)</sup> Ewert et al. (2011), <sup>9)</sup> Casella & Contursi (2004), <sup>10)</sup> Umamo & Shibamoto (1987), <sup>11)</sup> Collin et al. (1993), <sup>12)</sup> Feron et al. (1991), <sup>13)</sup> Panosyan et al. (2001), <sup>14)</sup> Miller & Danielson (1988)

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass für geröstete Erdnüsse Gehalte an 4-HNE und MDA bekannt sind, allerdings für Acrolein bisher nicht bestimmt wurden. Ferner wurden bisher keine Untersuchungen zu den entsprechenden Gehalten in den nicht gerösteten (nativen) Erdnüssen durchgeführt, sodass keine Aussage über deren Bildung als Folge der Röstung getroffen werden kann. Sowohl 4-HNE als auch Acrolein konnten bisher nur in erhitztem Erdnussöl und MDA in kommerziellem Erdnussöl nachgewiesen werden. Untersuchungen zum Bildungsverhalten als Folge der Erhitzung von Erdnussöl wurden bisher nicht durchgeführt.

## 2.4 Lipierung – Reaktionen von Sekundärprodukten der Lipidperoxidation mit Nukleophilen

Da viele der entstehenden Sekundärprodukte funktionelle Gruppen tragen, stellen sie potentielle Reaktionspartner für nukleophile Angriffe dar. Hierzu sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen, die sich mit entsprechenden Reaktionen beschäftigen. Diese Untersuchungen fanden überwiegend in Modellsystemen und vor physiologischen Hintergründen mit dem Ziel statt, die Folgen des oxidativen Stresses zu untersuchen (Sayre et al., 2006). Im Vordergrund standen dabei in der Regel Reaktionen zwischen Aminosäureseitenketten und ausgewählten Sekundärprodukten.

In der Literatur gibt es für Reaktionen zwischen Sekundärprodukten aus der Lipidperoxidation und Nukleophilen keine konkrete einheitliche Bezeichnung. Reaktionen zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und Aminokomponenten werden als Glykierung, Maillard-Reaktion (Maillard, 1912) oder nicht enzymatische Glykosylierung bezeichnet. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagen, Reaktionen zwischen Carbonylverbindungen und Nukleophilen, insbesondere Aminosäuren, in Analogie als „Lipierung“, beziehungsweise „Lipierungsreaktionen“ zu bezeichnen. Kommt es zu Weiterreaktionen dieser Addukte, so werden stabile Folgeprodukte als advanced lipoxidation endproducts (ALE) bezeichnet (Sayre et al., 1996 und Sayre et al., 2006). Diese könnten entsprechend als „advanced lipation endproducts“ unter Beibehaltung derselben Abkürzung „ALE“ bezeichnet werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Begriffe „Lipierung“, „Lipierungsreaktion“ sowie „Lipierungsprodukte“ und „ALE“ zur Bezeichnung der entsprechenden Reaktionen und Addukte verwendet.

Nachfolgend werden bekannte Lipierungsprodukte aus Reaktionen von Nukleophilen, insbesondere der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins, und den für die vorliegende Arbeit relevanten Sekundärprodukten Hexanal, Acrolein, MDA und 4-HNE vorgestellt.

### 2.4.1 Bekannte Lipierungsprodukte des Hexanals

In Abb. 14 ist ein Überblick über potentielle Lipierungsprodukte von Aldehyden am Beispiel bekannter Lipierungsprodukte des Hexanals mit Nukleophilen dargestellt.

Tashiro et al. (1985) führten Untersuchungen zu Lipierungsreaktionen mit Hexanal durch, indem sie gefriergetrocknetes Lysozym für 10 Tage Hexanaldampf bei 50 °C aussetzten und als Folge eine Lysinabnahme von 27 % sowie eine Bräunung beobachteten.

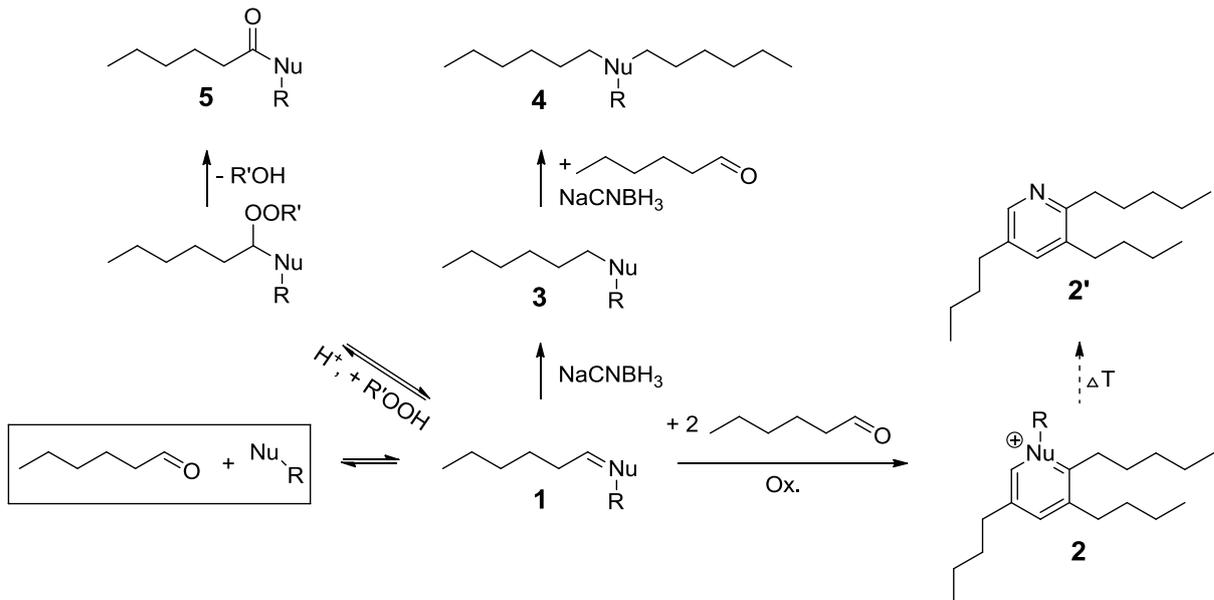


Abb. 14 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des Hexanals mit Nucleophilen (Nu-R<sup>n</sup>)

Nach äquimolarer Inkubation von Lysin und Hexanal bei 50 °C für 7 h und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 24 h wurde das Pyridiniumderivat 1-(5-carboxy-5-aminopentyl)-2-pentyl-3,5-dibutylpyridiniumbetain **2** identifiziert (Kato et al., 1986). Hierbei ist prinzipiell neben der Bildung des 1,2,3,5-substituierten Derivats auch die Bildung eines 1,3,4,5-substituierten Derivats möglich (Suyama & Adachi, 1979). Der Bildungsmechanismus wurde in Anlehnung an Suyama & Adachi (1979) postuliert, die sich mit Reaktionen von Aldehyden und  $\alpha$ -Aminogruppen von Aminosäuren beschäftigten. Die Bildung erfolgt über die Schiff'sche Base **1**, gefolgt von Aldolkondensationen unter Einbeziehung von zwei weiteren Hexanalmolekülen und eines Oxidationsschritts (Kato et al., 1986). Die Oxidation kann hierbei sauerstoffinduziert, durch Disproportionierung oder durch Oxidationsmittel erfolgen (Suyama & Adachi, 1979). Bei Temperaturen im Bereich von 180 °C kann es zu einem Hofmann-Abbau der Pyridiniumverbindungen kommen, wodurch die entsprechenden, flüchtigeren Pyridine **2'** gebildet werden (Suyama & Adachi, 1980; Suyama & Adachi, 1979). Dies wurde unter anderem am Beispiel der Pyridine, welche durch Erhitzen von Pyridiniumderivaten, die aus der Reaktion von Lysin und Propanal entstanden sind, gezeigt (Suyama & Adachi, 1980). Eine Charakterisierung, ob es sich bei den Pyridiniumverbindungen um die  $\alpha$ - oder  $\epsilon$ -Amino-Derivate handelte, erfolgte allerdings nicht (Suyama & Adachi, 1980). Generell nimmt auf Grund der Bildung von Hexanal-Lysin-Pyridiniumderivaten die Hydrophobizität von Proteinen zu, woraus eine Reduktion der Löslichkeit resultiert (Kato et al., 1986). Eine Proteinquervernetzung über die Pyridiniumderivate sollte allerdings nicht erfolgen können (Kato et al., 1986). Als Folge der Inkubation von N <sup>$\alpha$</sup> -Acetyllysin mit Hexanal unter physiologischen Bedingungen in Anwesenheit des Reduktionsmittels NaCNBH<sub>3</sub> konnte sowohl das monoalkylierte **3** als auch das dialkylierte **4** Reaktionsprodukt

massenspektrometrisch identifiziert werden (Fenaille et al., 2004). Unter oxidativen Bedingungen kann es protonenkatalysiert zur Bildung von N<sup>ε</sup>-(Hexanoyl)lysin (HEL) **5** kommen (Ishino et al., 2008). Die Bildung von **5** wurde unter physiologischen Inkubationsbedingungen nach der Umsetzung von N<sup>α</sup>-Benzoylglycyllysin mit Hexanal in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> massenspektrometrisch und mittels 1D und 2D NMR-Spektroskopie nachgewiesen (Ishino et al., 2008). Die Oxidation kann durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dessen Bildung als Folge der Lipidperoxidation durch eine 1,2-Eliminierung aus Alkylhydroperoxiden diskutiert wird oder durch direkte Reaktion mit Alkylhydroperoxiden erfolgen (Ishino et al., 2008). Die Bildung von **5** kann auch über einen anderen Mechanismus ohne Beteiligung von Hexanal ablaufen (Kato & Osawa, 2010). Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von ω-6-Fettsäuren. Nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Benzoylglycyllysin mit 13-HPODE unter physiologischen Inkubationsbedingungen konnte **5** ebenfalls identifiziert werden (Kato et al., 1999). Am Beispiel der Reaktion von Pyridoxamin mit Linolsäure unter physiologischen Inkubationsbedingungen zum entsprechenden Pyridoxaminderivat wurde ein Reaktionsmechanismus über die 13-HPODE vorgeschlagen, welche zur entsprechenden Ketoctadecadiensäure (KODE) oxidiert und unter Reaktion mit Pyridoxamin zum entsprechenden Carbinolamin umgesetzt wird (Onorato et al., 2000). Nach einer metallionen-katalysierten Spaltung der C-C-Bindung kommt es schließlich zur Bildung von **5** (Onorato et al., 2000). Ein weiterer, ebenfalls am Beispiel des Pyridoxamins postulierter Bildungsmechanismus, verläuft ebenfalls über die Vorstufe der 13-HPODE, welche anschließend oxidativ zum 2-Ketoheptanal abgebaut und schließlich mit der Aminogruppe reagieren kann (Metz et al., 2003). Über die Bildung eines Hemiacetals, welches in wässriger Lösung hydrolysiert, kommt es schließlich zur Bildung des entsprechenden Hexanoyl-Pyridoxamin-Addukts (Metz et al., 2003). Dieser Reaktionsweg setzt allerdings eine sich in ortho-Stellung befindende Hydroxygruppe voraus und ist deshalb nicht auf Aminosäureseitenketten übertragbar.

Generell stellen gesättigte Aldehyde Reaktionspartner dar, die im Vergleich zu den Alkenalen oder Hydroxyalkenalen deutlich unreaktiver sind, da nur die Möglichkeit der Bildung einer Schiff'schen Base und die hierüber möglichen Folgeprodukte besteht. Die Bildungen von Michael-Additionsprodukten oder deren Folgereaktionsprodukten sind nicht möglich (Fenaille et al., 2003). Eine direkte Proteinquervernetzung ist somit als Folge ebenfalls nicht möglich.

### 2.4.2 Bekannte Lipierungsprodukte des Acroleins

In Abb. 15 ist ein Überblick über potentielle Lipierungsprodukte der 2-Alkenale am Beispiel bekannter Lipierungsprodukte des Acroleins mit Nukleophilen dargestellt.

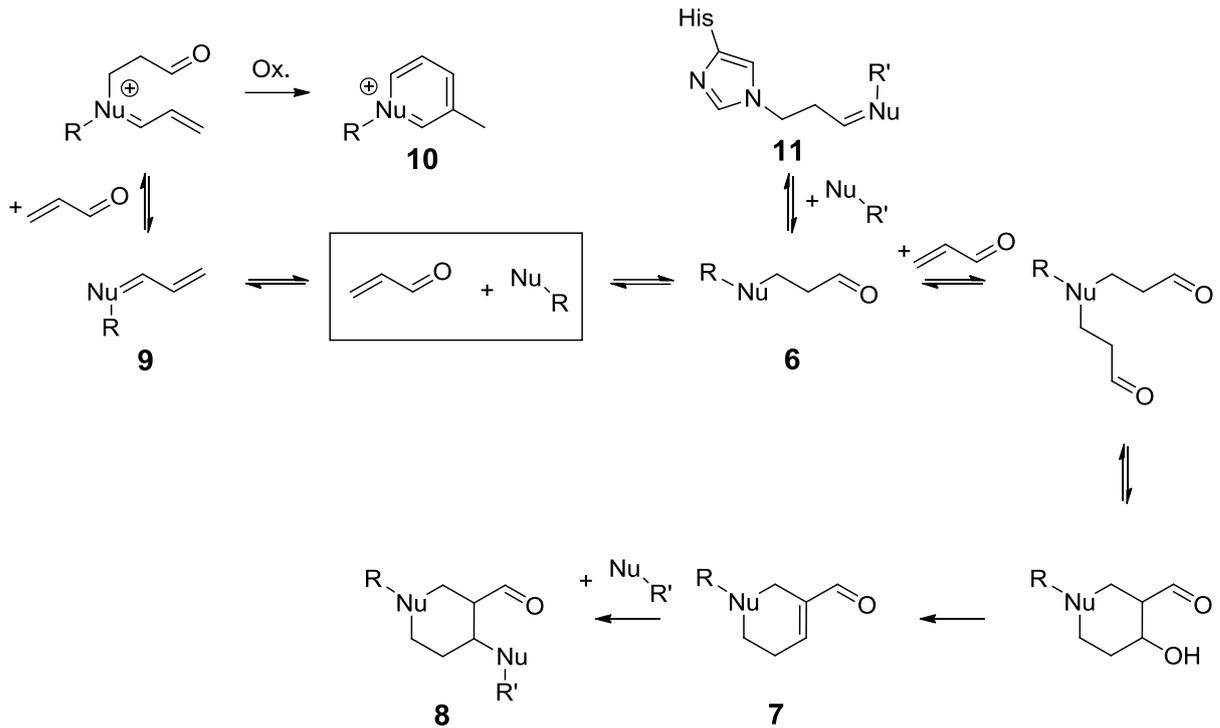


Abb. 15 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des Acroleins mit Nucleophilen (Nu-R<sup>n</sup>)

Acrolein kann prinzipiell nukleophil am C<sub>1</sub> und C<sub>3</sub> angegriffen werden. Kommt es zur Michael-Addition am C<sub>3</sub>, so entsteht das Propanal-Addukt **6**, welches durch erneute Michael-Addition eines Acroleinmoleküls und einer nachfolgenden Aldolkondensation zum entsprechenden 3-Formyl-3,4-dehydropiperidino-Derivat (FDP-Derivat) **7** weiterreagieren kann (Uchida et al., 1998). Die Bildung des Propanal-Addukts **6** kann hierbei durch Reaktion von Cystein-, Histidin- oder Lysinseitenketten erfolgen, wohingegen **7** exklusiv nur nach Reaktion mit Lysinseitenketten gebildet werden kann (Colzani et al., 2013). So wurde nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyllysin mit Acrolein unter physiologischen Bedingungen und salzsaurer Hydrolyse das entsprechende N<sup>ε</sup>-(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)lysin (FDP-Lysin) **7** identifiziert (Uchida et al., 1998). Dieses stellt allerdings kein Endprodukt dar, sondern kann eine weitere Michael-Addition unter Beteiligung von Thiolgruppen eingehen, wodurch es zur Ausbildung des entsprechenden quervernetzenden Thioethers **8** kommen kann (Furuhata et al., 2002). Erfolgt der nukleophile Angriff am C<sub>1</sub> des Acroleins, kommt es zur Ausbildung der Schiff'schen Base **9**. Diese kann durch Michael-Addition eines weiteren Moleküls Acrolein, zwei nachfolgenden Oxidationsschritten und Cyclisierung zum N<sup>ε</sup>-(3-Methylpyridinium)-derivat **10** (MP-Derivat) reagieren (Furuhata et al., 2003). Die detaillierten Oxidations- und Cyclisierungsreaktionen sind bisher allerdings nicht geklärt. Nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyllysin mit Acrolein unter physiologischen Bedingungen wurde das entsprechende N<sup>α</sup>-Acetyl-N<sup>ε</sup>-(3-methylpyridinium)-lysin (N<sup>α</sup>-Acetyl-MP-Lysin) massenspektrometrisch sowie mittels 1D und 2D NMR-Spektroskopie identifiziert (Furuhata et al., 2003). Analoge Pyridiniumderivate wurden auch für 2-Butenal (Ichihashi et al., 2001), 2-Hexenal (Baker et al., 1998), 2-Heptenal (Globisch et al.,

2014), 2-Octenal (Alaiz & Barragán, 1995a, Alaiz & Barragán, 1995b) und 2-Nonenal (Ishino et al., 2010) nachgewiesen. Eine Bestimmung der Gehalte an FDP- und MP-Lysin in bovinem Serumalbumin (BSA), welches unter physiologischen Bedingungen mit Acrolein modifiziert wurde zeigte, dass jeweils 49 % und 23 % des Lysinverlusts durch die Bildung des FDP- und MP-Lysins erklärt werden konnten (Furuhata et al., 2003). Somit stellte das FDP-Lysin das Hauptprodukt dar (Furuhata et al., 2003). Die Bestimmung erfolgte dabei mittels Aminosäureanalyse nach salzsaurer Hydrolyse. Erfolgt eine Michael-Addition des Histidin-Imidazolrings unter der Bildung von **6**, so kann ein weiteres Proteinquervernetzungsprodukt **11** nach Ausbildung einer zusätzlichen Schiff'schen Base, beispielsweise mit einer  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins, entstehen (Ishii et al., 2007).

Somit kann festgehalten werden, dass im Falle der 2-Alkenale eine Michael-Addition zur Ausbildung von FDP-Addukten und die Bildung einer Schiff'schen Base zur Ausbildung von Pyridinium-Addukten führen kann (Ichihashi et al., 2001). Weiterhin sind 2-Alkenal-induzierte Proteinquervernetzungen möglich.

### 2.4.3 Bekannte Lipierungsprodukte des Malondialdehyds

In Abb. 16 ist ein Überblick über potentielle Lipierungsprodukte von MDA mit Nukleophilen dargestellt.

Malondialdehyd liegt auf Grund seines  $pK_a$ -Werts von 4,6 (Slatter et al., 1998) unter physiologischen Bedingungen in Form seines resonanzstabilisierten Enolat anions vor. Dennoch kann es auch bereits unter diesen Bedingungen zu Lipierungsreaktionen kommen (Sayre et al., 2006). Die durch nukleophilen Angriff am  $C_1$  gebildete Schiff'sche Base **12** steht im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Aminopropenal **12'** (Itakura & Uchida, 2001; Requena et al., 1997; Nair et al., 1981), wobei das Enaminal **12'** die bevorzugte Konformation darstellt (Girón et al., 1992). Durch Reduktion und salzsaure Hydrolyse kann **12** in Form des 3-( $N^\epsilon$ -lysino)propan-1-ols (LM) und seines Artefakts 3-( $N^\epsilon$ -lysino)-1-chlorpropan (LMCl) aus dem Proteinverband freigesetzt werden (Requena et al., 1997). Im Falle des Imidazolrings des Histidins konnten zwei entsprechende Ethylidenderivate nach Inkubation von BSA mit MDA identifiziert sowie deren Anteile an den Histidinresten in Plasmaproben von Diabetikern mittels Aminosäureanalyse zu 0,2-0,9 % bestimmt werden (Slatter et al., 2004). Erfolgt ein zweiter nukleophiler Angriff am  $C_3$ , kommt es zur Bildung eines Diimins **13**, welches im Gleichgewicht mit seinem resonanzstabilisierten Enamin **13'** ( $Nu, Nu'$ -1-Amino-3-iminopropen) steht (Sayre et al., 2006; Requena et al., 1997; Chio & Tappel, 1969). Dieses kann nach Reduktion mittels  $NaBH_4$  durch Säurehydrolyse aus dem Proteinverband in Form des 1,3-Di( $N^\epsilon$ -lysino)-

propans (LML) freigesetzt werden (Requena et al., 1997). Hierdurch kann es zu intra- und intermolekularen Proteinquervernetzungen kommen.

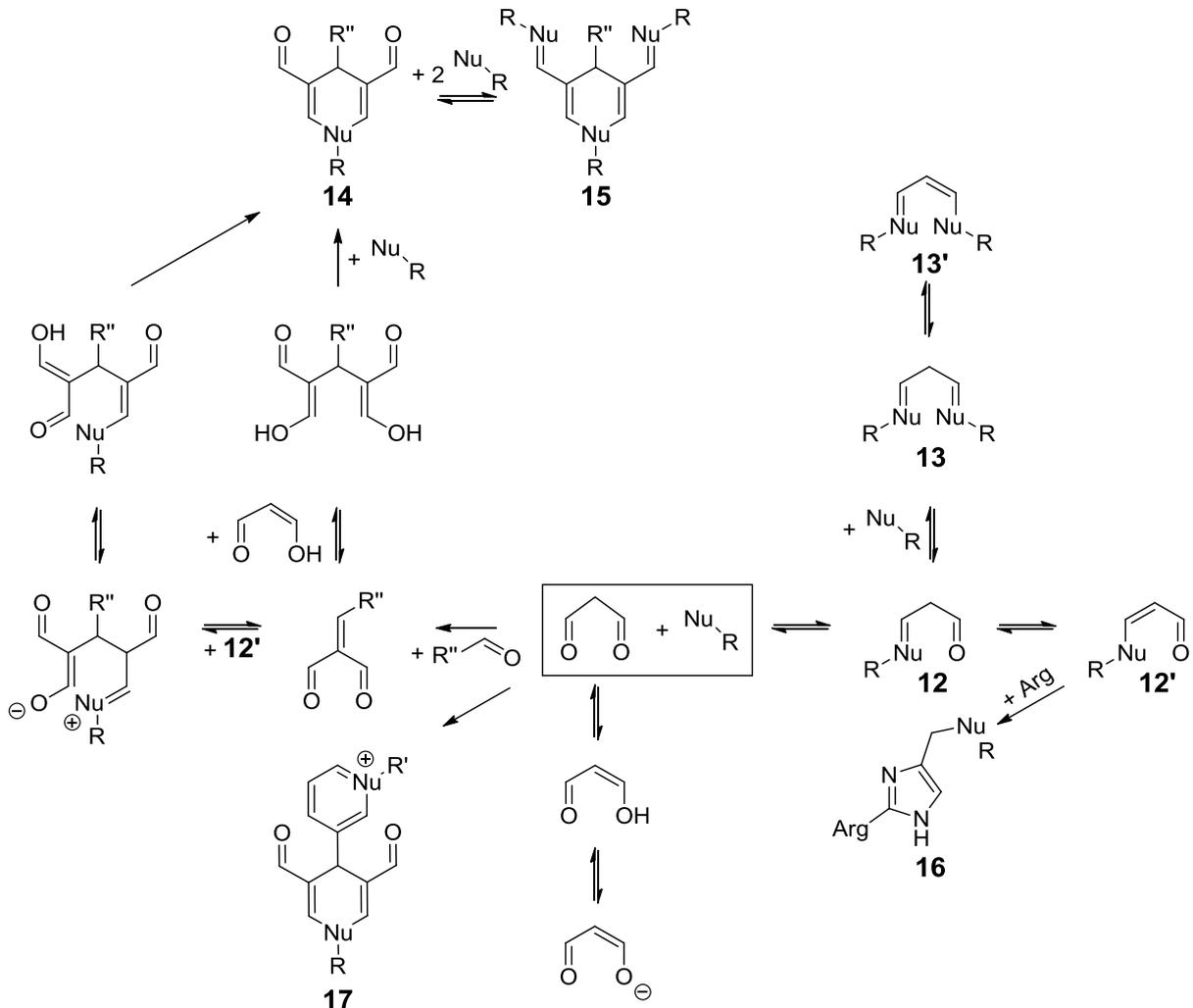


Abb. 16 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des MDA mit Nucleophilen (Nu-R<sup>n</sup>)

MDA kann durch die Reaktion mit Aldehyden zum entsprechenden Aldolkondensationsprodukt umgesetzt werden, welches prinzipiell in Form seines cyclischen Dihydropyranaddukts nachgewiesen werden kann (Nair et al., 1988). Die Aldehydbildung (Acetaldehyd) kann hierbei direkt durch thermische Spaltung des hydrierten Enaminals, welches die Vorstufe von **12** beziehungsweise **12'** darstellt, erfolgen (Nair et al., 1988). Das Aldolkondensationsprodukt kann als Michael-Akzeptor für das Enaminal **12'** dienen. Nach Cyclisierung und Dehydratation kommt es schließlich zur Bildung eines 1,4-Dihydropyridin-Addukts **14** (4-Methyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbaldehyd), welches ein Fluorophor darstellt (Sayre et al., 2006; Xu et al., 1997; Nair et al., 1988). Die Bildung des 1,4-Dihydropyridin-Addukts **14** kann auch über die Reaktion eines weiteren MDA-Moleküls an das Aldolkondensationsprodukt, gefolgt von einem nukleophilen Angriff, erfolgen (Nair et al., 1988). Anhand von Modelluntersuchungen mit Propylamin und MDA konnte unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden, dass **14**

das Hauptprodukt aus der Reaktion mit MDA darstellt (Slatter et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass es sich bei **14** um kein Endprodukt handelt, sondern dieses durch weitere nukleophile Angriffe in das Quervernetzungsprodukt **15** überführt werden kann (Slatter et al., 1998). Das Aminopropenaladdukt **12'** kann nukleophil durch die Guanidinogruppe des Arginins angegriffen werden, wobei es zunächst zur Ausbildung einer Schiff'schen Base kommt, die schließlich zum 2-Ornitinyl-4-methyl(1- $\epsilon$ -lysyl)1,3-imidazol **16** cyclisieren kann (Slatter et al., 2004). Dieses Addukt stellt ein Crosslink-Produkt zwischen den Seitenketten von Lysin und Arginin und einem Molekül MDA dar und konnte in Modellansätzen nach Inkubation von bovinem Serumalbumin mit MDA mittels  $^1\text{H}$  und 2D NMR-Spektroskopie sowie massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Slatter et al., 2004). Nach Inkubation von  $\text{N}^\alpha$ -Acetyl-glycyl-L-lysinmethylester mit MDA, wurde mittels NMR-Spektroskopie und FAB-Massenspektrometrie ein Fluorophor **17** identifiziert, welches sowohl einen Dihydropyridinals auch einen Pyridiniumring aufweist (Itakura et al., 1996). Der Bildungsmechanismus ist bisher ungeklärt, allerdings stellt **17** ein Crosslink-Produkt aus zwei Molekülen Nucleophilen und 4 Molekülen MDA dar (Itakura et al., 1996).

Somit kann festgehalten werden, dass MDA-induzierte Lipierungsreaktionen häufig zur Bildung von Fluorophoren führen können, weshalb vor allem MDA-Lipierungsprodukte im Zusammenhang mit Lipofuszenen (Alterspigmenten) diskutiert werden (Yin, 1996). Weiterhin sind MDA-induzierte Proteinquervernetzungen möglich.

### 2.4.4 Bekannte Lipierungsprodukte des 4-Hydroxynonenals

In Abb. 17 ist ein Überblick über potentielle Lipierungsprodukte der 4-Hydroxyalk-2-enale am Beispiel bekannter Lipierungsprodukte des 4-HNE mit Nucleophilen dargestellt.

Ein nukleophiler Angriff am 4-HNE kann an der Aldehydgruppe des  $\text{C}_1$  erfolgen, wodurch es zur Ausbildung einer Schiff'schen Base **18** kommt. Weiterhin kann ein Michael-Addukt **19** nach Angriff am  $\text{C}_3$  resultieren. Die Bildung des Michael-Addukts **19** stellt unter milden, wässrigen Reaktionsbedingungen (23 °C, pH 7,4) die Hauptreaktion zwischen Nucleophilen und 4-HNE dar, die allerdings reversibel verläuft (Lin et al., 2005; Xu et al., 1999). Im Falle der Thiolgruppe des Cysteins sowie des Imidazolrings des Histidins konnte das entsprechende Hemiacetal **20** nachgewiesen werden (Nadkarni & Sayre, 1995; Esterbauer et al., 1991), welches sich theoretisch unter Abspaltung von Wasser zum entsprechenden Dihydrofuran stabilisieren könnte (Sayre et al., 2006). Für die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins konnte das Michael-Addukt auf Grund seiner Instabilität nicht in Form des Hemiacetals, sondern nach Reduktion als entsprechendes 1,4-Diol nachgewiesen werden (Lin et al., 2005; Nadkarni & Sayre, 1995). Mittels  $^1\text{H}$  NMR konnte in Folge einer milden, wässrigen Inkubation mit einem 10-fachen

molaren Aminüberschuss, nach Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$ , der Anteil des reduzierten Michael-Addukts zu 67 % abgeschätzt werden (Lin et al., 2005). Nach saurer Hydrolyse des reduzierten Michael-Addukts kann dieses in seine reduzierte, cyclisierte Form überführt und nachgewiesen werden (Requena et al., 1997).

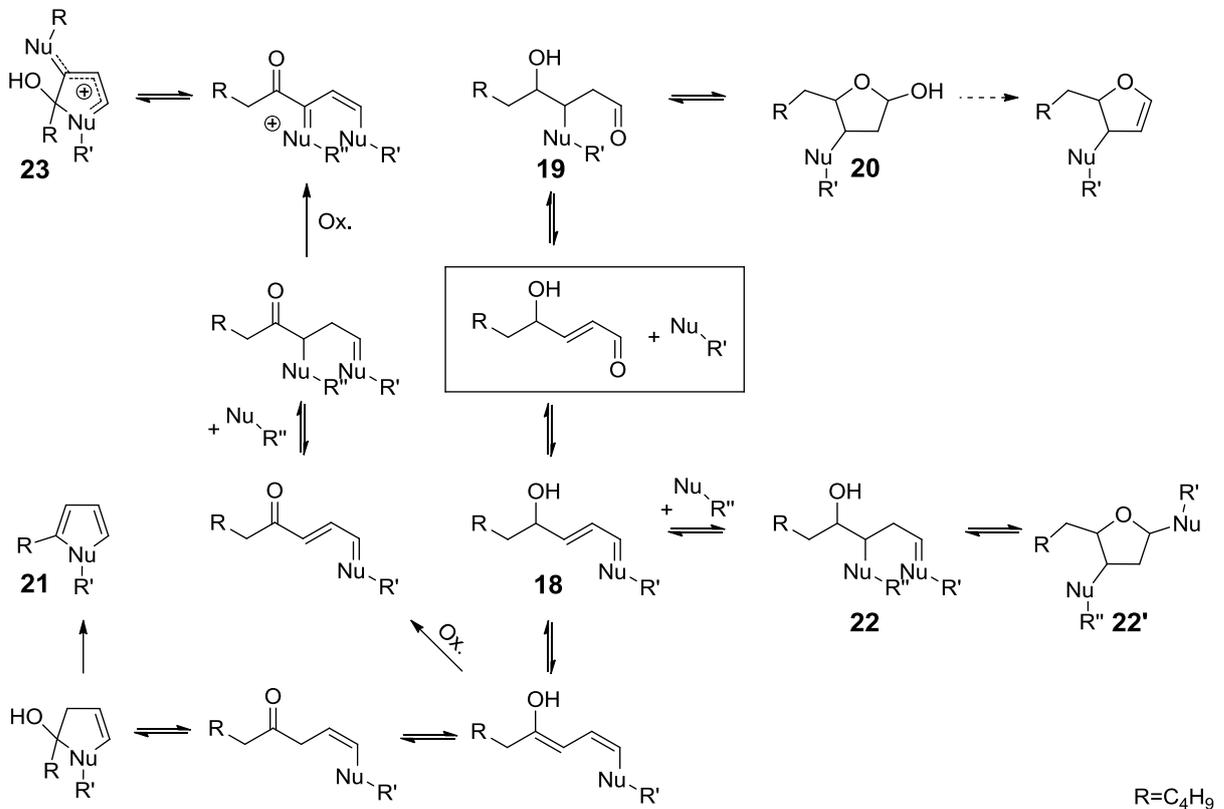


Abb. 17 Übersicht bekannter Lipierungsprodukte des 4-HNE mit Nukleophilen (Nu-R<sup>n</sup>)

Kommt es zur Ausbildung der ebenfalls reversibel gebildeten Schiff'schen Base **18** (Nadkarni & Sayre 1995; Uchida & Stadtman, 1993), so kann diese in das entsprechende Enamin und nach Keto-Enol-Tautomerisierung in das 4-Oxo-Enamin umgelagert werden, welches schließlich zum 2-Pentylpyrrolderivat **21** cyclisieren kann (Sayre et al., 1993). Dieses stellt nach Sayre et al. (2006) und Sayre et al. (1996) ein ALE dar, welches auf Grund des Kondensationsschritts irreversibel gebildet wird (Sayre et al., 1993). Mittels <sup>13</sup>C NMR konnte als Folge einer Inkubation von BSA mit 4-HNE unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,4) gezeigt werden, dass 20 % des reagierten 4-HNE in Form des 2-Pentylpyrrolderivats vorlagen (Amarnath et al., 1998). Hierdurch wird die Hydrophobizität des Proteins erhöht und es besteht die Möglichkeit zu Pyrrol-induzierten Quervernetzungen (Amarnath et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit der intra- beziehungsweise intermolekularen Proteinquervernetzung besteht durch Ausbildung eines Schiff'sche Base-Michael-Addukts **22** unter Beteiligung eines 4-HNE-Moleküls, welches im Gleichgewicht mit seinem Hemiacetal **22'** steht (Nadkarni & Sayre, 1995; Uchida & Stadtman, 1993). Dies stellt allerdings ein reversibel gebildetes Produkt dar, welches erst durch Reduktion, beispielsweise mit  $\text{NaBH}_4$ , in ein stabiles Diamin überführt

wird (Xu et al., 1999; Nadkarni & Sayre, 1995). Anhand von  $^1\text{H}$  NMR-Untersuchungen unter reduktiven Bedingungen wurde festgestellt, dass das Schiff'sche Base-Michael-Addukt **22** in wässrigen Modellsystemen ein Minorprodukt darstellt, und dass es vor allem zur Bildung des 4-HNE-Michael-Addukts **19** kommt (Xu et al., 1999; Nadkarni & Sayre, 1995). Lin et al. (2005) konnten die jeweiligen Masseanteile des Diamins und des Michael-Addukts unter reduzierenden Bedingungen in Modellansätzen mittels  $^1\text{H}$  NMR zu 5 % und 67 % abschätzen. Kommt es zur Oxidation des Enamins, einer Michael-Addition eines zweiten Nucleophils und einem zweiten Oxidationsschritt, gefolgt von einer Cyclisierung, so kann das 2-Alkyl-2-hydroxy-1,2-dihydro-pyrrol-3-oniminiumion **23** entstehen, welches ein Fluorophor (ex/em 360/430 nm) darstellt (Xu et al., 1999; Xu & Sayre, 1998; Itakura et al., 1998). Die Bildung des Fluorophors kann auch aus 4-Oxonon-2-enal hervorgehen (Xu & Sayre, 1998), erfolgt allerdings nur bei Anwesenheit von Sauerstoff und wird durch Anwesenheit oxidierender Metallionen, wie beispielsweise  $\text{Cu}^{2+}$ , beschleunigt (Xu et al., 1999). Optimale Reaktionsbedingungen zur Bildung des Fluorophors stellen ein Überschuss des Nucleophils im Verhältnis zu 4-HNE von 5-10:1, ein pH-Wert zwischen 7 und 7,5 und ein  $\text{Cu}^{2+}$ -Gehalt von 0,5 % bezogen auf 4-HNE dar (Xu et al., 1999). Nach Modellinkubation von RNase A (1 mM) mit 4-HNE (1,5 mM) bei pH 7,2 und Raumtemperatur für 5 h wurde mittels Fluoreszenzmessung abgeschätzt, dass 1,8 % der Lysinreste modifiziert in Form des Fluorophors vorlagen (Xu et al., 1999).

Die Reaktivität des 4-HNE gegenüber den Aminosäureseitenketten wird in der Reihenfolge Cystein  $\gg$  Histidin  $>$  Lysin angegeben, wohingegen Arginin nicht als relevanter Reaktionspartner des 4-HNE angesehen wird (Doorn & Petersen, 2002).

### 2.4.5 Lipierungsprodukte im physiologischen Kontext und in Lebensmitteln

Die in der Literatur diskutierten Lipierungsprodukte wurden in der Regel indirekt immunochemisch oder massenspektrometrisch durch Verfolgung von Massenzunahmen oder direkt nach Derivatisierung über die HPLC-UV, Aminosäureanalyse oder seltener über die HPLC mit gekoppelter massenspektrometrischer Detektion nachgewiesen (Spickett, 2013; Carini et al., 2004).

#### **Lipierungsprodukte des Hexanals**

Die Bildung von  $\text{N}^\epsilon$ -(Hexanoyl)lysin (HEL) **5**, welches unter oxidativen Bedingungen sowohl in Anwesenheit von Hexanal (Ishino et al., 2008) als auch ohne Beteiligung von Hexanal durch Fettsäurehydroperoxide gebildet werden kann (Kato & Osawa, 2010; Onorato et al., 2000;

Kato et al., 1999), wurde mittels LC-ESI-MS/MS in humanen Urinproben nachgewiesen (Kato et al., 2004). Die Gehalte an freiem HEL **5** konnten hierbei unter Verwendung eines stabilisotopenmarkierten Standards in Urinproben von Diabetikern zu 3,2  $\mu\text{mol/mol}$  Kreatin quantifiziert werden. In den Proben der nicht diabetischen Kontrollgruppe wurden hingegen signifikant niedrigere Gehalte von 1,6  $\mu\text{mol/mol}$  Kreatin bestimmt. Da das entsprechende N<sup>α</sup>-Addukt nicht nachgewiesen werden konnte, wurden als Quelle lipierte Proteine und keine Artefakte, die im Zuge der Aufarbeitung entstanden sind, angenommen (Kato et al., 2004). Nach Verzehr von 26 g Kakaopulver pro Tag über 12 Wochen konnte eine signifikante Reduktion von **5** in den Urinproben von Probanden gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, was ursächlich auf den hohen Polyphenolgehalt des Kakaos zurück geführt wurde (Kato & Osawa, 2010; Baba et al., 2007). Die Quantifizierung von **5** erfolgte hierbei ebenfalls mittels LC-ESI-MS/MS über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse.

In einem Homogenisat aus Hähnchenschenkelfleisch und PBS-Puffer konnte in Abhängigkeit der Erhitzungszeit bei 50 °C nach Reduktion mit NaCNBH<sub>3</sub> eine Zunahme der Gehalte der reduzierten Schiff'schen Base **3** über mono- und polyklonale Antikörper mittels ELISA quantifiziert werden (Zielinski et al., 2001). Die Gehalte lagen hierbei in einem Bereich, angegeben als Hexanal-Äquivalente, von 5-61 nmol/g Fleisch (Zielinski et al., 2001), wobei sich die Gehalte teilweise um den Faktor 3 dahingehend unterschieden, ob sie über die mono- oder polyklonalen Antikörper bestimmt wurden. Weiterhin zeigten die monoklonalen Antikörper, die gegen Hexanal-BSA-Addukte erzeugt wurden, Kreuzreaktivitäten im Bereich von 38-77 % gegenüber Hühnerserumalbumin, welches durch Pentanal, Heptanal und 2-Hexenal modifiziert wurde. Die polyklonalen Antikörper wurden dahingehend nicht getestet (Zielinski et al., 2001). Eine eindeutige Quantifizierung war somit nicht gegeben. Weiterhin konnte die Bildung von HEL **5** mittels ELISA in Reissamen, die bei 5 °C und 40 °C gelagert wurden, nachgewiesen werden (Minato et al., 2005). Hierbei konnten in den frischen und den gelagerten Proben Addukte identifiziert werden, wohingegen sich nur bei den für 40 °C für drei Monate gelagerten Proben ein signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten zeigte. Eine Beurteilung der Zunahme an **5** erfolgte dabei nicht durch eine Quantifizierung, sondern durch Vergleich, der im ELISA gemessenen Absorptionen.

### **Lipierungsprodukte des Acroleins**

In Lebergewebeproben von Mäusen, Ratten und Menschen konnten Acrolein-DNA-Addukte in Form cyclischer Hydroxypropanodeoxyguanosin-Addukte mittels HPLC in Gehalten von jeweils 1,0-1,7, 0,2-1,0 und 0,3-2,0 Addukten pro 10<sup>6</sup> Guaninmolekülen quantifiziert werden (Nath & Chung, 1994). Unter Verwendung der gleichen Methode konnten in Mundgewebeproben von Rauchern Hydroxypropanodeoxyguanosin-Addukte in Gehalten von 1,4  $\mu\text{mol/mol}$  Guanin quantifiziert werden, wohingegen die Gehalte bei Nichtrauchern mit

0,5  $\mu\text{mol/mol}$  Guanin signifikant geringer nachgewiesen wurden (Nath et al., 1998). Somit konnte erstmals eine Zunahme konkreter Addukte aus Acrolein, welches im Zigarettenrauch enthalten ist, mit DNA-Molekülen beobachtet werden (Nath et al., 1998). Hauptsächlich für nicht-endogene Acroleinexpositionen wird Zigarettenrauch angesehen (Stevens & Maier, 2008). Wird von einem mittleren Gehalt an Acrolein in der Atmosphäre von 0,3  $\mu\text{mol/m}^3$  ausgegangen (EPA, 2003), kommt es zu einer durchschnittlichen Acrolein-Aufnahme von 2,8  $\mu\text{mol/24 h}$  (Stevens & Maier, 2008), wodurch auch Acrolein-Addukte bei Nichtrauchern erklärt werden könnten. Mittels Antikörpern, welche nach Umsetzung von Schlitzschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) mit Acrolein und nachfolgender Immunisierung von Kaninchen gewonnen wurden und deren immunologische Spezifität gegenüber  $\text{N}^\alpha$ -Acetyl- $\text{N}^\epsilon$ -(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysin (FDP-Acetyllysin) **7** bestätigt wurde, konnten in Gehirnproben von Patienten, die an Alzheimer erkrankt waren, entsprechende FDP-Addukte immunochemisch detektiert werden (Calingasan et al., 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Gehirnproben gesunder Probanden keine Immunreaktivitäten. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass Acrolein-Proteinaddukte geeignete Marker seien, um oxidative Proteinveränderungen bei Alzheimererkrankungen zu detektieren (Calingasan et al., 1999). Weiterhin wurde diskutiert, dass oxidative Proteinveränderungen an der Bildung von Neurofibrillenbündeln und dem Absterben von Neuronen beteiligt sein könnten (Calingasan et al., 1999). Mittels Aminosäureanalyse unter Verwendung eines synthetisierten FDP-Lysin-Standards konnten Uchida et al. (1998) FDP-Lysin **7** anhand eines *in vitro* Experiments in  $\text{Cu}^{2+}$ -oxidiertem LDL quantifizieren. Nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C und pH 7,4 konnten 3,4 % des beobachteten Lysinverlusts durch die Bildung von **7** erklärt werden. Mittels LC-ESI-MS/MS konnten Maeshima et al. (2012) über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse MP-Lysin **10** in oxidiertem LDL, welches einer *in vitro* Oxidation für 48 h in Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  bei 37 °C ausgesetzt war, quantifizieren. Hierbei konnten 0,06 mol MP-Lysin/mol LDL bestimmt werden, wodurch 1 % des Lysinverlusts erklärbar war. FDP-Lysin **7** konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnte über die gleiche Methode MP-Lysin **10** in Nierengewebeproben von Mäusen nachgewiesen werden, die  $\text{Fe}^{3+}$ -Nitritotriacetat ausgesetzt waren (Maeshima et al., 2012).  $\text{Fe}^{3+}$ -Nitritotriacetat induzierte hierbei radikalvermittelte, oxidative Gewebeschädigungen.

In Lebensmittelproben wurden bisher keine Acrolein-Lipierungsprodukte bestimmt.

### **Lipierungsprodukte des MDA**

In LDL-Proben gesunder Probanden konnten mittels GC-MS nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse anhand einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse die Schiff'sche Base **12** in Form des 3-( $\text{N}^\epsilon$ -lysino)propan-1-ols (LM) und das  $\text{N,N}'$ -1-Amino-3-iminopropen **13'** in Form des 1,3-Di( $\text{N}^\epsilon$ -lysino)propans (LML) quantifiziert werden (Requena et al., 1997). Die mittleren

Gehalte lagen für LM und LML jeweils bei 0,12 und 0,002 mmol/mol Lysin (Requena et al., 1997). Mittels immunochemischer Anfärbung in Lebergewebeproben von Minischweinen, die einer Diät mit Ethanol (5 g/ kg Körpergewicht) ausgesetzt wurden, konnten bereits nach einem Monat MDA-Addukte nachgewiesen werden (Niemelä et al., 1995). Hieraus wurde geschlossen, dass Lipierungsprodukte schon im Anfangsstadium von Lebererkrankungen gebildet werden. Im weiteren Verlauf bis zu 12 Monaten traten Leberentzündungen, Nekrosen und Fibrosen auf, weshalb spekuliert wurde, dass ein Zusammenhang mit den gebildeten Lipierungsprodukten bestand (Niemelä et al., 1995). In dieser Studie war(en) allerdings die konkrete(n) Struktur(en), welche durch die MDA-Antikörper erkannt wurde(n), nicht bekannt. Anhand von KLH-MDA-Antikörpern, deren Spezifität für MDA-Addukte und im Speziellen gegen das fluoreszierende Dihydropyridin-Addukt **14** nachgewiesen wurde, konnte mittels Western Blot an LDL, welches in Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  bei pH 7,2 und 37 °C oxidiert wurde, das entsprechende MDA-Addukt **14** nachgewiesen werden (Yamada et al., 2001). Des Weiteren konnten Yamada et al. (2001) Immunreaktivitäten des Antikörpers gegenüber arteriosklerotischen Plaques aus humanen Aorten beobachten. Hieraus wurde geschlossen, dass das Dihydropyridin-Addukt **14** als Folge altersbedingter Erkrankungen gebildet wird (Yamada et al., 2001). Mittels Aminosäureanalyse wurde das Quervernetzungsprodukt 2-Ornityl-4-methyl(1- $\epsilon$ -lysyl)1,3-imidazol **16** quantifiziert und gezeigt, dass bis zu 0,5 % der Lysin- und 0,7 % der Argininreste in Plasmaproben von Diabetikern durch **16** modifiziert vorlagen (Slatter et al., 2004).

Untersuchungen zum Vorliegen von freiem und gebundenem MDA in Lebensmittelproben wurden von Piche et al. (1988) vor dem Hintergrund einer Abschätzung der Karzinogenität durchgeführt. Hierfür wurden unter anderem Hähnchenbrust, geräucherter Lachs und geräucherte Felchen nach enzymatischer Hydrolyse untersucht. Mittels HPLC wurde unter Verwendung eines  $\text{N}^\epsilon$ -(Prop-2-enal)lysin-Standards **12'** festgestellt, dass weniger als 10 % des in Lebensmitteln vorkommenden MDA in freier Form vorliegen und 80 % in Form von **12'**. Somit würde **12'** das Hauptaddukt aus MDA und Aminosäureseitenketten darstellen (Piche et al., 1988). Eine Angabe quantifizierter Gehalte an **12'** in den Lebensmittelproben erfolgte hierbei nicht. Weiterhin wurde anhand von Ratten gezeigt, dass eine intraperitoneale Applikation von **12'** zu keiner Erhöhung des Gehalts an freiem MDA im Urin führte. Da somit die Metabolisierung von **12'** nicht zu freiem MDA führte, wurde geschlossen, dass MDA in Lebensmitteln keine toxikologische Bedeutung hat (Piche et al., 1988). Ein möglicher Metabolit, der nach Verabreichung von MDA-modifiziertem BSA und **12'** an Ratten im Urin mittels HPLC nachgewiesen werden konnte, ist die  $\text{N}^\alpha$ -acetylierte Form von **12'** (McGirr et al., 1985). Nach gastrointestinaler Intubation von radioaktiv markiertem **12'** an Ratten wurden die Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung untersucht und festgestellt, dass nur 8-15 % der verabreichten Menge zu freiem Lysin abgebaut wurden (Girón-Calle et al., 2002). Somit kommt

es als Folge des Magentransits nur in geringen Anteilen zu hydrolytischen Spaltungen von **12'**. In Urin- und Fäzesproben konnten 57 % der intraperitoneal in Form von **12'** applizierten radioaktiven Stoffmenge wiedergefunden werden. Als mögliche Ausscheidungsprodukte wurden das unveränderte **12'** oder das N<sup>α</sup>-acetylierte Derivat diskutiert (Girón-Calle et al., 2002). Weitere 5 % der radioaktiven Stoffmenge fanden sich in Geweben wieder, wovon der Hauptanteil in der Leber identifiziert wurde (Girón-Calle et al., 2002). Lynch et al. (2001) konnten mittels ELISA in Rinder- und Schweineliposomen, Rindermicrosomen und Rindfleisch MDA-Lipierungsprodukte identifizieren, die allerdings weder strukturell charakterisiert, noch quantifiziert wurden. Auch hier konnte in Abhängigkeit der Lagerdauer in den Rindfleischproben eine tendenzielle Zunahme der MDA-Addukte beobachtet werden (Lynch et al., 2001). In Proteinextrakten aus rohen und gerösteten Erdnüssen konnten MDA-Addukte nachgewiesen werden, die im ELISA bei den gerösteten Erdnüssen um den Faktor zwei höhere Absorptionen zeigten, als bei den rohen Erdnüssen (Chung et al., 2002; Chung & Champagne, 2001). Eine Charakterisierung der antigenen Strukturen oder eine Quantifizierung der Addukte erfolgte nicht. Allerdings wurde diskutiert, dass unter anderem MDA-Addukte für eine verstärkte IgE-Bindung gerösteter Erdnüsse im Vergleich zu den rohen Erdnüssen verantwortlich sein könnten (Chung & Champagne, 2001).

### **Lipierungsprodukte des 4-HNE**

4-HNE-Lipierungsprodukte konnten anhand von KLH-Antikörpern, welche nach Umsetzung von KLH mit 4-Oxononanal und nachfolgender Immunisierung von Kaninchen gewonnen wurden, in Gehirngewebeproben von Patienten mit bekannter Alzheimererkrankung in Form von Pyrrol (**21**)- und Pyrrolidinaddukten nachgewiesen werden (Montine et al., 1997). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass es zur Akkumulation von 4-HNE-Pyrrolen im Cytoplasma der Pyramidenzellen und den Neurofibrillenbündeln kam (Montine et al., 1997). Sayre et al. (1997) konnten ebenfalls in Gehirngewebeproben unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Antikörpern, die gegen 2-Pentylpyrroladdukte **21** gerichtet waren, zeigen, dass die Anteile an 2-Pentylpyrroladdukten **21** in Gewebeproben von Patienten, die an Alzheimer erkrankt waren, höher lagen, als bei nicht erkrankten Patienten. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass 4-HNE, welches in Folge oxidativen Stresses gebildet werden kann, eine Rolle bei der Degenerierung von Neuronen spielen und somit an der Entstehung von Alzheimer beteiligt sein könnte (Sayre et al., 1997). In Plasmaproben von Patienten mit Nierenerkrankungen im Endstadium und Patienten mit Arteriosklerose konnten mittels ELISA Gehalte an 2-Pentylpyrrolen **21** von jeweils 24,3 und 15,2 nmol/ml quantifiziert werden (Salomon et al., 2000). Gesunde Probanden wiesen im Vergleich dazu mit 8,0 nmol/ml signifikant geringere Gehalte auf, weshalb 4-HNE-Pyrrol-Addukte im Blut als Markersubstanzen für eine pathophysiologische Lipidperoxidation diskutiert werden (Salomon

et al., 2000). Zusätzlich konnten 4-HNE-Pyrrol-Addukte **21** an Apo B-Proteinen und an Kollagenfasern einer arteriosklerotischen Ablagerung identifiziert werden (Salomon et al., 2000). Ylä-Herttuala et al. (1989) konnten qualitativ anhand von Western-Blots zeigen, dass LDL aus arteriosklerotischen Läsionen 4-HNE-Lysin-Addukte aufwies, wohingegen LDL aus gesunden Probanden keine positive Reaktion zeigte.

Analog den nachgewiesenen MDA-Addukten, konnten Lynch et al. (2001) mittels ELISA in Rinder- und Schweineliposomen, Rindermicrosomen und Rindfleisch 4-HNE-Lipierungsprodukte identifizieren. Aussagen über die genaue als Antigen fungierende Struktur wurden nicht getätigt und es erfolgte keine Quantifizierung, sondern eine Beurteilung anhand von Absorptionzunahmen. In Abhängigkeit der Lagerdauer konnte in den Rindfleischproben eine Absorptionzunahme der 4-HNE-Addukt-Gehalte festgestellt werden (Lynch et al., 2001). In Proteinextrakten aus rohen und gerösteten Erdnüssen konnten mittels ELISA 4-HNE-Addukte nachgewiesen werden, die sich aber bezüglich ihrer Absorptionswerte nicht signifikant unterschieden (Chung et al., 2002; Chung & Champagne, 2001). Da auf Grund einer Erdnussröstung die Proteinlöslichkeit reduziert wird (Kopper et al., 2005), ist allerdings fraglich, inwieweit hierbei lipierte Proteine in den Extrakt übergehen konnten. Analog dazu konnten auch keine Zunahmen der Gehalte an N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) festgestellt werden (Chung et al., 2002; Chung & Champagne, 2001). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Studie, in welcher die CML-Gehalte in Erdnüssen direkt massenspektrometrisch quantifiziert und deutliche Zunahmen in Abhängigkeit der Röstbedingungen beobachtet wurden (Wellner et al., 2012b).

In 22 frischen Lebensmittelproben wurde N<sup>ε</sup>-Pyrrolylnorleucin mittels Kapillarelektrophorese nach alkalischer Hydrolyse quantifiziert (Zamora et al., 1999a), das aus der Reaktion von 4,5-Epoxy-2-alkenalen und der ε-Aminogruppe des Lysins hervorgeht (Zamora & Hidalgo, 1994). Die Gehalte lagen hierbei zwischen 0,24-6,36 mmol/kg Lebensmittel. In Erdnüssen konnten 2,89 mmol/kg quantifiziert werden, wobei keine Angabe darüber erfolgte, ob es sich um native oder geröstete Erdnüsse handelte (Zamora et al., 1999a). In Modellsystemen konnte bereits ein weiteres Addukt aus 4,5-Epoxy-2-alkenalen und dem Imidazolring des Histidins nachgewiesen werden (Zamora et al., 1999b). Ein aus 2,4-Decadienal hervorgehendes Lipierungsprodukt, welches sich exklusiv nur durch Reaktion mit der α-Aminogruppe von Aminosäuren bilden kann, stellt das (*E,E*)-Deca-2,4-dien-1-amin dar (Karademir et al., 2013). Die Bildung ist hierbei unabhängig von der zur Verfügung stehenden freien Aminosäure. Ein qualitativer Nachweis konnte mittels UHPLC-HRMS in gerösteten Haselnüssen erfolgen (Karademir et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass generell, beispielsweise vergleichend mit Maillard-Reaktionsprodukten, weniger Lipierungsprodukte nachgewiesen oder quantifiziert werden. Die

in der Literatur publizierten Untersuchungen erfolgten vor allem vor physiologischen Hintergründen. Studien, die sich mit Lipierungsprodukten in Lebensmitteln beschäftigen, sind im Vergleich dazu in der Unterzahl. In der Regel erfolgen die Identifizierungen oder Quantifizierungen über immunochemische Methoden, wohingegen massenspektrometische Analyseverfahren nur selten Anwendung finden. Bei den eingesetzten Antikörpern ist das konkrete als Epitop erkannte Strukturmerkmal häufig nicht eindeutig identifiziert, sodass weder Aussagen über das tatsächlich identifizierte Lipierungsprodukt getroffen wurden, noch Kreuzreaktivitäten zu anderen Lipierungsprodukten ausgeschlossen werden konnten. Erst durch Einsatz direkter, idealerweise massenspektrometischer Analyseverfahren unter Verwendung chemisch charakterisierter Standards kann eine eindeutige Quantifizierung von Lipierungsprodukten realisiert werden. Ungenauigkeiten der immunochemischen Methoden werden anhand der Studien von Chung & Champagne (2001) und Chung et al. (2002) deutlich. Hierbei konnten als Folge einer Erdnussröstung keine Zunahmen, der mittels CML-Antikörper erfassten Gehalte an CML festgestellt werden, wohingegen eine direkte Quantifizierung mittels GC-MS deutliche Zunahmen in Abhängigkeit der Röstbedingungen zeigte (Wellner et al., 2012b). Erdnussproben wurden bezüglich Lipierungsprodukten bisher nur in den Studien von Chung et al. (2002), Chung & Champagne (2001) und Zamora et al. (1999a) untersucht. Hierbei konnten immunochemisch 4-HNE- und MDA-Addukte in rohen und gerösteten Erdnüssen identifiziert, eine tendenzielle Zunahme als Folge der Röstung abgeschätzt sowie N<sup>ε</sup>-Pyrrolylnorleucin in kommerziellen Erdnüssen mittels Kapillarelektrophorese quantifiziert werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Nachfolgend sind diejenigen Chemikalien, Materialien und Geräte aufgeführt, die im Rahmen der Arbeiten an der Professur für Lebensmittelchemie verwendet wurden. Chemikalien, Materialien und Geräte, die am Paul-Ehrlich-Institut in Langen oder am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden Verwendung gefunden haben, sind unter den entsprechenden Methoden aufgeführt.

#### 3.1.1 Chemikalien

Tab. 6 Verwendete Chemikalien

Name	Spezifikation, Katalognummer	Hersteller, Bezug
1,1,3,3-Tetraethoxypropan-1,3-d <sub>2</sub>	99,1 %, 98,5 Atom-% D, DLM-6109-0	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
1,1,3,3-Tetramethoxypropan	zur Synthese, 8.20756.0250	Merck, Darmstadt
1,1,4,4-Tetramethoxybut-2-en, ( <i>E</i> )-	95 %, 368202	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1,3-Diethylbenzol	≥ 99 %, puriss., 97865	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Brompentan-1,1-d <sub>2</sub>	98,9 %, 99,2 Atom-% D, CS04-482_358	Campro Scientific, Berlin
2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyhydroxylamin-Hydrochlorid, <i>o</i> -	> 99 %, A18368	Alfa Aesar, Ward Hill, NY, USA
2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluol	≥ 99 %, W218405	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Iodacetamid	zur Synthese, 8.04744.0025	Merck, Darmstadt
4-Hydroxynon-2-enal-Dimethylacetal, ( <i>E</i> )-	Hexanlösung, ≥ 85 %, H9538	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton	HPLC grade, 22928	VWR, Darmstadt
Acetonitril	HPLC grade, 20060 LC-MS grade, 83640	VWR, Darmstadt
Acrolein	90 %, stabilisiert mit Hydrochinon, 110221	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acroleindimethylacetal	98 %, 190543-5ML	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid/Bis-Lösung, 29:1	40 % (w/v), C=3,3 %, 10680	SERVA, Heidelberg
Amberlyst-15	hydrogen form, dry, 06423	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	zur Analyse, 1.01145.0500	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	p.a., 13375	SERVA, Heidelberg
Ammoniumsulfat	zur Analyse, 0032	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ascorbinsäure	99,5 %, zur Analyse, 10167	Grüssing, Filsum
Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, N,O-	for GC derivatization, 33024	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Name	Spezifikation, Katalognummer	Hersteller, Bezug
Bis-Tris-Propan	≥ 99 %, B6755	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	99,5 %, 10207	Grüssing, Filsum
Bovines Serumalbumin	≥ 98 %, A7906	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
But-2-enal, -(Z) und -(E) (1:20)	≥ 99,5 %, 27980	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carboxymethyllysin, N <sup>ε</sup> -	≥ 97 %, SC1505	PolyPeptide Group, Strasbourg, Frankreich
Carboxymethyllysin-d <sub>2</sub> , N <sup>ε</sup> -	1,0 mg/ml, ≥ 97 %, SC1529	PolyPeptide Group, Strasbourg, Frankreich
Chloroform	HPLC grade, 83626	VWR, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau	G 250, 17524	SERVA, Heidelberg
Corolase PP		AB Enzymes, Darmstadt
Deuteriochloroform	99,8 Atom-% D, 151823	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dichlormethan	HPLC grade, 23373	VWR, Darmstadt
Diethylether	zur Analyse, 2362 puriss, 24004	Th. Geyer, Renningen Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	99 %, reinst, 12150	Grüssing, Filsum
Dinatriumtetraborat-Decahydrat	99 %, reinst, 12187	Grüssing, Filsum
Dithiothreitol, DL-	99 %, 43819	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Druckluft, synthetisch	20,5 % O <sub>2</sub> in N <sub>2</sub>	Air Liquide, Paris, Frankreich
Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	≥ 99 %, puriss p.a., 31232	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	100 %, A0061	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	HPLC grade, 153385	VWR, Darmstadt
Ethylacetat	puriss p.a., 33211	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure	≥ 99 %, p.a., 8040	Carl Roth, Karlsruhe
Furosin-Dihydrochlorid	≥ 97 %, SC494	PolyPeptide Laboratories SAS, Strasbourg, Frankreich
Glycerol	≥ 99,5 %, p.a., 3783	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	99,5 %, 11018	Grüssing, Filsum
Helium	5.0, He 99,999 %	Air Liquide, Paris, Frankreich
Hept-2-enal, (E)-	≥ 95 %, W316504	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Heptafluorbuttersäure	A14907.22	VWR, Darmstadt
Heptanal	≥ 95 %, W254002	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hex-2-enal, (E)-	98 %, 132659	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hexan, n-	HPLC grade, 24575	VWR, Darmstadt
Hexanal	98 %, 115606	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hexanal-d <sub>12</sub>	98,3 %, 98,8 Atom-% D, D-6265	CDN Isotopes, Quebec, Kanada
Hoveyda-Grubbs-Katalysator, 2 <sup>nd</sup> Generation	97 %, 569755-500MG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	99,5 %, p.a., wasserfrei, 12008	Grüssing, Filsum
Kaliumpermanganat	≥ 99 %, 223468	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leucin Aminopeptidase M	70,4 U/ml, L5006-50UN	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Linolsäuremethylester	≥ 99 %, L1876	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lithiumaluminiumhydrid	powder, reagent grade, 95 %, 199877	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumspäne	≥ 99,5 %, purum, für Grignard Reaktionen, 63035	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Name	Spezifikation, Katalognummer	Hersteller, Bezug
Magnesiumsulfat	99 %, reinst, 12094	Grüssing, Filsum
Methanol	HPLC grade, 20864	VWR, Darmstadt
Molybdätophosphorsäure Hydrat	p.a., 005572	ChemPUR, Karlsruhe
Natriumborhydrid	gepulvert, zur Synthese, A0549	AppliChem, Darmstadt
Natriumbromid	98 %, 1063601000	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	99,5 %, wasserfrei, 12118	Grüssing, Filsum
Natriumchlorid	Reagent Ph. Eur., 27810	VWR, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	99 %, zur Analyse, 12132	Grüssing, Filsum
Natriumhydrogencarbonat	99,5 %, zur Analyse, 12143	Grüssing, Filsum
Natriumhydroxid	99 %, reinst, 12156	Grüssing, Filsum
Natriumlaurylsulfat (SDS)	≥ 99 %, 20760	SERVA, Heidelberg
Natriumsulfat	99 %, wasserfrei, reinst, 12175	Grüssing, Filsum
Natronlauge	32 % (m/v), reinst, 12192U	Grüssing, Filsum
N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin	> 99 %, 744-59-2	Fluka, Buchs, Schweiz
Nonafluorpentansäure	97 %, 396575	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonalacton, $\gamma$ -	zur Synthese, 8.43783.0100	Merck, Darmstadt
Nonanal	97 %, A15908	Alfa Aesar, Karlsruhe
N-Tri(hydroxymethyl)methyl-glycin	zur Analyse, 37195	SERVA, Heidelberg
N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin	E-1120.0005	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Oct-1-en-3-ol	zur Synthese, 8.18543.0050	Merck, Darmstadt
Octanal	99 %, O5608	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G	A1404	AppliChem, Darmstadt
Palladium auf Aktivkohle	10 % Pd (w/w)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pentafluorphenylhydrazin	for HPLC derivatization, ≥ 98 %, 93742-10G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pentan, n-	zur Analyse, 1147.1000	Th. Geyer, Renningen
Pepsin	EC 3.4.23.1, 10 FIP-U/mg, P6887	Merck, Darmstadt
Petrolether	Siedebereich 40-60 °C, 10707403	Acros Organics/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung	Tabletten, 18912-014	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Prolidase	100 U/ml, P6675-150UN	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pronase E	EC 3.4.24.4, 4000 PU/mg, 107433	Merck, Darmstadt
Protein Marker III (6,5-200)	A4402	AppliChem, Darmstadt
Protein Marker Roti <sup>®</sup> -Mark Standard	T851	Carl Roth, Karlsruhe
Pyridiniumchlorochromat	98 %, 190144	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pyrralin	40 nmol/ml H <sub>2</sub> O	Synthese im Arbeitskreis (Henle & Bachmann, 1996)
Reinstwasser	Hausinterne Anlage Purelab plus mit Mischbettionenaustauscher und Filter 0,2 $\mu$ m, Leitfähigkeit: 0,055 $\mu$ S/cm	USFilter, Ransbach-Baumbach

Name	Spezifikation, Katalognummer	Hersteller, Bezug
Salzsäure	rauchend, 37 %, zur Analyse, 100317	Merck, Darmstadt
Salzsäure in Methanol	1 mol/l, 23206	Grüssing, Filsum
Schwefelsäure	95 %, 20700	VWR, Darmstadt
Selenreaktionsgemisch nach Wieninger	UN3288	Riedel-de-Haën, Seelze
Stickstoff	5.0, N <sub>2</sub> 99,999 %	Air Liquide, Paris, Frankreich
Tetradeuteromethanol	99,8 Atom-% D, 151947	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetrahydrofuran	HPLC grade, 7344.1	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin, N,N,N',N'-	≥ 98,5 %, 35925	SERVA, Heidelberg
Thymol	≥ 99 %, 5391	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	≥ 99 %, p.a., 8789	Carl Roth, Karlsruhe
Triethylamin	≥ 99,5 %, BioUltra, 90335	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	ultrapure, A1086	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoff	5.0, H <sub>2</sub> 99,999 %	Air Liquide, Paris, Frankreich
Xylol, p-	analytical standard, 95680	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Für LC-ESI-MS/MS-Messungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet, welches über Kaliumpermanganat destilliert wurde. Puffer für die Aminosäureanalyse sind von der SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck, bezogen worden.

### 3.1.2 Materialien

Tab. 7 Verwendete Materialien

Name	Spezifikation, Katalognummer	Hersteller, Bezug
Anionenaustauscher	Macro-Prep <sup>®</sup> High Q Support, 156-0040	Bio-Rad, München
Bördelkappen	548-0010	VWR, Darmstadt
Dünnschichtchromato- graphie-Platten	Kieselgel 60, 20 x 20 cm, 0,25 mm	Merck, Darmstadt
Dialyseschlauch, Cellulose	Ø 27 mm, MWCO 14 kDa, D9527-100FT	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Einmalspritzen Norm-Ject	steril, 1,0 ml	neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg
Elektrophoresegele	9 % Vario Gel, 12 Bahnen, 1,0 mm stark, 95-80-102	Biostep, Burkhardtsdorf
Extraktionshülsen für Soxhlet	33 x 94 mm	Whatman, Dassel
Faltenfilter	595,5, Ø 110 mm	Whatman, Dassel
Größenausschlussfilter	MWCO 300 kDa	Sartorius, Göttingen
Vivaspin 6 ml		
HPLC-Vials	1,5 ml	VWR, Darmstadt

Name	Spezifikation, Katalognummer	Hersteller, Bezug
Hydrolyseröhrchen mit Schraubdeckel und Septum	Duran, 12 x 100 mm	Schott, Mainz
Inserts für HPLC-Vials	200 µl	VWR, Darmstadt
Kanülen Sterican®	Ø 0,8 mm x 50 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kationenaustauscher	DOWEX 50 WX-8, 200-400 mesh, 335355000	Acros Organics/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kieselgel 60	0,063-0,200 mm, Porengröße 60 °A	Merck, Darmstadt
Membranfilterscheiben für Fließmittelfiltration	GH Polypro 47 mm, 0,45 µm, hydrophiles Polypropylen	Pall, Dreieich
Mikrotiterplatten Parafilm „M“	96 well transparent + schwarz 38 m x 10 cm, ST284971605	Brand, Wertheim neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Rollrandschnappdeckelgläser	verschiedene Größen: 10-25 ml	VWR, Darmstadt
Rundfilter	589/2, Ø 40,5 mm (Weißbandfilter)	Whatman, Dassel
Septen für HPLC-Vials	PTFE-beschichtet	Carl Roth, Karlsruhe
Silikonöl	M 100, bis 250 °C, 13101	Grüssing, Filsum
SPE-Kartuschen	Waters Oasis HLB 6cc (200 mg) , WAT106202	Waters, Eschborn
	Strata C18-E, 500 mg/3 ml, 8B-S001-HBJ	Phenomenex, Torrance, CA, USA
	GracePure™ SPE C18-Max 500 mg/3 ml, 5138766	Grace Davison Discovery Sciences, Alltech Grom, Rottenburg-Hailfingen
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm, 0,20 µm, regenerierte Zellulose	Whatman, Dassel
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	VWR, Darmstadt

## 3.1.3 Geräte

Tab. 8 Verwendete Geräte

Name	Spezifikation	Hersteller, Bezug
Aminosäureanalysator	S4300	SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH, Fürstenfeldbruck
Aminosäureanalysensäule	Kationenaustauschersäule LCA K07/Li	Laserchrom HPLC Laboratories Ltd., Rochester, England
Analysenwaagen	BP 121 S, Genauigkeit 0,0001 g BP 3100 S, Genauigkeit 0,01 g	Sartorius, Göttingen
Anionenaustauscher	Niederdrucksystem BioLogic LP, Interfacebox, UV-Detektor K-2501, Fraction Collector Model 2128	Bio-Rad, München Knauer, Berlin Knauer, Berlin Bio-Rad, München
Anionenaustauschersäule	15 x 170 mm, gefüllt mit Macro-Prep <sup>®</sup> High Q Support	Bio-Rad, München
Elektrophorese	Gelgießkammer SG50, Vertikal-Elektrophoresekammer SE 600, Power Supply Model 1000/500, Thermostat RM6, Einschweißgerät Futura Junior Elektrophoresekammer für Fertiggele 10 x 10 cm, GV101	Hoefer, Holliston, MA, USA Hoefer, Holliston, MA, USA Bio-Rad, München Lauda, Lauda-Königshofen Audion, Kleve Biostep, Burkhardtsdorf
Elementanalytoren	Micro cube EuroEA 3000	Elementar, Hanau Eurovector, Mailand, Italien
Evaporator	TurboVap <sup>®</sup> LV	Zymark Ctr., Hokinton, MA, USA
Fraktionensammler für Kationenaustauscher GC-MS (EI)	Model 2110 Fraction Collector mit 10 ml Glasröhrchen GC 7890A, Injektor 7683 series mit Sample Tray, MS 5975C mit EI-Quelle	Bio-Rad, München Agilent, Böblingen
GC-MS-Säulen	HP-5MS Kapillarsäule (30,0 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke) mit Zebron Z-guard Vorsäule (deaktiviert, 5,0 m x 0,25 mm ID)	Agilent, Böblingen
	ZB-5 Guardian Kapillarsäule (30,0 m + 5,0 m Vorsäule x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke)	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Gefriertrocknungsanlagen	TR-FFAP (30,0 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke) ALPHA 1-2 ALPHA 1-4 LD plus BETA 1-8 K mit Isopropanolbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Martin Christ, Osterode am Harz
HPLC-DAD, analytisch	WellChrom-Serie, Degasser, Solvent Organizer K-1500, HPLC PUMP K-1001, dynamische Mischkammer K-5001, Autosampler Basic Marathon, Säulenofen, DAD K-2700	Knauer, Berlin

Name	Spezifikation	Hersteller, Bezug
HPLC-Säulen	Eurospher 100-5 C18 (250 x 3,0 mm) mit Vorsäule des gleichen Materials	Knauer, Berlin
	Eurospher 100-5 C18, (125 x 4,6 mm) mit Vorsäule des gleichen Materials	Knauer, Berlin
	Eurospher 100-10 C18 (250 x 16 mm) mit Vorsäule des gleichen Materials	Knauer, Berlin
	Furosine Dedicated Column, 5 µm (4,6 x 250 mm) mit Vorsäule des gleichen Materials	Grace Davison Discovery Sciences, Alltech Grom
	Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm) ohne Vorsäule	GmbH, Rottenburg-Hailfingen
HPLC-UV, semipräparativ	Smartline-Serie, Solvent Manager 5000, Handinjektionseinheit, Pumpe 1000, UV-Detektor 2500	Knauer, Berlin
	ICP 400	Memmert, Schwabach
Inkubationsschrank-Präzisionsbrutschrank		
Kationenaustauschersäule	1,5 x 50 cm, gefüllt mit DOWEX 50 WX-8	Bio-Rad, München
Kjeldahl-Apparatur	Aufschlussblock Digestion Unit K-435, Destillationsapparatur Unit B-324, Rührwerk 728 Stirrer, Titrationseinheit 775 Dosimat	Büchi Labortechnik, Essen
		Metrohm, Filderstadt
LC-ESI-MS/MS	1200 Series, Degasser G1379B, Pumpe G1312A, Autosampler G1329A, Thermostat G1330B, Säulenofen G1316A, DAD G1315D, Triple Quad LC/MS G6410A mit ESI-Quelle	Agilent, Böblingen
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Minishaker	MS1	IKA®-Werke, Staufen
NMR-Spektrometer	DRX-500	Bruker, Rheinstetten
	Avance 400	
	Avance 600	
Ölbäder	HBR 4 digital, temperierbar, mit Rührwerk	IKA®-Werke, Staufen
	RCT basic mit Thermometer ETS-D4-fuzzy	
pH-Messgerät	inoLab Level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weinheim
Photometer	Ultrospec® 1000	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Reihenwasserbad für Soxhlet-Extraktion	1042	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Trockenschrank	ULM 500	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510	Bandelin electronic, Berlin
Ultra-Turrax®	T18 basic	IKA®-Werke, Staufen
Vakuumkonzentrator	Savant SPD131DDA Speed Vac Concentrator, Kühlfalle RVT4104, Pumpe OFP-400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Name	Spezifikation	Hersteller, Bezug
Vakuumpumpe	VCZ 224	Ilmvac, Ilmenau
Vakuumrotationsverdampfer	Laborota 4002-digital mit Vakuumpumpe VCZ 224 Heidolph VV 2000 mit Wasserbad WB und Wasserstrahlpumpe	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	M12	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Centrifuge 5804R Heraeus Biofuge Stratos	Eppendorf, Hamburg Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zerkleinerer	Speedy Pro GVA 1	Krups, Offenbach am Main

## 3.2 Probenmaterial

### 3.2.1 Handelsproben

#### **Erdnussproben**

##### *Native Erdnüsse*

Veggie's Delight (Düsseldorf), Erdnüsse in der Schale, roh, ungeröstet, ungesalzen

##### *Jumbo Erdnüsse*

Stoltzenberg Nuss GmbH (Hamburg), geröstet, Ursprung: USA

#### **Erdnussöl**

##### *Natives Erdnussöl*

rinatura, Rila Feinkost-Importe GmbH & Co. KG (Stemwede-Levern), raffiniert, hochehitzebar, Zusammensetzung pro 100 ml Öl: Eiweiß 0 g, Kohlenhydrate 0 g, Fett 92 g, davon gesättigte Fettsäuren 11 g

### 3.2.2 Röst-, Erhitzungs- und Kochexperimente

#### **Erdnussröstung**

Die Erdnussröstung erfolgte entsprechend Literaturangaben (Wellner et al., 2012b; Cong et al., 2008; Beyer et al., 2001; Brown et al., 1972). Hierzu wurden native, ungeröstete Erdnüsse (nachfolgend bezeichnet als native Erdnüsse) mit Schale nebeneinander auf einer Aluminiumfolie ausgebreitet und für 20 beziehungsweise 40 min bei 170 °C im vorgeheizten Trockenschrank geröstet. Die Temperaturkontrolle erfolgte mittels Thermometer. Die Röstung für 20 min sollte hierbei einer industriellen Röstung entsprechen, wohingegen die Röstung für 40 min zu sehr dunklen Erdnüssen führte. Diese wiesen ein deutlich verbranntes Röstaroma auf und waren nicht mehr zum Verzehr geeignet. Nach der Röstung wurden die Erdnüsse geschält,

von den Samenhäutchen befreit, mittels Küchenmaschine zerkleinert und im Tiefkühlschrank bei  $-18\text{ °C}$  gelagert.

### **Erhitzung von Erdnussöl**

Analog den Erdnussröstbedingungen wurde natives, raffiniertes Erdnussöl erhitzt. Hierzu wurden 50 g Erdnussöl in einen 250 ml Rundkolben eingewogen und unter leichtem Rühren für 20 und 40 min im vorgeheizten Ölbad auf  $170\text{ °C}$  erhitzt. Die Temperaturkontrolle im Öl erfolgte hierbei mittels Thermometer. Die Ölproben wurden im Tiefkühlschrank bei  $-18\text{ °C}$  gelagert.

### **Kochen von Erdnüssen**

Die Kochexperimente wurden im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Diana Kaden (Kaden, 2015) durchgeführt. Zunächst wurde die Schale der nativen Erdnüsse durch Zusammenpressen an einem Ende geöffnet. Im Anschluss wurden 85 g der Erdnüsse mit Schale in einem 600 ml Becherglas mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 480 ml aufgefüllt. Die Kochzeit betrug analog Beyer et al. (2001) 20 min im siedenden Wasserbad. Im Anschluss verblieben die Erdnüsse für 30 min im Wasserbad, wurden dann von ihrer Schale und dem Samenhäutchen befreit und äußerlich abgetrocknet. Die Lagerung erfolgte im Tiefkühlschrank bei  $-18\text{ °C}$ .

## **3.3 Isolierung des Erdnussproteinextrakts**

Zur Extraktion der Erdnussproteine wurde ein Extraktionspuffer nach Chung & Champagne (1999) gewählt, da in Vorversuchen mit diesem Puffer die höchsten Proteinausbeuten erzielt werden konnten. Hierzu wurden 3 g der nativen, geschälten und zerkleinerten Erdnüsse mit 21 ml  $0,1\text{ M NaHCO}_3$ -Puffer (pH 10,4, Einstellung mit  $1\text{ M NaOH}$ ) versetzt und mittels Ultra-Turrax für 2 min bei 11200 U/min homogenisiert. Im Anschluss erfolgte die Proteinextraktion im Kühlraum für 1 h bei  $6\text{ °C}$  unter Rühren. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei  $8643 \times g$  und  $4\text{ °C}$  wurde der Überstand abgenommen und der Rückstand ein zweites Mal analog extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden für 48 h bei  $6\text{ °C}$  gegen entionisiertes Wasser dialysiert und im Anschluss gefriergetrocknet. Die Extraktionsausbeute betrug 12,7 g erhaltenes Erdnussreinproteinextrakt pro 100 g eingesetzte Erdnüsse, beziehungsweise 53,4 % bezogen auf den Erdnussproteingehalt. Der Proteingehalt des Extrakts betrug 81,0 %.

### 3.4 Isolierung des Erdnusshauptallergens Ara h 1

Die Methodenentwicklung erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Martin Globisch (Globisch, 2010). Hierzu wurde zunächst eine Vorreinigung durch fraktionierte Fällung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , in Anlehnung an Maleki et al. (2000b) durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte schließlich säulenchromatographisch mittels starkem Anionenaustauschermaterial.

Hierfür wurde das flüssige Erdnussproteinextrakt vor der Dialyse nach Kapitel 3.3 eingesetzt. Unter Beachtung der Sättigungskonzentration von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , die bei 4 °C 519,1 g/l beträgt, wurde durch Zugabe von festem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eine Konzentration von 70 % (m/v) im Erdnussproteinextrakt eingestellt. Die Proteinfällung erfolgte im Kühlraum für 1 h bei 6 °C unter Rühren. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 8643 x g und 4 °C wurde der Ara h 1-reiche Überstand abgenommen, für 24 h bei 6 °C gegen entionisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Die weitere Aufreinigung wurde mittels starkem Anionenaustauschermaterial unter Verwendung einer nach Burks et al. (1992a) modifizierten Fließmittelzusammensetzung realisiert. Hierzu wurden 30 mg des Präzipitats in 1,0 ml Fließmittel A gelöst, membranfiltriert (0,45 µm) und entsprechend nachfolgenden Parametern und dem Trennprogramm in Tab. 9 zur Trennung eingesetzt.

Anlage	Niederdrucksystem LP Chromatography System (Bio-Rad)
Säule	15 x 170 mm, Volumen: 30 cm <sup>3</sup> , Material: Macro-Prep <sup>®</sup> High Q Support
Säulentemperatur	Raumtemperatur (20 °C)
Injektionsvolumen	0,8 ml
Detektion	280 nm
Flussrate	Gradient
Fließmittel	A: 0,02 M Bis-Tris-Propan in 4 M Harnstoff, pH 7,2, eingestellt mit 6 M HCl B: 1,5 M NaCl

Nach drei durchgeführten Trennungen erfolgte eine Regeneration des Säulenmaterials durch Spülen mit 150 ml 2 M NaCl-Lösung, 150 ml 1 M HCl und 150 ml Fließmittel A, jeweils bei einer Flussrate von 2 ml/min.

Das Ara h 1 eluierte hierbei zwischen 51 und 70 min und wurde mittels Fraktionensammler gesammelt. Die vereinigten Fraktionen mehrerer Trennläufe wurden für 48 h bei 6 °C gegen entionisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die Extraktionsausbeute betrug 31,4 % bezogen auf das eingesetzte Erdnussproteinextrakt, beziehungsweise 16,8 % bezogen auf den Erdnussproteingehalt. Der Proteingehalt des isolierten Ara h 1 betrug 85,7 %. Die detaillierte

Charakterisierung des isolierten Ara h 1 ist in der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Martin Globisch beschrieben (Globisch, 2010).

Tab. 9 Trennprogramm zur Ara h 1-Isolierung mittels Anionenaustauscher

Stufe des Trennprogramms	Zeit [min]	FM B [min]	Fluss [ml/min]
1	0 – 2	0	2,0
2	2 – 22	0	2,0
3	22 – 100	10	1,5
4	100 – 200	50	1,5
5	200 – 210	100	2,0
6	210 – 230	100	2,0
7	230 – 240	0	2,0
8	240 – 260	0	2,0

### 3.5 Inkubationen von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Lipidperoxidationsprodukten

Zur Identifizierung von Reaktionsprodukten, die sich aus der Umsetzung der ε-Aminogruppe des Lysins mit Sekundärprodukten der Lipidperoxidation ergeben, erfolgten Inkubationen von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, als Modellsubstanz für proteingebundenes Lysin, mit ausgewählten Sekundärprodukten in 5 ml Methanol für 4 h bei 75 °C. In Tab. 10 sind die Inkubationsbedingungen sowie das weitere Vorgehen zur Identifizierung der entstandenen Reaktionsprodukte dargestellt. Die Inkubation mit Acrolein (jeweils 100 mM) fand nach Uchida et al. (1998) in 5 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) für 24 h bei 37 °C unter Rühren statt, da als Folge der Inkubation in Methanol das acetylierte FDP-Lysin nicht identifiziert werden konnte. Die Freisetzung von Malondialdehyd aus 1,1,3,3-Tetramethoxypropan erfolgte nach Kap. 3.10.13. Für die LC-ESI-MS/MS-Messungen wurden jeweils 1,0 ml direkt aus den Reaktionsansätzen entnommen, membranfiltriert (0,45 µm) und zur Messung entsprechend der Parameter nach Kap. 3.10.11 eingesetzt. Zur sauren Hydrolyse und zur Reduktion wurden ebenfalls jeweils 1,0 ml entnommen, in ein Hydrolyseröhrchen überführt und das Lösungsmittel mittels Stickstoffstrom evaporiert. Für die direkte salzsaure Hydrolyse nach Kap. 3.10.5 erfolgte die Zugabe von 1,5 ml 6 M HCl. Zur vorherigen Reduktion kam die Methodik nach Kap. 3.10.8 zur Anwendung. Die Reduktionslösung wurde im Anschluss vollständig an einer Wasserstrahlpumpe bei 40 °C eingengt und der Rückstand in 1,0 ml Methanol aufgenommen. Von den direkt hydrolysierten Proben wurden jeweils 1,0 ml Hydrolysat am Vakuumkonzentrator bei 37 °C zur Trockene eingengt und in 1,0 ml Methanol aufgenommen. Nach

Membranfiltration (0,45  $\mu\text{m}$ ) wurden die Proben zur LC-ESI-MS/MS-Messung nach Kap. 3.10.11 eingesetzt.

Tab. 10 Inkubationen von ausgewählten Sekundärprodukten mit N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin

Sekundärprodukt	Konzentration Sekundärprodukt [mM]	Konzentration N <sup>α</sup> -Acetyl-L-lysin [mM]	Behandlung vor der Messung
Hexanal	30	10	direkt eingesetzt, Hydrolyse, Reduktion
Hexanal + Nonanal	10	10	direkt eingesetzt
( <i>E</i> )-2-Heptenal	10	10	direkt eingesetzt, Hydrolyse
Acrolein	10	10	direkt eingesetzt, Hydrolyse, Reduktion
Malondialdehyd	10	10	direkt eingesetzt, Hydrolyse, Reduktion
( <i>E</i> )-4-Hydroxynonenal	10	10	direkt eingesetzt, Reduktion

### 3.6 Inkubationen des Erdnussproteinextrakts mit ausgewählten Lipidperoxidationsprodukten

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob und in welchem Ausmaß sich Lipierungsprodukte als Folge einer Inkubation von Erdnussproteinen mit Sekundärprodukten der Lipidperoxidation bilden, erfolgte die Inkubation extrahierter Erdnussproteine mit ausgewählten Sekundärprodukten. Im Anschluss erfolgte sowohl eine Quantifizierung von Lipierungsprodukten mittels LC-ESI-MS/MS als auch die Bestimmung der absoluten Lysinabnahmen mittels Aminosäureanalyse. Die Inkubationen mit MDA und Acrolein erfolgten im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Meike Deuber (Deuber, 2015) und mit 4-HNE im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Diana Kaden (Kaden, 2015).

Die Inkubationen wurden in Inkubationsreihen mit aufsteigenden Gehalten an Sekundärprodukten durchgeführt. Eingesetzt wurden Hexanal, (*E*)-2-Heptenal, Acrolein, MDA und 4-HNE. Für jeden Inkubationsansatz wurden 100 mg Erdnussproteine (Reinprotein), die nach Kap. 3.3 isoliert wurden, in 25 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst. Anschließend wurden die Proben in 25 ml Schottflaschen überführt und mit der benötigten Stoffmenge an

Sekundärprodukt versetzt. Die Menge an zugegebenem Sekundärprodukt richtete sich dabei nach der Summe der Stoffmengen der potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin. Deren jeweilige Gehalte im Erdnussproteinextrakt betragen  $3,83 \pm 0,79$ ,  $19,27 \pm 0,06$ ,  $32,58 \pm 1,39$  und  $70,58 \pm 3,22$  mmol/100 g Protein (Summe: 126,26 mmol/100 g Protein). Nach der Inkubation mit Hexanal wurden die Lipierungsprodukte LHP 1, LHP 2 und N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, im Falle der Inkubation mit (*E*)-2-Heptenal (*Z*)- und (*E*)-BPP, nach Inkubation mit Acrolein MP-Lysin und nach der Inkubation mit 4-HNE das Lipierungsprodukt 2-PPL quantifiziert. Nach der Inkubation mit Malondialdehyd wurde nur die Aminosäureabnahme verfolgt. Die Inkubationen wurden jeweils in folgenden molaren Stoffmengenverhältnissen durchgeführt (Sekundärprodukt : Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren): 0,1:1, 0,2:1, 0,5:1, 1:1, 5:1 und 10:1. Die Inkubation mit Acrolein erfolgte in den Stoffmengenverhältnissen: 0,1:1, 0,2:1, 0,5:1, 1:1 und 5:1. Im Falle des 4-HNE erfolgte keine Inkubation in einem 0,5:1-Stoffmengenverhältnis. Zusätzlich wurde jeweils ein Blindwert mitgeführt, der nur aus Erdnussproteinextrakt in Puffer, ohne Zugabe des Sekundärprodukts, bestand. Volumendifferenzen wurden durch Zugabe von Puffer ausgeglichen. Nach Zugabe eines Rührfisches, Überschichten mit Stickstoff und Abdichten der Deckel mit Parafilm wurden die Proben in ein Wasserbad gestellt und bei 37 °C für 24 h analog Ishino et al. (2010), Furuhashi et al. (2003) und Ichihashi et al. (2001) unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 24 h bei 6 °C dialysiert (14 kDa MWCO), gefriergetrocknet und die Proteingehalte mittels Kjeldahl nach Kap. 3.10.2.1 bestimmt.

Zur Quantifizierung der Aminosäureabnahmen wurden die Proben nach Kap. 3.10.7 enzymatisch hydrolysiert, um säurelabile Reaktionsprodukte zu berücksichtigen. Zusätzlich erfolgte eine salzsaure Hydrolyse nach Kap. 3.10.7 zur Quantifizierung des Histidingehalts, da dieser nach enzymatischer Hydrolyse auf Grund von Coelutionen nicht auswertbar war.

Zur Quantifizierung entstandener Lipierungsprodukte mittels LC-ESI-MS/MS wurde entsprechend Tab. 11 aufgearbeitet.

Die Quantifizierungen erfolgten im Falle des Vorhandenseins von stabilisotopenmarkierten internen Standards für die Analyten LHP 1, LHP 2 und N<sup>ε</sup>-Hexyllysin unter Verwendung derselben Stoffmengen an internem Standard in den Kalibrierpunkten, die auch den Proben zugesetzt wurden. Für die Lipierungsprodukte (*Z*)-BPP-Lysin, (*E*)-BPP-Lysin, MP-Lysin und 2-PPL, für die keine stabilisotopenmarkierten internen Standards zur Verfügung standen, erfolgten die Kalibrierungen als Matrixkalibrierungen. Hierzu wurde das entsprechend den Proben hydrolysierte Ausgangserdnussproteinextrakt als Matrix eingesetzt und mit der gleichen Stoffmenge des internen Standards N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin versetzt, die auch den jeweiligen Proben zugesetzt wurde.

Tab. 11 Aufarbeitung der mit ausgewählten Sekundärprodukten inkubierten Erdnussproteinextraktproben, IS - interner Standard

Produkt	Hydrolyse	Aufarbeitung zur Messung	Messmethode nach Kap.
N <sup>ε</sup> -Hexyl- lysin	3 mg Probe zur Reduktion und sauren Hydrolyse nach Kap. 3.10.8 eingesetzt	<i>Blindwert:</i> nach Hydrolyse vollständig an der Wasserstrahlpumpe eingeengt, zur SPE in 200 µl IS N <sup>ε</sup> -Hexyllysin-d <sub>12</sub> (298 ng/ml Wasser) + 3 ml Reinstwasser gelöst; <i>restliche Proben:</i> 1,5 ml der Hydrolysate eingeengt, zur SPE in 200 µl IS und 1 ml Reinstwasser gelöst; SPE analog Kap. 3.10.16	3.10.16
LHP 1 LHP 2	12 mg Probe + 4 ml 6 M HCl	1,0 ml Hydrolysat eingeengt, <i>Blindwert:</i> gelöst in 150 µl Reinstwasser, 50 µl Methanol und 50 µl IS LHP-d <sub>29</sub> (250 nM in Reinstwasser); <i>restliche Proben:</i> gelöst in 100 µl Methanol, 400 µl Reinstwasser, davon 50 µl + 50 µl IS LHP-d <sub>29</sub> , 50 µl Methanol und 100 µl Wasser	3.10.17
(Z)-BPP (E)-BPP	12 mg Probe + 4 ml 6 M HCl	1,0 ml Hydrolysat eingeengt, gelöst in 250 µl Reinstwasser, 200 µl Methanol und 50 µl des IS N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin (30,6 nM in Methanol:Reinstwasser, (50:50, v/v))	3.10.18
MP-Lysin	2 mg Probe + 4 ml 6 M HCl	<i>Blindwert:</i> 1,5 ml Hydrolysat eingeengt; <i>restliche Proben:</i> 0,5 ml Hydrolysat eingeengt; Proben jeweils gelöst in 130 µl Fließmittel A (10 mM NFPA in Wasser), 150 µl Fließmittel B (10 mM NFPA in Acetonitril) und 20 µl IS N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin (153 nM in Methanol:Reinstwasser, (50:50, v/v))	3.10.19
2-PPL	3 mg Probe zur enzymatischen Hydrolyse nach Kap. 3.10.5 eingesetzt	<i>Blindwert:</i> gelöst in 360 µl Reinstwasser, 100 µl Methanol und 54 µl IS N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin (38,3 nM in Methanol:Reinstwasser, (50:50, v/v)); <i>restliche Proben:</i> gelöst in 400 µl Wasser und 100 µl Methanol, dann 500-fach mit Methanol:Wasser (80:20, v/v) inklusive 40 µl IS verdünnt	3.10.20

### 3.7 Inkubation von Ara h 1 mit 4-Hydroxynonenal

Die Inkubationen erfolgten im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Diana Kaden (Kaden, 2015). Zur Inkubation von Ara h 1 mit 4-HNE wurden 30 mg Reinprotein des nach Kap. 3.4 isolierten Ara h 1 in 25 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und in 25 ml Schottflaschen überführt. Das nach Kap. 3.9.1 freigesetzte 4-HNE wurde in Form einer Konzentrationsreihe zugesetzt. Hierbei richtete sich die zugegebene Stoffmenge an 4-HNE nach den potentiell reaktiven Aminosäuren des Ara h 1 Cystein, Histidin, Lysin und Arginin, deren Gehalte  $6,32 \pm 0,56$ ,  $20,68 \pm 0,35$ ,  $39,94 \pm 0,26$  und  $74,84 \pm 0,07$  mmol/100 g Protein (Summe: 141,78 mmol/100 g Protein) betragen. Die Inkubationen wurden in folgenden molaren Stoffmengenverhältnissen durchgeführt (Sekundärprodukt:Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren): 0,1:1, 0,2:1, 1:1 und 5:1. Zusätzlich wurde ein Blindwert mitgeführt, der nur aus Ara h 1 in Puffer ohne Zugabe von 4-HNE bestand. Nach Zugabe eines Rührfisches, Überschichten mit Stickstoff und Abdichten der Deckel mit Parafilm erfolgte die Inkubation für 24 h bei 37 °C unter Rühren im Wasserbad. Im Anschluss wurden die Proben für 24 h gegen entionisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Die Quantifizierung des gebildeten 2-PPL erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse analog der in Kap. 3.6 angegebenen Aufarbeitung für die Inkubation des Erdnussproteinextrakts.

### 3.8 Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Linolsäuremethylester unter oxidativen Bedingungen

Zur Identifizierung von Lipierungsprodukten zwischen N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Sekundärprodukten an den Fettsäureresten, die im Zuge der Lipidperoxidation entstehen, wurden Inkubationsbedingungen in Anlehnung an Refsgaard et al. (2000) gewählt. Hierzu wurden 50 mM N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, 250 mM Linolsäuremethylester, 125 mM Ascorbinsäure und 0,5 mM FeCl<sub>3</sub> in 1,0 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) für 2,5 h im Wasserbad bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurden 0,5 ml des Inkubationsansatzes abgenommen und nach Membranfiltration (0,45 µm) direkt zur LC-ESI-MS/MS-Messung nach Kap. 3.10.11 eingesetzt. Die verbleibenden 0,5 ml wurden zur Stabilisierung gebildeter Schiff'scher Basen reduziert. Hierzu wurden 0,05 ml Boraxpuffer und 0,15 ml 0,2 M NaBH<sub>4</sub>-Lösung (siehe Kap. 3.10.8) zugesetzt und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz membranfiltriert (0,45 µm) und entsprechend Kap. 3.10.11 zur Messung eingesetzt. Flüchtige Produkte wurden mittels GC-MS (EI) über die NIST-Datenbank (NIST), sowie über die Zuordnung von Fragmentationen identifiziert. Hierzu wurde der im Kolben verbliebene

Fettsäurerest mit 1,0 ml Reinstwasser extrahiert und nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g und Raumtemperatur die wässrige Phase abgenommen. Nach Extraktion der wässrigen Phase mit 0,2 ml Hexan und Zentrifugation für 5 min bei 10000 x g und Raumtemperatur wurde die Hexanphase über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, membranfiltriert (0,45 µm) und mittels Scan-Modus entsprechend den in Kap. 3.10.12 angegebenen Parametern vermessen.

## 3.9 Darstellungen von Analysenstandards

### 3.9.1 Darstellung von (*E*)-1,1-Dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA)

Die Darstellung des 4-HNE-DMA erfolgte nach der Methode von Soulère et al. (2007) über eine Kreuzmetathese. Hierzu wurden 25 ml Dichlormethan, welches zuvor für 15 min durch Einleiten von Stickstoff mit Hilfe einer Gaswaschflasche sauerstofffrei gespült wurde, in einen 50 ml Dreihalskolben vorgelegt. Nach Zugabe von 496 µl 1-Octen-3-ol, 1164 µl Acroleindimethylacetal und 25,9 mg Hoveyda-Grubbs-Katalysator der zweiten Generation wurde für 5 h unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Hiernach erfolgte die Zugabe weiterer 25,9 mg Katalysator und erneutes Rühren für 20 h unter Stickstoffatmosphäre. Nach Evaporieren des Dichlormethans mittels Stickstoffstrom bei Raumtemperatur erfolgte die Aufreinigung des 4-HNE-DMA durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60. Als Eluent wurde Diethylether/Pentan (50:50, v/v) verwendet, dem 0,1 % Triethylamin zugesetzt wurde. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 2 ml/min in Fraktionssammelröhrchen zu jeweils 10 ml. Die Detektion der 4-HNE-DMA enthaltenden Fraktionen erfolgte nach dünnschichtchromatographischer Trennung an Kieselgel 60 durch Besprühen mit einer 5 %igen Molybdatophosphorsäurelösung (5 % Molybdatophosphorsäure in Ethanol und 10 % Schwefelsäure) und Erhitzen im Trockenschrank für 5 min bei 105 °C. Die Identifizierung des 4-HNE-DMA erfolgte durch Vergleich der R<sub>f</sub>-Werte mit kommerziellem 4-HNE-DMA. Der R<sub>f</sub>-Wert des 4-HNE-DMA betrug hierbei 0,53. Relevante Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel bei 40 °C abrotiert und das erhaltene 4-HNE-DMA gefriergetrocknet.

Zur Freisetzung des 4-HNE wurden 5 mg 4-HNE-DMA in einem 10 ml Rundkolben mit 0,5 ml 0,1 M HCl für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration erfolgte photometrisch über das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 13750 \text{ l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$  in wässriger Lösung nach Esterbauer et al. (1991). Für die 4-HNE-Quantifizierung mittels GC-MS wurde nach der Freisetzung drei Mal mit Hexan extrahiert (500 µl + 300 µl + 300 µl). Die tatsächliche Konzentration des 4-HNE in

Hexan wurde photometrisch über das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 14400 \text{ l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$  in Hexan nach Esterbauer et al. (1991) bestimmt.

#### Analytische Daten

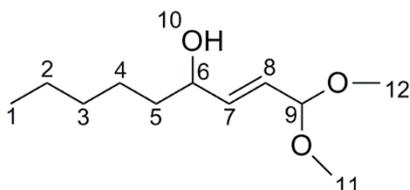


Abb. 18 Struktur von (*E*)-1,1-Dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA)

**(*E*)-1,1-Dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA):**  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,86 (t, 3H,  $J = 7,9$  Hz, H-9), 1,23-1,33 (m, 6H, H-6, H-7, H-8), 1,50 (m, 2H, H-5), 3,30 (s, 6H, H-11, H-12), 3,45 (s, 1H, H-10), 4,13 (q, 1H,  $J = 6,3$  Hz, H-4), 4,77 (d, 1H,  $J = 4,7$  Hz, H-1), 5,63 (ddd, 1H,  $J = 1,3$  Hz,  $J = 4,7$  Hz,  $J = 15,8$  Hz, H-2), 5,86 (ddd, 1H,  $J = 1,3$  Hz,  $J = 6,0$  Hz,  $J = 15,8$  Hz, H-3). Elementaranalyse:  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_3$  ( $M = 202,29$  g/mol) erfordert C = 65,31 %, H = 10,96 %; gefunden: C = 65,44 %, H = 10,55 %. Reinheit: DC: > 99 % (ein Spot), photometrisch nach Freisetzung: 97 %. Ausbeute = 346 mg (molare Ausbeute = 53,7 %).

### 3.9.2 Darstellung von (*E*)-5,5-Dideuterio-1,1-dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA- $\text{d}_2$ )

Die Synthesen der Precursoren 4,4-Dimethoxy-but-2-enal und 1,1-Dideuterio-1-pentylmagnesiumbromid erfolgten in Anlehnung an Chandra & Srivastava (1997). Für die Synthese des 4,4-Dimethoxybut-2-enals wurden zunächst 45,9 ml Aceton in einen 100 ml Dreihalskolben vorgelegt. Nach Zugabe von 0,4605 g Amberlyst-15-Katalysator, 0,339 ml Wasser und 2,084 ml (*E*)-1,1,4,4-Tetramethoxybut-2-en wurde für 6 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration durch wasserfreies Natriumcarbonat wurde das Lösungsmittel bei 40 °C abrotiert, wodurch das (*E*)-4,4-Dimethoxy-but-2-enal erhalten wurde.

#### Analytische Daten

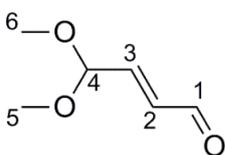


Abb. 19 Struktur von (*E*)-4,4-Dimethoxy-but-2-enal

**(E)-4,4-Dimethoxy-but-2-enal:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,38 (s, 6H, H-5, H-6), 5,07 (dd, 1H,  $J = 1,2$  Hz,  $J = 3,9$  Hz, H-4), 6,38 (ddd, 1H,  $J = 1,2$  Hz,  $J = 7,8$  Hz,  $J = 15,9$  Hz, H-3), 6,64 (dd, 1H,  $J = 3,9$  Hz,  $J = 15,9$  Hz, H-2), 9,64 (d, 1H,  $J = 7,8$  Hz, H-1). Reinheit: 93.1% (GC-MS). Ausbeute = 1,2105 g (molare Ausbeute = 76,3 %).

Für die Synthese des 1,1-Dideuterio-1-pentylmagnesiumbromids wurden zunächst 0,8 ml Diethylether und 0,103 g Magnesiumspäne in einen 25 ml Dreihalskolben vorgelegt. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  1,1-Dideuterio-1-brompentan wurde die Reaktionsmischung unter Rühren auf 45 °C unter Rückfluss erhitzt. Die zunächst aufgetretene Weißfärbung zeigte das Einsetzen der Bildung des deuterierten Grignardreagenzes 1,1-Dideuterio-1-pentylmagnesiumbromid an. Nach Zugabe von 5,52 ml Diethylether und 350  $\mu\text{l}$  1,1-Dideuterio-1-brompentan in 1,11 ml Diethylether wurde die Reaktionsmischung für 30 min unter leichtem Sieden am Rückfluss erhitzt, wobei eine Dunkelfärbung auftrat. Nach Abkühlen auf 0 °C im Eisbad (NaCl-Zusatz) erfolgte der Zusatz von 280  $\mu\text{l}$  (E)-4,4-Dimethoxy-but-2-enal in 1,84 ml Diethylether. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt, im Anschluss durch Zugabe von 2,76 ml einer gesättigten Ammoniumchloridlösung abgestoppt und vier Mal mit jeweils 15 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigte Etherphase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei 40 °C abrotiert. Die Aufreinigung des 4-HNE-DMA- $\text{d}_2$  erfolgte analog des nicht markierten 4-HNE-DMA (siehe Kap. 3.9.1).

Zur Freisetzung des 4-HNE- $\text{d}_2$  wurden 3 mg 4-HNE-DMA- $\text{d}_2$  in einem 10 ml Rundkolben mit 0,3 ml 0,1 M HCl für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dreimaliger Extraktion mit Hexan (500  $\mu\text{l}$  + 300  $\mu\text{l}$  + 300  $\mu\text{l}$ ) erfolgte die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration photometrisch über das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 14400 \text{ l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$  in Hexan nach Esterbauer et al. (1991).

#### Analytische Daten

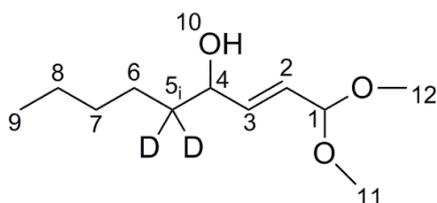


Abb. 20 Struktur von (E)-5,5-Dideuterio-1,1-dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA- $\text{d}_2$ )

**(E)-5,5-Dideuterio-1,1-dimethoxynon-2-en-4-ol (4-HNE-DMA- $\text{d}_2$ ):**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,87 (t, 3H,  $J = 6,4$  Hz, H-9), 1,29 (m, 6 H, H-6, H-7, H-8), 3,31 (s, 6H, H-11, H-12), 3,46 (s, 1H, H-10), 4,13 (d, 1H,  $J = 6,3$  Hz, H-4), 4,78 (d, 1H,  $J = 4,8$  Hz, H-1), 5,64 (ddd, 1H,  $J = 0,9$  Hz,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 15,7$  Hz, H-2), 5,87 (ddd, 1H,  $J = 0,9$  Hz,  $J = 6,0$  Hz,  $J = 15,7$  Hz, H-3). Reinheit DC: > 99% (ein Spot). Ausbeute = 154 mg (molare Ausbeute = 44,6%).

### 3.9.3 Darstellung von 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin)

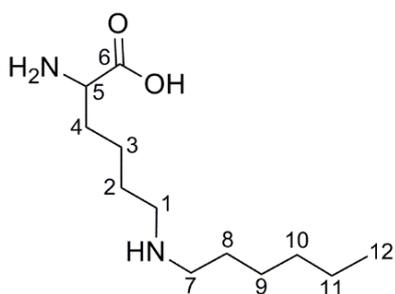
Die Darstellung erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Jana Kreßler (Kreßler, 2014). Hierzu wurden in einen 500 ml Rundkolben 500 mg N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, 111 µl Hexanal und 50 mg Palladium-Kohlenstoff-Katalysator in 200 ml Methanol vorgelegt. Nach Evakuieren des Kolbens mittels Vakuumpumpe, bis ein leichtes Sieden des Methanols zu beobachten war, wurde ein zuvor evakuierter und mit Wasserstoff gefüllter Ballon aufgesetzt und das Reaktionsgemisch für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Hydrierung wurde das Reaktionsgemisch durch einen Membranfilter (0,45 µm) filtriert und das Lösungsmittel im Anschluss bei 40 °C abrotiert. Zur Entschützung der α-Aminogruppe wurden 200 ml 6 M HCl zugegeben und das Reaktionsgemisch für 23 h bei 110 °C am Rückfluss erhitzt. Die Salzsäure wurde nachfolgend an einer Wasserstrahlpumpe bei 40 °C entfernt und das Produkt über Ionenaustauschchromatographie an einem starken Kationenaustauscher entsprechend nachfolgenden Parametern aufgereinigt.

Tab. 12 Arbeitsschritte zur Aufreinigung der 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure mittels Kationenaustauschchromatographie

Arbeitsschritt	Aufgabe auf Kationenaustauscher
Konditionierung	250 ml 1 M HCl 250 ml 6 M HCl 250 ml Wasser
Aktivierung	250 ml 0,1 M HCl
Probenaufgabe	Reaktionsansatz in 20 ml 0,1 M HCl gelöst, wovon jeweils 10 ml auf die Säule aufgegeben wurden
Elution	jeweils 250 ml 0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 4 M und 6 M HCl, Fluss: 2 ml/min

Mittels LC-ESI-MS/MS-Messungen (Kap. 3.10.11) im Scan-Modus zeigte sich, dass das Produkt in der Fraktion mit 6 M HCl eluierte. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte mittels Fraktionensammler zu jeweils 7 ml, welche schließlich vereinigt wurden. Die Salzsäure wurde mittels Wasserstrahlpumpe bei 40 °C entfernt, das Produkt in Methanol gelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mittels Stickstoffstrom evaporiert und gefriergetrocknet.

## Analytische Daten

Abb. 21 Struktur von 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin)

**2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  231,2 ( $M+H^+$ ). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>):  $\delta$  1,00 (t, 3 H,  $J = 6,9$  Hz, H-12), 1,43 (m, 4 H, H-10, H-11), 1,48 (m, 2 H, H-9), 1,66 (m, 2 H, H-3A,B), 1,78 (m, 2 H, H-8), 1,86 (m, 2 H, H-2), 2,07 (m, 2 H, H-4A,B), 3,07 (m, 2 H, H-7), 3,10 (m, 2 H, H-1), 4,08 (t, 1 H,  $J = 6,3$  Hz, H-5). Elementaranalyse: C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $M = 230,35$  g/mol) erfordert C = 62,57 %, H = 11,38 %, N = 12,16 %; gefunden: C = 44,72 %, H = 9,55 %, N = 9,55 %. Chromatographische Reinheit (HPLC-DAD-ESI-MS/MS nach PITC-Derivatisierung nach Schneider (2002)): 82 %. Reinheit: 64,4 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 93,6 mg (molare Ausbeute = 23,7 %).

Analog wurde ein stabilisotopenmarkierter Standard N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> dargestellt. Hierfür wurden in einen 500 ml Rundkolben 310 mg N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, 75  $\mu$ l Hexanal-d<sub>12</sub> und 60 mg Palladium-Kohlenstoff-Katalysator in 200 ml Methanol vorgelegt und analog des nicht markierten Standards verfahren. Der Anschluss einer Aufreinigung erfolgte nicht, nachdem sich anhand einer Charakterisierung mittels LC-ESI-DAD-MS/MS (Kap. 3.10.11) zeigte, dass nur geringfügig Nebenprodukte enthalten waren. Des Weiteren erfolgte keine weitere Charakterisierung mittels NMR Spektroskopie.

**2-Amino-6-(1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,6-dodecadeuteriohexylamino)hexansäure (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub>):** ESI-MS (positiv mode):  $m/z$  243,4 ( $M+H^+$ ). Elementaranalyse: C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>D<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $M = 242,44$  g/mol) erfordert C = 59,45 %, H = 5,82 %, N = 11,55 %; gefunden: C = 35,68 %, H = 6,75 %, N = 10,17 %. Chromatographische Reinheit (LC-DAD-ESI-MS/MS nach PITC-Derivatisierung nach Schneider (2002)): 48,7 %. Reinheit: 42,9 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 300 mg (molare Ausbeute = 96,8 %).

### 3.9.4 Darstellung von 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure und 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 1 und LHP 2)

In einem 500 ml Rundkolben wurden 376,5 mg N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und 753,3 μl Hexanal in 200 ml Methanol 4 h bei 75 °C unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und 150 ml 6 M HCl zugegeben. Die Entschützung der α-Aminogruppe erfolgte für 23 h bei 110 °C unter Rückfluss. Die Salzsäure wurde nachfolgend mittels einer Wasserstrahlpumpe bei 40 °C entfernt, der Rückstand in 15 ml Methanol gelöst und zur besseren Handhabbarkeit in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel mittels Stickstoffstrom evaporiert und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC mit nachfolgenden Parametern. Hierzu wurden 20 mg des Reaktionsgemisches in 1 ml Methanol gelöst und nach Membranfiltration (0,45 μm) zur Trennung eingesetzt.

Anlage	HPLC-UV, semipräparativ, Knauer, Berlin
Säule	Eurospher 100-10 C18 (250 x 16 mm), mit Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur	Raumtemperatur (23 °C)
Injektionsvolumen	1 ml
Detektion	227 nm
Flussrate	3 ml/min
Fließmittel	A: 13 mM Heptafluorbuttersäure in Wasser B: 13 mM Heptafluorbuttersäure in Acetonitril

#### Trennprogramm

Tab. 13 Trennprogramm LHP 1 und LHP 2 mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	40
5	40
15	60
30	95
40	95
43	40
53	40

Die Elutionen des LHP 1 und LHP 2 erfolgten hierbei jeweils zwischen 24,7 und 26,7 min und 26,7 und 29,2 min. Die Fraktionen mehrerer Läufe wurden vereinigt, das Lösungsmittel bei 40 °C abrotiert und die Produkte gefriergetrocknet.

## Analytische Daten

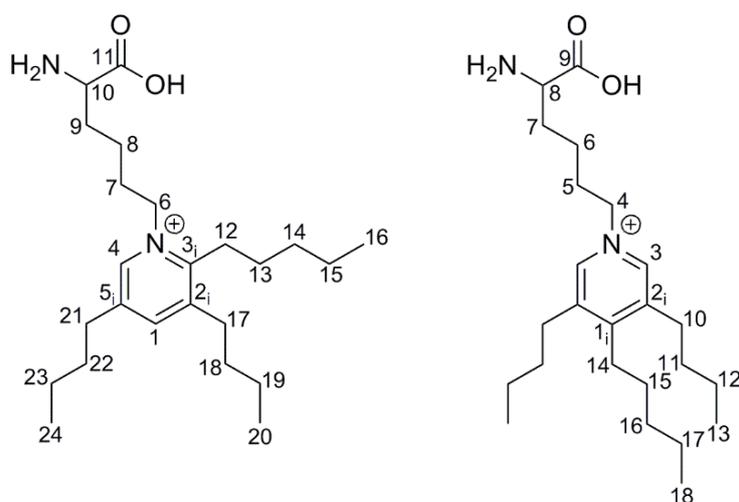


Abb. 22 Strukturen von (links) 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 1) und (rechts) 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 2)

**2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 1):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  391,5 ( $M^+$ ).  $^1H$  NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  1,05 (dt, 6 H,  $J = 2,3$  Hz,  $J = 7,2$  Hz, H-20, H-24), 1,08 (t, 3 H,  $J = 7,2$  Hz, H-16), 1,52 (m, 6 H, H-15, H-19, H-23), 1,62 (m, 2 H, H-14), 1,75 (m, 8 H, H-8A,B, H-13, H-18, H-22), 2,09 (m, 4 H, H-7, H-9A,B), 2,86 (t, 2 H,  $J = 7,9$  Hz, H-21), 2,91 (t, 2 H,  $J = 7,9$  Hz, H-17), 3,14 (t, 2 H,  $J = 7,5$  Hz, H-12), 4,08 (t, 1 H,  $J = 6,4$  Hz, H-10), 4,63 (t, 2 H,  $J = 7,9$  Hz, H-6), 8,32 (s, 1 H, H-1), 8,71 (s, 1 H, H-4). Elementaranalyse:  $C_{24}H_{43}N_2O_2$  ( $M = 391,61$  g/mol) erfordert C = 73,61 %, H = 11,07 %, N = 7,15 %; gefunden: C = 39,68 %, H = 4,40 %, N = 2,80 %. Chromatographische Reinheit (LC-DAD-ESI/MS/MS): 98,0 %. Anteil des Kations 38,4 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 47,8 mg (molare Ausbeute = 55,3 %).

**2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (LHP 2):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  391,5 ( $M^+$ ).  $^1H$  NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  1,03 (t, 3 H,  $J = 7,5$  Hz, H-18), 1,08 (t, 6 H,  $J = 7,5$  Hz, H-13), 1,50 (m, 4 H, H-17), 1,57 (m, 6 H, H-12), 1,59-1,76 (m, 14 H, H-6A,B, H-11, H-15, H-16), 1,99-2,13 (m, 6 H, H-5, H-7), 2,91 (t, 4 H,  $J = 7,5$  Hz, H-10), 2,97 (t, 2 H,  $J = 7,2$  Hz, H-14), 4,06 (t, 1 H,  $J = 6,4$  Hz, H-8), 4,59 (t, 2 H,  $J = 7,5$  Hz, H-4), 8,68 (s, 2 H, H-3). Elementaranalyse:  $C_{24}H_{43}N_2O_2$  ( $M = 391,61$  g/mol) erfordert C = 73,61 %, H = 11,07 %, N = 7,15 %; gefunden: C = 39,91 %, H = 4,25 %, N = 2,81 %. Chromatographische Reinheit (LC-DAD-ESI/MS/MS): 92,8 %. Anteil des Kations 36,5 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 32,8 mg (molare Ausbeute = 38,0 %).

### 3.9.5 Darstellung von 2-Amino-6-[2,4-dideuterio-3,5-bis(1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonadeuteriobutyl)-6-(2,2,3,3,4,4,5,5,5-nonadeuteriopentyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure (LHP 1-d<sub>29</sub>)

In einem 100 ml Rundkolben wurden 46,6 mg N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und 100 µl Hexanal-d<sub>12</sub> in 25 ml Methanol 4 h bei 75 °C unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und 20 ml 6 M HCl zugegeben. Die Entschützung erfolgte für 23 h bei 110 °C unter Rückfluss. Die HCl wurde nachfolgend mittels einer Wasserstrahlpumpe bei 40 °C entfernt, der Rückstand in 5 ml Methanol gelöst und zur besseren Handhabbarkeit in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel mittels Stickstoffstrom evaporiert und die Reaktionsmischung gefriergetrocknet. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC mit den in Kapitel 3.9.4 genannten Parametern. Aufgereinigt und nachfolgend charakterisiert wurde hierbei das zuerst eluierende Produkt LHP 1-d<sub>29</sub>. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion gesammelt, die sowohl das LHP 1-d<sub>29</sub> als auch das LHP 2-d<sub>29</sub> enthielt und nachfolgend als LHP-d<sub>29</sub> bezeichnet wird. Letztere wurde nicht mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert und diente als interner Standard zur Quantifizierung von LHP 1 und LHP 2 in den Erdnuss- und Inkubationsproben, da bereits beide Verbindungen enthalten waren. Die für die Quantifizierungen eingesetzte Konzentration an LHP-d<sub>29</sub> bezog sich somit auf die Feststoffeinwaage ohne Berücksichtigung der tatsächlichen Reinheit.

#### Analytische Daten

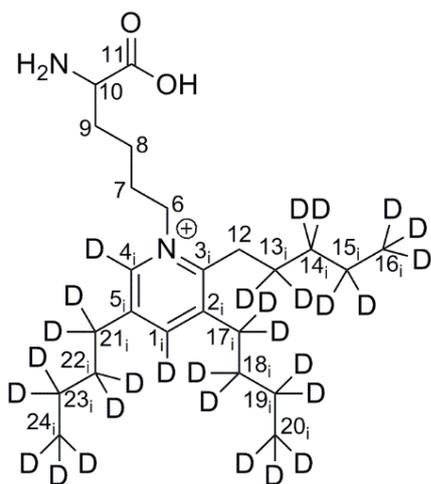


Abb. 23 Struktur von 2-Amino-6-[2,4-dideuterio-3,5-bis(1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonadeuteriobutyl)-6-(2,2,3,3,4,4,5,5,5-nonadeuteriopentyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure LHP 1-d<sub>29</sub>

**2-Amino-6-[2,4-dideuterio-3,5-bis(1,1,2,2,3,3,4,4,4-nonadeuteriobutyl)-6-(2,2,3,3,4,4,5,5,5-nonadeuteriopentyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure (LHP 1-d<sub>29</sub>):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  420,6 ( $M^+$ ). <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>):  $\delta$  1,72 (m, 2 H, H-8), 2,08 (m, 6 H, H-7, H-9), 3,10 (s, 2 H, H-12), 4,06 (t, 2 H,  $J = 6,3$  Hz, H-10), 4,62 (t, 2 H,  $J = 8,2$  Hz, H-6). Elementaranalyse: C<sub>24</sub>H<sub>14</sub>D<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M = 420,84 g/mol) erfordert C = 68,50 %, H = 3,35 %, N = 6,66 %; gefunden: C = 38,88 %, H = 3,75 %, N = 2,88 %. Chromatographische Reinheit (LC-DAD-ESI/MS/MS): > 99 %. Anteil des Kations 43,2 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 77,9 mg (molare Ausbeute = 80,9 %).

### 3.9.6 Darstellung von (*Z*)- und (*E*)-2-Amino-6-[4-butyl-3-(pent-1-enyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((*Z*)- und (*E*)-BPP)

In einem 500 ml Rundkolben wurden 376,5 mg N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und 827,0  $\mu$ l (*E*)-2-Heptenal in 200 ml Methanol für 4 h bei 75 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels bei 40 °C erfolgte zur Entschützung der Zusatz von 150 ml 6 M HCl und die Reaktionsmischung wurde für 23 h auf 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde die HCl an einer Wasserstrahlpumpe bei 40 °C entfernt. Die Aufreinigung des (*Z*)- und (*E*)-BPP erfolgte mittels semipräparativer HPLC. Hierzu wurden 2 mg des Reaktionsgemisches in 1 ml Methanol gelöst und nach Membranfiltration (0,45  $\mu$ m) zur Trennung eingesetzt.

Anlage	HPLC-UV, semipräparativ, Knauer, Berlin
Säule	Eurospher 100-10 C18 (250 x 16 mm), mit Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur	Raumtemperatur (23 °C)
Injektionsvolumen	1 ml
Detektion	227 nm
Flussrate	Gradient
Fließmittel	A: 13 mM Heptafluorbuttersäure in Wasser B: 13 mM Heptafluorbuttersäure in Acetonitril

Trennprogramm

Tab. 14 Trennprogramm (*Z*)- und (*E*)-BPP mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0	25	3
5	25	3
25	50	3
34	50	3

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
35	50	0,7
55	50	0,7
56	50	3
58	95	3
63	95	3
65	25	3
80	25	3

Die Elutionen des (*Z*)-BPP und (*E*)-BPP erfolgten jeweils zwischen 37 und 41 min und 41 und 51 min. Die Fraktionen mehrerer Läufe wurden vereinigt und das Lösungsmittel bei 40 °C abrotiert. Zur Erhöhung der Reinheit wurden die erhaltenen Produkte ein zweites Mal analog aufgereinigt und im Anschluss gefriergetrocknet.

#### Analytische Daten

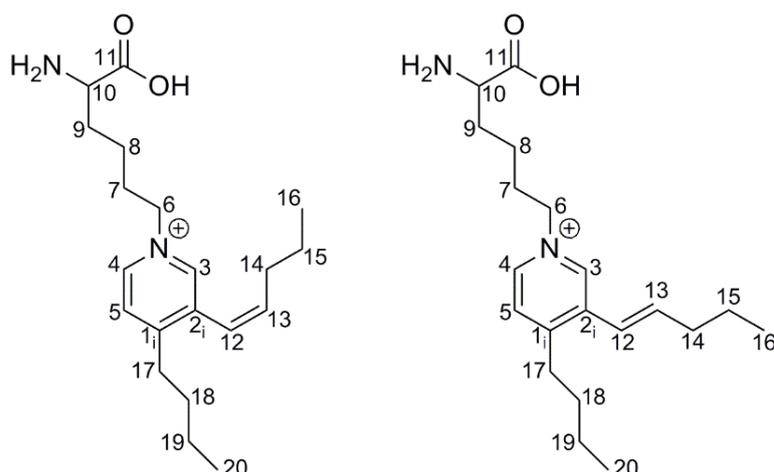


Abb. 24 Strukturen von (links) 2-Amino-6-[4-butyl-3-[(*Z*)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((*Z*)-BPP) und (rechts) 2-Amino-6-[4-butyl-3-[(*E*)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((*E*)-BPP)

**2-Amino-6-[4-butyl-3-[(*Z*)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((*Z*)-BPP):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  333,3 ( $M^+$ ).  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-d}_4$ ):  $\delta$  0,98 (t, 3H,  $J = 7,5$  Hz, H-16), 1,04 (t, 3H,  $J = 7,5$  Hz, H-20), 1,51 (m, 2H, H-19), 1,57 (m, 2H, H-15), 1,72 (m, 2H, H-18), 1,60-1,69 (m, 2H, H-8A,B), 2,03-2,10 (m, 2H, H-9A,B), 2,13 (m, 2H, H-7), 2,19 (q, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H-14), 2,96 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz, H-17), 4,05 (t, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-10), 4,67 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H-6), 6,24 (dt, 1H,  $J = 7,5$  Hz,  $J = 11,3$  Hz, H-13), 6,60 (d, 1H,  $J = 11,3$  Hz, H-12), 8,02 (d, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-5), 8,75 (s, 1H, H-3), 8,81 (d, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-4). Elementaranalyse:  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $M = 333,25$  g/mol) erfordert C = 52,74 %, H = 6,09 %, N = 5,13 %; gefunden: C = 39,77 %, H = 3,92 %, N = 3,60 %. Chromatographische Reinheit (HPLC-DAD): > 99 %.

Anteil des Kations 42,9 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 16,7 mg (molare Ausbeute = 11,2 %).

**2-Amino-6-[4-butyl-3-[(*E*)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((*E*)-BPP):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  333,3( $M^+$ ).  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  1,06 (t, 3H,  $J = 7,5$  Hz, H-20), 1,08 (t, 3H,  $J = 7,5$  Hz, H-16), 1,53 (m, 2H, H-19), 1,60-1,71 (m, 2H, H-8A,B), 1,66 (m, 2H, H-15), 1,72 (m, 2H, H-18), 2,04-2,09 (m, 2H, H-9A,B), 2,15 (m, 2H, H-7), 2,41 (q, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H-14), 3,02 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz, H-17), 4,07 (t, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-10), 4,65 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H-6), 6,62 (dt, 1H,  $J = 6,8$  Hz,  $J = 15,8$  Hz, H-13), 6,76 (d, 1H,  $J = 15,8$  Hz, H-12), 7,93 (d, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-5), 8,71 (d, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-4), 9,04 (s, 1H, H-3). Elementaranalyse:  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $M = 333,25$  g/mol) erfordert C = 52,74 %, H = 6,09 %, N = 5,13 %; gefunden: C = 39,24 %, H = 2,86 %, N = 3,06 %. Chromatographische Reinheit (HPLC-DAD): 98,1 %. Anteil des Kations 35,7 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 11,9 mg (molare Ausbeute = 6,9 %).

#### 3.9.7 Darstellung von 2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)-hexansäure (MP-Lysin)

Die Darstellung des MP-Lysins erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Meike Deuber (Deuber, 2015). In einen 500 ml Rundkolben wurden 470 mg  $\text{N}^\alpha$ -Acetyl-L-lysin, 368  $\mu\text{l}$  Acrolein und 250 ml Methanol vorgelegt und für 4 h bei 75 °C unter Rückfluss gekocht. Nach Entfernen des Methanols mittels Vakuumrotationsverdampfer wurden zur Entschützung 250 ml 6 M HCl zugegeben und das Reaktionsgemisch für 23 h bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen der HCl mittels Wasserstrahlpumpe bei 40 °C wurde der Reaktionsansatz gefriergetrocknet. Die Aufreinigung erfolgte zweistufig mittels semi-präparativer HPLC mit nachfolgenden Parametern. Zur ersten Aufreinigung wurden 20 mg des Reaktionsgemisches in 1,0 ml Methanol gelöst und nach Membranfiltration (0,45  $\mu\text{m}$ ) zur Trennung eingesetzt. Die vereinigten Fraktionen wurden mittels Vakuumrotationsverdampfer eingengt und in 3,0 ml Methanol aufgenommen. Jeweils 300  $\mu\text{l}$  wurden mit 800  $\mu\text{l}$  Methanol verdünnt, membranfiltriert (0,45  $\mu\text{m}$ ) und zur zweiten Reinigung eingesetzt.

Anlage	HPLC-UV, semipräparativ, Knauer, Berlin
Säule	Eurospher 100-10 C18 (250 x 16 mm), mit Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur	Raumtemperatur (23 °C)
Injektionsvolumen	1 ml
Detektion	267 nm

Flussrate 1. Reinigung: 2,5 ml/min, 2. Reinigung: 8,0 ml/min  
 Fließmittel A: 11 mM Essigsäure und 2 mM Nonfluorpentansäure in Wasser  
 B: 11 mM Essigsäure und 2 mM Nonfluorpentansäure in Methanol

## Trennprogramm

Tab. 15 Trennprogramm der ersten (links) und zweiten Reinigung (rechts) des MP-Lysins mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	40	0	5
5	40	55	77
45	74	62	77
46	95	63	5
59	95	70	5
60	40		
70	40		

Die Elution des MP-Lysins erfolgte bei der ersten Reinigung zwischen 20,0 und 35,0 min und bei der zweiten Reinigung zwischen 34,0 und 36,0 min. Das Lösungsmittel wurde mittels Vakuumrotationsverdampfer entfernt, das Produkt in 1,0 ml Methanol gelöst, in ein 2,0 ml-Probengefäß überführt, mittels Stickstoffstrom evaporiert und gefriergetrocknet.

## Analytische Daten

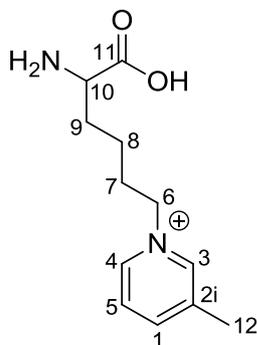


Abb. 25 Struktur von 2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (MP-Lysin)

**2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (MP-Lysin):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  223,1 ( $M^+$ ).  $^1\text{H}$  NMR (400,1 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  1,54 (m, 4 H, H-8A,B), 1,95 (m, 4 H, H-9A,B), 2,05 (m, 2 H, H-7), 2,54 (s, 3 H, H-12), 3,95 (t, 1 H,  $J = 6,2$  Hz, H-10), 4,58 (t, 2 H,  $J = 7,6$  Hz, H-6), 7,95 (t, 1 H,  $J = 7,6$  Hz, H-5), 8,40 (d, 1 H,  $J = 8,1$  Hz, H-1), 8,77 (d, 1 H,  $J = 5,9$  Hz, H-4), 8,85 (s, 1 H, H-3). Elementaranalyse:  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $M = 223,29$  g/mol) erfordert C = 64,55 %, H = 8,58 %, N = 12,55 %; gefunden: C = 32,73 %, H = 2,66 %, N = 3,07 %. Chromatographische Reinheit (HPLC-DAD-ESI-MS/MS): > 99 %. Anteil des Kations: 24,5 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 23,5 mg (molare Ausbeute = 4,2 %).

### 3.9.8 Darstellung von 2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PPL)

Die Darstellung der 2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure erfolgte vierstufig ausgehend von  $\gamma$ -Nonalacton, welches zunächst in Anlehnung an Schwetlick (2004) und Takeoka et al. (1995) reduktiv mittels Lithiumaluminiumhydrid zum Nonan-1,4-diol gespalten wurde. Im Anschluss erfolgte eine Oxidation mittels Pyridiniumchlorochromat zum 4-Oxononanal in Anlehnung an Corey & Suggs (1975), welches in einer Paal-Knorr-Pyrrol-Synthese in Anlehnung an Sayre et al. (1996) mit N <sup>$\alpha$</sup> -Acetyl-L-lysin zum 2-Pentylpyrrol-acetyllysin umgesetzt wurde. Die Entschützung der  $\alpha$ -Aminogruppe erfolgte anschließend mittels basischer Hydrolyse, wodurch das 2-Pentylpyrrollysin (2-PPL) erhalten wurde.

Zur Darstellung des Nonan-1,4-diols wurden in einen 500 ml Dreihalskolben 150 ml THF und 2,6 g Lithiumaluminiumhydrid vorgelegt und im Eisbad gekühlt. Unter Rühren und weiterem Kühlen wurden 12,5 ml  $\gamma$ -Nonalacton in 50 ml THF mittels Tropftrichter zugegeben. Im Anschluss wurde das Eisbad entfernt. Nachdem die Reaktionsmischung Raumtemperatur erreicht hatte, wurde für 3 h unter leichtem Rückfluss erhitzt. Nachdem erneut mittels Eisbad gekühlt wurde, erfolgte langsam die Zugabe von eisgekühltem Reinstwasser bis keine weitere Wasserstoffbildung mehr beobachtet werden konnte. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht über wasserfreiem MgSO<sub>4</sub> getrocknet, über MgSO<sub>4</sub> filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt.

#### Analytische Daten

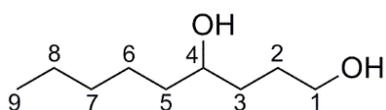


Abb. 26 Struktur von Nonan-1,4-diol

**Nonan-1,4-diol:** <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,82 (t, 3H,  $J$  = 7,2 Hz, H-9), 1,23 (m, 4 H, H-7, H-8), 1,37 (m, 4H, H-3, H-6), 1,57 (m, 4H, H-2, H-5), 3,52 (m, 2H, H-1), 3,57 (m, 1H, H-4). Reinheit: 98,2% (GC-MS). Ausbeute = 8,4473 g (molare Ausbeute = 67,5%).

Zur Darstellung des 4-Oxononanal wurden in einen 500 ml Dreihalskolben 17,0 g Pyridiniumchlorochromat in 100 ml Dichlormethan suspendiert (Corey & Suggs, 1975). Nach der Zugabe von 8,4473 g Nonan-1,4-diol in 50 ml Dichlormethan wurde die Reaktion unter Rühren für 2 h bei Raumtemperatur fortgeführt, wobei sich die Reaktionsmischung dunkel verfärbte. Im Anschluss wurden 150 ml Diethylether hinzugegeben und die Reaktionsmischung über MgSO<sub>4</sub> filtriert. Die Zugabe von Diethylether gefolgt von einem Filtrationsschritt wurde

so oft wiederholt, bis keine Präzipitation mehr beobachtet werden konnte. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt und die Aufreinigung des 4-Oxononanal erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60. Als Eluent kam Ethylacetat/Hexan (15:85, v/v) zum Einsatz (Sayre et al., 1993). Fraktionen, die 4-Oxononanal enthielten, wurden mittels GC-MS (EI) identifiziert (siehe Kap. 3.10.12), vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt.

#### Analytische Daten

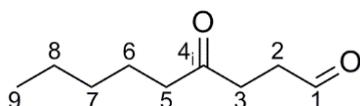


Abb. 27 Struktur von 4-Oxononanal

**4-Oxononanal:**  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,85 (m, 6H, H-9), 1,26 (m, 9H, H-7, H-8), 1,55 (m, 3H, H-6), 2,43 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H-5), 2,71 (m, 4H, H-2, H-3), 9,77 (s, 1H, H-1). Reinheit: 49,3% (GC-MS). Ausbeute = 2,3225 g (molare Ausbeute = 13,9%).

Zur Darstellung der 2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PPL) wurden in einem 50 ml Rundkolben 1,0 g 4-Oxononanal und 2,0 g  $\text{N}^\alpha$ -Acetyl-L-lysin in 25 ml Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) in einer Paal-Knorr-Pyrrol-Synthese unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für 72 h zum 2-Pentylpyrrolacetyllysin umgesetzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel durch Evaporieren mittels Stickstoffstrom entfernt. Die Entschützung der  $\alpha$ -Aminogruppe erfolgte durch Zugabe von 250 ml einer 2 M NaOH-Lösung und Erhitzen für 23 h bei 110 °C unter Rückfluss. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei 60 °C wurde der Rückstand drei Mal mit jeweils 10 ml Chloroform extrahiert, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und über  $\text{MgSO}_4$  filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC. Hierzu wurden 25 mg des Feststoffs in 1,0 ml Methanol aufgenommen und nach Membranfiltration (0,45  $\mu\text{m}$ ) entsprechend nachfolgenden Parametern zur Aufreinigung eingesetzt.

Anlage	HPLC-UV, semipräparativ, Knauer, Berlin
Säule	Eurospher 100-10 C18 (250 x 16 mm), mit Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur	Raumtemperatur (23 °C)
Injektionsvolumen	1,0 ml
Detektion	227 nm
Flussrate	4 ml/min
Fließmittel	A: Wasser B: Acetonitril

## Trennprogramm

Tab. 16 Trennprogramm 2-PPL mittels semipräparativer RP-HPLC-UV

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	10
2	10
30	95
40	95
42	10
52	10

Die Elution des 2-PPL erfolgte zwischen 21 und 23 min. Die Fraktionen mehrerer Läufe wurden vereinigt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt und das Produkt gefriergetrocknet.

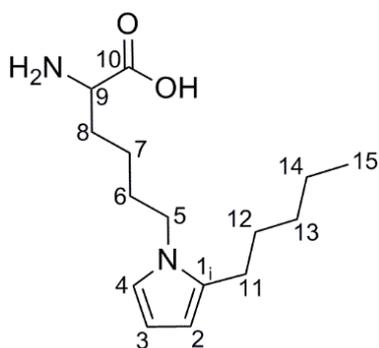
*Analytische Daten*

Abb. 28 Struktur von 2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PPL)

**2-Amino-6-(2-pentyl-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PPL):** ESI-MS (positiv mode),  $m/z$  267,3 ( $M+H^+$ ).  $^1H$  NMR (600 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  0,99 (m, 6H, H-15), 1,44 (m, 6H, H-14, H-13), 1,51 (m, 5H, H-7), 1,68 (m, 2H, H-12), 1,80 (m, 2H, H-6), 1,98 (m, 2H, H-8a,b), 2,6 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H-11), 3,56 (t, 1H,  $J = 6,0$  Hz, H-9), 3,91 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H-5), 5,8 (m, 1H,  $J = 3,0$  Hz, H-2), 6,00 (t, 1H,  $J = 3,0$  Hz, H-3), 6,64 (d, 1H,  $J = 3,0$  Hz, H-4). Elementaranalyse:  $C_{15}H_{26}N_2O_2$  ( $M = 266,40$  g/mol) erfordert C = 67,63 %, H = 9,84 %, N = 10,52 %; gefunden: C = 61,23 %, H = 10,94 %, N = 7,90 %. Chromatographische Reinheit (HPLC-DAD-ESI-MS/MS nach PITC-Derivatisierung nach Schneider (2002)): > 99 %. Reinheit: 75,1 % (N-Verhältnis, korrigiert). Ausbeute = 13,7 mg (molare Ausbeute = 4,4 %).

## 3.10 Analytische Methoden

### 3.10.1 Bestimmung des pH-Werts

Die pH-Wert-Bestimmung der Erdnussproben erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Meike Deuber (Deuber, 2015). Hierzu wurden 1,0 g der zerkleinerten Erdnüsse in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, 20 ml Reinstwasser zugegeben und für 1 min mittels Ultra-Turrax bei 11200 U/min homogenisiert. Nach Filtration (Whatman 595 ½) erfolgte die pH-Wert-Bestimmung mittels pH-Elektrode.

### 3.10.2 Proteingehaltsbestimmung

#### 3.10.2.1 Kjeldahl

Die Bestimmung des Rohproteingehalts erfolgte nach der Methode L 06.00-7 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges Tabakgesetz, § 28 b GenTG (BVL). Die Proben wurden zu jeweils 15 mg Protein eingewogen, mit einer Spatelspitze Katalysatormischung nach Wieninger sowie 10 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Analog wurde ein Blindwert ohne Probeneinwaage angesetzt. Die Aufschlüsse erfolgten in einer Aufschlusseinheit der Firma Büchi. Nachdem die Proben farblos und klar waren, wurden 10 ml destilliertes Wasser zugesetzt und mit nachfolgenden Parametern an einer Destillationseinheit der Firma Büchi in einen Erlenmeyerkolben destilliert, in den zuvor 100 ml destilliertes Wasser vorgelegt wurden:

Vorlage Borsäure 2 % (m/v)	50 ml
Zugabe destilliertes Wasser	15 ml
Zugabe Natronlauge 32 % (m/v)	40 ml
Destillationsdauer	4 min

Die Titration erfolgte im Anschluss mit 0,1 M Schwefelsäure gegen Tashiro-Mischindikator. Die Berechnung des Proteingehalts P erfolgte unter Einbeziehung des Faktors F 5,3 für Ölsamen wie folgt (Matissek et al., 2010):

$$P [\%] = \frac{(a - b) \cdot 0,14008 \cdot F}{E}$$

a Verbrauch an Schwefelsäurelösung (0,1 M) im Hauptversuch in ml

b	Verbrauch an Schwefelsäurelösung (0,1 M) im Blindversuch in ml
0,14008	Umrechnungsfaktor auf mg Stickstoff
F	Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Proteingehalts
E	Probeneinwaage in g

#### 3.10.2.2 BCA-Test

Die Bestimmung des Proteingehalts der LDL-Proben erfolgte mittels BCA-Test unter Verwendung des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Waltham, MA, USA) im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Karl Schaller (Schaller, 2015). Die Kalibrierung erfolgte unter Verwendung einer 2,0 mg/ml BSA-Lösung in 0,01 M PBS-Puffer (pH 7,4) im Bereich von 125 µg/ml bis 2000 µg/ml. Der PBS-Puffer wurde aus PBS-Tabletten (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Waltham, MA, USA) hergestellt. Als Blindwert diente 0,01 M PBS-Puffer. In eine Mikrotiterplatte wurden 25 µl der Probelösungen und 200 µl des Arbeitsreagenzes pipettiert und die Absorption nach 2 h bei Raumtemperatur bei  $\lambda = 560$  nm mittels Mikrotiterplattenlesegeräts gemessen.

#### 3.10.3 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden am Institut für Anorganische Chemie der Technischen Universität Dresden an einem vario Micro cube (Elementar, Hanau) sowie am Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Dresden, hierbei freundlicherweise von Anke Peritz, an einem EuroEA 3000 (Eurovector, Mailand) durchgeführt. Zur Reinheitsbestimmung der dargestellten Präparate wurde anhand des Gehalts an theoretisch berechnetem Stickstoff  $N_{theoretisch}$  und dem mittels Elementaranalyse bestimmten Gehalt an Stickstoff  $N_{bestimmt}$  über nachfolgende Gleichung der Anteil des Produkts in den Präparaten ermittelt:

$$\text{Produktanteil [\%] (m/m)} = \frac{N_{bestimmt}}{N_{theoretisch}} \cdot 100 \%$$

Da bei den kationischen Produkten, die als Heptafluorbutyrate isoliert wurden, der Anteil an Gegenionen nicht bekannt war, erfolgten hierbei die Reinheitsangaben bezogen auf das reine Kation ohne Gegenion.

Weiterhin diente die Elementaranalyse zur Proteingehaltsbestimmung der modifizierten Ara h 1-Ansätze. Hierzu wurden jeweils 2,5 mg Substanz zur Bestimmung eingesetzt und über

den erhaltenen Stickstoffgehalt mittels Faktor 5,3 für Ölsamen (Matissek et al., 2010) der Proteingehalt berechnet.

### 3.10.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die kernspinresonanzspektroskopischen Messungen wurden am Institut für Organische Chemie der TU Dresden, freundlicherweise von Dr. Margit Gruner und Anett Rudolph, durchgeführt. Die  $^1\text{H}$ -Spektroskopien wurden hierbei an einem Bruker Avance 600 Spektrometer bei 600,16 MHz und einem Bruker DRX 500 Spektrometer bei 500,13 MHz durchgeführt.  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden an einem Bruker DRX 500 Spektrometer bei 150,9 MHz aufgenommen. Die 2D-Spektren wurden mittels Bruker Avance 600 aufgezeichnet. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen am Institut für Anorganische Chemie der TU Dresden, freundlicherweise durch Sivathmehhan Yogendra. Hierbei wurden  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und 2D-Spektren an einem Bruker Avance 400 Spektrometer bei 400,13 MHz, beziehungsweise 100,61 MHz aufgenommen. Für die Messungen wurden jeweils 20 mg der zu untersuchenden Substanzen in 750  $\mu\text{l}$  des entsprechenden deuterierten Lösungsmittels gelöst.

Folgende 2D-Experimente wurden zur Strukturaufklärung durchgeführt: COSY (correlation spectroscopy), NOESY (nuclear overhauser enhancement spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum coherence) und HMBC (heteronuclear multiple bond correlation). Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) wurden in parts per million (ppm) relativ zu den jeweiligen Referenzsignalen der eingesetzten Lösungsmittel (Tab. 17), welche als interne Standards dienen, angegeben.

Tab. 17 NMR-Spektroskopie, Referenzsignale der eingesetzten Lösungsmittel (Gottlieb et al., 1997; Cambridge Isotope Laboratories)

Lösungsmittel	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
Tetradeuteromethanol (MeOH- $d_4$ )	$\delta_{\text{H}} = 4,78 \text{ ppm (s)}$	$\delta_{\text{C}} = 49,05 \text{ ppm}$
Deuteriochloroform ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta_{\text{H}} = 7,26 \text{ ppm (s)}$	$\delta_{\text{C}} = 77,13 \text{ ppm}$

### 3.10.5 Hydrolysen

#### 3.10.5.1 Salzsäure Hydrolyse

Für die salzsäure Hydrolyse wurden die Proben entsprechend Tab. 18 in Hydrolyseröhrchen eingewogen und nach Zugabe von 6 M HCl für 1 min mit Stickstoff überschichtet. Die flüssigen

LDL-Proben wurden entsprechend der benötigten Proteinmenge in die Hydrolyseröhrchen pipettiert und vor Zugabe der Salzsäure gefriergetrocknet. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse wurden kommerziell geröstete Erdnussproben zusätzlich unter Verwendung analoger Volumina an 8 M, 10 M und 12 M HCl hydrolysiert. Die Hydrolysen erfolgten für 23 h bei 110 °C im Sandbad im Trockenschrank. Hieran schloss sich eine Filtration der Proben durch aschefreie Filter an. Nach der Hydrolyse wurde unter Berücksichtigung der Dichte von 6 M HCl ( $\rho = 1,09 \text{ g/ml}$ ) die genaue Konzentration an ursprünglicher Probeneinwaage im Hydrolysat berechnet. Für die Furosinquantifizierung wurde das Hydrolysat direkt auf die SPE aufgegeben und für alle weiteren Quantifizierungen ein Aliquot des Hydrolysats am Vakuumkonzentrator eingeeengt (Tab. 18). Für die Quantifizierungen von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin und CML erfolgte vor der Hydrolyse eine Reduktion nach Kap. 3.10.8.

Tab. 18 Einwaagen für die salzsaure Hydrolyse und weiterverwendete Aliquote

Analyt	Probe	Einwaage [mg]	Zugabe 6 M HCl [ml]	Aliquot [ml]
ASA	Erdnüsse	240	4	0,3
	Inkubationsproben	12	4	0,3
	LDL <sup>1)</sup>	1 (Protein)	1	0,3
Furosin	Erdnüsse	240	4	0,5
CML	Erdnüsse	12 mg <sup>2)</sup>		1,0
LHP 1, LHP 2	Erdnüsse	60	4	1,0
	Inkubationsproben	12	4	1,0
N <sup>ε</sup> -Hexyllysin	Erdnüsse	12 mg <sup>2)</sup>		vollständig
	Inkubationsproben	3 mg <sup>2)</sup>		BW: vollständig, sonst 1,5 ml
(Z)-, (E)-BPP	Inkubationsproben	12	4	1,0
MP-Lysin	Erdnüsse	60	4	1,0
	Inkubationsproben	2	4	0,2 - 1,5
	LDL <sup>1)</sup>	0,6 (Protein)	1,5	1,4

<sup>1)</sup> sowohl nLDL, als auch oxLDL; <sup>2)</sup> zur Reduktion nach Kapitel 3.10.8

### 3.10.5.2 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte nach Henle et al. (1991a). Folgende Enzymlösungen wurden benötigt:

Pepsin-Lösung (frisch hergestellt)	2 mg Pepsin (20 FIP-U) in 1 ml 0,02 M HCl
Pronase-Lösung (frisch hergestellt)	2 mg Pronase E (8000 PU) in 1 ml Tris/HCl-Puffer (2 M, pH 8,2)

Aminopeptidase-Lösung	gebrauchsfertige Suspension, 70,4 U/ml
Prolidase-Lösung	in Reinstwasser gelöst, 100 U/ml

Die Erdnuss- und Erdnussproteinproben wurden zu 2-3 mg Protein in Rollrandschnappdeckelgläser eingewogen und mit 1,0 ml einer 0,02 M HCl, der zur Konservierung ein Kristall Thymol zugesetzt wurde, versetzt. Von den nLDL- und oxLDL-Proben wurden Volumina, die 0,7 mg Protein entsprachen, in die Rollrandschnappdeckelgläser vorgelegt, gefriergetrocknet und dann analog verfahren. Nach Zugabe von 50 µl der Pepsin-Lösung erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 24 h im Inkubationsschrank. Im Anschluss wurden 250 µl Tris/HCl-Puffer (2 M, pH 8,2) sowie 50 µl Pronase-Lösung zugegeben und die Proben bei 37 °C für weitere 24 h inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Prolidase-Lösung sowie 4 µl Aminopeptidase-Lösung wurde analog bei 37 °C für 24 h inkubiert und die Proben anschließend gefriergetrocknet.

### 3.10.6 Freie Aminosäuren

Zur Bestimmung der freien Aminosäuren wurden 1,0 g der zerkleinerten Erdnussproben in 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 5,0 ml Reinstwasser versetzt und für 2 min mittels Ultra-Turrax bei 11200 U/min homogenisiert. Zur Extraktion wurden die Proben für 15 min bei 65 °C ins Wasserbad gestellt und im Anschluss für 10 min bei 10000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Filtration des Überstands (Whatman 595 ½) wurden 1,5 ml des Filtrats mit 1,5 ml einer 36 %igen TCA-Lösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand drei Mal mit jeweils 2,0 ml Diethylether ausgeschüttelt und die organische Phase jeweils abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurden 2,0 ml der wässrigen Phase gefriergetrocknet, in 500 µl ASA-Puffer (siehe Kap. 3.10.7) gelöst, 1+4 mit ASA-Puffer verdünnt und zur ASA nach Kap. 3.10.7 eingesetzt.

### 3.10.7 Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse (ASA) erfolgte nach salzsaurer oder enzymatischer Hydrolyse mittels Ionenaustauschchromatographie mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung nach Henle et al. (1991b). Hierzu wurden die nach Kap. 3.10.5 erhaltenen salzsauren, beziehungsweise enzymatischen Hydrolysate in 0,5 ml ASA-Puffer (0,12 M Lithiumcitrat, pH 2,2) gelöst, bei Bedarf verdünnt, membranfiltriert (0,45 µm) und zur Messung entsprechend nachfolgender Parameter eingesetzt. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dipl.-Ing. (FH) Karla

Schlösser an der Professur für Lebensmittelchemie durchgeführt. Bei den Inkubationsproben nach Kap. 3.6 und Kap. 3.7 wurde Valin als interner Standard angesehen und die Aminosäureabnahmen als Valinäquivalente bezogen auf das Ausgangsverhältnis des jeweiligen Blindwerts entsprechend nachfolgender Gleichung berechnet:

$$\text{Aminosäureabnahme [\%]} = 100\% - \frac{100\% \cdot \left(\frac{[Lys]}{[Val]}\right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{[Lys]}{[Val]}\right)_{\text{Blindwert}}}$$

Anlage	Aminosäureanalysator S4300 (SYKAM)	
Säule	Kationenaustauschersäule LCA K07/Li (Laserchrom HPLC Laboratories Ltd., Rochester, England)	
Säulentemperatur	Gradient, siehe Tab. 20	
Injektionsvolumen	10 - 100 µl	
Detektion	570 nm und 440 nm (Prolin)	
Flussrate	Puffer	0,45 ml/min
	Ninhydrin	0,25 ml/min
Fließmittel	A	0,12 M Lithiumcitrat, pH 2,9
	B	0,30 M Lithiumcitrat, pH 4,2
	C	0,30 M Lithiumcitrat, pH 8,0
	D (Regenerierung)	0,50 M Lithiumhydroxid
Trennprogramm		

Tab. 19 Trennprogramm für die Aminosäureanalyse

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Puffer C [%]	Puffer D [%]
0,0	85	15	-	-
3,0	85	15	-	-
4,0	79	21	-	-
21,0	43	57	-	-
25,0	43	57	-	-
33,0	-	100	-	-
39,0	-	-	100	-
43,0	-	-	77	23
61,0	-	-	77	23
61,1	-	-	-	100
64,1	-	-	-	100
64,2	85	15	-	-
77,2	85	15	-	-

Tab. 20 Aminosäureanalyse, Programm zur Derivatisierung mit Ninhydrin

Zeit [min]	Ventil	Säulentemperatur [°C]
0,0	30 % Isopropanol in Wasser	42
0,1	Ninhydrin	42
25,0	Ninhydrin	42
40,0	Ninhydrin	60
46,0	Ninhydrin	74
60,0	Ninhydrin	74
61,0	30 % Isopropanol in Wasser	74
71,0	30 % Isopropanol in Wasser	42
201,0	30 % Isopropanol in Wasser	42

### 3.10.8 Reduktion mit NaBH<sub>4</sub>

Reduktionen erfolgten zur Identifizierung von Lipierungsprodukten (Kap. 3.5) und zur Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysine (Kap. 3.10.16) und CML (Kap. 3.10.23) in Anlehnung an Hegele et al. (2008). Hierzu wurden 12 mg der Erdnussproben, 3 mg der Inkubationsproben beziehungsweise 1,0 ml der methanolischen Inkubationsansätze in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen bzw. pipettiert. Methanolische Lösungen wurden zunächst mittels Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Nach Zugabe von 3,0 ml 0,2 M Boraxpuffer (pH 9,5) und 2,0 ml einer 1,0 M NaBH<sub>4</sub>-Lösung in 0,1 M NaOH wurden die Proben gevortext und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach vorsichtiger Zugabe von 1,0 ml 6 M HCl wurden 5,0 ml 12 M HCl zugegeben, mit Stickstoff überschichtet und dann für 23 h bei 110 °C im Sandbad im Trockenschrank hydrolysiert. Im Anschluss erfolgte eine Filtration durch aschefreie Filter.

### 3.10.9 Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenzmessung des von Xu et al. (1999) beschriebenen Fluorophors **23** (Kap. 2.4.4, Abb. 17) erfolgte an den mit 4-HNE modifizierten Erdnussprotein- und Ara h 1-Proben. Hierfür wurden die nach Kap. 3.10.5 enzymatisch hydrolysierten Probelösungen verwendet, um eventuelle fluoreszenzverstärkende Effekte, die im Proteinverband auftreten könnten, zu vermeiden. Die jeweils in 500 µl ASA-Puffer vorliegenden Probelösungen wurden entsprechend ihrer Proteineinwaagen auf 0,1 mg Protein/ml mit ASA-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 200 µl der Probelösungen auf Mikrotiterplatten aufgetragen und ein ASA-Puffer-Blindwert mitgeführt. Die Messungen erfolgten nach Xu et al. (1999) bei

$\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$  mittels Mikrotiterplattenlesegerät. Die Angabe der Messwerte erfolgte in Intensitätseinheiten nach Blindwertkorrektur. Nachfolgende Parameter wurden zur Messung eingesetzt:

Mode	Fluorescence top reading
Excitation wavelenth	360 nm
Emission wavelenth	430 nm
Excitation bandwith	9 nm
Emission bandwith	20 nm
Gain	0
Number of flashes	10
Integration time	20 $\mu\text{s}$
Lag time	0 $\mu\text{s}$
Settle time	0 $\mu\text{s}$
Z-Position (manual)	20000 $\mu\text{m}$

## 3.10.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

### 3.10.10.1 Gradientengele (5-15 % Acrylamid)

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an Laemmli (1970) unter Verwendung eines Probenpuffers nach Schägger & von Jagow (1987) durchgeführt. Die Reduktionen und Alkylierungen der Thiolgruppen der Proben erfolgten nach Westermeier (2005), die Anfärbung der Gele nach Radola (1980). Folgende Lösungen wurden benötigt:

#### *Lösungen zur Probenvorbereitung*

Probenpuffer, pH 8,0	4,84 g Tris, 0,03 g EDTA, 1,0 g SDS, 13,8 ml Glycerol (87 %ig), 0,01 g Orange G, pH-Wert mittels 6 M HCl eingestellt, auf 50 ml mit Reinstwasser aufgefüllt
Iodacetamidlösung (frisch)	0,2 g Iodacetamid in 1,0 ml Reinstwasser gelöst
DTT-Lösung (frisch)	0,15 g DTT in 0,2 ml Reinstwasser gelöst

#### *Lösungen zur Gelherstellung*

Acrylamidstammlösung	Acrylamid/Bis-Lösung 29:1, 40 % (w/v), C = 3,3 % (Serva)
Trenngelpuffer, pH 8,5	19,47 g Tris, 0,16 g SDS, pH-Wert mittels 6 M HCl eingestellt, auf 50 ml mit Reinstwasser aufgefüllt
Per-Lösung (frisch)	430 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1,0 ml Reinstwasser gelöst

*Pufferlösungen für die Elektrophorese*

Anodenpuffer, pH 8,9	121,1 g Tris, pH-Wert mittels 6 M HCl eingestellt, auf 5,0 l mit Reinstwasser aufgefüllt
Kathodenpuffer, pH 8,2	12,1 g Tris, 17,9 g Tricin, 1 g SDS, auf 1,0 l mit Reinstwasser aufgefüllt

*Lösungen zur Färbung*

Fixierlösung	200 g Trichloressigsäure, auf 1,0 l mit Reinstwasser aufgefüllt
Färbelösung	400 mg Coomassie Brillantblau G-250, auf 1,0 l mit Entfärbelösung aufgefüllt
Entfärbelösung	Wasser:Methanol:Eisessig (65:25:10, v/v/v)

*Eingesetzte Molmassenmarker*

AppliChem Protein Marker III: 6,5, 14, 20, 29, 45, 66, 116, 212 kDa

Roti<sup>®</sup>-Mark Standard: 14, 20, 29, 43, 66, 118, 212 kDa

**Gießen der Gradientengele**

Die Herstellung der Gellösungen für die Gradientengele (T = 5-15 %, C = 3,3 %) erfolgte entsprechend Tab. 21.

Tab. 21 SDS-PAGE, Herstellung der Gellösungen

Lösung	Trenngel schwer 15 % Acrylamid	Trenngel leicht 5 % Acrylamid	Spacergel 5 % Acrylamid
Glycerol (87 %ig) [ml]	3,065	-	-
Trenngelpuffer [ml]	3,120	3,120	3,120
Acrylamidstammllösung [ml]	3,753	1,251	1,251
	mit Reinstwasser auf 10 ml auffüllen		
	Zugabe von jeweils 10 µl TEMED		

Das Gießen der Gradientengele erfolgte mit Hilfe einer Mischkammer im Kühlraum bei 6 °C unter Verwendung von vorgekühlten Gellösungen und Gelkammern. Hierzu wurden jeweils 7 ml der schweren und leichten Gellösungen in die Mischkammer vorgelegt, mit jeweils 40 µl Per-Lösung versetzt und die Gele unter Rühren der Gellösungen gegossen. Nach einer Standzeit von jeweils 15 min im Kühlraum und bei Raumtemperatur wurden die Gele mit Reinstwasser überschichtet und für 1 h bei 40 °C zur vollständigen Polymerisierung in einen Trockenschrank gestellt. Nach Abnehmen der Wasserschicht und Einsetzen der Probenkämme wurde die Spacergellösung aufgegeben. Die Polymerisierung erfolgte über Nacht im Kühlraum.

#### **Probenvorbereitung**

Zur Probenvorbereitung wurden die Proben entsprechend ihrer Proteingehalte auf 1 mg/ml eingewogen. Die benötigte Probenmenge wurde zunächst mit 0,5 ml einer 6 M Harnstofflösung versetzt, für 15 min im Ultraschallbad behandelt und im Anschluss 0,5 ml Probenpuffer zugegeben. Zur Reduktion wurden 0,5 ml der Probelösung mit 10 µl DTT-Lösung versetzt, für 4 min im siedenden Wasserbad erhitzt, unter fließendem Wasser abgekühlt, mit 5 µl DTT-Lösung und 53 µl Iodacetamidlösung versetzt und über Nacht in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt.

#### **Elektrophorese**

In die Probentaschen wurden jeweils 10 µl der Probelösung und des Markers aufgegeben. Die Elektrophorese erfolgte vertikal unter Kühlung auf 10 °C mit nachfolgenden Parametern für zwei Gele:

1. Phase	1 h	50 mA	400 V
2. Phase	5 h	110 mA	800 V

#### **Anfärbung**

Zunächst wurden die Gele für 20 min in die Fixierlösung gelegt und im Anschluss drei Mal für jeweils 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Färbung kamen die Gele für 30 min in die Färbelösung und anschließend drei Mal für jeweils 20 min in die Entfärbelösung.

Densitometrische Auswertungen erfolgten unter Verwendung der Software TotalLab TL120, Version 2006c (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, UK).

### 3.10.10.2 Isokratische Gele (9 % Acrylamid)

Zur elektrophoretischen Trennung der simuliert verdauten Erdnussproben wurden isokratische Fertiggele (9 % Vario Gel, Biostep, Burkhardtsdorf) verwendet. Der benötigte Laufpuffer wurde wie folgt hergestellt:

Laufpuffer, pH 8,5                      290,7 g Tris, 286,7 g Tricin und 40 g SDS mit Reinstwasser auf 2,0 l aufgefüllt

Die Probenvorbereitung erfolgte analog Kap. 3.10.10.1, wobei jeweils 14 µl auf das Gel aufgetragen wurden. Der Marker wurde zu 7 µl aufgetragen. Mit dem auf 6 °C vorgekühlten und 1:20 mit Reinstwasser verdünnten Laufpuffer wurde sowohl die Kathoden- als auch die Anodenbox befüllt und die Elektrophorese mit nachfolgenden Parametern für 2 Gele durchgeführt:

1. Phase	0,25 h	70 mA	80 V
2. Phase	1 h	150 mA	180 V

Zur Detektion der Banden kamen die Lösungen nach Kap. 3.10.10.1 zur Anwendung. Zunächst wurden die Gele für 20 min in die Fixierlösung gelegt und im Anschluss für 5 + 5 + 15 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Färbung kamen die Gele für 45 min in die Färbelösung und anschließend drei Mal für jeweils 15 min in die Entfärbelösung.

### 3.10.11 Identifizierung von Lipierungsprodukten mittels LC-ESI-MS/MS

Die nach der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation (Kap. 3.5) sowie mit Linolsäuremethylester unter oxidativen Bedingungen gebildeten Lipierungsprodukte (Kap. 3.8) wurden mittels LC-ESI-MS/MS zunächst in Scanläufen und nachfolgend anhand ihrer charakteristischen Fragmentationen in Produktionenscans identifiziert. Hierzu wurden die nach Kap. 3.5 beziehungsweise Kap. 3.8 erhaltenen Proben entsprechend nachfolgender Parameter und den in Tab. 23 beziehungsweise Tab. 24 angegebenen Parametern der jeweiligen Produktionenscans zur Messung eingesetzt. Die Scanläufe und Produktionenscans der Acrolein- und MDA- sowie der 4-HNE-Lipierungsprodukte wurden jeweils im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeiten von Meike Deuber (Deuber, 2015) und Stefanie Pattke (Pattke, 2014) durchgeführt.

Anlage	LC-ESI-MS/MS, Agilent, Böblingen		
Säule	Eurospher 100-5 C18 (250 x 3,0 mm), Knauer, Berlin		
Säulentemperatur	30 °C		
Injektionsvolumen	5 µl		
Detektion	MS/MS		
	Modus	1. Scan (5,1-78 min), positiv mode, scan time 200 ms, Fragmentorspannung 135 V 2. Produktionenscan (siehe Tab. 23 und Tab. 24), positive mode, scan time 200 ms, Fragmentorspannung 135 V	
	Gastemperatur	300 °C	
	Gasfluss	11 l/min	
	Zerstäuberdruck	15 psi	
Flussrate	0,38 ml/min		

Fließmittel A: 11 mM Essigsäure und 2 mM Heptafluorbuttersäure in Wasser  
 B: 11 mM Essigsäure und 2 mM Heptafluorbuttersäure in Acetonitril

Trennprogramm

Tab. 22 Trennprogramm zur Identifizierung von Lipierungsprodukten mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	2
50	70
65	90
75	90
78	2
88	2

Tab. 23 LC-ESI-MS/MS-Produktionenscanparameter zur Identifizierung von Lipierungsprodukten nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation

Inkubation mit	Lipierungsprodukt	m/z	Retentionszeit [min]	Kollisionsspannung [eV]	
Hexanal	<i>vor Hydrolyse</i>				
		N <sup>ε</sup> -Hexyl-AcLys	273,2 (M+H <sup>+</sup> )	29,8	15
		AcLHP 1	433,3 (M <sup>+</sup> )	49,0	30
		AcLHP 2	433,3 (M <sup>+</sup> )	50,9	30
	<i>nach Hydrolyse</i>				
		N <sup>ε</sup> -Hexyllysin	231,1 (M+H <sup>+</sup> )	30,1	15
		N <sup>ε</sup> -Hexyllysin-d <sub>12</sub>	243,1 (M+H <sup>+</sup> )	28,3	15
		LHP 1	391,3 (M <sup>+</sup> )	45,0	30
		LHP 1-d <sub>29</sub>	420,5 (M <sup>+</sup> )	44,5	20
		LHP 2	391,3 (M <sup>+</sup> )	46,9	30
		LHP 2-d <sub>29</sub>	420,5 (M <sup>+</sup> )	46,0	20
	Hexanal +	AcLHP 1	433,3 (M <sup>+</sup> )	46,4	30
	Nonanal	AcLHP 2	433,3 (M <sup>+</sup> )	48,3	30
		AcLys-2xHex-1xNon	475,4 (M <sup>+</sup> )	53,1 - 56,5	35
	AcLys-1xHex-2xNon	517,4 (M <sup>+</sup> )	59,7 - 63,4	35	
	AcLys-3xNon 1	559,5 (M <sup>+</sup> )	66,3	40	
	AcLys-3xNon 2	559,5 (M <sup>+</sup> )	69,8	40	
<i>(E)</i> -Hept-2-enal	<i>vor Hydrolyse</i>				
		<i>(Z)</i> -AcBPP	375,3 (M <sup>+</sup> )	38,3	25
		<i>(E)</i> -AcBPP	375,3 (M <sup>+</sup> )	40,0	25
	<i>nach Hydrolyse</i>				
		<i>(Z)</i> -BPP	333,3 (M <sup>+</sup> )	34,5	20
	<i>(E)</i> -BPP	333,3 (M <sup>+</sup> )	35,5	20	

Inkubation mit	Lipierungsprodukt	m/z	Retentionszeit [min]	Kollisionsspannung [eV]
Acrolein	MP-AcLys	264,9 (M <sup>+</sup> )	18,8	20
	<i>nach Red. und Hydrolyse</i>			
	FDP-Lysin	243,1 (M+H <sup>+</sup> )	14,1	15
	<i>nach Hydrolyse</i>			
	MP-Lys	223,1 (M <sup>+</sup> )	16,9	20
Malondialdehyd	2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)hexansäure	296,9 (M+H <sup>+</sup> )	14,4	20
	N <sup>ε</sup> -Propenal-AcLys	243,0 (M+H <sup>+</sup> )	15,7	15
	2-Acetamido-6-[(3-(5-acetamido-6-hydroxy-6-oxo-hexyl)iminoprop-1-enyl)amino]hexansäure	413,0 (M+H <sup>+</sup> )	21,2	30
<i>(E)</i> -4-Hydroxy-non-2-enal	<i>vor Hydrolyse</i>			
	Pyridinium-Derivat	365,2 (M <sup>+</sup> )	31,3	25
	Schiff'sche Base	327,2 (M+H <sup>+</sup> )	34,3	20
	2-PP-AcLys	309,2 (M+H <sup>+</sup> )	44,4	25
	<i>nach Red. und Hydrolyse</i>			
	red., cycl. Michael-Addukt	287,2 (M+H <sup>+</sup> )	28,0	15
	<i>nach bas. Hydrolyse</i>			
	2-PPL	267,2 (M+H <sup>+</sup> )	21,7	20

Ac - Acetylgruppe an N<sup>α</sup>-Position; Lys - Lysin; Red./red. – Reduktion/reduziert nach Kap. 3.10.8; cycl. - cyclisiert; Hex - Hexanal; Non - Nonanal; Hydrolyse - salzsaure Hydrolyse nach Kap. 3.10.5; bas. Hydrolyse - basische Hydrolyse (2 M NaOH, 23 h, 110 °C)

Tab. 24 LC-ESI-MS/MS-Produktionenscanparameter zur Identifizierung von Lipierungsprodukten nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Linolsäuremethylester unter oxidativen Bedingungen, PP - Pentylpyrrol

Lipierungsprodukt	m/z	Retentionszeit [min]	Kollisionsspannung [eV]
N <sup>ε</sup> -Hexyl-AcLys (nach Reduktion)	272,2 (M+H <sup>+</sup> )	20,0	20
2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]hexansäure („N <sup>ε</sup> -Hexyl-AcLys-Analogon“)	359,2 (M+H <sup>+</sup> )	21,4	20
2-PP-AcLys	309,2 (M+H <sup>+</sup> )	22,7	20
2-Acetamido-6-[2-(8-methoxy-8-oxo-octyl)pyrrol-1-yl]hexansäure („2-PP-AcLys-Analogon“)	395,3 (M+H <sup>+</sup> )	23,6	25

### 3.10.12 Semiquantifizierung flüchtiger Sekundärprodukte in erhitztem Erdnussöl mittels GC-MS (EI)

Die Bestimmungen erfolgten im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Marco Schindler (Schindler, 2013). Zur Semiquantifizierung flüchtiger Sekundärprodukte, die sich beim Erhitzen von Erdnussöl unter Erdnussröstbedingungen bildeten, wurden 50 g natives, raffiniertes Erdnussöl in einen 500 ml Dreihalskolben eingewogen. Nach der Zugabe von 75  $\mu$ l (jeweils 0,45  $\mu$ mol 1,3-Diethylbenzol und *p*-Xylol) einer internen Standardlösung, bestehend aus jeweils 6 mM 1,3-Diethylbenzol und *p*-Xylol in Dichlormethan, wurde der Kolben im vorgeheizten Ölbad für 20 min auf 170 °C erhitzt. Die Temperaturkontrolle des Öls erfolgte mittels Thermometer. Nach Erreichen der Temperatur wurden die entstandenen flüchtigen Sekundärprodukte mit Hilfe eines angelegten sanften Luftstroms in eine Gaswaschflasche, die mit 100 ml Dichlormethan gefüllt war, eingeleitet. Im Anschluss wurde das Dichlormethan am Rotationsverdampfer bei 46 °C unter Atmosphärendruck auf ein Volumen von 5 ml eingengt und hiervon ein Aliquot zur GC-MS-Messung mit nachfolgenden Parametern eingesetzt. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und Fragmentmuster entsprechender Standardsubstanzen.

Anlage	GC-MS, Agilent, Böblingen	
Säule	HP-5MS Kapillarsäule (30,0 m x 0,25 mm ID, 0,25 $\mu$ m Filmdicke) mit Zebtron Z-guard Vorsäule (deaktiviert, 5,0 m x 0,25 mm ID), Agilent	
Injektor	Temperatur	250 °C
	Injektionsvolumen	1 $\mu$ l
	Modus	pulsed splitless
Auxiliarytemperatur	250 °C	
Trägergas	Helium	
	Modus	constant flow
Fluss	1,0 ml/min	
Detektor	MS, Scan-Modus	
	Detektionsbereich	m/z 30 - 300
	Solvent delay	5 min
Ionisierung	electron impact, 70 eV	
	Temperatur Quelle	150 °C
	Temperatur Quadrupol	230 °C

Säulenofen	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]
	40	0	9
	61	3	3
	76	3	0
	90	6	0
	110	20	1
	300	30	0
post run time: 3 min bei 300 °C			

Die Semiquantifizierung der Analyten erfolgte über die Berechnung der relativen Peakflächenanteile mit den zugehörigen internen Standards (vgl. Tab. 25) durch Verhältnisbildung der Analytpeakfläche  $A_{Analyt}$  und der Gesamtpeakfläche  $A_{gesamt}$  aller Analyten entsprechend nachfolgender Gleichung.

$$\text{relativer Peakflächenanteil [\%]} = \frac{A_{Analyt}}{A_{gesamt}} \cdot 100 \%$$

Tab. 25 Semiquantifizierung flüchtiger Sekundärprodukte - Analyten und zugehörige interne Standards

Interner Standard mit Siedebereich <sup>1)</sup>	Ausgewertete Analyten
<i>p</i> -Xylol, 137 - 138 °C	Hexanal, 2-Hexenal, Heptanal
1,3-Diethylbenzol, 180 - 181 °C	2-Heptenal, Octanal, Nonanal

<sup>1)</sup> Siedebereiche wurden den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnommen (Sigma-Aldrich, 2012)

### 3.10.13 Quantifizierung von Malondialdehyd

Die Quantifizierung von Malondialdehyd erfolgte modifiziert in Anlehnung an eine von Fenaille et al. (2001) publizierte Methode zur Bestimmung von MDA in Milchpulver im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Meike Deuber (Deuber, 2015). Die Quantifizierung erfolgte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von MDA-d<sub>2</sub> als internen Standard.

#### Freisetzung von MDA und MDA-d<sub>2</sub>

Die Freisetzung von MDA aus 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) erfolgte durch Vorlage von 25 mg TMP in einen 10 ml Rundkolben und Zugabe von 6,0 ml 0,1 M HCl. Die Hydrolyse erfolgte im Wasserbad bei 40 °C für 40 min. Die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration des MDA erfolgte im Anschluss photometrisch bei  $\lambda = 245$  nm unter Verwendung des

Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 13700 \text{ l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$  nach Esterbauer et al. (1991). Die Freisetzungsraten betragen hierbei in der Regel 100 %.

Die Freisetzung von MDA-d<sub>2</sub> aus 1,1,3,3-Tetraethoxypropan-d<sub>2</sub> (TEP-d<sub>2</sub>) und die Bestimmung der tatsächlichen Konzentration erfolgten analog unter Vorlage von 9 mg TEP-d<sub>2</sub> und Hydrolyse mit 2,0 ml 0,1 M HCl.

#### **Extraktion**

Von den zerkleinerten Erdnussproben wurden jeweils 1,0 g in 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50  $\mu\text{l}$  (800 nmol) einer entsprechend verdünnten MDA-d<sub>2</sub>-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 4,0 ml Reinstwasser und 300  $\mu\text{l}$  einer 3,2 %igen BHT-Lösung wurde mittels Ultra-Turrax für 1 min bei 11200 U/min homogenisiert. Die BHT-Lösung wurde hierbei durch Lösen von 1,6 g BHT in 50 ml Hexan hergestellt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g und 4 °C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und der Rückstand ein zweites Mal analog extrahiert.

Von den Erdnussölproben wurden ebenfalls jeweils 1,0 g in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 50  $\mu\text{l}$  einer entsprechend verdünnten MDA-d<sub>2</sub>-Lösung (23 nmol) versetzt. Nach Vortexen für 1 min wurden 2,0 ml Reinstwasser und 150  $\mu\text{l}$  der 3,2 %igen BHT-Lösung zugegeben. Die Extraktion erfolgte durch Vortexen für 1 min. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 x g und 4 °C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Extraktion ein zweites Mal analog wiederholt. Zur Entfernung verbleibender Fettrückstände wurde die wässrige Phase im Anschluss filtriert (Whatman 595 ½).

#### **Derivatisierung**

Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes wurden 25 mg (Pentafluorphenyl)hydrazin (PFPH) in 50 ml Reinstwasser im Ultraschallbad gelöst. Zur Derivatisierung wurden die wässrigen Extrakte der Proben mit jeweils 1,0 ml des Derivatisierungsreagenzes versetzt und kurz geschüttelt. Die Derivatisierung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die wässrigen Phasen drei Mal mit jeweils 1,0 ml Hexan extrahiert. Bei den Erdnussproben wurde nach jeder Hexanzugabe für 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Bei den Ölproben wurde nur nach der letzten Hexanzugabe für 5 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Vereinigung der jeweiligen Hexanphasen wurden diese im Stickstoffstrom bei 35 °C getrocknet, der Rückstand in 0,5 ml Hexan aufgenommen und durch Zugabe einer Spatelspitze Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet.

#### **GC-MS (EI)**

Nach Membranfiltration (0,45  $\mu\text{m}$ ) wurde ein Aliquot zur GC-MS (EI)-Messung entsprechend den unter Kap. 3.10.12 angegebenen Parametern eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die SIM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 26).

Säule	TR-FFAP (30,0 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA		
Detektor	MS, SIM-Modus		
	Solvent delay	6,5 min	
Säulenofen	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]
	50	0	3
	260	20	0
	post run time: 3 min bei 240 °C		

Tab. 26 MDA-Quantifizierung - Quantifier- und Qualifier-Ionen

Analyt	Zeitfenster [min]	Quantifier-Ion [m/z]	Qualifier-Ion [m/z]	Dwell time [ms]
MDA-PFPH	6,5 - 16,5	234	117	100
MDA-d <sub>2</sub> -PFPH	6,5 - 16,5	236	117	100

Die Kalibrierungen erfolgten getrennt für die Erdnuss- und Erdnussölproben. Im ersten Fall wurden 8,0 ml Reinstwasser und im zweiten Fall 4,0 ml Reinstwasser in 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, der interne Standard analog der jeweiligen Probenaufarbeitung sowie die benötigte Menge an MDA-Lösung zugesetzt. Die Verdünnung der MDA-Stammlösung erfolgte hierbei unter Verwendung von Reinstwasser. Die Derivatisierung wurde analog den Proben durchgeführt. Der Kalibrierbereich lag im Falle der Erdnussproben im Bereich von 0,02-4,5 mM MDA und bei den Erdnussölproben im Bereich von 2,5-750 µM MDA.

### 3.10.14 Quantifizierung von Acrolein

Die Quantifizierung von Acrolein erfolgte in Anlehnung an die in Kap. 3.10.13 beschriebene Methode zur Quantifizierung von MDA im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Meike Deuber (Deuber, 2015). Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung von (*E*)-But-2-enal als internem Standard, der sich von Acrolein durch eine zusätzliche Methylengruppe unterscheidet. But-2-enal entsteht natürlicherweise im Zuge der LPO. Deshalb konnte es in geringen Mengen im Bereich von 1-2 % der zugesetzten Stoffmenge an 2-Butenal in den Proben nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde jede Probe zusätzlich ohne Zugabe des internen Standards aufgearbeitet und die Peakfläche des internen Standards in der jeweiligen Probe um diese Peakfläche korrigiert.

#### **Extraktion**

Die wässrige Extraktion der Erdnuss- und Erdnussölproben erfolgte nach Kap. 3.10.13. Den Erdnussproben wurden dabei zuvor jeweils 20 µl (241 nmol) einer in Reinstwasser verdünnten

Lösung des internen Standards zugegeben und den Erdnussölproben 20 µl (48 nmol) einer entsprechend verdünnten Lösung. Nach der Extraktion wurden die wässrigen Extrakte der Erdnussproben membranfiltriert (0,2 µm) und die wässrigen Extrakte der Erdnussölproben analog Kap. 3.10.13 filtriert (Whatman 595 ½).

### Derivatisierung

Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes wurden 200 mg o-(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)hydroxylaminhydrochlorid (PFBHA-HCl) in 10,0 ml Reinstwasser im Ultraschallbad gelöst. Zur Derivatisierung wurden die wässrigen Extrakte der Proben mit jeweils 300 µl des Derivatisierungsreagenzes versetzt und kurz geschüttelt. Die Derivatisierung erfolgte für 1 h bei 37 °C im Wasserbad. Die nachfolgende Hexanextraktion und Trocknung erfolgte wie unter Kap. 3.10.13 beschrieben. Die Rückstände wurde anschließend in 500 µl Hexan aufgenommen.

### GC-MS (EI)

Nach Membranfiltration (0,45 µm) wurde ein Aliquot zur GC-MS (EI)-Messung entsprechend den in Kap. 3.10.12 angegebenen Parametern eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die SIM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 27).

Säule	ZB-5 Guardian Kapillarsäule (30,0 m + 5,0 m Vorsäule x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke), Phenomenex, Torrance, CA, USA		
Detektor	MS, SIM-Modus		
	Solvent delay	8 min	
Säulenofen	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]
	50	0	3
	300	20	0
	post run time: 3 min bei 300 °C		

Tab. 27 Acrolein-Quantifizierung - Quantifier- und Qualifier-Ionen

Analyt	Zeitfenster [min]	Quantifier-Ion [m/z]	Qualifier-Ion [m/z]	Dwell time [ms]
Acrolein-PFBHA (anti + syn)	8,0 - 9,0	181	251	100
But-2-enal-PFBHA (anti + syn)	9,0 - 18,5	181	265	100

Die Quantifizierungen erfolgten für die Erdnuss- und Erdnussölproben über dieselbe Kalibrierung. Hierzu wurden 4,0 ml Reinstwasser in 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, 20 µl (48 nmol) einer entsprechend verdünnten Lösung des internen Standards sowie die benötigte Stoffmenge an Acrolein-Lösung zugesetzt. Zur Verwendung kam hierfür eine stabilisierte Acroleinstandardlösung (90 %ig, 16,6 M,  $\rho_{25^\circ\text{C}} = 0,839 \text{ g/ml}$ , laut Sicherheits-

datenblatt). Die Verdünnungen der Acrolein- und But-2-enal-Stammlösungen erfolgten mit Reinstwasser. Die Derivatisierung wurde analog den Proben durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 3-1200  $\mu\text{M}$  Acrolein. Im Falle der Erdnussproben wurde die abgewichene Zugabe an internem Standard rechnerisch berücksichtigt.

### 3.10.15 Quantifizierung von 4-HNE

#### **Extraktion**

Die Quantifizierung von 4-HNE in Erdnussöl, Erdnüssen und LDL erfolgte über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung des hierfür dargestellten internen Standards 4-HNE-DMA- $\text{d}_2$  (Kap. 3.9.2). Die Freisetzung aus dem Dimethylacetal erfolgte nach Kapitel 3.9.2. Die Quantifizierung von 4-HNE in den LDL-Proben wurde im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Karl Schaller (Schaller, 2015) durchgeführt.

In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 1,0 g der Erdnussölproben oder der zerkleinerten Erdnüsse eingewogen. Nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  einer internen Standardlösung von 4-HNE- $\text{d}_2$  in Hexan (95 nmol) sowie 10 ml einer 0,1 %igen Ascorbinsäurelösung (m/v), wurden die Proben für 2 min bei 11200 U/min mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Im Anschluss wurden die Proben für 10 min bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Extraktion wurde ein zweites Mal nach Zugabe von 10 ml der 0,1 %igen Ascorbinsäurelösung (m/v) wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden drei Mal mit jeweils 10 ml Dichlormethan für jeweils 1 min durch Schütteln extrahiert und die organischen Phasen jeweils durch Zentrifugation für 2 min bei 10000 x g und 4 °C abgetrennt. Die vereinigten organischen Phasen wurden filtriert (Whatman, 595  $\frac{1}{2}$ ) und das Lösungsmittel bei 30 °C mittels Stickstoffstrom evaporiert.

#### **Derivatisierung**

Der erste Derivatisierungsschritt erfolgte mit PFBHA-HCl. Hierzu wurden 200  $\mu\text{l}$  einer 20 mg/ml PFBHA-HCl-Lösung in Wasser (m/v) den evaporierten Proben zugegeben und im Wasserbad für 1 h bei 40 °C erhitzt. Von den LDL-Proben wurde ein Aliquot, 250  $\mu\text{g}$  Protein enthaltend, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 200  $\mu\text{l}$  der PFBHA-HCl-Lösung, 250  $\mu\text{l}$  einer 2 mM EDTA-Lösung und 750  $\mu\text{l}$  einer BHT-Lösung in Methanol (50  $\mu\text{g}$  BHT/ml Methanol) in Anlehnung an van Kuijk et al. (1995) versetzt. Nach Zugabe von 0,25 nmol 4-HNE- $\text{d}_2$  wurde mittels Vortexer homogenisiert und anschließend analog den Erdnuss- und Erdnussölproben im Wasserbad erhitzt. Im Anschluss wurden zu den Erdnuss-, Erdnussöl- und LDL-Proben jeweils 1,3 ml Hexan zugegeben und die Proben mittels Vortexer homogenisiert. Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  konzentrierter Schwefelsäure entsprechend van Kuijk et al. (1995)

wurden die Proben erneut mittels Vortexer homogenisiert und für 3 min bei 2300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Hexanphasen wurden daraufhin abgenommen und durch Zugabe einer Spatelspitze wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, membranfiltriert (0,45 µm) und bei 30 °C mittels Stickstoffstrom evaporiert.

Der zweite Derivatisierungsschritt erfolgte mit N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA). Hierzu wurden jeweils 200 µl BSTFA zu den evaporierten Proben pipettiert und für 3 h bei Raumtemperatur derivatisiert.

### GC-MS (EI)

Ein Aliquot wurde zur GC-MS-Messung mit den unter Kap. 3.10.12 aufgeführten Parametern eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die SIM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 28).

Säule	ZB-5 Guardian Kapillarsäule (30,0 m + 5,0 m Vorsäule x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke), Agilent, Böblingen		
Detektor	MS, SIM-Modus		
	Solvent delay	10 min	
Säulenofen	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/min]	Haltezeit [min]
	100	0	4
	300	15	0
	post run time: 3 min bei 300 °C		

Tab. 28 4-HNE-Quantifizierung - Quantifier- und Qualifier-Ionen

Analyt	Zeitfenster [min]	Quantifier-Ion [m/z]	Qualifier-Ion [m/z]	Dwell time [ms]
4-HNE-PFBO-TMS (anti + syn)	10,0 - 17,3	242	352	80
4-HNE-d <sub>2</sub> -PFBO-TMS (anti + syn)	10,0 - 17,3	244	352	80

Die Quantifizierungen erfolgten jeweils im Bereich von 5-1500 µM 4-HNE unter Verwendung von 4-HNE in Hexan, welches zuvor aus 4-HNE-DMA nach Kap. 3.9.1 freigesetzt wurde. Im Falle der Kalibrierung des 4-HNE-Gehalts in den Erdnuss- und Erdnussölproben wurden jeweils 95 nmol 4-HNE-d<sub>2</sub> in Hexan, beziehungsweise zur Kalibrierung des 4-HNE in den LDL-Proben, jeweils 0,25 nmol 4-HNE-d<sub>2</sub> zu den Kalibrierpunkten pipettiert. Nach Evaporieren des Lösungsmittels wurde analog den Proben derivatisiert.

### 3.10.16 Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin

Die Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin erfolgte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse in den Erdnussproben sowie in den nach Kap. 3.6 mit Hexanal modifizierten Erdnussprotein-extraktproben nach Aufreinigung über Festphasenextraktion (SPE) an C-18-Material (Strata C18-E, 500 mg/3 ml, Phenomenex), (Tab. 29). Auf Grund der Instabilität, der aus der Reaktion der ε-Aminogruppe des Lysins und Hexanal hervorgehenden Schiff'schen Base, erfolgte vor der salzsauren Hydrolyse nach Kap. 3.10.5.1 eine Reduktion nach Kap. 3.10.8. und die Quantifizierung anschließend in Form des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin. Im Falle der Erdnussproben wurden die reduzierten Hydrolysate vollständig an der Wasserstrahlpumpe bei 40 °C einrotiert, in 3,0 ml Reinstwasser und 200 µl interner Standardlösung N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> (300 mg/ml Reinstwasser) gelöst. Im Falle der Inkubationsproben wurde entsprechend Kap. 3.6, Tab. 11 verfahren. Die erhaltenen Lösungen wurden entsprechend Tab. 29 mittels Festphasenextraktion aufgereinigt.

Tab. 29 Durchführungsschema für die Festphasenextraktion zur Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin

Arbeitsschritt	Aufgabe auf SPE-Kartusche
Konditionierung	5 ml Methanol 5 ml Reinstwasser
Probenaufgabe	reduziertes Hydrolysat, Probengefäß zwei Mal mit jeweils 0,5 ml Reinstwasser nachgespült
Waschen	5 ml Reinstwasser
Elution	5 ml 1 M HCl in Methanol (Grüssing)

Die Elution erfolgte hierbei in Zentrifugenröhrchen (10 ml). Das Lösungsmittel wurde am Evaporator bei 30 °C mittels Stickstoffstrom abgedampft, die Rückstände in 0,2 ml Methanol und 0,1 ml Reinstwasser aufgenommen, membranfiltriert (0,45 µm) und entsprechend nachfolgender Parameter zur Messung eingesetzt (Tab. 30, Tab. 31).

Anlage	LC-ESI-MS/MS, Agilent, Böblingen	
Säule	Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm), Agilent, Böblingen	
Säulentemperatur	30 °C	
Injektionsvolumen	Erdnussproben	60 µl
	Inkubationsproben	5 µl
Detektion	MS/MS	
	Modus	MRM, positive mode
	Gastemperatur	300 °C
	Gasfluss	11 l/min
	Zerstäuberdruck	15 psi

Flussrate	0,25 ml/min
Fließmittel	A: 11 mM Essigsäure und 2 mM Heptafluorbuttersäure in Wasser B: 11 mM Essigsäure und 2 mM Heptafluorbuttersäure in Acetonitril
Trennprogramm	

Tab. 30 Trennprogramm N<sup>ε</sup>-Hexyllysin mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	2
5	2
22	90
28	90
29	2
36	2

Tab. 31 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin

Parameter	N <sup>ε</sup> -Hexyllysin	N <sup>ε</sup> -Hexyllysin-d <sub>12</sub>
Zeitfenster [min]	9,0 - 19,0	
Quantifier Übergang [m/z]	231,1→84,1	243,3→84,1
Fragmentorspannung [V]	125	125
Kollisionsspannung [eV]	24	24
Dwell time [ms]	100	100
Qualifier Übergang [m/z]	231,1→130,1	243,3→130,1
Fragmentorspannung [V]	125	125
Kollisionsspannung [eV]	12	12
Dwell time [ms]	100	100

Die Kalibrierung erfolgte im Falle der Erdnussproben im Bereich von 5-120 nM und im Falle der Inkubationsproben im Bereich von 0,07-15 µM unter Einstellung der gleichen Konzentration an internem Standard N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> in den Kalibrierpunkten, die auch in den Proben vorlag.

### 3.10.17 Quantifizierung von LHP 1 und LHP 2

Die Quantifizierung von LHP 1 und LHP 2 erfolgte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse in den Erdnussproben sowie in den nach Kap. 3.6 mit Hexanal modifizierten Erdnussprotein-extraktproben. Hierzu wurden zunächst jeweils 1,0 ml der nach Kap. 3.10.5 erhaltenen salzsauren Hydrolysate am Vakuumkonzentrator bei 37 °C eingengt. Die Erdnussproben

wurden im Anschluss in 50 µl Methanol, 150 µl Reinstwasser und 50 µl des internen Standards LHP-d<sub>29</sub>, der sowohl LHP 1-d<sub>29</sub> als auch LHP 2-d<sub>29</sub> enthielt (Mischfraktion, siehe Kap. 3.9.5, ca. 250 pmol/ml Reinstwasser), gelöst. Im Falle der Inkubationsproben wurde der Blindwert analog gelöst, die modifizierten Proben allerdings verdünnt. Hierzu wurden diese zunächst in 100 µl Methanol und 400 µl Reinstwasser gelöst. Von dieser Lösung wurden 50 µl mit 50 µl Methanol, 100 µl Reinstwasser und 50 µl interner Standardlösung versetzt. Nach Membranfiltration (0,45 µm) wurden die Proben entsprechend den in Kap. 3.10.16 angegebenen Parametern zur Messung eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die MRM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 32, Tab. 33).

Injektionsvolumen 60 µl

Trennprogramm

Tab. 32 Trennprogramm LHP 1 und LHP 2 mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	2
5	2
22	51
24	90
30	90
31	2
37	2

Tab. 33 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von LHP 1 und LHP 2

Parameter	LHP 1	LHP-d <sub>29</sub>	LHP 2
Zeitfenster [min]	16,0 - 19,9		19,9 - 23,0
Quantifier Übergang [m/z]	391,3→262,3	420,5→291,4	391,3→262,3
Fragmentorspannung [V]	136	136	129
Kollisionsspannung [eV]	25	25	28
Dwell time [ms]	100	100	100
Qualifier Übergang [m/z]	391,3→84,1	420,5→84,1	391,3→84,1
Fragmentorspannung [V]	136	136	129
Kollisionsspannung [eV]	39	39	39
Dwell time [ms]	100	100	100

Die Kalibrierung erfolgte im Falle der Erdnussproben für LHP 1 im Bereich von 0,1-3,5 nM. Im Falle der Inkubationsproben erfolgte die Quantifizierung des LHP 2 ebenfalls über die LHP 1-Kalibrierung im Bereich von 0,004-80 µM. In den Kalibrierpunkten wurde dabei jeweils

die gleiche Konzentration an internem Standard LHP-d<sub>29</sub> eingestellt, die auch in den Proben vorlag.

### 3.10.18 Quantifizierung von (*Z*)- und (*E*)-BPP

Die Quantifizierung von (*Z*)- und (*E*)-BPP erfolgte in den nach Kap. 3.6 mit (*E*)-2-Heptenal modifizierten Erdnussproteinextraktproben. Hierzu wurden 1,0 ml der nach Kap. 3.10.5 erhaltenen salzsauren Hydrolysate am Vakuumkonzentrator bei 37 °C eingengt und in 250 µl Reinstwasser, 200 µl Methanol und 50 µl (1,5 pmol) des internen Standards N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin mit einer Konzentration von 30,6 nM in Methanol:Reinstwasser (50:50, v/v) gelöst. Nach Membranfiltration (0,45 µm) wurden die Proben entsprechend den in Kap. 3.10.16 angegebenen Parametern zur Messung eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die MRM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 34).

Injektionsvolumen 10 µl

Trennprogramm entsprach Kap. 3.10.17, Tab. 32

Tab. 34 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von (*Z*)- und (*E*)-BPP

Parameter	N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin	( <i>Z</i> )-BPP	( <i>E</i> )-BPP
Zeitfenster [min]	18,0 - 20,1	20,1 - 21,0	21,0 - 23,5
Quantifier Übergang [m/z]	327,1→166,1	333,3→204,2	333,3→204,2
Fragmentorspannung [V]	80	133	134
Kollisionsspannung [eV]	4	21	21
Dwell time [ms]	300	100	100
Qualifier Übergang [m/z]	327,1→105,1	333,3→84,1	333,3→84,1
Fragmentorspannung [V]	80	133	134
Kollisionsspannung [eV]	32	33	30
Dwell time [ms]	300	100	100

Die Quantifizierungen für (*Z*)- und (*E*)-BPP erfolgten jeweils im Bereich von 0,02-25 µM über eine Matrixkalibrierung. Hierzu wurde analog den Proben das nicht inkubierte Erdnussproteinextrakt, in welchem die beiden Lipierungsprodukte nicht nachweisbar waren, sauer hydrolysiert. Nach Einengen, Lösen analog den Proben, Zusatz der entsprechenden Stoffmengen an (*Z*)- und (*E*)-BPP sowie Einstellung, der den Proben entsprechenden Konzentration an internem Standard, wurden die Kalibrierpunkte nach Membranfiltration (0,45 µm) zur Messung eingesetzt.

### 3.10.19 Quantifizierung von MP-Lysin

Die Quantifizierung von MP-Lysin erfolgte in den Erdnussproben, den nach Kap. 3.6 mit Acrolein modifizierten Erdnussproteinextraktproben sowie den LDL-Proben mittels Matrixkalibrierung.

Die nach Kap. 3.10.5 erhaltenen eingeeengten salzsauren Hydrolysate wurden jeweils in 130  $\mu$ l Fließmittel A, 150  $\mu$ l Fließmittel B und 20  $\mu$ l (3,0 pmol) einer 150 nM internen Standardlösung N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin in Methanol:Reinstwasser (50:50, v/v) gelöst. Nach Membranfiltration (0,45  $\mu$ m) wurden die Proben entsprechend den in Kap. 3.10.16 angegebenen Parametern zur Messung eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die MRM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 35, Tab. 36).

Säule	Eurospher 100-5 C18 (250 x 3,0 mm) , Knauer, Berlin	
Injektionsvolumen	Erdnussproben	50 $\mu$ l
	Inkubationsproben	35 $\mu$ l
Flussrate	0,38 ml/min	
Fließmittel	A: 10 mM Nonafluorpentansäure in Wasser	
	B: 10 mM Nonafluorpentansäure in Acetonitril	
Trennprogramm		

Tab. 35 Trennprogramm MP-Lysin mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	2
20	27
25	90
35	90
37	2
32	2

Die Kalibrierung erfolgte für die Erdnussproben im Bereich von 2-2000 nM über eine Matrixkalibrierung. Hierzu wurden analog den Erdnussproben jeweils 1,0 ml des erhaltenen salzsauren Probenhydrolysats der nativen Erdnüsse eingeeengt und unter Zusatz der entsprechenden Stoffmengen an MP-Lysin analog den Proben aufgearbeitet. Im Falle der modifizierten Erdnussproteinextraktproben erfolgte die Kalibrierung im Bereich von 2-3400 nM ebenfalls über eine Matrixkalibrierung. Hierzu wurde jeweils 1,0 ml des salzsauren Hydrolysats des nativen Erdnussproteinextrakts eingeeengt und unter Zusatz der entsprechenden Stoffmengen an MP-Lysin analog den Proben aufgearbeitet. Nach Membranfiltration wurden die Kalibrierpunkte zur Messung eingesetzt. Die Kalibrierung der LDL-Proben erfolgte im Bereich von

10-300 nM. Für die Matrixkalibrierung wurde eine den Proben entsprechende Proteinmenge nLDL zur salzsauren Hydrolyse eingesetzt und nach Zugabe der entsprechenden Stoffmengen an MP-Lysin analog den Proben aufgearbeitet. Da in den nativen Erdnuss- und nLDL-Proben MP-Lysin nachweisbar war, erfolgte eine rechnerische Korrektur der Kalibrierung.

Tab. 36 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von MP-Lysin

Parameter	N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin	MP-Lysin
Zeitfenster [min]	20,0 - 32,0	20,0 - 32,0
Quantifier Übergang [m/z]	327,1→166,1	223,1→84,1
Fragmentorspannung [V]	90	129
Kollisionsspannung [eV]	4	11
Dwell time [ms]	200	100
Qualifier Übergang [m/z]	327,1→105,1	223,1→94,1
Fragmentorspannung [V]	90	129
Kollisionsspannung [eV]	34	20
Dwell time [ms]	200	100

### 3.10.20 Quantifizierung von 2-PPL

Die Quantifizierung von 2-PPL erfolgte in den Erdnuss-, den nach Kap. 3.6 mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteinextrakt- und den LDL-Proben. Auf Grund der Säurestabilität erfolgte die Freisetzung aus dem Proteinverband enzymatisch nach Kap. 3.10.5.

Im Falle der Erdnussproben wurde auf Grund der geringen 2-PPL-Gehalte ein dreifacher enzymatischer Ansatz gewählt. Hierzu wurden 35 mg der Erdnussproben zur enzymatischen Hydrolyse nach Kap. 3.10.5 eingesetzt und jeweils mit den dreifachen Volumina an Puffern und Enzymlösungen versetzt. Die gefriergetrockneten Hydrolysate wurden jeweils in 250 µl Reinstwasser, 80 µl Methanol und 20 µl (0,2 pmol) einer 10 nM internen Standardlösung N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin in Methanol:Reinstwasser (50:50, v/v) gelöst.

Die Quantifizierungen in den mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteinextraktproben erfolgten im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Diana Kaden (Kaden, 2015) mit dem einfachen enzymatischen Ansatz. Die Lyophilisate wurden zunächst in 400 µl Reinstwasser und 100 µl Methanol gelöst. Anschließend wurde die 0,1:1-Probe 100-fach und die übrigen Proben 500-fach mit Reinstwasser:Methanol (80:20, v/v) inklusive 40 µl (6 pmol) einer 150 nM internen Standardlösung auf ein Endvolumen von 2,0 ml verdünnt. Der Blindwert wurde in 390 µl Reinstwasser, 100 µl Methanol und 10 µl interner Standardlösung gelöst.

Die Quantifizierungen in den LDL-Proben erfolgten im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Karl Schaller (Schaller, 2015) mit dem einfachen enzymatischen Ansatz. Von den LDL-Proben wurden Probenvolumina in die Rollrandschnappdeckelgläser vorgelegt, die 2,5 mg LDL-Protein enthielten, und gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden mit 238  $\mu$ l Reinstwasser, 50  $\mu$ l Methanol und 12  $\mu$ l (0,74 pmol) einer 61,3 nM internen Standardlösung versetzt und durch Vortexen homogenisiert.

Nach Membranfiltration (0,45  $\mu$ m) wurden die Proben entsprechend den in Kap. 3.10.16 angegebenen Parametern zur Messung eingesetzt. Davon abgewichene Parameter sowie die MRM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 37).

Injektionsvolumen	Erdnussproben	60 $\mu$ l
	Inkubationsproben	40 $\mu$ l
	LDL-Proben	50 $\mu$ l
Trennprogramm	entsprach Kap. 3.10.17, Tab. 32	

Tab. 37 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von 2-PPL

Parameter	N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin	2-PPL
Zeitfenster [min]	15,5 - 20,6	20,6 - 28,0
Quantifier Übergang [m/z]	327,1 $\rightarrow$ 166,1	267,2 $\rightarrow$ 204,2
Fragmentorspannung [V]	90	148
Kollisionsspannung [eV]	4	18
Dwell time [ms]	300	100
Qualifier Übergang [m/z]	327,1 $\rightarrow$ 105,1	267,2 $\rightarrow$ 84,1
Fragmentorspannung [V]	90	148
Kollisionsspannung [eV]	34	29
Dwell time [ms]	300	100

Die Kalibrierung erfolgte für die Erdnussproben im Bereich von 10-170 nM und für die Inkubationsproben im Bereich von 10-900 nM über eine Matrixkalibrierung. Hierzu wurden die nativen Erdnüsse, beziehungsweise das nicht inkubierte, native Erdnussproteinextrakt, in denen jeweils kein 2-PPL nachweisbar war, analog den Proben enzymatisch hydrolysiert. Nach Lösen, entsprechend der Proben, erfolgte der Zusatz der benötigten Stoffmenge an 2-PPL sowie die Einstellung, der den Proben entsprechenden Konzentration an internem Standard. Nach Membranfiltration wurden die Kalibrierpunkte zur Messung eingesetzt. Im Falle der LDL-Proben wurde, da es sich um ausblickende Untersuchungen handelte, ohne Matrix im Bereich von 7-60 nM kalibriert.

3.10.21 Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-(2-Furoylmethyl)lysin (Furosin)

Die Quantifizierung des Amadori-Produkts N<sup>ε</sup>-Fruktoselysin in den Erdnussproben erfolgte nach salzsaurer Hydrolyse (3.10.5) in Form des dabei entstandenen N<sup>ε</sup>-(2-Furoylmethyl)lysin (Furosin) in Anlehnung an Resmini et al. (1990). Nach Aufreinigung über Festphasenextraktion (SPE) an C-18-Material (GracePure™ SPE C18-Max 500 mg/3 ml) erfolgte die Detektion mittels RP-HPLC-DAD. Das Durchführungsschema ist in Tab. 38 dargestellt. Das tatsächlich eluierte Volumen wurde durch Differenzwägung der Eluat-Vials vor und nach der Elution unter Einbeziehung der Dichte von 3 M HCl  $\rho = 1,05 \text{ g/ml}$  (Kaltofen et al., 1969) berechnet. Die Kalibrierung erfolgte mit kommerziell erhältlichem Furosin-Dihydrochlorid. Die Konzentration der hergestellten Stammlösung (ca. 40 nmol/ml) wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz nach photometrischer Messung bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon = 15316 \text{ l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$  berechnet. Die Umrechnung von Furosin in das Amadori-Produkt N<sup>ε</sup>-Fruktoselysin erfolgte durch Multiplikation der Stoffmenge an Furosin mit dem Faktor 3,1 nach Krause et al. (2003).

Tab. 38 Durchführungsschema für die Festphasenextraktion zur Furosin-Quantifizierung

Arbeitsschritt	Aufgabe auf SPE-Kartusche
Konditionierung	5 ml Methanol 10 ml Reinstwasser
Aufgabe Hydrolysat	0,5 ml
Elution	stufenweise mit 3 M HCl: 0,5 ml + 0,5 ml + 1,0 ml + 1,0 ml

Im Anschluss wurden jeweils 1,5 ml der Eluate im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingengt, in 0,5 ml Fließmittel A aufgenommen, membranfiltriert (0,45  $\mu\text{m}$ ) und entsprechend nachfolgender Parameter (Tab. 39) zur Messung eingesetzt. Die Kalibrierung erfolgte extern im Bereich von 1-20 nmol/ml.

Anlage	HPLC-DAD, analytisch, Knauer, Berlin
Säule	furosine dedicated column, 5 $\mu\text{m}$ (4,6 x 250 mm), mit Vorsäule, Grace Davison Discovery Sciences, Alltech Grom GmbH, Rottenburg-Hailfingen
Säulentemperatur	33 °C
Injektionsvolumen	20 $\mu\text{l}$
Detektion	280 nm
Flussrate	1,2 ml/min
Fließmittel	A: 0,4 % Essigsäure in Reinstwasser (v/v) B: 0,3 % Kaliumchlorid in FM A (m/v)

## Trennprogramm

Tab. 39 Trennprogramm Furosin mittels HPLC-DAD

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	0
15,5	0
22,5	50
25	50
27	0
34	0

### 3.10.22 Quantifizierung von 6-(2-Formyl-5-hydroxymethylpyrrol-1-yl)-L-norleucin (Pyrralin)

Die Quantifizierung von Pyrralin in den Erdnussproben erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse (3.10.5) in Anlehnung an Förster et al. (2005). Die Kalibrierung erfolgte über einen im Arbeitskreis synthetisierten Pyrralin-Standard. Die Konzentration der hergestellten Stammlösung (ca. 40 nmol/ml) wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz nach photometrischer Messung bei  $\lambda = 297$  nm unter Einbeziehung des Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon = 14454,4 \text{ l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$  berechnet. Die gefriergetrockneten enzymatischen Hydrolysate wurden in 0,5 ml des Fließmittels gelöst, membranfiltriert (0,45  $\mu\text{m}$ ) und entsprechend nachfolgender Parameter zur Messung eingesetzt.

Anlage	HPLC-DAD, analytisch, Knauer, Berlin
Säule	Eurospher 100-5 C18, (125 x 4,6 mm), mit Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur	30 °C
Injektionsvolumen	20 $\mu\text{l}$
Detektion	297 nm
Flussrate	1,6 ml/min
Fließmittel	7,5 mM Natriumpentansulfonat in 10 % Ethanol, pH 3,0, eingestellt mit Propionsäure
Trennprogramm	isokratisch, t = 28 min

Die Kalibrierung erfolgte extern im Bereich von 1,5-12 nmol/ml.

### 3.10.23 Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyl-L-lysin (CML)

Die Quantifizierung von CML in den Erdnussproben erfolgte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse nach Delatour et al. (2009) und Hegele et al. (2008) nach Reduktion, salzsaurer Hydrolyse und Aufreinigung über Festphasenextraktion (SPE) an Waters Oasis HLB 6cc (200 mg) Kartuschen. Folgende Lösungen wurden benötigt:

Trispuffer, pH 8,2	24,2 g Tris auf 100 ml mit Reinstwasser aufgefüllt
Probenpuffer	37,6 ml 0,02 M HCl, 11,7 ml Trispuffer, 0,7 ml Reinstwasser

Hierzu wurden jeweils 1,0 ml des nach Kap. 3.10.8 erhaltenen salzsauren Hydrolysats im Vakuumkonzentrator bei 37 °C zur Trockene eingengt und im Anschluss in 750 µl Probenpuffer aufgenommen. Zu 345 µl dieser Lösung wurden 20 µl (194 pmol) interne Standardlösung CML-d<sub>2</sub> (9,7 µM), 100 µl Nonafluorpentansäure (NFPA) und 1035 µl Reinstwasser zugegeben und zur SPE nach Tab. 40 eingesetzt. Die Elution erfolgte hierbei in 10 ml Zentrifugenröhrchen.

Tab. 40 Durchführungsschema für die Festphasenextraktion zur CML-Quantifizierung

Arbeitsschritt	Aufgabe auf SPE-Kartusche
Konditionierung	2 ml Methanol
	2 ml Methanol:10 mM NFPA (50:50, v/v)
	2 x 2 ml 10 mM NFPA
Aufgabe Probelösung	vollständig
Waschen	2 x 2 ml 10 mM NFPA
	2 ml Methanol:10 mM NFPA (5:95, v/v)
Elution	2 ml Methanol:10 mM NFPA (50:50, v/v)

Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Evaporator bei 30 °C abgedampft, der Rückstand in 200 µl Fließmittel A aufgenommen, membranfiltriert (0,45 µm) und entsprechend den in Kap. 3.10.18 angegebenen Parametern zur Messung eingesetzt. Davon abgewichene Parameter, sowie die MRM-Parameter sind nachfolgend angegeben (Tab. 41, Tab. 42). Die Kalibrierung erfolgte im Bereich von 20-1000 nM unter Einstellung der gleichen Konzentration an internem Standard CML-d<sub>2</sub> in den Kalibrierpunkten, die auch in den Proben vorlag.

Säulentemperatur	35 °C	
Injektionsvolumen	20 µl	
Detektion	Gastemperatur	350 °C
	Zerstäubedruck	35 psi
Fließmittel	A: 10 mM Nonafluorpentansäure in Wasser	
	B: 10 mM Nonafluorpentansäure in Acetonitril	

## Trennprogramm

Tab. 41 Trennprogramm CML mittels LC-ESI-MS/MS

Zeit [min]	Fließmittel B [%]
0	5
15	50
16	85
21	85
23	5
33	5

Tab. 42 LC-ESI-MS/MS-Parameter zur Quantifizierung von CML

Parameter	CML	CML-d <sub>2</sub>
Zeitfenster [min]	3,0 - 16,0 min	
Quantifier Übergang [m/z]	205,1→130,1	207,1→130,1
Fragmentorspannung [V]	86	86
Kollisionsspannung [eV]	8	8
Dwell time [ms]	200	200
Qualifier Übergang [m/z]	205,1→84,1	207,1→84,1
Fragmentorspannung [V]	86	86
Kollisionsspannung [eV]	8	8
Dwell time [ms]	200	200

### 3.11 Methoden zur Beurteilung des allergenen Potentials

Die Western Blots und ELISAs wurden am Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in Langen im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeiten von Diana Kaden (Kaden, 2015) und Meike Deuber (Deuber, 2015) in Zusammenarbeit mit Dr. Masako Toda und Maren Krause auf Grundlage hausinterner Methoden des PEI durchgeführt.

#### Probenvorbereitung für die Western-Blots und ELISAs

Von den modifizierten Proteinextrakten wurden jeweils Lösungen von 2 mg Protein/ml in PBS-Puffer (siehe Kapitel 3.11.1) hergestellt. Von diesen Lösungen wurden anschließend 500 µl abgenommen und mit PBS-Puffer auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml verdünnt (nicht zentrifugierte Proben). Die Ausgangslösungen wurden nachfolgend für 10 min bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt (zentrifugierte

Proben). Die Kalibrierung erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,02-2,0 mg BSA/ml PBS-Puffer, hergestellt aus einer 2 mg/ml BSA-Stammlösung in PBS-Puffer. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels Mikrotiterplattenlesegerät SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Anschließend wurden die zentrifugierten Proben mit PBS-Puffer auf einen Proteingehalt von 0,5 mg/ml verdünnt.

Die nicht zentrifugierten Proben wiesen somit einen Proteingehalt von 1 mg/ml und die zentrifugierten Proben einen Proteingehalt von 0,5 mg/ml auf.

#### 3.11.1 Western Blots

Nachfolgend sind die für die Durchführung des Western Blots benötigten Reagenzien aufgeführt. Reagenzien, die vom PEI gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt wurden, sind entsprechend gekennzeichnet.

PBS-Puffer, pH 7,1	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in Reinstwasser gelöst, pH-Wert mit 1 M HCl eingestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 1,0 l aufgefüllt
SDS-Lösung, 10 %ig	gebrauchsfertig
Laemmli-Puffer	10 ml SDS-Lösung, 5,0 ml Glycerol, 4,0 ml 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8, gebrauchsfertig), 3,0 ml Reinstwasser und 0,2 % Bromphenolblau gemischt
Trenngelpuffer, pH 8,8	18,2 g Tris in Reinstwasser gelöst, pH-Wert mit 12 M HCl eingestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt
Sammelgelpuffer, pH 6,8	6,1 g Tris in Reinstwasser gelöst, pH-Wert mit 12 M HCl eingestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt
Pyronin Y, 1 %ig	gebrauchsfertig
APS, 10 %ig	gebrauchsfertig
Tris-Glycin-Stammpuffer Laufpuffer	30,2 g Tris und 144 g Glycin in 1,0 l Reinstwasser gelöst 100 ml Tris-Glycin-Stammpuffer und 10 ml SDS-Lösung mit Reinstwasser auf 1,0 l aufgefüllt
Transferpuffer	100 ml Tris-Glycin-Stammpuffer, 1,0 ml SDS-Lösung und 200 ml Methanol mit Reinstwasser auf 1,0 l aufgefüllt
TBS-Puffer, pH 7,4	6,057 g Tris und 8,766 g NaCl in Reinstwasser gelöst, pH-Wert mit 25 %iger HCl eingestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 1,0 l aufgefüllt

Als Molmassenmarker wurde SeeBlue Plus2 prestained verwendet: 4, 6, 17, 22, 30, 42, 60, 148, 250 kDa.

### Probenvorbereitung

Die nicht zentrifugierten Probelösungen wurden 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt, sodass eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml resultierte. Die zentrifugierten Probelösungen wurden direkt eingesetzt. Zur Herstellung der Reduktionslösung wurden 210 µl Laemmli-Puffer mit 7 µl 1 M DTT-Lösung versetzt und damit die Probelösungen für die SDS-PAGE wie folgt hergestellt:

nicht zentrifugierte Proben	12,5 µl Probelösung + 20 µl Laemmli-Puffer + 47,5 µl Reinstwasser
zentrifugierte Proben	2,5 µl Probelösung + 20 µl Laemmli-Puffer + 57,5 µl Reinstwasser

Die Proben wurden zur Reduktion für 5 min bei 95 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) erhitzt und anschließend für 1,0 min bei 13000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert.

Die Probelösungen des simulierten gastrointestinalen Verdauens wurden analog 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt. Von den mit Pepsin verdauten Proteinlösungen wurden jeweils 24 µl entnommen und mit 8 µl Laemmli-Puffer (ohne DTT) versetzt. Von den mit CorolasePP verdauten Proteinlösungen wurden jeweils 28 µl entnommen und mit 4 µl Laemmli-Puffer (ohne DTT) versetzt.

Die Proben wurden im Anschluss ebenfalls für 5 min bei 95 °C im Thermomixer erhitzt.

### SDS-PAGE

Zum Einsatz kamen hierbei 13 %ige, isokratische Acrylamidgele. Die Herstellung der Gellösungen erfolgte entsprechend Tab. 43.

Tab. 43 SDS-PAGE für Western Blot, Herstellung der Gellösungen

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidlösung, 30 %ig [ml]	13	2
Trenngel- oder Sammelgelpuffer [ml]	7,5	3,0
Reinstwasser [ml]	9,5	7,0
SDS-Lösung [µl]	300	120
Pyronin Y [µl]	-	12
TEMED [µl]	30	24
Ammoniumpersulfat (43 %, m/v) [µl]	150	60

Nachdem das Trenngel in der Gelapparatur Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad, München) gegossen wurde, erfolgte eine Überschichtung mit Ethanol. Die Polymerisierung erfolgte bei Raum-

temperatur. Nach Entfernen des Ethanol wurde das Trenngel gegossen, der Probenkamm eingesetzt und das Gel zur Polymerisierung für 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zur Elektrophorese wurden jeweils 16 µl der reduzierten Probelösungen beziehungsweise der unreduzierten Proben aus den Verdauungsansätzen sowie 3,5 µl des Molmassenmarkers aufgetragen. Die Elektrophorese wurde anschließend bei einer Spannung von 105 V für 2 h durchgeführt. Der Endpunkt war erreicht, sobald die Lauffront des Pyronin Y das Ende des Gels erreicht hatte.

Zur Detektion mittels Coomassie-Brillantblau wurden die Gele im Anschluss drei Mal mit destilliertem Wasser gespült und schließlich für 1 h mit Färbelösung (GelCode™ Blue Safe Protein Stain, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) angefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel über Nacht in destilliertes Wasser gelegt.

#### **Blotten**

Nach Entnahme der Gele aus der Gelkammer wurden diese für 10 min in 30 ml Transferpuffer äquilibriert. Analog wurde mit den benötigten Nitrozellulosemembranen, Filterpapieren und Schwämmen verfahren. Die Stapelreihenfolge des Blottens ist nachfolgend aufgeführt:

Schwamm – 2 Filterpapiere – Polyacrylamidgel – Nitrozellulosemembran – 2 Filterpapiere – Schwamm.

Nach Einfüllen des Transferpuffers in die Kammer erfolgte das Blotten für 90 min bei einer Spannung von 105 V unter Eisbadkühlung. Durch dreiminütiges Anfärben der Proteine mit Ponceau S, erfolgte die Kontrolle des Blottens. Nach Einlegen der Nitrocellulosemembran in destilliertes Wasser erschienen die geblotteten Proteine rötlich gefärbt. Für die anschließende vollständige Entfärbung wurde die Membran für 5 min in TBS-Puffer gelegt.

#### **Immunochemische Detektion**

Folgende Reagenzien wurden für die immunochemische Detektion benötigt:

Blockierungspuffer	1,6 g BSA in 80 ml TBS-Puffer gelöst und 240 µl Tween 20 zugegeben
TBST-Puffer	50 µl Tween 20 auf 100 ml mit TBS-Puffer verdünnt
Inkubationspuffer	0,1 g BSA in 100 ml TBST-Puffer gelöst

Um unspezifische Bindungsstellen auf den Nitrocellulosemembranen zu blockieren, wurden diese für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert. Die Membranen wurden anschließend zusammengerollt und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C auf einem Rollbrett inkubiert. Hierzu wurden von den eingesetzten Patientenseren US 4 und

US 6 (Tab. 44) jeweils 60 µl mit 540 µl des Inkubationspuffers verdünnt. Die Ara h 1-Antikörper wurden 1:10 und die Ara h 2-Antikörper 1:1000 mit Inkubationspuffer verdünnt. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen drei Mal für jeweils 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 4 h mit den Sekundärantikörpern, an die jeweils das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, inkubiert. Die zur Verfügung stehenden Sekundärantikörper anti-human-AP, anti-mouse Ara h 1-AP und anti-rabbit Ara h 2-AP wurden vor ihrer Verwendung 1:750 mit TBST-Puffer verdünnt. Im Anschluss wurden die Membranen drei Mal für jeweils 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 20 ml Detektionslösung (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad, München), wobei die Entwicklung auf Sicht erfolgte und nach Auftreten einer Blaufärbung durch Waschen der Membran mit Reinstwasser abgestoppt wurde.

Die eingesetzten Patientenserum US 4 und US 6 wurden von PlasmaLab International (Everett, WA, USA) bezogen. Die Spezifikationen sind in Tab. 44 angegeben. Die Ara h 1- und Ara h 2-Antikörper sowie das Serum PEI 231 eines Nichtallergikers wurden vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen zur Verfügung gestellt, das Serum FM 007 von Frau Prof. Mahler (Universitätsklinikum Erlangen).

Tab. 44 Spezifikationen der eingesetzten Seren US 4 und US 6

Serum	US 4	US 6
CAP total peanut [kU/ml]	42,3	66,4
CAP Ara h 1 [kU/ml]	81,7	33,9
CAP Ara h 2 [kU/ml]	43,3	39,1

### 3.11.2 ELISA

Die Durchführung des ELISA wurde in Form eines indirekten ELISA unter Verwendung der zentrifugierten Probelösungen realisiert. Nachfolgende Reagenzien wurden ergänzend zu den in Kap. 3.11.1 aufgeführten Reagenzien benötigt.

PBST-Puffer, pH 7,1            50 µl Tween 20 mit PBS-Puffer auf 100 µl aufgefüllt

PBST-Puffer mit 2 % BSA    2,0 g BSA in 100 ml PBST-Puffer gelöst

Die benötigten Seren und Antikörper wurden, wie in Tab. 45 angegeben, mit PBST-Puffer mit 2 % BSA verdünnt.

Tab. 45 Verdünnungen der Seren und Antikörper für den ELISA

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
US 4	1:300	anti-human IgE-HRP	1:3000
US 6	1:150	anti-human IgE-HRP	1:3000
FM 007	1:200	anti-human IgE-HRP	1:3000
Serum 231	1:100	anti-human IgE-HRP	1:3000
Mouse anti-Ara h 1	1:500	anti-mouse IgG-HRP	1:10000
Rabbit anti-Ara h 2	1:30000	anti-rabbit IgG-HRP	1:10000

#### **Coating**

Die zentrifugierten Probelösungen wurden auf einen Proteingehalt von 200 ng/ml mit PBS-Puffer verdünnt. Jeweils 50 µl der verdünnten Probelösungen wurden in eine 96-Well-Platte (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pipettiert und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Verwerfen der Probelösungen wurden die Wells drei Mal mit jeweils 250 µl PBST-Puffer gewaschen, zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 100 µl PBST-Puffer mit 2 % BSA zugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln inkubiert.

#### **Zugabe der Primärantikörper**

Jeweils 50 µl der nach Tab. 45 verdünnten Patientenseren und Antikörper gegen Ara h 1 und Ara h 2 wurden in die entsprechenden Wells pipettiert. Zusätzlich wurden 3 Kontrollproben (anti-human IgE-HRP, anti-mouse IgG-HRP und anti-rabbit IgG-HRP, jeweils verdünnt) sowie eine PBST-Pufferkontrolle mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Wells vier Mal mit jeweils 250 µl PBST-Puffer gewaschen.

#### **Zugabe der Sekundärantikörper**

Als Sekundärantikörper kamen die nach Tab. 45 verdünnten anti-human IgE-HRP, anti-mouse IgG-HRP und anti-rabbit IgG-HRP zur Verwendung. Nach Zugabe von jeweils 50 µl in die entsprechenden Wells wurde für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Wells im Anschluss fünf Mal mit jeweils 250 µl PBST-Puffer gewaschen.

#### **Detektion**

Jeweils 100 µl TMB-Substratlösung (BD Biosciences, Heidelberg) wurden in die Wells pipettiert und auf Sicht für maximal 30 min bei Raumtemperatur entwickelt. Nach Auftreten einer Blaufärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA-Reader SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) bei  $\lambda = 450$  nm über die Software Soft Max Pro 5.2.

### 3.11.3 Simulierter gastrointestinaler Verdau

Die simulierte gastrointestinale Verdauung wurde anhand eines einfachen Modells, welches sich auf die proteolytischen Verdauungsvorgänge im Magen und Dünndarm beschränkte, durchgeführt. Die methodische Grundlage stellte hierbei die Arbeit von Hernández-Ledesma et al. (2004) dar, wobei einige Modifizierungen vorgenommen wurden. Die Pepsinaktivität wurde um den Faktor 10 für die Erdnussproben (für SDS-PAGE) und um den Faktor 50 für die reinen, modifizierten Proteine (für Western Blots) reduziert. Des Weiteren wurde der Magenverdau auf 90 min und der Dünndarmverdau auf 60 min verkürzt, da die M-Zellen der Peyer-Plaques, welche Peptide resorbieren können, bereits nach 16 min Transitzeit erreicht werden (Eiwegger et al., 2006). Die Corolaseaktivität wurde im Falle der Erdnussproben zusätzlich um den Faktor 10 reduziert. Die modifizierten Erdnussproteinextrakte wurden hierbei direkt eingesetzt. Die zerkleinerten nativen, gekochten und gerösteten Erdnüsse wurden zuvor mittels Soxhlet-Extraktion unter Verwendung von Petrolether für 6 h entfettet und anschließend der Proteingehalt mittels Kjeldahl nach Kap. 3.10.2.1 bestimmt.

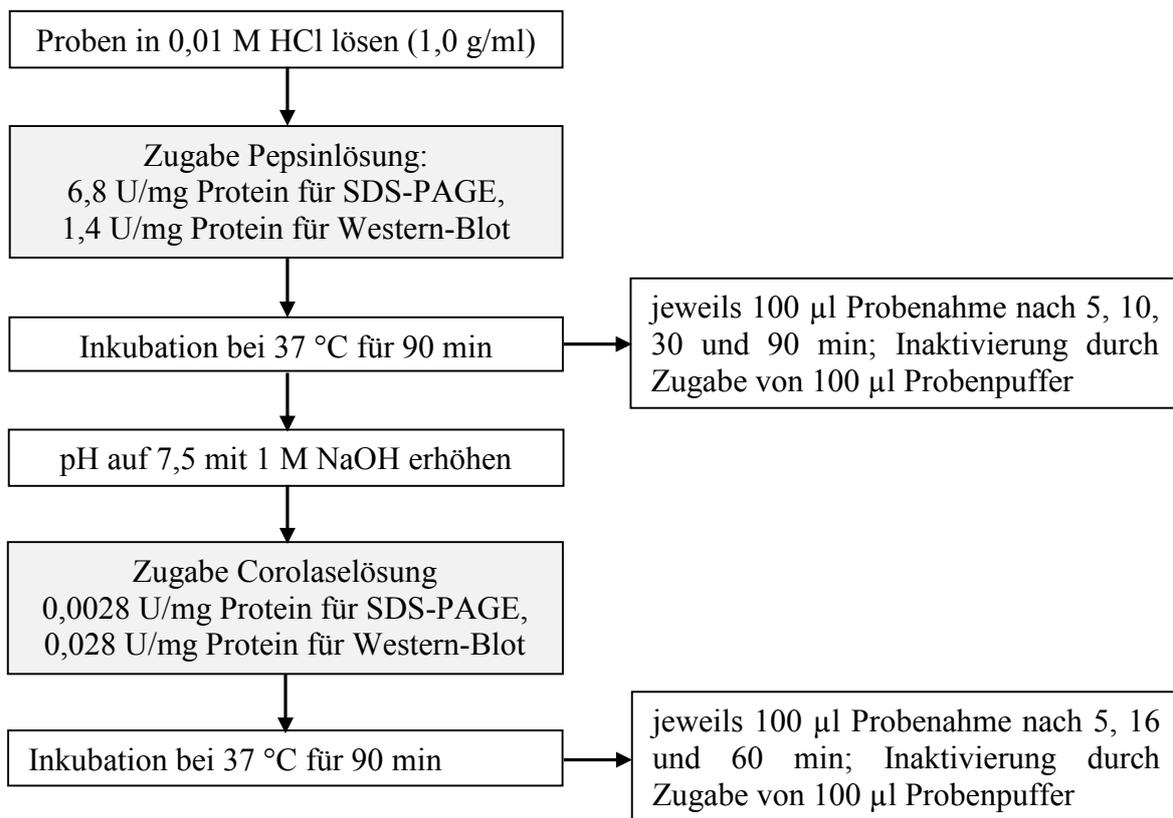


Abb. 29 Durchführungsschema des simulierten gastrointestinalen Verdaus

Die Simulation des Magenverdaus erfolgte durch Lösen der Proben (1,0 mg Protein/ml) in 0,01 M HCl (pH 2,0) und Zugabe von Pepsin (3300 U/mg Enzym). Nach Erhöhung des pH-Werts auf 7,5 durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung erfolgte der simulierte Dünndarmverdau nach Zugabe des Pankreasenzymgemisches Corolase PP (0,71 U/mg Enzym).

Die Probenahmen erfolgten zu definierten Zeiten und die Inaktivierung der Enzyme durch Zugabe von Elektrophoresepuffer mit 6 M Harnstoff, welcher analog Kap. 3.10.10 durch Zugabe von 36,04 g Harnstoff pro 100 ml Puffer hergestellt wurde. Das Durchführungsschema ist in Abb. 29 dargestellt. Für die SDS-PAGE wurden im Falle der Gradientengele (Kap. 3.10.10.1) jeweils 20  $\mu$ l und im Falle der isokratischen Gele (Kap. 3.10.10.2) jeweils 14  $\mu$ l der erhaltenen Probelösungen aufgetragen. Bezüglich des Western Blots wurde wie unter Kap. 3.11.1 beschrieben verfahren. Dieser wurde freundlicherweise von Maren Krause am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt.

## 3.12 Isolierung und *in vitro* Oxidation von LDL

Die Plasmaproben zur Isolierung des LDL wurden vom Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um gepooltes, humanes Plasma von Plasmaspendern, deren Plasma nicht für medizinische Zwecke verwendbar war. Die Isolierung, Makrophagenaufnahmetests und PCR-Versuche wurden ebenfalls am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Karl Schaller (Schaller, 2015) in Zusammenarbeit mit Dr. Anja Hofmann und Annika Frenzel durchgeführt. Hierzu fanden hausinterne Methoden Anwendung, die nachfolgend vorgestellt werden.

Alle Glasgeräte, die mit Plasma oder LDL in Kontakt kamen, wurden desinfiziert sowie alle Lösungen und Verbrauchsmaterialien nach Kontakt autoklaviert.

### 3.12.1 Isolierung

Die LDL-Isolierung erfolgte aus den Plasmaproben mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Nachfolgende Reagenzien wurden benötigt:

Dichtemedium 1 ( $\rho = 1,006$ g/ml)	11,4 g NaCl und 0,1 g EDTA in 1,0 l bidestilliertem Wasser gelöst und 1,0 ml 1 M NaOH zugegeben
Dichtemedium 2 ( $\rho = 1,182$ g/ml)	124,9 g NaBr mit Dichtemedium 1 auf 500 ml aufgefüllt
Dichtemedium 3 ( $\rho = 1,120$ g/ml)	50 ml Dichtemedium 1 und 92 ml Dichtemedium 2 gemischt

In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Ultra High Performance, VWR, Darmstadt) wurden 3,0 ml Plasma vorgelegt und mit 3,0 ml Dichtemedium 1 versetzt. Nach Austarieren auf der Feinwaage auf 0,01 g wurden die Proben für 3 h bei 440000 x g und 18 °C ultrazentrifugiert (Optima

MAX-XP, Beckman, Brea, CA, USA). Das sich anschließend am Miniskus als milchige Schicht befindene VLDL wurde mittels Pipette entfernt, wobei das abgenommene Volumen pro Röhrchen 2,5 ml betragen hat. Die in den Röhrchen verbliebenen Lösungen wurden vereinigt und jeweils 3,0 ml in Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 3,0 ml Dichtemedium 3 und Austarieren wurde analog obigen Bedingungen ultrazentrifugiert und anschließend das sich am oberen Meniskus befindene, gelbliche LDL mittels Pipette abgenommen, wobei pro Röhrchen maximal 1,5 ml abgenommen wurden.

Die Rückstände wurden jeweils gesammelt und vor ihrer Entsorgung autoklaviert. Das LDL wurde in Form des vor Oxidation geschützten EDTA-LDL oder nach Dialyse in Form des reinen LDL bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Dialyse (Spectra/Por, MWCO 300 kDa, Carl Roth) erfolgte gegen 0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4), der zuvor aus PBS-Tabletten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hergestellt wurde. Vor ihrer Verwendung wurden die Dialyseschläuche für 30 min in bidestilliertes Wasser gelegt sowie der PBS-Puffer für 30 min mit Stickstoff gespült. Die Dialyse erfolgte bei 6 °C über Nacht unter Rühren gegen 2,0 l PBS-Puffer, wobei der Puffer insgesamt drei Mal gewechselt wurde. Das erhaltene native LDL (nLDL) wurde unter Lichtausschluss bei 4 °C aufbewahrt. Der mittels BCA-Test (Kap. 3.10.2.2) bestimmte Proteingehalt lag im Bereich von 0,4 mg Protein/ml LDL-Lösung.

### 3.12.2 *In vitro* Oxidation

Für die *in vitro* Oxidation wurde das benötigte Volumen an nLDL in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und das entsprechende Volumen einer 10 mM CuSO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben, sodass eine Endkonzentration von 50 µM in der Lösung erreicht wurde. Diese wurde in 1,5 ml Probengefäße aliquotiert und für 24 h bei 300 U/min und 37 °C in einem Thermoschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss wurden die Lösungen vereinigt und durch Zugabe eines entsprechenden Volumens einer 10 mM EDTA-Lösung eine EDTA-Konzentration von 0,1 M eingestellt. Das oxidierte EDTA-LDL wurde nach 15 min analog Kap. 3.12.1 dialysiert und das erhaltene oxidierte LDL (oxLDL) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### **Aufkonzentrierung**

Um das erhaltene nLDL und oxLDL aufzukonzentrieren, kamen Größenausschlussfilter (Vivaspin 6 ml, MWCO 300 kDa, Sartorius, Göttingen) zur Verwendung. Die Proben wurden hierzu in die Filter eingefüllt und für 10 min bei 3000 x g und 18 °C zentrifugiert. Die im Anschluss in den Konzentratoren verbliebenen LDL-Lösungen wurden entnommen und bei

4 °C im Kühlschrank gelagert. Der nach der Aufkonzentrierung mittels BCA-Test (Kap. 3.10.2.2) bestimmte Proteingehalt lag im Bereich von 1,5 mg Protein/ml.

### 3.13 Statistik

Sofern nicht separat vermerkt, sind die Messwerte als arithmetisches Mittel, basierend auf Zweifachbestimmungen, unter Angabe der zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Diese wurden nach Funk et al. (2005) und Rauscher et al. (1986) aus einer Reihe von  $n$  Zufallsvariablen ( $x_1, x_2, \dots, x_n$ ) wie folgt berechnet:

**Arithmetisches Mittel** 
$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

**Standardabweichung** 
$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Die Bestimmungen der Nachweisgrenzen erfolgten nach Kromidas (2000) unter Zugrundelegung eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 3:1. Die Bestimmungsgrenzen wurden unter Zugrundelegung eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 5:1 bestimmt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Einfluss der Maillard-Reaktion auf das allergene Potential von Erdnüssen wurden Lysinabnahmen als Folge der Erdnussröstung von bis zu 42 % festgestellt, wovon allerdings nur 10 % durch die Maillard-Reaktionsprodukte N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin, Pyrrolin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin erklärbar waren (Wellner et al. (2012b)). Ursächlich für den hohen Anteil an nicht erklärbarer Lysinderivatisierung wurden Reaktionen mit Carbonylverbindungen aus der Lipidperoxidation diskutiert. Hieran anknüpfend wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst für die verwendeten Erdnussproben ebenfalls die Aminosäurezusammensetzungen sowie das Ausmaß der Maillard-Reaktion durch Quantifizierung der Gehalte an N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin, Pyrrolin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin bestimmt.

Um die Bildung flüchtiger Sekundärprodukte der Lipidperoxidation unter konkreten Erdnussröstbedingungen erfassen zu können, wurden Methoden für die GC-MS (EI) zur Quantifizierung ausgewählter Sekundärprodukte entwickelt. Hierüber wurden die Gehalte an Sekundärprodukten in Erdnussöl- und Erdnussproben als Folge der Erhitzung, beziehungsweise Röstung quantifiziert.

In der Literatur existieren nur sehr wenige quantitative Daten betreffend Gehalte an Lipierungsprodukten in Lebensmitteln und speziell in Erdnüssen. Deshalb wurden anhand von Inkubationsversuchen mit extrahierten Erdnussproteinen aus ungerösteten Erdnüssen sowie mit N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und ausgewählten Sekundärprodukten die resultierenden Aminosäureabnahmen im Proteinverband verfolgt und konkrete Lipierungsprodukte mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert. Nach der Darstellung ausgewählter Lipierungsprodukte wurden Methoden zur Quantifizierung in den modifizierten Erdnussproteinen und Erdnüssen entwickelt. Hierüber konnten die Anteile an den Lysinabnahmen bestimmt, sowie erstmalig die Quantifizierung von Lipierungsprodukten in nativen und gerösteten Erdnüssen realisiert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Lipierungsreaktionen im physiologischen Kontext. Da in der Literatur keine Untersuchungen zum Einfluss von Lipierungsreaktionen auf das allergene Potential von Erdnüssen vorliegen, wurden mit gezielt lipierten Erdnussproteinen Allergenitätstests durchgeführt. Hierfür kamen ELISAs und Western Blots zum Einsatz. Weiterhin wurde der Einfluss der Lipierung und der Zubereitungsart auf die Verdaubarkeit anhand simulierter gastrointestinaler Verdauungstests untersucht sowie ausblickend ausgewählte Lipierungsprodukte in nativen (nLDL) und *in vitro* oxidierten LDL-Proben (oxLDL) quantifiziert.

## 4.1 Aminosäurezusammensetzungen und Ausmaß der Maillard-Reaktion der Erdnussproben

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Erdnussproben wurden zunächst bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzungen und ihrer Gehalte an Maillard-Reaktionsprodukten charakterisiert. Hierzu wurden ungeröstete Erdnüsse (native Erdnüsse) mit Schale entsprechend Literaturangaben bei 170 °C für 20 min (Wellner, 2012a; Cong et al., 2008; Beyer et al., 2001; Brown et al., 1972) und darüber hinaus auch für 40 min geröstet. Die Röstung für 20 min sollte hierbei einer industriellen Röstung entsprechen und die 40-minütige Röstung einer weiteren Verfolgung der Reaktionen in Abhängigkeit der Röstzeit dienen. Die hierbei erhaltenen Erdnüsse waren im Gegensatz zu den für 20 min gerösteten Erdnüssen dunkler, wiesen einen verbrannten Geruch auf und waren nicht mehr verzehrbar.

### 4.1.1 Aminosäurezusammensetzung

Da es sich bei den Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin um potentielle Reaktionspartner für nukleophile Reaktionen im Proteinverband handelt, wurden die Gehalte in Abhängigkeit der Röstbedingungen mittels Aminosäureanalyse quantifiziert. Die Verfolgung der Gehalte der Aminosäuren Cystein, Lysin und Arginin erfolgte nach dreistufiger enzymatischer Totalhydrolyse (eH). Hierdurch konnten auch im Zuge der Röstung entstandene säurelabile Aminosäureaddukte mit erfasst werden. Die Quantifizierung der Aminosäure Histidin erfolgte nach salzsaurer Totalhydrolyse (sH), da nach enzymatischer Hydrolyse Coelutionen auftraten. Zunächst wurde die Vollständigkeit der salzsauren und enzymatischen Hydrolysen überprüft. Hierzu wurden im Falle der salzsauren Hydrolyse kommerziell geröstete Erdnüsse (Handelsprobe) unter Verwendung von 6 bis 12 M Salzsäure hydrolysiert. Die Aminosäuregehalte wurden jeweils auf die nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure erhaltenen Gehalte bezogen, die auf mmol/100 g Protein berechnet worden waren. Auf Grund der Säurelabilität des Cysteins wurden neben Histidin, Lysin und Arginin zusätzlich die Gehalte an Valin mit verglichen (Abb. 30A). Die Aminosäurefreisetzungen lagen hierbei im Bereich von 90-113 %, bezogen auf die Gehalte nach Hydrolyse mit 6 M Salzsäure. Tendenzen in Abhängigkeit der Säurestärke waren nicht zu beobachten. Somit kann festgestellt werden, dass eine Erhöhung der Säurekonzentration zu keinen erhöhten Gehalten an Aminosäuren führt,

weshalb im Rückschluss die Hydrolyse unter Verwendung von 6 M Salzsäure als vollständig angesehen wird.

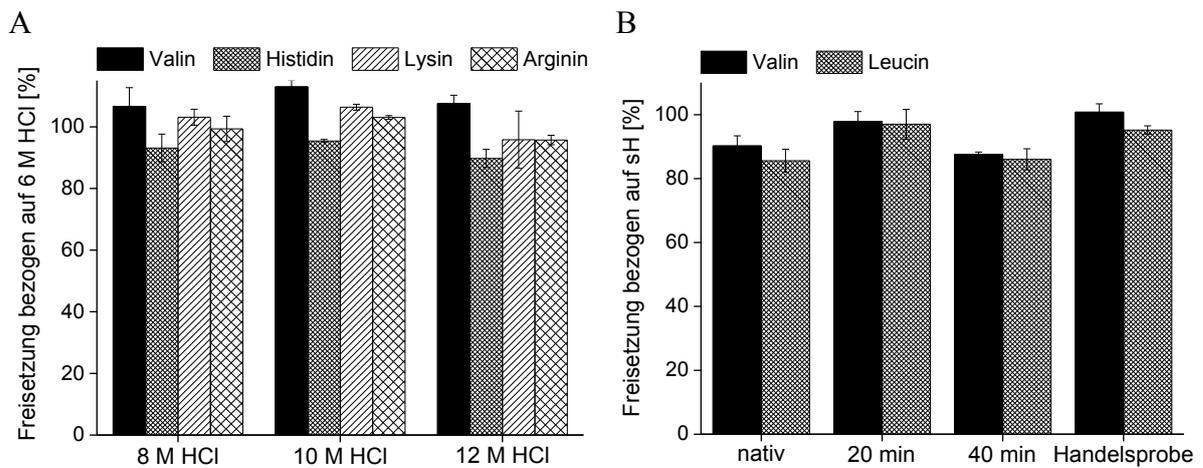


Abb. 30 Vergleich der Aminosäurefreisetzungen (A) nach salzsaurer Hydrolyse am Beispiel einer kommerziellen Erdnussprobe (Handelsprobe) unter Variation der Salzsäurekonzentration, bezogen auf die Freisetzung nach Hydrolyse mit 6 M HCl sowie (B) nach enzymatischer Hydrolyse der nativen, bei 170 °C gerösteten Erdnüsse und der kommerziell gerösteten Handelsprobe, bezogen auf die Freisetzung nach salzsaurer Hydrolyse (sH) mit 6 M HCl

Die Methode der enzymatischen Proteinhydrolyse wurde für Milchprodukte publiziert (Henle et al., 1991a), weshalb zunächst überprüft werden musste, ob diese auch für Erdnüsse anwendbar war. Weiterhin musste in Betracht gezogen werden, dass die Aminosäurefreisetzung durch eine enzymatische Hydrolyse in Abhängigkeit der thermischen Behandlung der Erdnüsse zu unterschiedlichen Freisetzungsraten führen könnte. Denkbar wäre beispielsweise eine reduzierte enzymatische Freisetzung auf Grund modifizierter Aminosäureseitenketten, wodurch die Substraterkennung durch die Enzyme eingeschränkt sein könnte. Deshalb wurden jeweils die nativen, gerösteten und kommerziell gerösteten Erdnussproben (Handelsprobe) untersucht. Da auf Grund der Erdnussröstung säurelabile Aminosäureseitenkettenmodifizierungen, beispielsweise durch die Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten oder Lipierungsprodukten zu erwarten waren, wurden zur Beurteilung der Aminosäurefreisetzung die Aminosäuren Valin und Leucin ausgewertet. Diese sind nicht durch nukleophile Reaktionen an ihren Seitenketten modifizierbar. Verglichen wurden jeweils die Gehalte nach enzymatischer und salzsaurer Hydrolyse (6 M Salzsäure), die hierzu jeweils auf mmol/100 g Protein berechnet wurden (Abb. 30B). Die Freisetzungsraten lagen hierbei für Valin im Bereich von 88-101% und für Leucin im Bereich von 86-97 %. Eine verminderte Freisetzungsraten als Folge der Röstung war nicht feststellbar. Die enzymatische Aminosäurefreisetzung kann somit als weitgehend vollständig und unabhängig von der Erdnussprobenart angesehen werden. Somit war ein Vergleich der Aminosäureabnahmen unterschiedlich gerösteter Erdnussproben nach enzymatischer Hydrolyse möglich.

In Abb. 31 sind die quantifizierten Gehalte der Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin in den untersuchten Erdnussproben dargestellt.

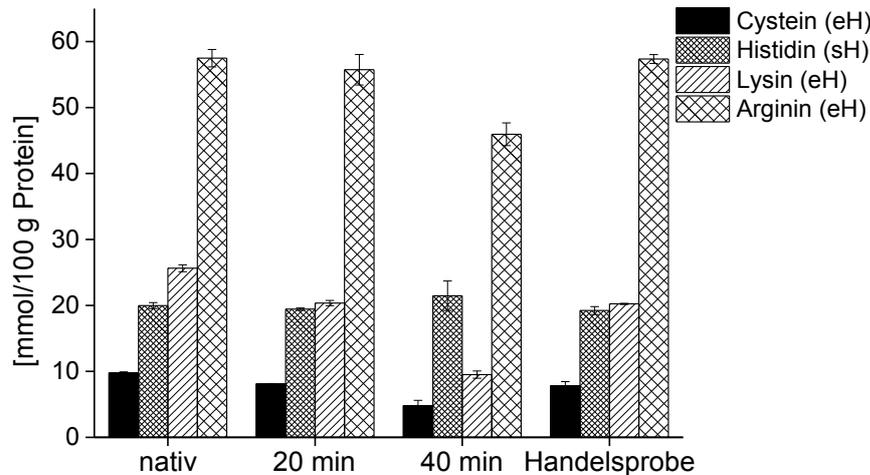


Abb. 31 Aminosäuregehalte nativer, bei 170 °C für 20 min und 40 min gerösteter Erdnüsse und der kommerziell gerösteten Handelsprobe; eH - enzymatische Hydrolyse, sH - salzsaure Hydrolyse

Hierbei war erkennbar, dass es als Folge der Erdnussröstung in Abhängigkeit der Röstzeit zu Aminosäureabnahmen kam. Die Gehalte an Cystein wurden als Folge der Röstung für 40 min um 51 % von 9,8 auf 4,8 mmol/100 g Protein, die Gehalte an Lysin um 63 % von 25,6 auf 9,5 mmol/100 g Protein und die Gehalte an Arginin um 20 % von 57,5 auf 45,9 mmol/100 g Protein reduziert. Der Histidingehalt änderte sich ausgehend von den nativen zu den für 40 min gerösteten Erdnüssen nicht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass auf Grund der durchgeführten salzsauren Hydrolyse möglicherweise gebildete säurelabile Histidin-Addukte nicht erfasst und somit nicht zu einer möglichen Histidinabnahme beitragen konnten. Im Falle der kommerziell gerösteten Erdnüsse konnten bezüglich der Aminosäureabnahmen keine Aussagen getroffen werden, da die Ausgangsgehalte der hierfür eingesetzten nativen, ungerösteten Erdnüsse nicht bekannt waren. Allerdings ließ sich diese Probe mit den bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnüssen vergleichen, wodurch die Röstung im Labormaßstab als realitätsnah eingestuft werden kann. Die Reaktivitätsreihenfolge der potentiell reaktiven Aminosäuren innerhalb des Erdnussproteinverbands lautet somit wie folgt: Lysin > Cystein > Arginin >> Histidin.

Der Summengehalt an freien Aminosäuren, die anhand der nativen Erdnüsse bestimmt wurden, betrug 5,1 mmol/100 g Protein und ist somit mit den Studien von Grimm et al. (1996) übereinstimmend. Die Gehalte an freiem Histidin, Lysin und Arginin wurden jeweils zu  $220,7 \pm 1,7$ ,  $369,3 \pm 8,1$  und  $1063,8 \pm 6,8$   $\mu\text{mol}/100$  g Protein bestimmt. Cystein war in freier Form nicht nachweisbar. Die Gehalte lagen somit um den Faktor 60-100 niedriger, als die der proteingebundenen Aminosäuren und konnten nur in geringem Umfang zu den in Abb. 31 dargestellten Gehalten der jeweiligen Aminosäuren beitragen. Die beobachteten Aminosäureabnahmen waren deshalb vor allem auf Modifizierungen der proteingebundenen

Aminosäuren zurückzuführen. Hinsichtlich der Relevanz zur Beeinflussung des allergenen Potentials auf Grund posttranslationaler Aminosäuremodifikationen sind Modifikationen freier Aminosäuren irrelevant, da lineare Epitope in der Regel aus 6 bis 15 Aminosäuren bestehen (Jäger et al., 2008; Bannon, 2004; Huby et al., 2000). Zur Mediatorfreisetzung bedarf es zusätzlich der Quervernetzung von zwei Antikörpern, wodurch eine Mindestantigengröße von 30 Aminosäuren, entsprechend zirka 3 kDa, angenommen wird (Huby et al., 2000). Diese Mindestgröße wird durch Vorliegen freier Aminosäuren nicht erreicht.

#### 4.1.2 Maillard-Reaktionsprodukte

Wie in Kap. 4.1.1 gezeigt, kam es als Folge der Erdnussröstung vor allem zur Modifizierung der proteingebundenen Aminosäure Lysin. Um Aussagen über den erklärbaren Lysinverlust treffen zu können, wurden aus diesem Grund Maillard-Reaktionsprodukte an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins quantifiziert. Als Vertreter der frühen Phase der Maillard-Reaktion wurde N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin (Fru-Lys) und als Vertreter der fortgeschrittenen Phase Pyrrolin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) quantifiziert. Zu beachten ist hierbei, dass CML durch die Maillard-Reaktion (Belitz et al., 2008) und in Folge der Lipidperoxidation entstehen kann (Requena et al., 1996). Die Quantifizierung von Fru-Lys erfolgte nach salzsaurer Hydrolyse mittels RP-HPLC-UV in Form des N<sup>ε</sup>-(2-Furoylmethyl)lysins (Furosin). Pyrrolin wurde auf Grund seiner Säurelabilität nach enzymatischer Hydrolyse mittels RP-HPLC-DAD und CML nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse mittels LC-ESI-MS/MS quantifiziert. Die abgeschätzten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methoden sind in Tab. 46 und die quantifizierten Gehalte in den Erdnussproben in Tab. 47 dargestellt.

Tab. 46 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Maillard-Reaktionsprodukt-Analytik, jeweils angegeben in  $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$

	Fru-Lys	Pyrrolin	CML
Nachweisgrenze	26,12	4,35	0,14
Bestimmungsgrenze	43,54	7,25	0,24

Tab. 47 Gehalte der quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte in den Erdnussproben, jeweils angegeben in  $\text{mmol}/100\text{ g Protein}$

Probe	Fru-Lys	Pyrrolin	CML
nativ	$0,55 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$
170 °C, 20 min	$0,85 \pm 0,072$	$0,27 \pm 0,001$	$0,06 \pm 0,006$
170 °C, 40 min	$0,98 \pm 0,059$	$0,76 \pm 0,022$	$0,12 \pm 0,004$
Handelsprobe	$0,72 \pm 0,019$	$0,08 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,004$

Bereits in den nativen Erdnüssen konnten Fru-Lys, Pyrralin und CML quantifiziert werden. Die Gehalte an Saccharose, Glukose und Fruktose betragen in nativen Erdnüssen jeweils bis zu 4,4 %, 0,08 % und 0,03 % (Vercellotti et al., 1995). Somit ist es prinzipiell möglich, dass es bereits während der Trocknung der Erdnüsse nach der Ernte durch Aufhängen (Bickel-Sandkötter, 2001; Franke et al., 1988) oder Schwadentrocknung mit nachfolgender Heißluft-trocknung (Vercellotti et al., 1995) zur Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten kommt. Als Folge der Röstung kam es vor allem zur Bildung der fortgeschrittenen Reaktionsprodukte Pyrralin und CML, wohingegen die Gehalte des Frühphasenprodukts Fru-Lys vergleichsweise langsam anstiegen. Auf Grund des niedrigen Gehalts an Zuckern ist die Bildung von Frühphasenprodukten, wie beispielsweise Amadori-Produkten, limitiert, wohingegen die Weiterreaktion zu stabilen Endprodukten (AGEs) begünstigt wird. Die Lysinblockierung der Erdnussproben durch Fru-Lys lag im Bereich von 17,3-30,7 mmol/mol Lysin, für Pyrralin im Bereich von 0,3-23,8 mmol/mol Lysin und für CML im Bereich von 0,3-3,6 mmol/mol Lysin. Somit lagen die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte an Fru-Lys, Pyrralin und CML in vergleichbaren Größenordnungen, wie sie von Wellner et al. (2012b) quantifiziert wurden. Auch Scheijen et al. (2016) bestimmten in Handelsproben mit 0,02 mmol CML/100 g Protein analoge Gehalte wie in der vorliegenden Arbeit. Die kommerzielle Probe wies vergleichbare Gehalte an Fru-Lys auf, wie die für 20 min geröstete Erdnussprobe, wohingegen die Gehalte an Pyrralin und CML um den Faktor drei niedriger lagen. Ursächlich hierfür könnte eine industrielle Röstung bei etwas niedrigeren Temperaturen als 170 °C gewesen sein, wodurch eine Weiterreaktion des Frühphasenprodukts nicht im Vordergrund stand.

In Abb. 32 ist der innerhalb der Erdnussröstreihe durch die quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte erklärbare Lysinverlust dargestellt. Hierbei ergab sich der Lysinverlust aus der Differenz der Lysingehalte der gerösteten Erdnussproben zu den nativen Erdnüssen.

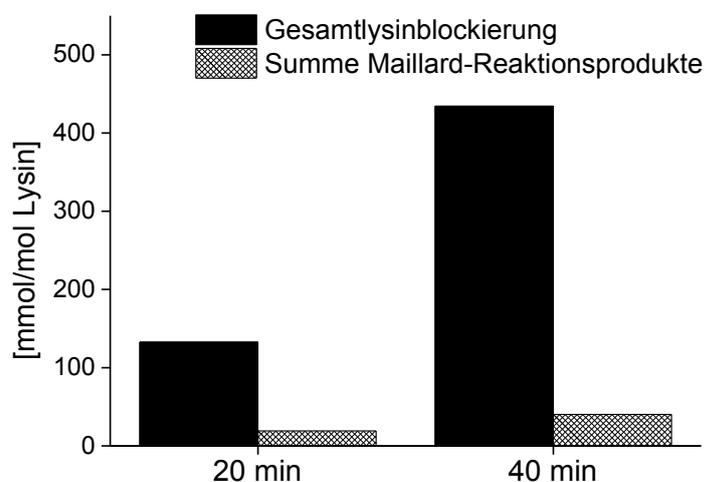


Abb. 32 Absoluter Lysinverlust und Summe der quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte in den bei 170 °C für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen bezogen auf die nativen Erdnüsse

Der durch die quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte erklärable Lysinverlust lag bei den für 20 min gerösteten Erdnüssen bei 14 % und bei den für 40 min gerösteten Erdnüssen bei 9 %. Somit konnte nur ein geringer Anteil des beobachteten Lysinverlusts durch die quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte erklärt werden, wobei der nicht erklärable Lysinverlust in Abhängigkeit der Röstzeit zunahm. Die hier erhaltenen Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen von Wellner et al. (2012b), die nach 20-minütiger Röstung 10 % des Gesamtlysinverlusts durch Quantifizierung der gleichen Maillard-Reaktionsprodukte erklären konnten. Als mögliche Ursache diskutierten Wellner et al. (2012b) die Bildung nicht erfasster Maillard-Reaktionsprodukte wie beispielsweise Crosslink-Produkten oder hochmolekularen Melanoidinen. Weitere Möglichkeiten könnten auf Grund des hohen Fettgehalts der Erdnüsse von 48 % (Souci et al., 2008) und des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren von 85 % (Maguire et al., 2004) Reaktionen im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation darstellen (Wellner et al., 2012b). Schon in den 1960er Jahren konnten Roubal & Tappel (1966) beobachten, dass eine wässrige Inkubation von peroxidiertem Ethylarachidonat mit  $\gamma$ -Globulin bei 37 °C zu einem Ausfällen des Proteins und einem Lysinverlust von 59 % führte. Ursächlich hierfür können Radikalreaktionen als auch Reaktionen mit Sekundärprodukten der Lipidperoxidation sein (Gardner, 1979). Werden die Radikalreaktionen betrachtet, so können die nach Kap. 2.3.1 in Anwesenheit von Metallionen gebildeten Fettsäurehydroperoxy- und Fettsäurehydroxyradikale mit Proteinen weiterreagieren, wodurch es nach Gardner (1979) zur Radikalbildung an den Aminosäureseitenketten kommen kann (Abb. 33).

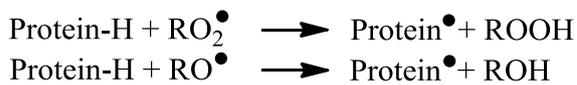


Abb. 33 Reaktionen von Fettsäurehydroperoxy- und Fettsäurehydroxyradikalen mit Proteinen nach Gardner (1979)

In wässriger Lösung oder bei hohen Wasseraktivitäten kommt es als Folge bevorzugt zur Bildung von Protein-Crosslinks, wohingegen in trockenen Systemen Proteinspaltungen im Vordergrund stehen (Gardner, 1979). Vorstellbar ist, dass letztgenannter Fall für Erdnüsse, die im ungerösteten Zustand einen Wassergehalt von 5,2 % aufweisen (Souci et al., 2008), relevanter sein könnte. Ein indirekter Nachweis einer ablaufenden Lipidperoxidation erfolgte durch den Nachweis flüchtiger Sekundärprodukte in Ölen, welche aus gerösteten Erdnüssen gewonnen wurden (Liu et al., 2011; Chetschik et al., 2008; Brown et al., 1972). Somit besteht die Möglichkeit, dass es zu Reaktionen dieser Sekundärprodukte mit Aminosäureseitenketten der Erdnussproteine kommen kann, wodurch ein Teil des bisher nicht erklärbaren Lysinverlusts beim Erdnussrösten erklärt werden könnte.

### 4.1.3 Fazit

Die Aminosäurefreisetzungsraten der salzsauren Hydrolyse unter Verwendung von 6 M Salzsäure sowie der dreistufigen enzymatischen Hydrolyse konnten im Falle der Erdnussproben als vollständig eingestuft werden. Die Reaktivitätsreihenfolge der potentiell reaktiven Aminosäuren während der Erdnussröstung lautete: Lysin > Cystein > Arginin >> Histidin. Hierbei wurden Lysinmodifikationen bis maximal 62 % verzeichnet, wovon im Falle der für 20 min gerösteten Erdnüsse allerdings nur 14 % und im Falle der für 40 min gerösteten Erdnüsse 9 % durch die Maillard-Reaktionsprodukte N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin, Pyrralin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin erklärt werden konnten. Die Ergebnisse von Wellner et al. (2012b) wurden somit bestätigt. Auf Grund des hohen Fettanteils der Erdnüsse von 48 % (Souci et al., 2008) und des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren von 85 % (Maguire et al., 2004) könnten Reaktionen im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation für die starke Lysinmodifizierung verantwortlich sein. Vor allem Reaktionen von Sekundärprodukten mit Aminosäureseitenketten stellen auf Grund des Nachweises von Sekundärprodukten in Ölen aus gerösteten Erdnüssen (Liu et al., 2011; Chetschik et al., 2008; Brown et al., 1972) potentielle Reaktionspartner dar.

## 4.2 Lipidperoxidationsprodukte in Erdnussöl- und Erdnussproben

### 4.2.1 Semiquantifizierung flüchtiger Verbindungen

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung potentieller Precursoren für Aminosäureseitenkettenmodifikationen, die als Folge der Lipidperoxidation während des Erdnussröstens entstehen können. Hierzu wurde zunächst raffiniertes Erdnussöl in Anwesenheit interner Standards (IS) unter Erdnussröstbedingungen auf 170 °C für 20 min erhitzt. Da sich die flüchtigen Sekundärprodukte in ihren Siedepunkten unterschieden, erfolgte die Auswertung von Hexanal, 2-Hexenal und Heptanal über den internen Standard p-Xylol, wohingegen die schwerer flüchtigen Verbindungen 2-Heptenal, Octanal und Nonanal über den internen Standard 1,3-Diethylbenzol ausgewertet wurden. Das Erdnussöl diente hierbei als Modell, da das Überführen der flüchtigen Verbindungen des erhitzten Öles reproduzierbarer durchgeführt werden konnte als beim Rösten von Erdnüssen. Der Einsatz raffinierten Erdnussöls begründet sich dadurch, dass dieses im Gegensatz zum unraffinierten Erdnussöl aus ungerösteten Erdnüssen gewonnen wird (Franke, 1992; Woodroof, 1983). Somit war das Vorliegen der Triacylglyceride in einem nativeren Zustand gewährleistet und möglicherweise gebildete Sekundärprodukte sind durch die Raffination entfernt worden. Die als Folge der

Erhitzung entstandenen flüchtigen Sekundärprodukte wurden durch einen Luftstrom in eine Dichlormethanvorlage überführt und mittels GC-MS (EI) analysiert. In Abb. 34 ist ein typisches GC-MS (EI)-Chromatogramm mit den zugeordneten flüchtigen Verbindungen dargestellt. Die Peakzuordnung erfolgte hierbei durch Vergleich von Retentionszeiten und Massenspektren mit entsprechenden Referenzsubstanzen. Abb. 35 stellt die unter Berücksichtigung der internen Standards erhaltenen relativen Peakflächenanteile bezogen auf den Gesamtpeakflächenanteil dar. Um zu überprüfen, ob bereits im nicht erhitzten Öl flüchtige Sekundärprodukte vorlagen, wurden die während der Aufheizphase entstandenen Verbindungen analysiert. Hierbei konnten allerdings keine flüchtigen Sekundärprodukte nachgewiesen werden, sodass deren Beitrag an den als Folge der Erhitzung erfassten Produkten als vernachlässigbar eingestuft wurde.

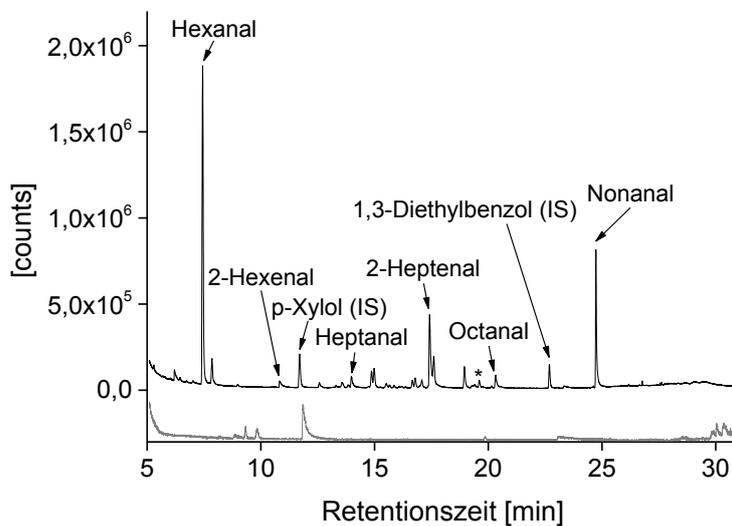


Abb. 34 GC-MS (EI)-Scan-Chromatogramm flüchtiger Verbindungen aus nicht erhitztem (grau, unten) und auf 170 °C für 20 min erhitztem (schwarzen, oben) raffiniertem Erdnussöl; \* 2-Pentylfuran

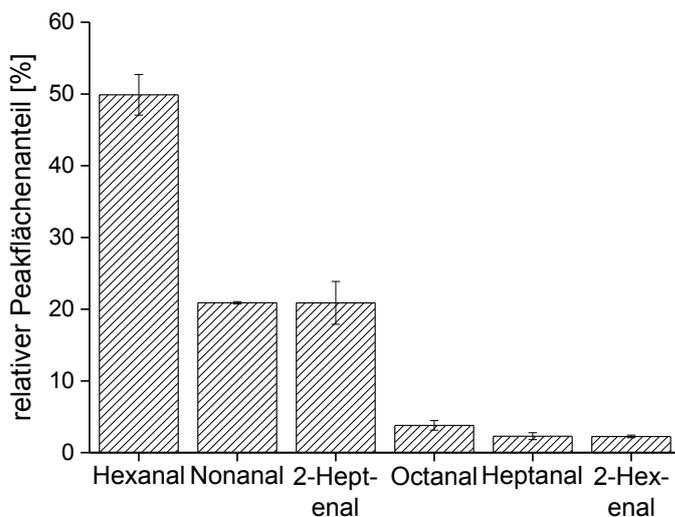


Abb. 35 Relative Peakflächenanteile flüchtiger Verbindungen die als Folge der Erhitzung von Erdnussöl auf 170 °C für 20 min entstanden sind

Als Folge der Erdnussröstung konnte die Bildung von Sekundärprodukten beobachtet werden. Anhand der relativen Peakflächenanteile war erkennbar, dass Hexanal, Nonanal und 2-Heptenal mengenmäßig die relevantesten Sekundärprodukte darstellten. Die Bildung von Hexanal und 2-Heptenal erfolgt hauptsächlich aus der Autoxidation von Linolsäure, wohingegen Nonanal überwiegend aus Ölsäure gebildet wird (Esterbauer et al., 1990a). Erdnussöl besteht zu 54 % aus Ölsäure und zu 22 % aus Linolsäure, Erdnüsse zu 22 % aus Ölsäure und zu 14 % aus Linolsäure (Souci et al., 2008). Somit können vergleichbare Anteile an Sekundärprodukten auch in gerösteten Erdnüssen erwartet werden. Chung et al. (1993) erhitzten raffiniertes Erdnussöl auf 50 bis 200 °C, wobei keine Angaben über die Erhitzungszeiten vorliegen. Dabei konnten sie in Abhängigkeit der Erhitzung Zunahmen der relativen Peakflächenanteile, unter anderem der hier erfassten Verbindungen, mittels GC-MS beobachten. Nach Rösten von Erdnüssen bis zum Erreichen eines „kommerziellen Röstaromas“ und nachfolgender Diethyletherextraktion bestimmten Chetschik et al. (2008) Aromaverdünnungsfaktoren der flüchtigen Sekundärprodukte. Hierdurch konnten sie im Vergleich zum Extrakt aus nicht gerösteten Erdnüssen unter anderem Zunahmen der Sekundärprodukte Hexanal, Octanal, Nonanal und 2-Heptenal in Bereichen des 4 bis 32-fachen feststellen. Matsui et al. (1998) konnten in unraffiniertem Erdnussöl nach Diethyletherextraktion mittels GC-MS unter anderem Hexanal, Octanal und 2-Heptenal nachweisen. Auch Brown et al. (1972) rösteten Erdnüsse bei 170 °C bis zum Erreichen eines „akzeptablen Röstresultats“. Im abgepressten Öl konnten sie nach Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin über Absorptionsmessungen eine Zunahme an flüchtigen und nicht flüchtigen Monocarbonylverbindungen von 8 auf 26 µmol/100 g Erdnussöl feststellen. Dünnschichtchromatographisch konnten sie zeigen, dass es sich vor allem um Alkanale, 2-Alkanone, 2-Alkenale und 2,4-Alkadienale handelte. Generell wird angenommen, dass in Ölen roher und gerösteter Erdnüsse jeweils Konzentrationen an flüchtigen Verbindungen in Bereichen von 20-30 und 50-60 µmol/100 g Öl enthalten sind (Brown et al., 1972). Liu et al. (2011) quantifizierten nach Abpressen der Öle gerösteter Erdnüsse (200 °C bis zu 50 min) mittels HS-SPME-GC-MS flüchtige Sekundärprodukte. Dabei konnten sie unter anderem Zunahmen der Sekundärprodukte Hexanal, Heptanal, 2-Octenal, 2-Decenal, 2-Undecenal und 2,4-Decadienal von jeweils 0,34 auf 0,67, 0,25 auf 1,06, 0,07 auf 0,20, 0,15 auf 0,60, 0,10 auf 1,59 und 0,20 auf 3,08 mg/kg Erdnussöl feststellen.

Somit ist festzuhalten, dass es als Folge der Erhitzung von Erdnussöl und der Röstung von Erdnüssen zur Bildung flüchtiger Sekundärprodukte kommt, wodurch auf eine als Folge der Röstung abgelaufene Lipidperoxidation rückgeschlossen werden kann.

## 4.2.2 Quantifizierung von Acrolein, Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal

### 4.2.2.1 Analytik

Mit der in Kap. 4.2.1 vorgestellten Methode konnte eine Abschätzung der Anteile an Sekundärprodukten erfolgen. Flüchtigere Sekundärprodukte wie Acrolein und Malondialdehyd (MDA) waren hierüber nicht erfassbar, da diese auf Grund ihrer niedrigen Siedepunkte bei der Aufarbeitung verloren gingen oder zusammen mit dem Lösungsmittel eluierten. Des Weiteren konnten schwerer flüchtige oder thermisch labile Produkte, wie beispielsweise 4-Hydroxynonenal (4-HNE) nicht erfasst werden, da diese nicht in die Dichlormethanvorlage überführt, beziehungsweise im GC-Injektor bei 250 °C abgebaut werden konnten. Im Falle des 4-HNE wäre eine thermisch induzierte Kondensation zum entsprechenden Cyclisierungsprodukt 2-Pentylfuran denkbar, welches ebenfalls in Abb. 34 identifiziert werden konnte. Acrolein, MDA und 4-HNE stellen auf Grund ihrer hohen Reaktivitäten interessante Reaktionspartner für weiterführende Reaktionen dar (Esterbauer et al., 1991).

Zur Erfassung von Acrolein, MDA und 4-HNE in den Erdnussöl- und Erdnussproben waren in der vorliegenden Arbeit Quantifizierungsmethoden mittels GC-MS (EI) zu entwickeln sowie hierüber die Gehalte in den Erdnussöl- und Erdnussproben zu quantifizieren. Die Quantifizierung von 4-HNE erfolgte über eine Stabilisotopenverdünnungs-analyse nach zweifacher Derivatisierung durch *o*-(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)hydroxylamin (PFBHA) und *N,O*-Bis(trimethylsilyl)tri-fluoracetamid (BSTFA) unter Verwendung von 4-HNE- $d_2$  als internem Standard. Erfasst wurden somit die entsprechenden *o*-(Pentafluor-benzyl)oxim-trimethylsilyl-Derivate (PFBO-TMS-Derivate). Der entwickelte Darstellungsweg des 4-HNE- $d_2$  ist in Kap. 3.9.2 angegeben. Die Quantifizierung von Acrolein erfolgte nach Derivatisierung durch PFBHA unter Verwendung von (*E*)-But-2-enal als internem Standard in Form der entsprechenden PFBO-Derivate. But-2-enal entsteht natürlicherweise im Zuge der Lipidperoxidation. Deshalb konnte es in sehr geringen Mengen im Bereich von 1-2 % der zugesetzten Stoffmenge an (*E*)-But-2-enal in den Proben nachgewiesen werden. Dies wurde rechnerisch berücksichtigt (siehe hierzu Kap. 3.10.14). Die Quantifizierung von MDA erfolgte nach Derivatisierung mittels Pentafluorphenylhydrazin (PFPH) über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung von MDA- $d_2$  als internem Standard. Erfasst wurden die entsprechenden PFPH-Derivate. Alle nachfolgend dargestellten Fragmentmuster ergaben sich bei einer Standard-EI-Spannung von 70 eV. Die in den Massenspektren abgebildeten Masse-Ladungs-Verhältnisse (*m/z*) entsprechen dabei den mittels GC-MS erhaltenen *m/z*. Die an den

Strukturformeln zugeordneten Fragmente zeigen die jeweils berechneten monoisotopischen Massen der Fragmentionen.

### Acrolein

In Abb. 36 sind die GC-MS (EI)-Massenspektren der Acrolein- und 2-Butenal-PFBO-Derivate sowie die zugeordneten Fragmente der jeweiligen Verbindungen dargestellt.

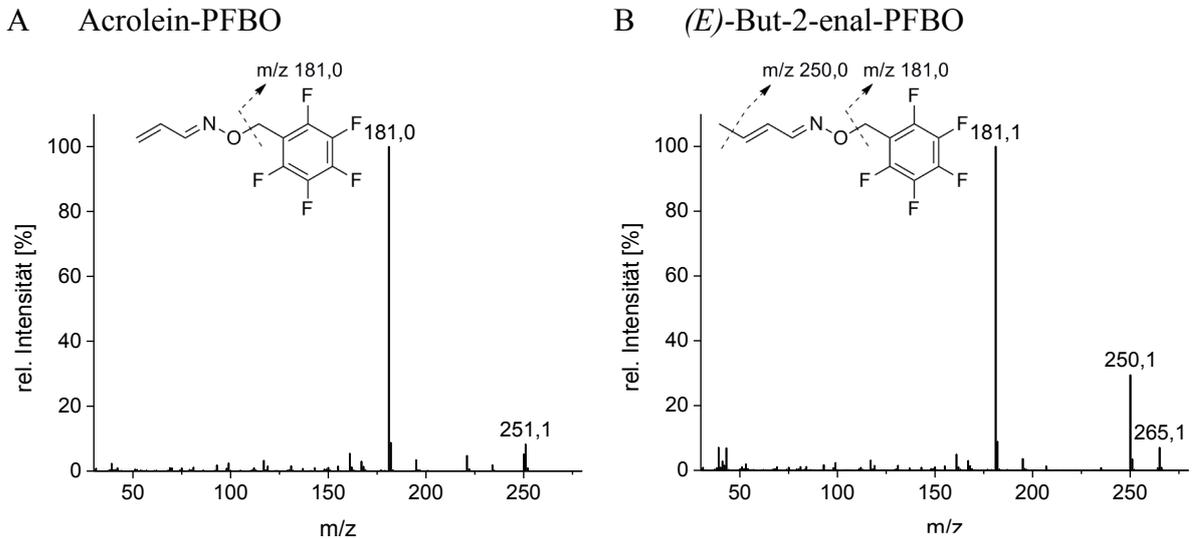


Abb. 36 GC-MS (EI)-Massenspektren der (A) Acrolein- und (B) (*E*)-But-2-enal-PFBO-Derivate

Im Falle des Acrolein-PFBO-Derivats (Abb. 36,A) wurden zwei Hauptionen beobachtet, wovon das Ion mit m/z 251,1 dem Molekülion zuzuordnen war. Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 251,0 g/mol auf. Das Fragmention mit m/z 181,0 wurde nach Kawai et al. (2007) dem fluorierten Benzylrest zugeordnet. Als Quantifier und Qualifier wurden somit jeweils die Fragmentionen mit m/z 181,0 und m/z 251,0 verwendet.

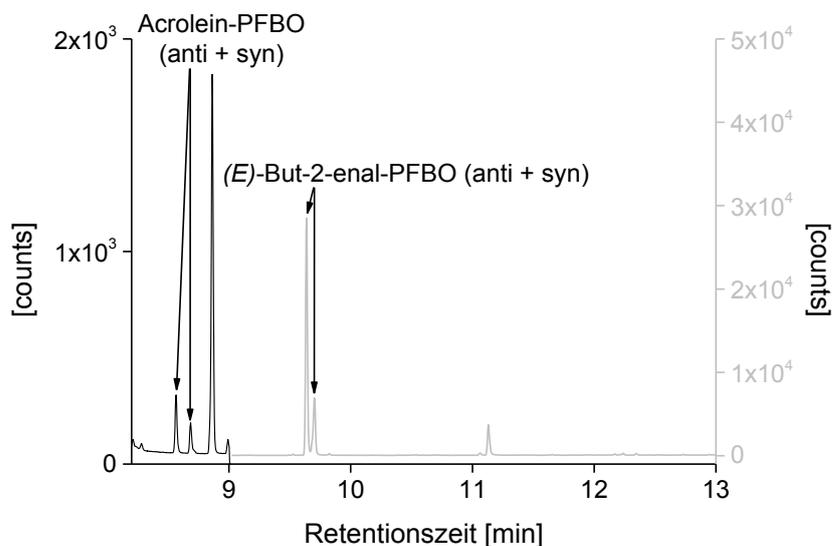


Abb. 37 GC-MS (EI)-SIM-Lauf zur Quantifizierung von Acrolein in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe mit den extrahierten Massespuren m/z 181 (schwarz) des Acrolein-PFBO und m/z 265 (grau) des internen Standards (*E*)-But-2-enal-PFBO

Analog entsprach im Falle des (*E*)-But-2-enal-PFBO-Derivats (Abb. 36,B) das Ion mit  $m/z$  265,1 dem Molekülion, welches eine berechnete monoisotopische Masse von 265,1 g/mol aufweist. Weiterhin waren Fragmentionen mit  $m/z$  250,1 und  $m/z$  181,1 erkennbar, wodurch das Fragmentmuster im Einklang mit der Literatur stand (Schmarr et al., 2008). Als Quantifier und Qualifier wurden jeweils die Ionen mit  $m/z$  181,0 und  $m/z$  265,1 verwendet. Ein beispielhaftes GC-MS (EI)-SIM-Chromatogramm der Quantifizierung von Acrolein in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe ist in Abb. 37 dargestellt.

### Malondialdehyd

In Abb. 38 sind die GC-MS (EI)-Massenspektren der MDA- und MDA- $d_2$ -PFPH-Derivate dargestellt.

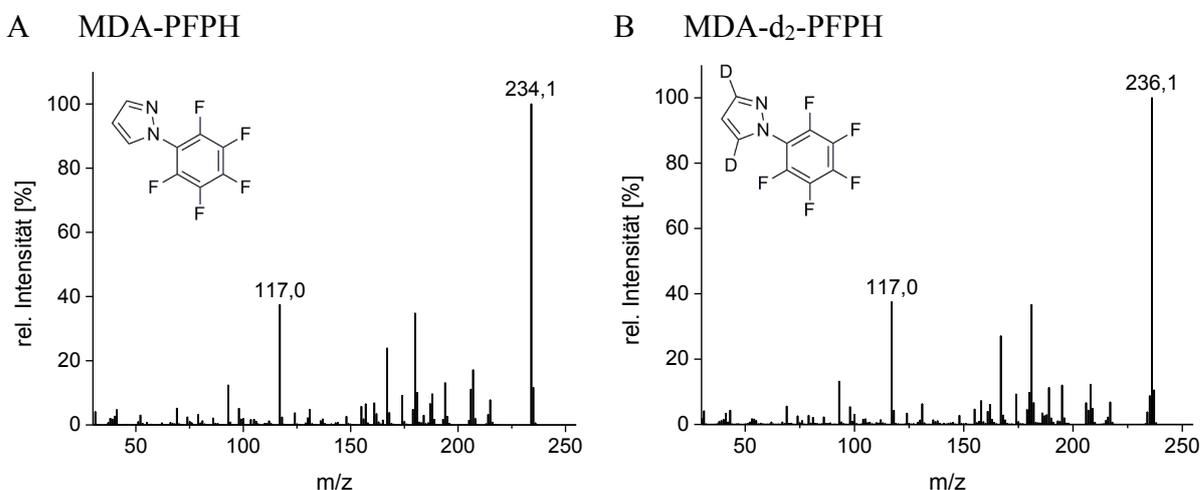


Abb. 38 GC-MS (EI)-Massenspektren der (A) MDA- und (B) MDA- $d_2$ -PFPH-Derivate

Das für MDA-PFPH (Abb. 38,A) erhaltene Fragmentmuster war in Übereinstimmung mit der Literatur (Fenaille et al., 2001). Das Fragmention mit  $m/z$  234,1 entsprach dabei dem Molekülion, das eine berechnete monoisotopische Masse von 234,0 g/mol aufweist. Im Falle des MDA- $d_2$ -PFPH-Derivats (Abb. 38,B) entsprach das Ion mit  $m/z$  236,1 dem Molekülion, welches eine berechnete monoisotopische Masse von 236,0 g/mol aufweist. Ewert et al. (2011) postulierten für das Fragmention mit  $m/z$  117,0, dass dies durch eine Neuordnung des aromatischen Rings entstehen und dem Ion  $[C_5F_3]^+$  entsprechen könnte. Das gleiche Fragmention konnten auch Pang et al. (2011) nach PFPH-Derivatisierung von 2-Methylacrolein, Furfural, 3-Methylbenzaldehyd und Glyoxal beobachten. Das von Pang et al. (2011) beschriebene Fragmention mit  $m/z$  183, welches dem Ion  $[C_6F_5NH]^+$  zugeordnet worden ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Ursächlich für ein verändertes Fragmentierungsverhalten könnte der im Falle des MDA ausgebildete aromatische Pyrazolring sein, wohingegen es im Falle von 2-Methylacrolein, Furfural, 3-Methylbenzaldehyd oder Glyoxal zur Ausbildung einer Schiff'schen Base kommt (Pang et al., 2011). Die Differenzierung von MDA-PFPH und MDA- $d_2$ -PFPH erfolgte anhand der Molekülionen  $m/z$  234,0 und  $m/z$  236,0.

Diese wurden jeweils als Quantifier der MDA-Analytik verwendet. Als Qualifier dienten jeweils die Fragmentationen mit  $m/z$  117,0. Ein beispielhaftes GC-MS (EI)-SIM-Chromatogramm der Quantifizierung von MDA in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe ist in Abb. 39 dargestellt.

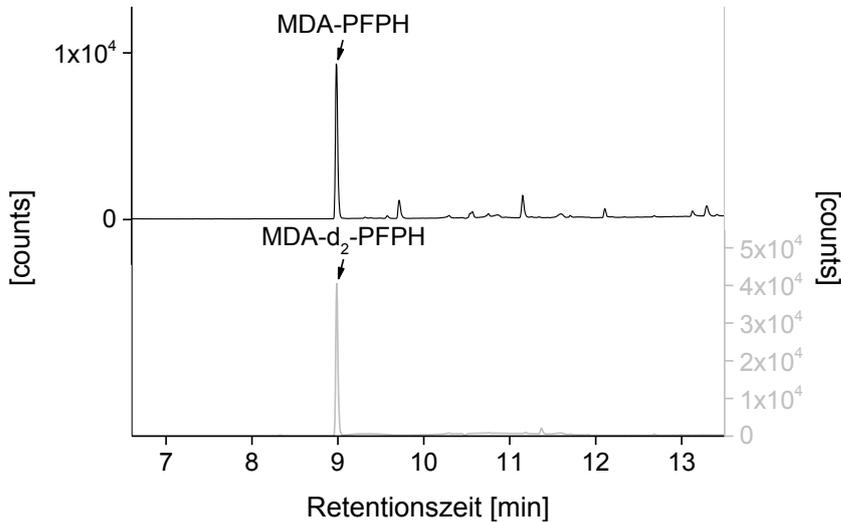
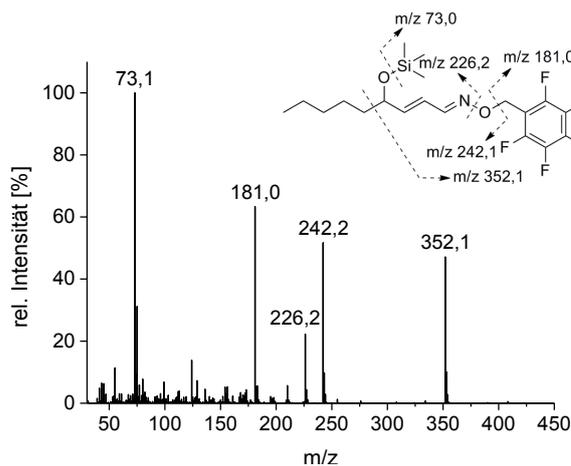


Abb. 39 GC-MS (EI)-SIM-Lauf zur Quantifizierung von MDA in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe mit den extrahierten Massespuren  $m/z$  234 (schwarz) des MDA-PFPH und  $m/z$  236 (grau) des internen Standards MDA- $d_2$ -PFPH

#### 4-Hydroxynonenal

In Abb. 40 sind die GC-MS (EI)-Massenspektren der 4-HNE- und 4-HNE- $d_2$ -PFBO-TMS-Derivate sowie die zugeordneten Fragmente der jeweiligen Verbindungen dargestellt.

A 4-HNE-PFBO-TMS



B 4-HNE- $d_2$ -PFBO-TMS

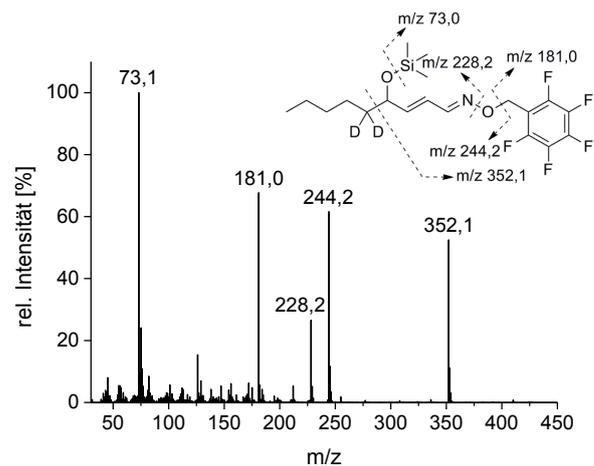


Abb. 40 GC-MS (EI)-Massenspektren der (A) 4-HNE- und (B) 4-HNE- $d_2$ -PFBO-TMS-Derivate

Das erhaltene Fragmentmuster des 4-HNE-Derivats (Abb. 40,A) war in Übereinstimmung mit der Literatur (Kawai et al., 2007). Die zweifache Deuterierung des 4-HNE- $d_2$  zeigte sich im Massenspektrum des 4-HNE- $d_2$ -Derivats (Abb. 40,B) in den Fragmentationen  $m/z$  244,2 und  $m/z$  228,2. Da die Fragmente  $m/z$  242,2 des 4-HNE-Derivats und  $m/z$  244,2 des 4-HNE- $d_2$ -

Derivats die höchsten Intensitäten in den sich unterscheidenden Fragmentationen aufwiesen, wurden diese als Quantifier für die 4-HNE-Analytik verwendet. Als Qualifier wurden jeweils die Fragmentationen mit  $m/z$  352,1 verwendet. Ein beispielhaftes GC-MS (EI)-SIM-Chromatogramm der Quantifizierung von 4-HNE in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe ist in Abb. 41 dargestellt. Erkennbar ist, dass im Vergleich zu Abb. 37 und Abb. 39 deutlich mehr Matrixbestandteile das gleiche Masse-Ladungs-Verhältnis aufweisen, wie die Quantifizierungen des derivatisierten 4-HNE ( $m/z$  242), beziehungsweise 4-HNE- $d_2$  ( $m/z$  244).

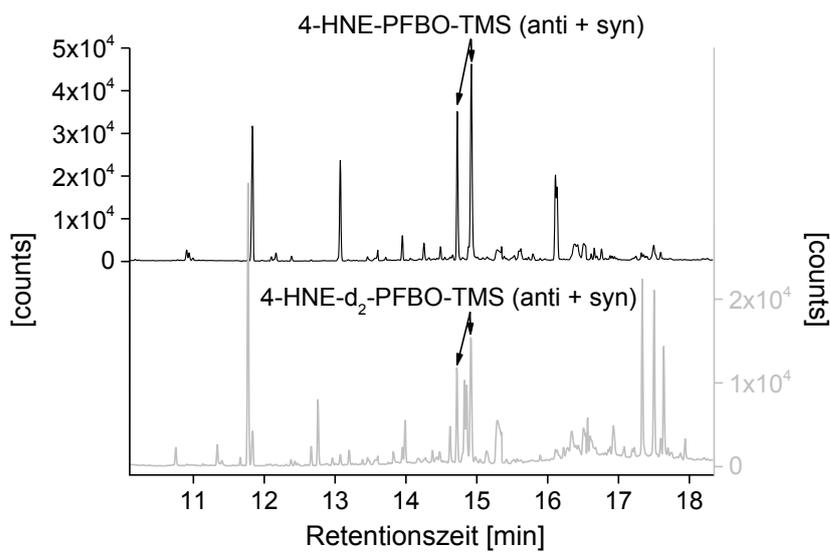


Abb. 41 GC-MS (EI)-SIM-Lauf zur Quantifizierung von 4-HNE in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe mit den extrahierten Massespuren  $m/z$  242 (schwarz) des 4-HNE-PFBO-TMS und  $m/z$  244 (grau) des internen Standards 4-HNE- $d_2$ -PFBO-TMS

In Tab. 48 sind die nach Kap. 3.13 bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der 4-HNE-, Acrolein- und MDA-Analytik angegeben.

Tab. 48 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der 4-HNE-, Acrolein- und MDA-Analytik, jeweils angegeben in nmol/100 g Öl beziehungsweise 100 g Protein

	Acrolein	MDA	4-HNE
Nachweisgrenze Erdnussöl	26,1	0,9	0,8
Bestimmungsgrenze Erdnussöl	43,5	1,6	1,3
Nachweisgrenze Erdnüsse	56,0	11,8	650
Bestimmungsgrenze Erdnüsse	93,0	19,7	1090

### 4.2.2.2 Quantifizierung

#### Acrolein

In Abb. 42 sind die in den Erdnussöl- und Erdnussproben quantifizierten Gehalte an Acrolein dargestellt.

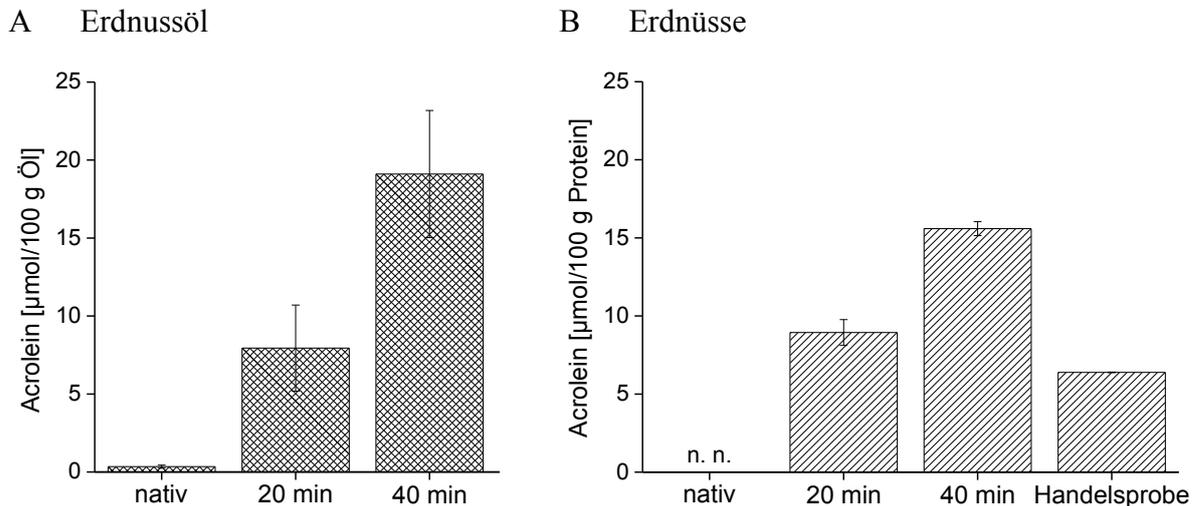


Abb. 42 Mittels GC-MS (EI) quantifizierte Gehalte an Acrolein in den auf 170 °C erhitzten (A) Erdnussöl- und (B) Erdnussproben; n. n. - nicht nachweisbar

In den **Erdnussölproben** (Abb. 42A) wurden Gehalte an Acrolein von 0,3-19,1 µmol/100 g Öl quantifiziert. Dies entsprach Gehalten von 0,2-10,7 mg/kg Öl. Somit erfolgte die Bildung des Acroleins im Erdnussöl in Abhängigkeit der Erhitzungszeit. Casella & Contursi (2004) quantifizierten Acrolein in Ölproben mittels HPLC. Hierbei konnten sie erst nach 2-stündiger Erhitzung von Erdnussöl auf 145 °C 2,7 µM Acrolein und nach 2-stündiger Erhitzung auf 200 °C 24 µM Acrolein nachweisen. Unter Zugrundelegung einer mittleren Dichte des Erdnussöls von 0,915 g/ml (Krist, 2013) entsprach dies jeweils Gehalten an Acrolein von 0,3 µmol/100 g Öl und 2,6 µmol/100 g Öl. Im Vergleich dazu lagen die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte etwas höher, jedoch in der gleichen Größenordnung. Da Casella & Contursi (2004) in nativem Erdnussöl kein Acrolein quantifizieren konnten, ist davon auszugehen, dass sich die in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit untersuchten Erdnussölproben in unterschiedlichen Stadien der Lipidperoxidation befunden haben. Das Vorhandensein von Acrolein in der nicht erhitzten Ölprobe, wie in vorliegender Arbeit nachgewiesen, ließ auf eine Lipidperoxidation zurückschließen, die sich bereits im Stadium der Bildung von Sekundärprodukten befunden hat (siehe hierzu Kap. 2.3.2). Somit setzte bereits der Abbau der primären Oxidationsprodukte ein. Die in der Literatur untersuchte Probe befand sich eventuell noch in der Bildungsphase der Primärprodukte (siehe hierzu Kap. 2.3.1), weshalb dann auch unter Hitzeeinwirkung die Weiterreaktion zu den Sekundärprodukten verzögert abgelaufen sein könnte. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte die von Casella & Contursi

(2004) höher gewählte Erhitzungstemperatur sein, wodurch es bevorzugt zu Reaktionen des Acroleins mit weiteren Abbauprodukten gekommen sein könnte (Ewert et al., 2011). Auch in den weiteren von Casella & Contursi (2004) untersuchten Ölproben konnte, bis auf Sonnenblumenöl, erst nach 2-stündiger Erhitzung der Öle auf 145 °C Acrolein quantifiziert werden. So betragen die Gehalte in Maiskeim-, Sonnenblumen- und Olivenöl jeweils 0,4, 0,3 und 0,5-0,9 µmol/100 g Öl. Ewert et al. (2011) quantifizierten mittels HRGC-MS Acrolein in Ölproben, die zuvor auf 180 °C für 2 h erhitzt wurden. Hierbei konnten sie Gehalte an Acrolein in Kokosnuss-, Oliven-, Raps-, Distel- und Leinöl von jeweils 2,0, 21,0, 189,3, 44,8 und 152,9 µmol/100 g Öl bestimmen. Die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte lagen somit innerhalb der Spannweite der Literaturwerte.

In den **Erdnussproben** (Abb. 42B) konnte erst nach einer 20-minütigen Röstung Acrolein nachgewiesen werden. Die Gehalte in den für 20 und 40 min gerösteten Proben betragen jeweils 8,9 und 15,6 µmol/100 g Protein, entsprechend 21,2 und 36,7 µmol/kg Erdnuss. Somit konnte in Abhängigkeit der Röstzeit eine Zunahme der Gehalte an Acrolein beobachtet werden. Eine mögliche Ursache dafür, dass in den nativen Erdnüssen kein Acrolein nachweisbar war, könnte einerseits der niedrige Siedepunkt des Acroleins von 52,5 °C (Abraham et al., 2011) darstellen. Hierdurch war es möglich, dass Acrolein, welches als Folge des Trocknungsprozesses der Erdnüsse an deren Oberfläche gebildet worden sein könnte, leichter abdampfen konnte und somit die Nachweisgrenze der Analysenmethode unterschritten wurde. Andererseits könnte das in den nativen Erdnüssen gebildete Acrolein auf Grund seiner hohen Reaktivität (Esterbauer et al., 1991) bereits mit Erdnussmatrixbestandteilen Reaktionen eingegangen sein, sodass in den gerösteten Erdnüssen als Folge der Röstung nachgebildetes Acrolein erfasst wurde, welches noch nicht abreagiert hatte. Weiterhin ist eine bevorzugte Bildung aus Glycerol oder Glukose denkbar (Stevens & Maier, 2008), welche erst im Zuge der Röstung aus den Triacylglyceriden beziehungsweise Stärke entstanden sind. Die Handelsprobe wies mit 6,4 µmol/100 g Protein, entsprechend 1,0 mg/kg Erdnuss, vergleichbare Gehalte auf wie die für 20 min gerösteten Erdnüsse. In der Literatur sind bisher keine quantitativen Daten zu Gehalten an Acrolein in Erdnüssen veröffentlicht. Generell ist die Datenlage für Lebensmittel, beispielsweise verglichen mit publizierten Gehalten an 4-HNE oder MDA, gering. In diversen Früchten wurde Acrolein im Bereich < 0,2-0,9 µmol/kg und in Gemüse bis zu 10,5 µmol/kg bestimmt (Feron et al., 1991). Collin et al. (1993) bestimmten mittels GC-MS in Weißkäse Gehalte im Bereich von 5,4-23,2 µmol/kg. In alkoholischen Getränken wurden mittels GC-MS und HPLC Gehalte von 12,0-198,0 µmol/kg detektiert (Panosyan et al., 2001; Feron et al., 1991; Miller & Danielson, 1988). Die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte liegen somit im Bereich der Literaturwerte.

### Malondialdehyd

In Abb. 43 sind die in den Erdnussöl- und Erdnussproben quantifizierten Gehalte an MDA dargestellt.

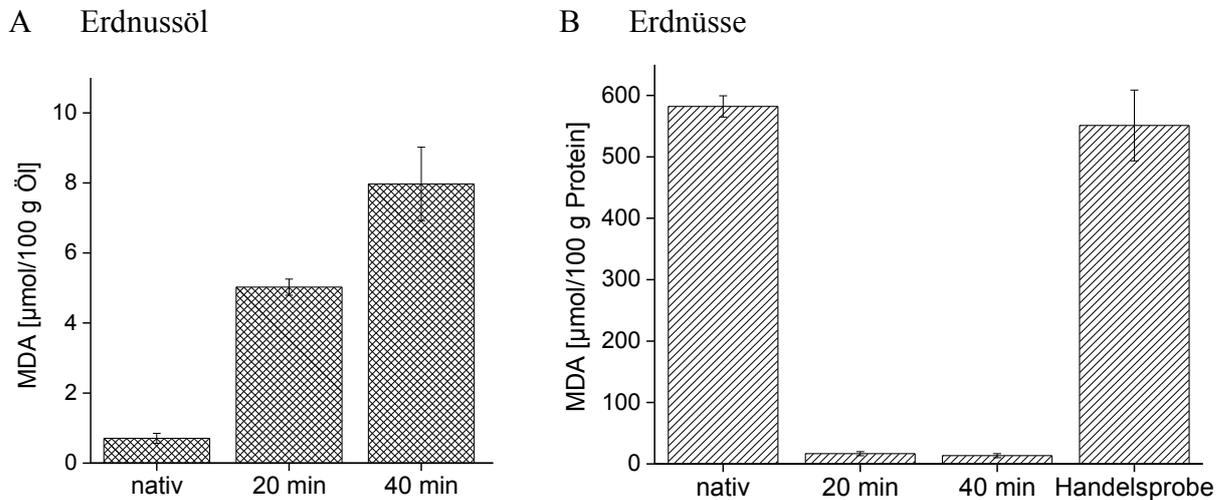


Abb. 43 Mittels GC-MS (EI) quantifizierte Gehalte an MDA in den auf 170 °C erhitzten (A) Erdnussöl- (n=2) und (B) Erdnussproben (n=3)

In den **Erdnussölproben** (Abb. 43A) wurde eine Zunahme der Gehalte an MDA, ausgehend von 0,7 auf 8,0 µmol/100 g Öl, entsprechend 0,5-5,7 mg/kg Erdnussöl, festgestellt. Somit konnte analog der Bildung des Acroleins (Abb. 42A) eine Zunahme in Abhängigkeit der Erhitzungsdauer verzeichnet werden. Die Gehalte stimmten mit den von Papastergiadis et al. (2012) mittels HPLC-Fluoreszenz quantifizierten Gehalten in nicht erhitztem Erdnussöl von 0,9 mg/kg überein. Weiterhin bestimmten Papastergiadis et al. (2012) in nicht erhitztem Maiskeim-, Sonnenblumen-, Raps- und Olivenöl Gehalte an MDA von jeweils 1,2, 0,8, 11,7 und 1,5 mg/kg Öl, die ebenfalls von ihrer Größenordnung mit den in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalten übereinstimmten.

In den **Erdnussproben** (Abb. 43B) konnte in Folge der Röstung eine deutliche Abnahme der Gehalte an MDA, ausgehend von 582,1 auf 13,4 µmol/100 g Protein, festgestellt werden. Dies entsprach Gehalten von 97,1-2,3 mg/kg Erdnuss. Die Gehalte der für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse unterschieden sich nicht signifikant voneinander, sodass hier ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und Abreaktion des MDA vermutet wurde. Papastergiadis et al. (2012) quantifizierten mittels HPLC-Fluoreszenz MDA in kommerziell gerösteten Erdnüssen zu 0,9 mg/kg Erdnuss. Diese Werte sind mit den in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalten der selbst gerösteten Erdnüsse vergleichbar. Die Handelsprobe wies mit 551,1 µmol/100 g Protein, entsprechend 114,0 mg/kg Erdnuss, vergleichbare Gehalte wie die native Erdnussprobe auf. Da die Lagerdauer und Lagerungsbedingungen der untersuchten Handelsprobe nicht bekannt waren, kann keine Aussage darüber getätigt werden, ob die in der Literatur untersuchte Handelsprobe analogen Bedingungen ausgesetzt war. Auf Grund der

Tatsache, dass die hier untersuchte Handelsprobe vergleichbare Gehalte wie die nativen Erdnüsse aufwies, wird vermutet, dass es nach der Röstung während der Lagerung zu einer Neubildung an MDA gekommen ist. Da die von Papastergiadis et al. (2012) untersuchte Handelsprobe vergleichbare Gehalte an MDA wie die in der vorliegenden Arbeit gerösteten Erdnüsse aufwies, kann zudem vermutet werden, dass diese Erdnüsse eventuell weniger lange gelagert wurden. Mittels HPLC-Fluoreszenz wurden in geräuchertem Lachs Gehalte an MDA von 0,1-0,6 mg/kg (Munasinghe et al., 2003a) und in Rindfleisch und Hering Gehalte von jeweils 3,6 und 2,3 mg/kg quantifiziert (Papastergiadis et al., 2012). Munasinghe et al. (2003b) quantifizierten ebenfalls mittels HPLC-Fluoreszenz in Schinken, Speck, Wiener Würstchen und Frankfurter jeweils Gehalte von 7,6-21,1, 0,007-0,013, 0,047-0,051 und 23,2 mg/kg. Okolie & Okugbo (2013) quantifizierten MDA in diversen Fleischproben im Bereich von 93,7-3415,6 mg/kg nach Derivatisierung durch Thiobarbitursäure (TBA) und photometrischer Detektion. Hierdurch kommt es allerdings zu einer Überquantifizierung der MDA-Gehalte, da neben MDA weitere Sekundärprodukte durch TBA derivatisiert werden, wodurch letztendlich die Summe der TBA-reaktiven Substanzen erfasst wird (Cordis et al., 1993). Schlörmann et al. (2015) erfassten in ungerösteten und gerösteten Haselnüssen, Mandeln, Macadamianüssen, Pistazien und Walnüssen ebenfalls die TBA-reaktiven Substanzen (angegeben als MDA-Äquivalente) und konnten hierbei in Abhängigkeit der Röstung Zunahmen beobachten. Hierdurch konnte ausgesagt werden, dass als Folge der Röstung Carbonylverbindungen gebildet wurden. Da allerdings neben MDA weitere thiobarbitursäurereaktiven Substanzen mit erfasst worden sein könnten, ist eine Aussage über eine mögliche Korrelation mit einer Zunahme an MDA nicht möglich. Ursächlich für die hohen Ausgangsgehalte an MDA in den nativen Erdnüssen könnte sowohl eine abgelaufene Lipidperoxidation während der Trocknung der Erdnüsse nach der Ernte, als auch eine UV-induzierte Fotooxygenierung gewesen sein (Esterbauer et al., 1991; Frankel & Neff, 1983).

#### **4-Hydroxynonenal**

In Abb. 44 sind die in den Erdnussöl- und Erdnussproben quantifizierten Gehalte an 4-HNE dargestellt.

In den **Erdnussölproben** (Abb. 44A) war eine Zunahme der 4-HNE-Gehalte, ausgehend von 0,1 bis auf 0,6  $\mu\text{mol}/100\text{ g Öl}$ , feststellbar. Dies entsprach Gehalten von 0,2 bis 1,0 mg/kg Öl. Somit wird deutlich, dass es, ausgehend von einem bestimmten Grundgehalt an 4-HNE, in Abhängigkeit der Erhitzungsbedingungen zur Neubildung kommt. Gabbanini et al. (2015) konnten in kommerziellem Erdnussöl mittels UHPLC-MS/MS kein 4-HNE nachweisen. Erst nach Erhitzung des Öles auf 180 °C für 1 h war ein Gehalt von 1,1 mg/kg Öl quantifizierbar. Dieser Wert ist mit den in der vorliegenden Arbeit nach Erhitzung des Öles für 40 min erhaltenen Werten vergleichbar.

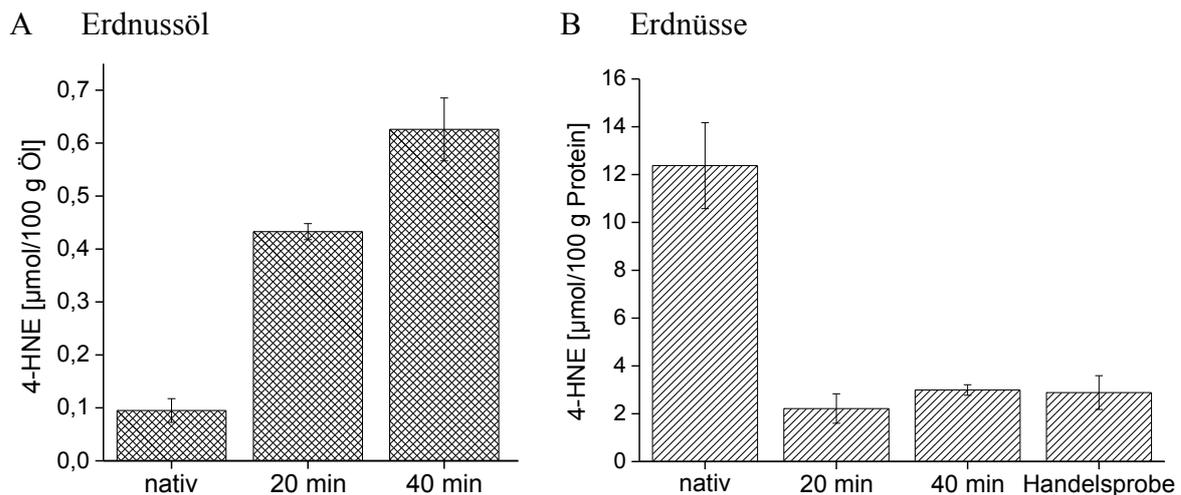


Abb. 44 Mittels GC-MS (EI) quantifizierte Gehalte an 4-HNE in den auf 170 °C erhitzten (A) Erdnussöl- und (B) Erdnussproben

Differenzen in den Absolutwerten an Sekundärprodukten könnten ihre Ursachen in unterschiedlichen Oxidationszuständen der untersuchten Proben haben. Hierauf könnten Unterschiede in der Lagerdauer und den Lagerbedingungen einen Einfluss gehabt haben. Hierdurch wäre erklärbar, dass Gabbanini et al. (2015) in der nativen Probe kein 4-HNE nachweisen konnten. Ebenfalls vergleichbare Daten erhielten Seppanen & Csallany (2006), die Sojabohnenöl auf 185 °C erhitzten und nach 2 h 1,8 mg 4-HNE/kg Öl mittels HPLC-UV nachweisen konnten. Han & Csallany (2008) erhitzten Butter-, Maiskeim- und Sojabohnenöl auf 190 °C für 30 min und konnten 4-HNE in Gehalten von 1-3 mg/kg Öl mittels HPLC-UV bestimmen. In nativem Olivenöl Extra wurden Gehalte von 0,06-0,12 mg 4-HNE/kg Öl mittels GC-MS quantifiziert (Papastergiadis et al., 2014). Precursoren für 4-HNE stellen hierbei  $\omega$ -6-Fettsäuren wie die Linol-,  $\gamma$ -Linolen- und Arachidonsäure dar (Spickett, 2013; Esterbauer et al., 1991). Nach Erhitzen von Methylolinoleat auf 185 °C für bis zu 6 h wurde mittels HPLC-UV festgestellt, dass es vor allem innerhalb der ersten Stunde zur Bildung des 4-HNE kam (Han & Csallany, 2009). Die Anteile an Linolsäure betragen in Erdnussöl und Erdnüssen jeweils 21,6 und 13,9 % (Souci et al., 2008), wohingegen die Gehalte an  $\gamma$ -Linolen- und Arachidonsäure nicht relevant sind (Maguire et al., 2004). Somit ist es naheliegend, dass die 4-HNE-Bildung als Folge der Erhitzung von Erdnussöl oder der Erdnussröstung ebenfalls zu Beginn erfolgt. Diese Vermutung stimmt mit den Beobachtungen in Abb. 44A überein, da die 4-HNE-Bildung innerhalb der ersten 20 min ausgeprägter erfolgte, als in den darauf folgenden 20 min.

In Abb. 44B sind die Gehalte an 4-HNE der **Erdnussproben** dargestellt. Diese nahmen als Folge der Röstung von 12,4  $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$  (4,5 mg/kg Erdnuss) der nativen Erdnüsse auf 2,2  $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$  (0,8 mg/kg Erdnuss) der für 20 min gerösteten Erdnüsse ab. Die Anwesenheit von 4-HNE in den nativen Erdnüssen könnte auf die Trocknung und anschließende Lagerung der Erdnüsse zurückzuführen gewesen sein. In der Handelsprobe

wurden Gehalte von 2,9  $\mu\text{mol}$  4-HNE/100 g Protein (1,3 mg/kg) quantifiziert. Diese Gehalte stimmten mit den Gehalten der im Labormaßstab gerösteten Erdnüsse überein. Zwischen den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gehalten an 4-HNE festgestellt werden. Dies deutete, analog den Untersuchungen zur Bildung von MDA (Abb. 43B), auf einen Zustand hin, in welchem die Bildung und der Abbau des 4-HNE im Gleichgewicht standen. Hierdurch könnte auch der quantifizierte Gehalt an 4-HNE in der Handelsprobe erklärt werden, deren Ausgangsgehalt an 4-HNE in den Erdnüssen vor der Röstung nicht bekannt war. Eine Neubildung wäre, wie im Falle des MDA, während der Lagerung nach der Röstung demnach nicht erfolgt. Denkbar wäre somit, dass auch als Folge des Erhitzens des Erdnussöls über einen längeren Zeitraum ein Plateau erreicht würde. Eine solche Plateaubildung konnten auch Seppanen & Csallany (2006) nach Erhitzen von Sojabohnenöl auf 185 °C ab 4 h Erhitzungszeit beobachten. Hierbei wurden 4-HNE-Gehalte im Bereich von 3 mg/kg Öl erreicht. Auch Han & Csallany (2009) beobachteten ein Plateau der 4-HNE-Gehalte nach Erhitzen von Linolsäuremethylester auf 185 °C ab 4 h Erhitzungsdauer. Papastergiadis et al. (2014) quantifizierten mittels GC-MS unter Anwendung der gleichen Derivatisierungsstrategie wie in vorliegender Arbeit 4-HNE in kommerziell erhältlichen Erdnüssen. Die bestimmten Gehalte lagen im Bereich von 0,1-0,6 mg/kg Erdnuss und sind somit mit den in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalten in den im Labormaßstab gerösteten Erdnüssen und der Handelsprobe vergleichbar. In Walnüssen konnten 0,1-0,4 mg 4-HNE/kg und in Säuglingsnahrung 0,2 mg/kg bestimmt werden (Papastergiadis et al., 2014). In Rind- und Schweinefleisch wurden mittels HPLC-UV jeweils Gehalte von 2,2-21,9 mg/kg und 0,2-23,8 mg/kg bestimmt, wobei eine Korrelation zwischen den 4-HNE-Gehalten des Schweinefleisches und den Gehalten an  $\omega$ -6-Fettsäuren festgestellt wurde (Sakai et al., 1995). In Blaumakrelen und Hähnchenfleisch wurden mittels HPLC-Fluoreszenz Gehalte an 4-HNE von jeweils 1,2 und 0,04 mg/kg quantifiziert (Tanaka et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte an 4-HNE liegen somit in einer vergleichbaren Größenordnung wie in der Literatur.

Somit kann festgehalten werden, dass es analog dem MDA in Anwesenheit weiterer Erdnussmatrixbestandteile zu einer Abnahme des Gehalts an 4-HNE kam, wohingegen als Folge des Erhitzens des reinen Erdnussöls unter gleichen Bedingungen eine Zunahme verzeichnet werden konnte. Ein thermischer Abbau des MDA und 4-HNE kann somit nicht maßgeblich zu den beobachteten Verlusten während der Erdnussröstung beigetragen haben.

### 4.2.3 Fazit

Anhand des Modells der Erhitzung von Erdnussöl unter Erdnussröstbedingungen konnten Hexanal, Nonanal und 2-Heptenal als relevante Sekundärprodukte identifiziert werden. Bisher wurden allerdings noch keine Studien durchgeführt, die konkrete Gehalte ausgewählter Sekundärprodukte vergleichend in nativen und gerösteten Erdnüssen sowie nativem und unter Erdnussröstbedingungen erhitztem Erdnussöl quantifizierten. Zudem wurde Acrolein bisher nicht in Erdnüssen quantifiziert. Da die Erdnussröstung bei 170 °C für 20 min eine industrielle Erdnussröstung nachempfinden sollte, sind nachfolgend die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte an Acrolein, MDA und 4-HNE in den Erdnussöl- und Erdnussproben zusammengefasst, die jeweils unter diesen Bedingungen erhitzt wurden (Tab. 49). Vergleichend dazu sind die quantifizierten Gehalte der industriell gerösteten Erdnuss handelsprobe angegeben.

Tab. 49 Quantifizierte Gehalte an Acrolein, MDA und 4-HNE in den bei 170 °C für 20 min erhitzten Erdnussöl- und Erdnussproben sowie der Handelsprobe

Sekundärprodukt	Erdnussöl [ $\mu\text{mol}/100\text{ g Öl}$ ]	Erdnüsse [ $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$ ]	Handelsprobe [ $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$ ]
Acrolein	$7,9 \pm 2,8$	$8,9 \pm 0,8$	$6,4 \pm 0,02$
MDA	$5,0 \pm 0,2$	$16,7 \pm 3,3$	$551,1 \pm 57,6$
4-HNE	$0,4 \pm 0,02$	$2,2 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,7$

Generell wurde festgestellt, dass **als Folge der Erhitzung des Erdnussöls** die Gehalte an Acrolein, MDA und 4-HNE zunahmen. Hierbei lagen die Gehalte an Acrolein und MDA etwa um den Faktor 10 höher als die des 4-HNE. Die in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalte ließen sich dabei größenordnungsmäßig in die Literaturwerte einordnen. Bezüglich der Erdnussproben wurde festgestellt, dass MDA und 4-HNE bereits in den nativen Erdnüssen in höheren Gehalten vorlagen als in den erhitzten Erdnussölproben, was auf die Verwendung von raffiniertem Erdnussöl zurückzuführen war. Ursächlich für das Vorliegen von Sekundärprodukten in den nativen Erdnüssen könnte eine während der Trocknung der Erdnüsse abgelaufene Lipidperoxidation gewesen sein. Um den Wassergehalt der Erdnüsse nach ihrer Ernte von 40 % auf 10 % zu senken, werden die Pflanzen von ihren Wurzeln getrennt und zusammen mit den Früchten für einige Wochen zum Trocknen aufgehängt (Bickel-Sandkötter, 2001; Franke et al., 1988). Alternativ kann die Trocknung durch Schwadentrocknung über zwei bis drei Tage und nachfolgender Heißlufttrocknung für 18-24 h realisiert werden (Vercellotti et al., 1995). Prinzipiell wäre auch eine Erdnuss-Lipoxygenaseaktivität als mögliche Ursache denkbar (Burow et al., 2000).

**Als Folge der Erdnussröstung** wurde im Falle von MDA und 4-HNE eine deutliche Abnahme der Gehalte beobachtet. Acrolein konnte hingegen nur in den gerösteten, nicht aber in den nativen Erdnüssen nachgewiesen werden. Dies könnte auf die hohe Reaktivität des Acroleins zurückzuführen sein (Esterbauer et al., 1991), wodurch es während der Lagerung der Erdnüsse bereits zu einer vollständigen Abreaktion gekommen sein könnte. Für MDA und 4-HNE existieren Literaturwerte für industriell geröstete Erdnussproben, die mit den in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Gehalten übereinstimmen (Papastergiadis et al., 2012, Papastergiadis et al., 2014). Acrolein konnte erstmals in Erdnussproben quantifiziert werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Handelsprobe wies vergleichbare Gehalte an Acrolein und 4-HNE auf wie die für 20 min im Labormaßstab geröstete Probe. Somit ergaben die angewandten Röstbedingungen ein der industriellen Röstung vergleichbares Produkt. Die hohen Gehalte an MDA könnten auf eine schnelle Nachbildung während der Lagerung zurückzuführen sein. Da als Folge der Erdnussröstung eine Abnahme der Gehalte der Sekundärprodukte MDA und 4-HNE festgestellt wurde, könnte es während der Röstung zu einer schnelleren Weiterreaktion mit Erdnussmatrixbestandteilen im Vergleich zu deren Nachbildung gekommen sein. Ein thermischer Abbau konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da als Folge der Erhitzung von Erdnussöl unter den gleichen Bedingungen Zunahmen der Sekundärprodukte beobachtet wurden. Potentielle Reaktionspartner stellen hierbei nukleophile Aminosäureseitenketten der Erdnussproteine dar. Somit könnte es während der Erdnussröstung neben der Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten zur Reaktion von Sekundärprodukten aus der Lipidperoxidation mit Aminosäureseitenketten gekommen sein. Für diese Reaktionen wird in der vorliegenden Arbeit in Analogie zur Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatischen Glykosylierung die Bezeichnung „Lipierungsreaktion“ oder „Lipierung“ vorgeschlagen (siehe hierzu Kap. 2.4). Die hierdurch entstehenden Lipierungsprodukte könnten zu der von Wellner et al. (2012b) beobachteten und nicht durch die Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten erklärten Lysinabnahme beitragen.

### 4.3 Identifizierung reaktiver Aminosäurereste der Erdnussproteine gegenüber ausgewählten Sekundärprodukten

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung reaktiver Aminosäurereste im Erdnussproteinverband gegenüber Sekundärprodukten. Hierüber sollten Informationen darüber erhalten werden, welche Aminosäuren für die nachfolgenden Untersuchungen zur Bildung konkreter Lipierungsprodukte relevant waren. Dazu wurde ein Erdnussproteinextrakt, das aus nativen, ungerösteten Erdnüssen isoliert wurde, mit den ausgewählten Sekundärprodukten Hexanal, 2-Heptenal, Acrolein, MDA und 4-HNE inkubiert. Die Auswahl der Sekundärprodukte

begründete sich wie folgt: (1) Hexanal und 2-Heptenal wurden als relevante Sekundärprodukte identifiziert, die als Folge der Erhitzung von Erdnussöl gebildet wurden (siehe hierzu Kap. 4.2.1); (2) Acrolein, MDA und 4-HNE wurden in der vorliegenden Arbeit in Erdnussöl- und Erdnussproben quantifiziert, da sie auf Grund ihrer hohen Reaktivitäten (Esterbauer et al., 1991) interessante Reaktionspartner für weiterführende Reaktionen darstellen (siehe hierzu Kap. 4.2.2); (3) Hexanal stand stellvertretend für die Gruppe der Aldehyde, 2-Heptenal und Acrolein für die Gruppe der 2-Alkenale, MDA für die Gruppe der Dialdehyde und 4-HNE für die Gruppe der 4-Hydroxyalkenale. Die Inkubationen erfolgten in aufsteigenden Stoffmengenverhältnissen (0,1:1 bis maximal 10:1) an Sekundärprodukt bezogen auf die Summe der Stoffmengen der potentiell reaktiven Aminosäuren der Erdnussproteine Cystein, Histidin, Lysin und Arginin. Deren Anteile betragen im Erdnussproteinextrakt jeweils  $3,83 \pm 0,79$ ,  $19,27 \pm 0,06$ ,  $32,58 \pm 1,39$  und  $70,58 \pm 3,22$  mmol/100 g Protein. Die Inkubationen erfolgten bei 37 °C für 24 h in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) in Anlehnung an Ishino et al. (2010), Furuhashi et al. (2003) und Ichihashi et al. (2001), die Auswertungen mittels Aminosäureanalyse nach enzymatischer Hydrolyse (eH), um säurelabile Produkte mit zu erfassen. Lediglich Histidin sowie Arginin im Falle der Inkubation mit 4-HNE wurden nach salzsaurer Hydrolyse (sH) erfasst, da es hier bei den enzymatischen Hydrolysaten zu Coelutionen bei der Aminosäureanalytik kam. Die nachfolgend dargestellten Aminosäureabnahmen wurden jeweils über die Verhältnisse zu Valin, bezogen auf die jeweiligen Ausgangsverhältnisse, der analog inkubierten Erdnussprotein-Blindwertproben berechnet. Valin diente hierbei als interner Standard. Die Auswirkungen auf die Proteinquervernetzung der Erdnussproteine wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Diese waren vor dem Hintergrund einer möglichen Beeinflussung des allergenen Potentials der Erdnussproteine interessant (siehe hierzu Kap. 2.2.3). Dabei lag der Fokus insbesondere auf den beiden Erdnusshauptallergenen Ara h 1 und Ara h 2. Die eingesetzten Proben wurden auf einen Proteingehalt von 1,0 mg/ml normiert, sodass eine direkte Vergleichbarkeit der Lanes untereinander gegeben ist. Des Weiteren wurden die Proben reduziert, um mögliche Disulfidbrücken zu spalten und beobachtete Quervernetzungen somit ausschließlich auf Reaktionen mit den Sekundärprodukten zurückzuführen waren.

### 4.3.1 Hexanal

In Abb. 45 sind die Aminosäureabnahmen und die SDS-PAGE der mit Hexanal inkubierten Erdnussproteine dargestellt.

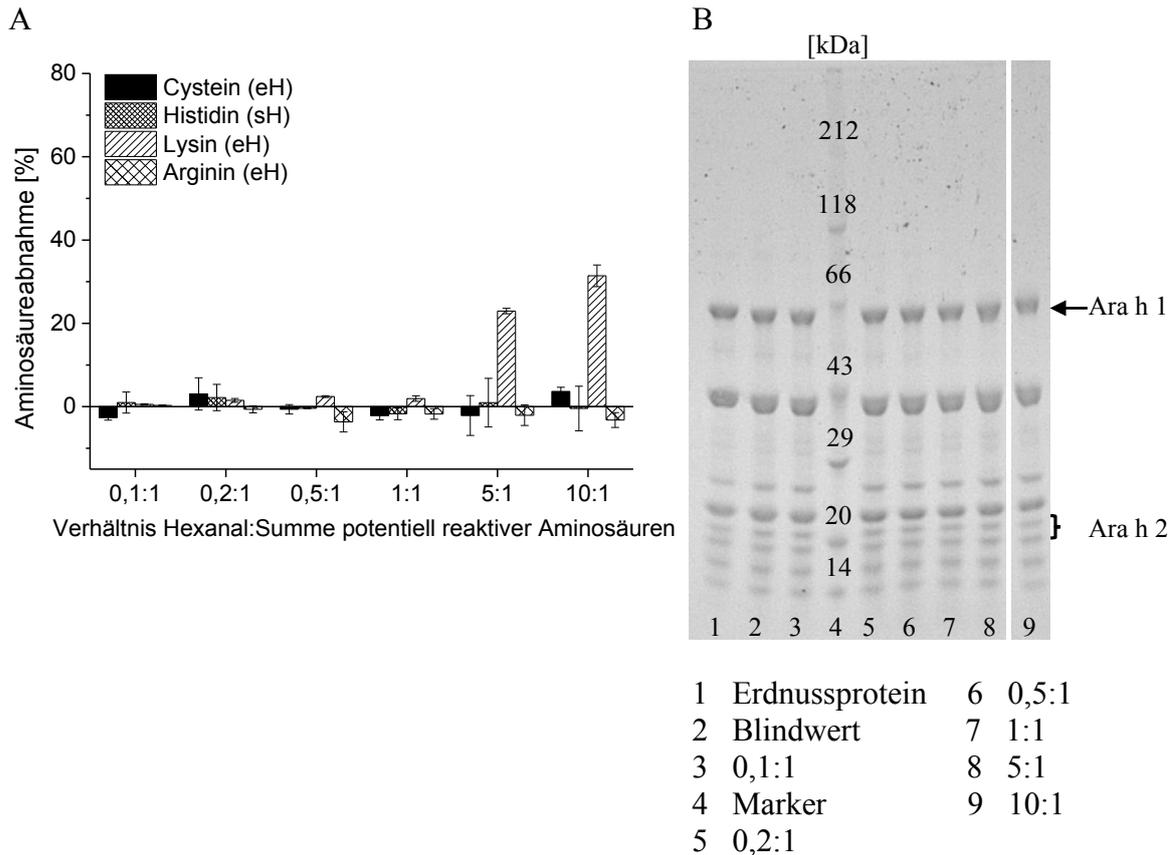


Abb. 45 Erdnussproteine inkubiert mit Hexanal; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid)

Die Aminosäureabnahmen (Abb. 45A) zeigen, dass Hexanal vor allem mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins Lipierungsreaktionen eingeht. Die Lysinabnahmen betragen im 0,1:1- und 10:1-Ansatz jeweils 1 % und 31 %. Weiterhin konnte im 10:1-Ansatz eine geringe Cysteinabnahme von 4 % festgestellt werden. Weitere Aminosäuren wurden nicht modifiziert. Anhand der SDS-PAGE (Abb. 45B) ist zu erkennen, dass es als Folge der Lipierung durch Hexanal zu keinen Proteinquervernetzungen kam. Auch der Vergleich des nicht inkubierten Erdnussproteinextrakts (Lane 1) mit dem inkubierten Erdnussprotein-Blindwert (Lane 2) zeigt, dass die Inkubation als solche bei 37 °C für 24 h zu keinen Proteinquervernetzungen führte. Wird das mögliche Reaktionsproduktspektrum des Hexanals mit Nucleophilen betrachtet, so kann zunächst als mögliches Lipierungsprodukt eine Schiff'sche Base **1** entstehen, welche einerseits bei Anwesenheit reduzierender Substanzen zu den entsprechenden mono- (**3**) und dialkylierten (**4**) Reaktionsprodukten (Fenaille et al., 2004) und andererseits zu 1,2,3,5- oder 1,3,4,5-substituierten Pyridiniumderivaten **2** unter Einbeziehung drei weiterer Hexanalmoleküle weiterreagieren kann (Kato et al., 1986; Suyama & Adachi, 1979). Zudem kann es protonenkatalysiert in Anwesenheit oxidierender Agenzien zur Bildung von N<sup>ε</sup>-(Hexanoyl)lysin **5** kommen (Ishino et al., 2008). Generell besteht somit im Falle der Aldehyde lediglich die Möglichkeit zur Ausbildung einer Schiff'schen Base sowie den hierüber zugänglichen Folgeprodukten. Eine direkte Proteinquervernetzung ist nicht möglich. Denkbar wäre diese im

Falle der Ausbildung von Aldolkondensationsprodukten des Hexanals, noch bevor es zu Reaktionen mit Nucleophilen kommt. Hierdurch bestünde die Möglichkeit, dass es nach einer Michael-Addition an das Aldolkondensationsprodukt zur Ausbildung einer Schiff'schen Base kommen und hierdurch Proteinquervernetzungen resultieren könnten. Zudem stellen Aldehyde, beispielsweise im Vergleich zu 2-Alkenalen oder 4-Hydroxy-alkenalen, unreaktivere Reaktionspartner da (siehe Kap. 4.3.5).

### 4.3.2 2-Heptenal und Acrolein

In Abb. 46 und Abb. 47 sind die Aminosäureabnahmen sowie die SDS-PAGEs der mit 2-Heptenal beziehungsweise Acrolein inkubierten Erdnussproteine dargestellt.

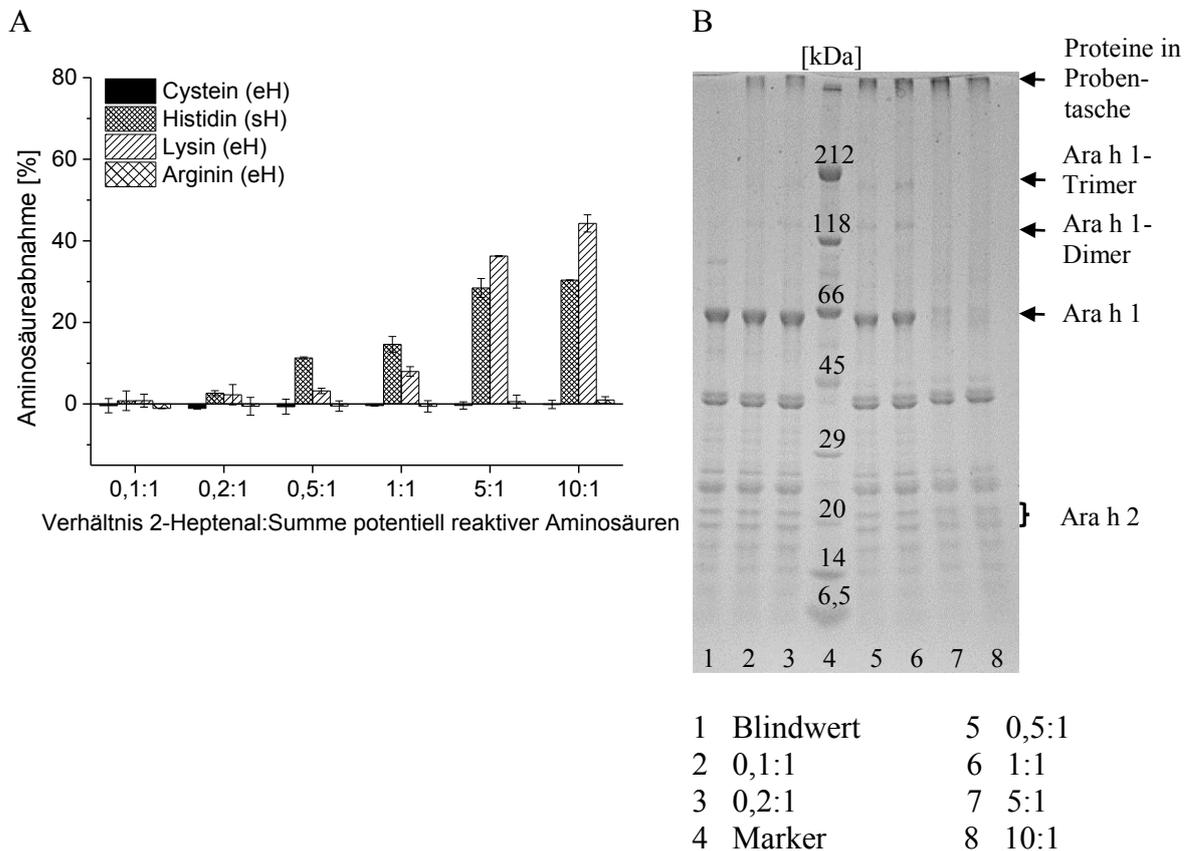


Abb. 46 Erdnussproteine inkubiert mit 2-Heptenal; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid)

2-Heptenal und Acrolein waren im Vergleich zum Hexanal deutlich reaktiver. So kam es bereits als Folge der Inkubation mit geringen Konzentrationen an **2-Heptenal** im 0,2:1-Ansatz zu einer Histidinmodifizierung von 3 % (Abb. 46A). Ab dem 0,5:1-Ansatz konnten auch Lysinmodifizierungen von 3 % festgestellt werden. Generell standen bei geringen 2-Heptenal-Konzentrationen Histidin- und bei höheren Konzentrationen Lysinmodifizierungen im Vordergrund. Diese

betragen bei fünffachem Überschuss an 2-Heptenal jeweils 28 und 36 % bezogen auf den Blindwert. Reaktionen mit Cystein oder Arginin wurden nicht beobachtet. Anhand der SDS-PAGE (Abb. 46B) zeigte sich, dass es bereits im 0,1:1-Ansatz (Lane 2) zu Proteinquervernetzungen kam. Dies wurde einerseits anhand der „verschmierten Banden“ über der Ara h 1-Bande sichtbar. Hierbei handelte es sich um Proteine, die sich auf Grund ihrer Modifizierung nicht mehr einer einheitlichen Molmasse zuordnen ließen. Andererseits waren Proteinaggregate erkennbar, die auf Grund ihrer Größe nicht mehr in das Trenngel eintreten konnten und somit Molmassen aufwiesen, die größer als 212 kDa waren. Weiterhin zeigten sich Ara h 1-Di- und Trimere, die densitometrisch ausgewertete Molmassen im Bereich von 130 und 190 kDa aufwiesen und somit dem zwei- beziehungsweise dreifachen Molekulargewicht des Ara h 1-Monomers entsprachen. Zudem wurde deutlich, dass damit einhergehend eine Abnahme der Intensität der Ara h 1-Bande zu verzeichnen war. Dies wurde besonders bei den fünf- (Lane 7) und zehnfachen (Lane 8) 2-Heptenal-Ansätzen deutlich. Bei den weiteren Erdnussproteinen zeigten sich hingegen kaum Intensitätsabnahmen. Somit kann ausgesagt werden, dass es durch 2-Heptenal vor allem zur Modifizierung des Erdnusshauptallergenes Ara h 1 kommt.

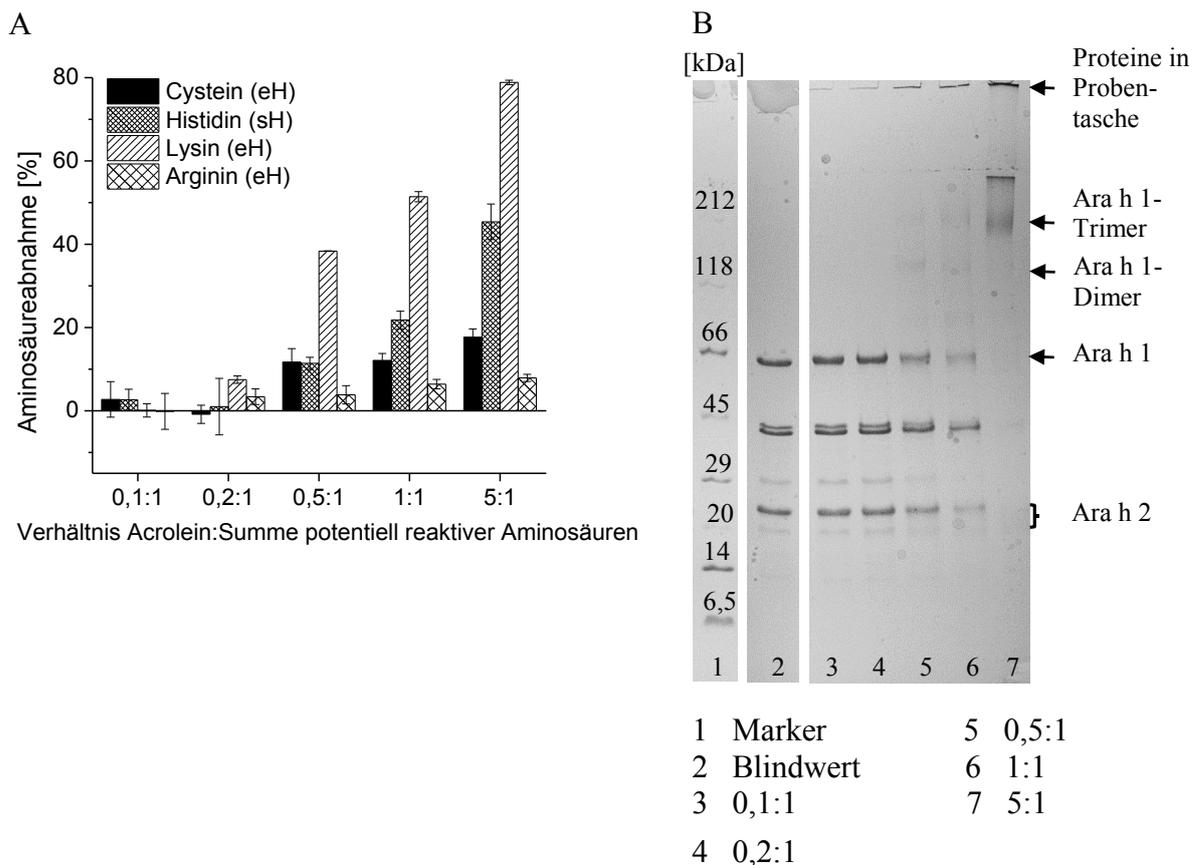


Abb. 47 Erdnussproteine inkubiert mit Acrolein; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid)

**Acrolein** zeigte im Vergleich zum 2-Heptenal eine höhere Reaktivität. So konnten bereits im 0,2:1-Ansatz Lysin- und Argininmodifizierungen von jeweils 7 und 3 % bestimmt werden (Abb. 47A). Im 0,5:1-Ansatz waren auch Cystein- und Histidinabnahmen von jeweils 12 % und 11 % zu beobachten. Im fünffachen Inkubationsansatz betrugen die Abnahmen von Cystein, Histidin, Lysin und Arginin jeweils 18 %, 45 %, 79 % und 8 %. Die Reaktivitätsreihenfolge für Acrolein im Erdnussproteinverband lautete somit wie folgt: Lysin > Histidin > Cystein > Arginin. Anhand der SDS-PAGE (Abb. 47B) konnten ab dem 0,5:1-Ansatz (Lane 5) Proteinquervernetzungen anhand der Ausbildung von Ara h 1-Di- und Trimeren, dem Auftreten „verschmierter Banden“ sowie dem Verbleib von Proteinaggregaten in den Probeauftragetaschen festgestellt werden. Im Gegensatz zum 2-Heptenal zeigten sich Intensitätsabnahmen aller Erdnussproteinbanden. Im 5:1-Ansatz waren keine Monomerbanden der einzelnen Erdnussproteine, allerdings deutlich ausgeprägte Ara h 1-Oligomerbanden und Proteinaggregate in der Proben tasche, erkennbar. Da die Inkubation mit Acrolein zu höheren Aminosäureabnahmen und weniger selektiven Proteinquervernetzungen führte als im Falle des 2-Heptenals, kann Acrolein bezüglich der Erdnussproteine als reaktiver eingestuft werden. Die Ursache für die schneller eintretende Proteinoligomerisierung in Anwesenheit des 2-Heptenals könnte auf dessen hydrophoberen Charakter zurückgeführt werden, wodurch sich dieses besser an das ebenfalls eher hydrophobe Ara h 1 anlagern konnte.

Generell können in Anwesenheit von 2-Alkenalen Michael-Addukte **6** gebildet werden, was ursächlich für die im Falle der 2-Heptenal-Inkubation zuerst aufgetretene Histidinabnahme gewesen sein könnte. Die gebildeten Michael-Addukte können im weiteren Reaktionsverlauf zur Bildung von Formylderivaten **7** führen (Uchida et al., 1998), die schließlich weiter zu den entsprechenden Thioethern **8** reagieren können (Furuhata et al., 2002). Hierdurch kann es sowohl zu inter- als auch zu intramolekularen Proteinquervernetzungen kommen. Ein weiteres Quervernetzungsprodukt kann durch Michael-Addition des Imidazolrings des Histidins und anschließender Ausbildung einer Schiff'schen Base, beispielsweise mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins, resultieren (Ishii et al., 2007). Dies könnte erklären, weshalb nach der Inkubation mit 2-Heptenal und Acrolein starke Abnahmen der Aminosäuren Histidin und Lysin beobachtet wurden. Kommt es andererseits zuerst zur Ausbildung einer Schiff'schen Base, so bilden sich Pyridiniumderivate **10** (Furuhata et al., 2003), wodurch weitere Quervernetzungsreaktionen unterbunden werden (Ishii et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit zur Quervernetzung bestünde prinzipiell auch über die Dihydropyridine, welche Vorstufen der Pyridiniumderivate darstellen, durch eine Michael-Addition an eine Schiff'sche Base (Baker et al., 1998).

### 4.3.3 Malondialdehyd

In Abb. 48 sind die Aminosäureabnahmen und die SDS-PAGE der mit MDA inkubierten Erdnussproteine dargestellt.

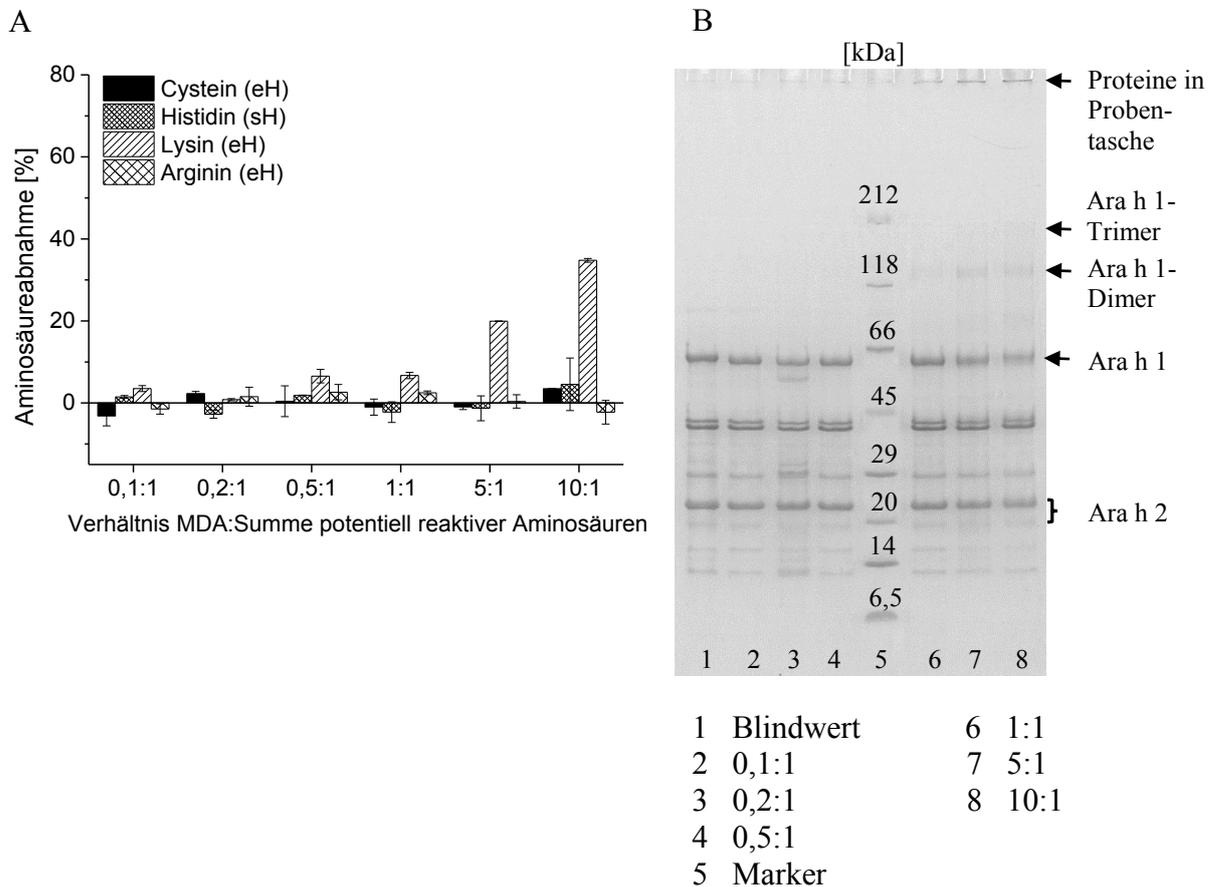


Abb. 48 Erdnussproteine inkubiert mit MDA; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid)

Mittels Aminosäureanalyse (Abb. 48A) wurde festgestellt, dass es als Folge der Inkubation mit MDA im Erdnussproteinverband hauptsächlich zur Abnahme der Aminosäure Lysin kam. Diese Abnahmen betragen im 5:1- und 10:1-Ansatz jeweils 20 % und 35 %. Für Cystein zeigte sich im zehnfachen Ansatz eine geringe Abnahme von 3 %. Für Arginin und Histidin konnten keine Abnahmen festgestellt werden. Somit war die Reaktivität von MDA unter den gegebenen Bedingungen mit der Reaktivität des Hexanals vergleichbar. Unter neutralen und alkalischen Bedingungen liegt MDA zu über 99 % in Form seines Enolatanions vor, wohingegen es auf Grund seines  $pK_a$ -Werts von 4,6 (Slatter et al., 1998) bei pH-Werten unter 4,5 in Form des nicht dissoziierten Enols vorliegt, welches im Gleichgewicht mit dem Dialdehyd steht (Esterbauer et al., 1991), (siehe hierzu Kap. 2.4.3 Abb. 16). Unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Inkubationsbedingungen bei pH 7,4 lag MDA somit in Form seines Enolatanions vor, wodurch die Reaktivität eingeschränkt war. King (1966) identifizierten beispielsweise nach Inkubation

von MDA und Arginin in 12 M HCl N<sup>δ</sup>-(2-Pyrimidinyl)-L-ornithin. Allerdings erfolgte der Umsatz in 6 M HCl bereits sechs Mal langsamer und in neutraler Lösung nicht mehr (King, 1966). Im Gegensatz dazu geht das Strukturisomer Methylglyoxal auch unter neutralen Reaktionsbedingungen Reaktionen mit der Guanidinogruppe des Arginins ein (Henle et al., 1994). Der pH-Wert der nativen Erdnüsse wurde zu 6,9, nach Röstung bei 170 °C für 20 min zu 6,6 und nach Röstung bei 170 °C für 40 min zu 6,3 bestimmt. Somit ist davon auszugehen, dass die Reaktivität des MDA in den Erdnüssen ebenfalls eingeschränkt ist. Als Folge der innerhalb der Erdnüsse ablaufenden Lipierungsreaktionen waren unter dem Einfluss von MDA demnach vor allem Lysin-Addukte zu erwarten.

Mittels SDS-PAGE (Abb. 48B) zeigte sich, dass es ab dem äquimolaren Inkubationsansatz (Lane 6) zu Quervernetzungen gekommen ist. Beobachtet wurden Ara h 1-Di- und -Trimere sowie das Verbleiben von Proteinaggregaten in den Probenflaschen. Gleichzeitig war eine Reduktion der Ara h 1-Monomerbande feststellbar, sodass geschlussfolgert werden kann, dass es sich bei den Proteinoligomeren in den Probenflaschen vor allem um Ara h 1-Oligomere handelte. Generell besteht für die ε-Aminogruppe des Lysins und MDA die Möglichkeit der Ausbildung einer Schiff'schen Base **12**, welche im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Aminopropenal **12'** steht (Itakura & Uchida, 2001; Requena et al., 1997; Nair et al., 1981). Dieses kann nukleophil durch die Guanidinogruppe des Arginins angegriffen werden, wodurch es über die Bildung einer Schiff'schen Base zur Cyclisierung und als Folge zur Ausbildung des Quervernetzungsprodukts 2-Ornitinyl-4-methyl-1-ε-lysyl-1,3-imidazol **16** kommen kann (Slatter et al., 2004). Slatter et al. (2004) konnten **16** nach Inkubation von bovinem Serumalbumin mit MDA mittels <sup>1</sup>H und 2D NMR-Spektroskopie sowie massenspektrometrisch nachweisen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es über das Aminopropenal **12'** durch einen weiteren nukleophilen Angriff am C<sub>3</sub> zur Bildung eines Diimins **13** kommt, welches im Gleichgewicht mit seinem resonanzstabilisierten Enamin **13'** steht (Sayre et al., 2006; Requena et al., 1997; Chio & Tappel, 1969), wodurch es ebenfalls zur Proteinquervernetzung kommen kann. Itakura et al. (1996) identifizierten ein weiteres mögliches, fluoreszierendes Proteinquervernetzungsprodukt **17** nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-glycyl-L-lysinmethylester mit MDA, welches sowohl einen Dihydropyridin- als auch einen Pyridiniumring aufweist. Zudem wurde die Bildung eines ebenfalls fluoreszierenden 1,4-Dihydropyridin-Addukts **14** beschrieben (Sayre et al., 2006; Xu et al., 1997; Nair et al., 1988), welches die Möglichkeit für zwei weitere nukleophile Angriffe bietet, wodurch sich ein weiteres Quervernetzungsprodukt **15** aus drei Nukleophilen bilden kann (Slatter et al., 1998).

### 4.3.4 4-Hydroxynonenal

In Abb. 49 sind die Aminosäureabnahmen und die SDS-PAGE der mit 4-HNE inkubierten Erdnussproteine dargestellt.

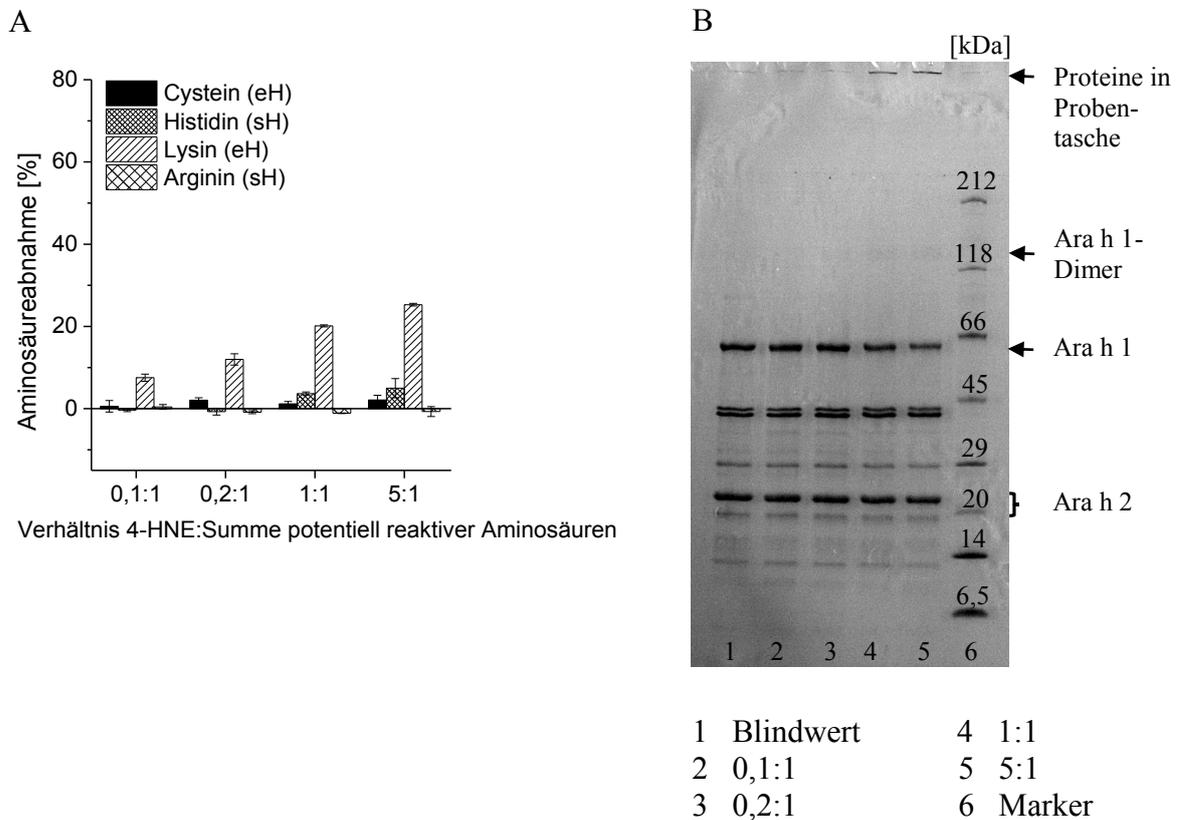


Abb. 49 Erdnussproteine inkubiert mit 4-HNE; (A) Aminosäureabnahmen und (B) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid)

Bereits ab dem 0,1:1-Ansatz kam es zu Lysinabnahmen (Abb. 49A), welche bis zum 5:1-Inkubationsansatz von 8 % auf 25 % zunahm. Weiterhin waren ab dem 1:1- bis zum 5:1-Inkubationsansatz Histidinabnahmen von 4 % bis 5 % zu beobachten. Cystein und Arginin blieben unverändert, obwohl Cystein nach Sayre et al. (1993) gegenüber 4-HNE eine höhere Reaktivität zeigt als Lysin. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte sein, dass Cystein einerseits im Erdnussproteinverband nur in geringen Stoffmengen von  $3,83 \pm 0,79$  mmol/100 g Protein vorkommt und andererseits im Proteinverband leicht zur Ausbildung von Disulfidbrücken neigt, sodass die Thiolgruppen nicht mehr für Reaktionen zur Verfügung standen. Somit kann festgehalten werden, dass es bereits bei geringen Konzentrationen an 4-HNE zu Lysinmodifizierungen kommt, die Reaktivität im Erdnussproteinverband allerdings geringer als die der 2-Alkenale ist.

Mittels SDS-PAGE (Abb. 49B) wurde gezeigt, dass es ab dem äquimolaren Inkubationsansatz zur Ausbildung von Ara h 1-Dimeren und Proteinaggregaten gekommen ist, die in den Proben-

taschen verblieben. Gleichzeitig konnte eine Intensitätsabnahme der Ara h 1-Monomerbande beobachtet werden, wohingegen die anderen Erdnussproteine unveränderte Bandenintensitäten zeigten. Somit wurde geschlussfolgert, dass diese Oligomere hauptsächlich aus Ara h 1-Untereinheiten aufgebaut waren. Möglichkeiten 4-HNE-induzierter Proteinquervernetzungen bestehen durch die Ausbildung eines Schiff'sche Base-Michael-Addukts **22** unter Beteiligung eines 4-HNE-Moleküls, welches im Gleichgewicht mit seinem Hemiacetal **22'** steht (Nadkarni & Sayre, 1995; Uchida & Stadtman, 1993). Zudem wurde die Bildung eines fluoreszierenden 2-Alkyl-2-hydroxy-1,2-dihydropyrrol-3-oniminiumions **23** beschrieben (Xu et al., 1999; Xu & Sayre, 1998; Itakura et al., 1998), dessen Bildung die Anwesenheit von O<sub>2</sub> benötigt und durch oxidierende Metallionen wie beispielsweise Cu<sup>2+</sup> beschleunigt wird (Xu et al., 1999). Xu et al. (1999) geben für optimale Reaktionsbedingungen einen Überschuss des Nucleophils im Verhältnis zu 4-HNE von 5-10:1 und einen pH-Wert von 7 bis 7,5 an.

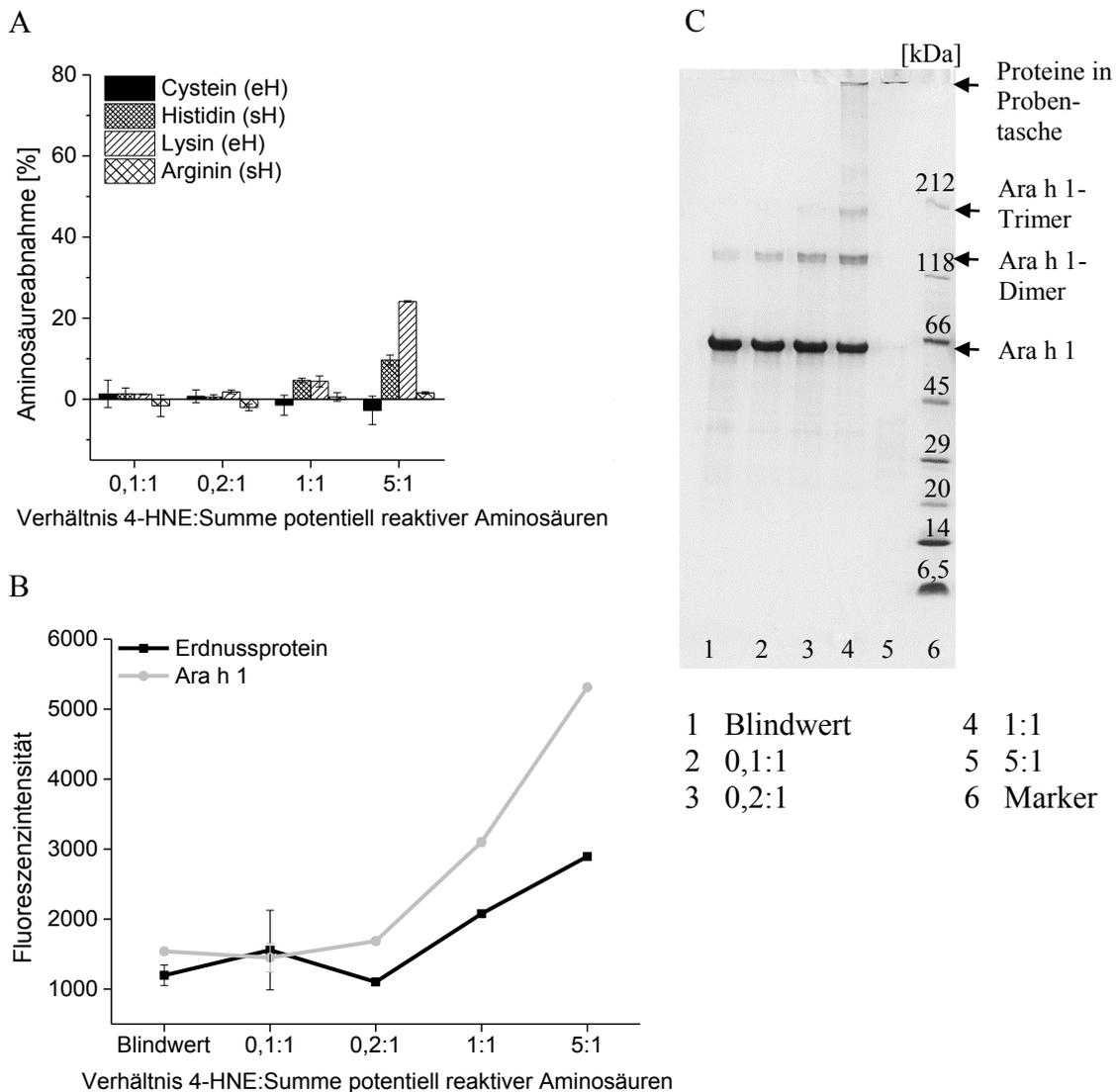


Abb. 50 Ara h 1 inkubiert mit 4-HNE; (A) Aminosäureabnahmen, (B) Fluoreszenzmessung der enzymatischen Hydrolysate und (C) SDS-PAGE (reduziert, 5-15 % Acrylamid)

Um den Einfluss einer 4-HNE-induzierten Lipierung auf das Erdnusshauptallergen Ara h 1 genauer zu untersuchen, erfolgte die Inkubation des isolierten Allergens analog den Inkubationen des Erdnussproteinextrakts. Die Gehalte der potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin wurden jeweils zu  $6,32 \pm 0,56$ ,  $20,68 \pm 0,35$ ,  $39,94 \pm 0,26$  und  $74,84 \pm 0,07$  mmol/100 g Protein bestimmt. Parallel wurden mit den enzymatischen Hydrolysaten Fluoreszenzmessungen durchgeführt, um Hinweise auf die Bildung des von Xu & Sayre (1998) beschriebenen Fluorophors **23** zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 50 dargestellt.

Analog des Erdnussproteinextrakts kam es bereits ab dem 0,1:1-Ansatz zu Lysinabnahmen (Abb. 50A), welche in Abhängigkeit der 4-HNE-Konzentration von 1 % auf 24 % zunahmen. Weiterhin zeigte sich ebenfalls analog des Erdnussproteinextrakts, dass ab dem äquimolaren Inkubationsansatz zunehmende Histidinabnahmen von 5 % auf 10 % auftraten. Anhand der SDS-PAGE (Abb. 50C) wurde deutlich, dass es bei Vorliegen des isolierten Ara h 1 schneller zu Oligomerisierungsreaktionen kam als im Erdnussproteinverband. Zunahmen an Ara h 1-Di- und -Trimeren konnten bereits ab dem 0,1:1-Ansatz (Lane 2) festgestellt werden. Ab dem äquimolaren Ansatz (Lane 4) waren zusätzlich Proteinaggregate in den Probenaschen erkennbar, die nicht in das Gel eintreten konnten. Die Inkubation mit 5:1-fachem Überschuss an 4-HNE (Lane 5) führte zu einer sehr starken Quervernetzung, sodass die Löslichkeit stark reduziert war und zudem die löslichen Proteine nicht mehr in das Gel eintreten konnten.

Anhand der enzymatischen Hydrolysate der Erdnussprotein- und Ara h 1-Inkubationsansätze wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Abb. 50B). Durch die Freisetzung aus dem Proteinverband sollten fluoreszenzverstärkende Effekte im Proteinverband durch mögliche Fluorophore vermieden werden. Deutlich erkennbar war, dass es ab dem äquimolaren Inkubationsansatz zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensitäten sowohl in den modifizierten Erdnussprotein- als auch den Ara h 1-Proben kam. Somit wurden Hinweise dahingehend erhalten, dass es als Folge der 4-HNE-induzierten Lipierung zur Bildung des von Xu et al. (1999) beschriebenen Fluorophors **23** gekommen sein könnte, auch wenn die optimalen Fluorophorbildungseigenschaften bei den hier durchgeführten Inkubationen nicht vorlagen. Dieses könnte zu den ab den äquimolaren Inkubationsansätzen beobachteten Proteinquervernetzungen beigetragen haben.

Ursache für die schnelle Quervernetzung des Ara h 1 in Anwesenheit quervernetzender Agenzien könnte zum einen die Anzahl der Lysinreste des Ara h 1 sein. Mit 36 Lysinresten weist das Ara h 1 im Vergleich zu den weiteren Erdnussproteinen die höchste Anzahl an Lysinresten auf (UniProt; NCBI). Im Gegensatz dazu enthält das Ara h 2 beispielsweise nur 3 Lysinreste und die weiteren Erdnussallergene zwischen 3 und 18 Lysinreste (UniProt; NCBI). Wie in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von Hexanal, Acrolein, 2-Heptenal, MDA und

4-HNE gezeigt, stellt Lysin diejenige Aminosäure dar, welche bevorzugt als Folge der Lipierung modifiziert wird. Aufgrund dessen ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es innerhalb der Erdnussproteine bevorzugt zu einer Modifizierung des Ara h 1 und als Folge auch zu Quervernetzungen kommt. Zum anderen bildet Ara h 1 in nativem Zustand Tri- und höhere Oligomere aus, die durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert sind (van Boxtel et al., 2006). Somit ist zusätzlich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es zur Ausbildung von Proteinquervernetzungen kommt, da naheliegend ist, dass schon miteinander in Kontakt stehende Proteine leichter untereinander quervernetzt werden können.

Vergleichend zu den durch Sekundärprodukte modifizierten isolierten Erdnussproteinen ist in Abb. 51 das Elektropherogramm der nativen und gerösteten Erdnüsse sowie der Handelsprobe dargestellt.

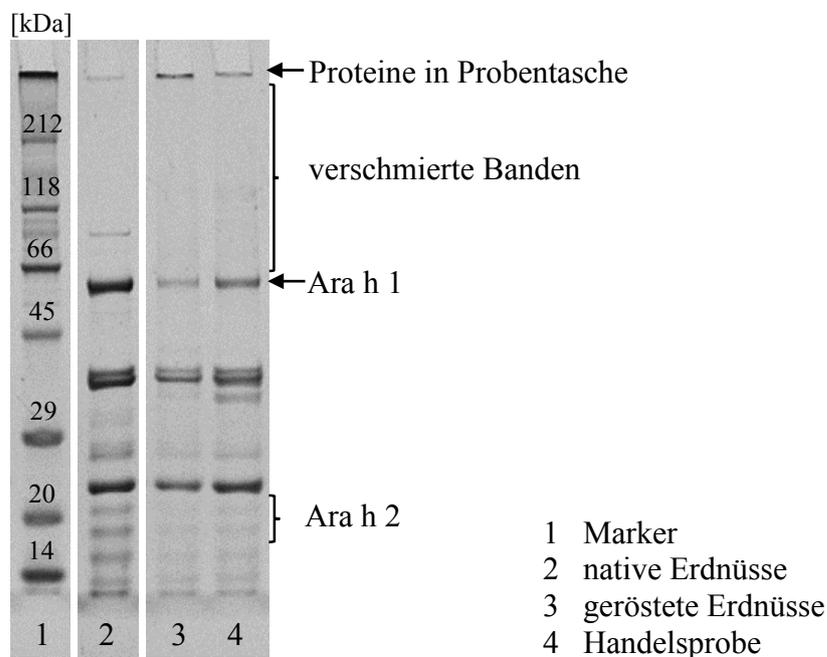


Abb. 51 SDS-PAGE der nativen und gerösteten Erdnüsse sowie der Handelsprobe (reduziert, isokratisch, 9 % Acrylamid)

Bei den gerösteten Erdnüssen (Lane 3) zeigt sich im Vergleich zu den nativen Erdnüssen (Lane 2) eine deutliche Reduktion der Bandenintensität des Ara h 1 sowie die Ausbildung verschmierter Banden mit Molekulargewichten > 66 kDa. Des Weiteren waren Proteinaggregate in den Probestaschen erkennbar, die auf Grund ihrer großen Molmassen nicht mehr in das Gel eintreten konnten. Auch die Handelsprobe (Lane 4) zeigte ein analoges Verhalten wie die im Labormaßstab gerösteten Erdnüsse. Ein Vergleich der Handelsprobe mit den nativen Erdnüssen war hierbei nicht möglich, da nicht bekannt war, welche Erdnüsse für die industrielle Röstung eingesetzt wurden. Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch Kopper et al. (2005), die eine deutliche Reduktion der Proteinbanden sowie die Ausbildung verschmierter Banden als

Folge der Erdnussröstung beobachteten. Die in der vorliegenden Arbeit durch die Sekundärprodukte modifizierten Erdnussproteine verhielten sich somit ähnlich den gerösteten Erdnüssen (Abnahme der Ara h 1-Bande, verschmierte Banden, in den Probestaschen verbliebene Proteinaggregate). Somit könnten beim Erdnussrösten ablaufende Lipierungsreaktionen mit zu der beobachteten Proteinquervernetzung beigetragen haben.

#### 4.3.5 Fazit

Anhand der Inkubationsmodelle isolierter, nativer Erdnussproteine mit ausgewählten Vertretern der Sekundärprodukte wurde gezeigt, dass es im Falle aller Sekundärprodukte zu Aminosäureabnahmen kam. Nachfolgende Tab. 50 fasst die Reaktivitäten der untersuchten Sekundärprodukte gegenüber den potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin sowie die proteinquervernetzenden Eigenschaften im Erdnussproteinverband zusammen.

Tab. 50 Zusammenfassung der Reaktivitäten der untersuchten Sekundärprodukte gegenüber Erdnussproteinen und Ara h 1 sowie deren proteinquervernetzende Eigenschaften; Unterschuss/Überschuss - Stoffmenge an Sekundärprodukt im Unterschuss/Überschuss bezogen auf die Summe der Stoffmengen der potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin

Sekundärprodukt	Reaktivität gegenüber Aminosäuren	proteinquervernetzende Eigenschaft
Hexanal	Lysin, Cystein (erst im 10:1-Ansatz)	keine
2-Heptenal	Histidin und Lysin geringe Konzentration (Unterschuss): Histidin > Lysin höhere Konzentration (Überschuss): Lysin > Histidin	hoch, ab geringster Konzentration beobachtet, vor allem Ara h 1 wurde quervernetzt
Acrolein	Cystein, Histidin, Lysin, Arginin geringe Konzentration (Unterschuss): Lysin > Cystein = Histidin > Arginin höhere Konzentration (Überschuss): Lysin > Histidin > Cystein > Arginin	hoch, ab 0,5:1-Ansatz beobachtet, wenig selektiv alle Erdnussproteine quervernetzt
MDA	Lysin, Cystein (erst im 10:1-Ansatz)	mittel, ab 1:1-Ansatz beobachtet, vor allem Ara h 1 quervernetzt
4-HNE	Erdnussproteinextrakt: Histidin, Lysin geringe Konzentration (Unterschuss): Lysin höhere Konzentration (äquimolar): Lysin > Histidin	mittel, ab 0,2:1-Ansatz beobachtet, vor allem Ara h 1 quervernetzt

Sekundär- produkt	Reaktivität gegenüber Aminosäuren	proteinquervernetzende Eigenschaft
	Ara h 1: Histidin, Lysin geringe Konzentration (Unterschuss): Lysin  höhere Konzentration (äquimolar): Lysin > Histidin	hoch, ab geringster Konzentration beobachtet

Somit kann festgehalten werden, dass (1) eine Lipierung von Erdnussproteinen im Proteinverband möglich ist, wodurch entsprechende Reaktionen auch als Folge der Erdnussröstung zu erwarten sind. (2) Lysin stellt diejenige Aminosäure im Erdnussproteinverband dar, die bevorzugt modifiziert wird. Lediglich im Falle des 2-Heptenals war bei niedrigen Konzentrationen eine Histidinmodifizierung zu beobachten, weshalb als Folge einer Erdnussröstung ebenfalls vor allem Lysin-Lipierungsprodukte zu erwarten sind. (3) Nach Vergleich der 5:1-Ansätze stellt Acrolein dasjenige Sekundärprodukt dar, welches im Erdnussproteinverband zur höchsten Aminosäuremodifizierung und Proteinquervernetzung führt. Die Reaktivitätsreihenfolge gegenüber den Erdnussproteinen lautet somit wie folgt: Acrolein > 2-Heptenal = 4-HNE > MDA > Hexanal. (4) Bei niedrigen und somit lebensmittelrelevanten Konzentrationen an Sekundärprodukten und unter Berücksichtigung des leicht sauren pH-Werts der Erdnüsse düften vor allem Lipierungsprodukte des Acroleins und 4-HNE relevant sein. (5) Als Folge der Lipierung kommt es vor allem zur Quervernetzung des Erdnusshauptallergens Ara h 1, wohingegen die weiteren Erdnussproteine, unter anderem das zweite Erdnusshauptallergen Ara h 2, nur geringfügig quervernetzt werden. Lediglich im Falle des Acroleins konnten unselektive Quervernetzungsreaktionen beobachtet werden, was sich in der Quervernetzung aller Erdnussproteine äußerte. Prinzipiell dürften neben der Verbindungsklasse des Sekundärprodukts auch dessen Kettenlänge sowie die Polarität des Proteins einen Einfluss auf die Reaktivität im Allgemeinen haben.

Weiterhin zeigte sich, dass es als Folge der Erdnussröstung, analog der Lipierung von Erdnussproteinen, auf der SDS-PAGE vor allem zur Abnahme der Ara h 1-Bandenintensität, der Ausbildung verschmierter Banden und dem Verbleib hochmolekularer Proteinaggregate in den Probenaschen kam. Somit kann geschlussfolgert werden, dass beim Erdnussrösten ebenfalls Lipierungsreaktionen ablaufen könnten, die zu der bisher nicht erklärbaren Lysinblockierung beitragen (Kap. 4.1.2 und Wellner et al., 2012b). Werden mögliche Auswirkungen auf das allergene Potential in Betracht gezogen, so könnten bei der Erdnussröstung gebildete Lipierungsprodukte einerseits das IgE-Bindevermögen direkt über Veränderungen nicht-kovalenter Wechselwirkungen beeinflussen oder zur Generierung von Neopeptopen führen. Weiterhin könnte die beobachtete Proteinquervernetzung die Verdaubarkeit von Erdnussallergenen reduzieren (Bogh et al., 2012; van Boxtel et al., 2006; Maleki et al., 2000b), wodurch sowohl die Wahrscheinlichkeit zur Resorption von Peptiden mit

intakten Epitopen als auch die Wahrscheinlichkeit zur Sensibilisierung auf Grund kontinuierlicher Freisetzung von Peptiden mit intakten Epitopen im Gastrointestinaltrakt erhöht werden könnte.

#### 4.4 Identifizierung von Lipierungsprodukten in Modellansätzen

Da Lysin diejenige Aminosäure darstellt, die im Erdnussproteinverband bevorzugt durch Sekundärprodukte der Lipidperoxidation modifiziert wurde (siehe hierzu Kap. 4.3), war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, mögliche Lipierungsprodukte des Lysins zu identifizieren und eine Auswahl über mögliche, relevante Lipierungsprodukte, die sich als Folge der Erdnussröstung bilden könnten, zu treffen. Zudem sollten Darstellungsstrategien abgeleitet werden, um ausgewählte Lipierungsprodukte erstmalig in Erdnussproben nachweisen und quantifizieren zu können. Hierzu wurde N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin (AcLys), als Modellsubstanz für proteingebundenes Lysin mit Hexanal, 2-Heptenal, Acrolein, MDA und 4-HNE in jeweils äquimolaren Stoffmengenverhältnissen für 4 h bei 75 °C in Methanol umgesetzt und die dabei entstandenen Lipierungsprodukte mittels LC-ESI-MS/MS (positive mode) identifiziert. Zunächst wurden Scanläufe durchgeführt und anschließend ausgewählte Lipierungsprodukte mittels collision-induced dissociation- (CID-) Experimenten in Produktionenscans identifiziert. Über die erhaltenen produktcharakteristischen Fragmentmuster (Tochterionen) erfolgte schließlich der Rückschluss auf die jeweilige Ausgangsverbindung (Mutterion). Anhand von Stabilitätsuntersuchungen der Lipierungsprodukte wurden Darstellungsstrategien abgeleitet und ausgewählte Verbindungen dargestellt.

Nachfolgend werden zunächst charakteristische Fragmente der Lysinderivate erläutert, die in nahezu allen Fragmentmustern der Produktionenscans identifiziert wurden. Angegeben sind jeweils die berechneten monoisotopischen Massen. Kommt es zur Abspaltung der Acetylgruppe (-43 u), tritt eine effektive Massenreduktion der Ausgangsverbindung von -42 u nach Protonierung der  $\alpha$ -Aminogruppe auf. Eine weitere Fragmentierung unter Abspaltung der  $\alpha$ -Aminogruppe in Form von NH<sub>3</sub> und CO aus der Carbonsäuregruppe resultiert in einer zusätzlichen Massenreduktion um -45 u (Shek et al., 2006), (Abb. 52). Die postulierten Bildungswege möglicher Lysin-Fragmentationen m/z 130,1, m/z 129,1, m/z 102,1 und m/z 84,1 in Anlehnung an Shek et al. (2006), Fenaille et al. (2004) und Yalcin & Harrison (1996) sind in Abb. 52 dargestellt.

Nach der Abspaltung der Acetylgruppe (-42 u) kann es entsprechend des Fragmentierungswegs 1 (positive Ladung befindet sich an der  $\epsilon$ -Aminogruppe) durch einen nukleophilen Angriff der  $\alpha$ -Aminogruppe an den  $\epsilon$ -Kohlenstoff zur Eliminierung der

$\epsilon$ -Stickstoffgruppierung kommen, wodurch es zur Bildung der 2-Piperidincarbonsäure mit  $m/z$  130,1 kommt (Shek et al., 2006; Yalcin & Harrison, 1996). Diese kann durch Eliminierung von CO und H<sub>2</sub>O (-46 u) in ein 2,3,4,5- oder 1,2,3,4-Tetrahydropyridin-1-ium-Derivat mit  $m/z$  84,1 überführt werden (Shek et al., 2006; Fenaille et al., 2004). Entsprechend des Fragmentierungswegs 2 (positive Ladung befindet sich an der  $\alpha$ -Aminogruppe) kommt es zum nukleophilen Angriff des  $\epsilon$ -Stickstoffs an den Carbonsäurekohlenstoff, wodurch zunächst unter Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 u) das  $\alpha$ -Amino- $\epsilon$ -Caprolactam mit  $m/z$  129,1 entsteht, welches nach Eliminierung von CO und NH<sub>3</sub> (-45 u) ebenfalls in das entsprechende Tetrahydropyridin-1-ium-Derivat überführt wird (Fenaille et al., 2004). Analoge Fragmentierungen sind auch bei alkylierten  $\epsilon$ -Aminogruppen zu erwarten. Im Falle quartärer Ammoniumverbindungen, wie den nachfolgend beschriebenen Pyridiniumderivaten, ist eine Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 2 nicht möglich.

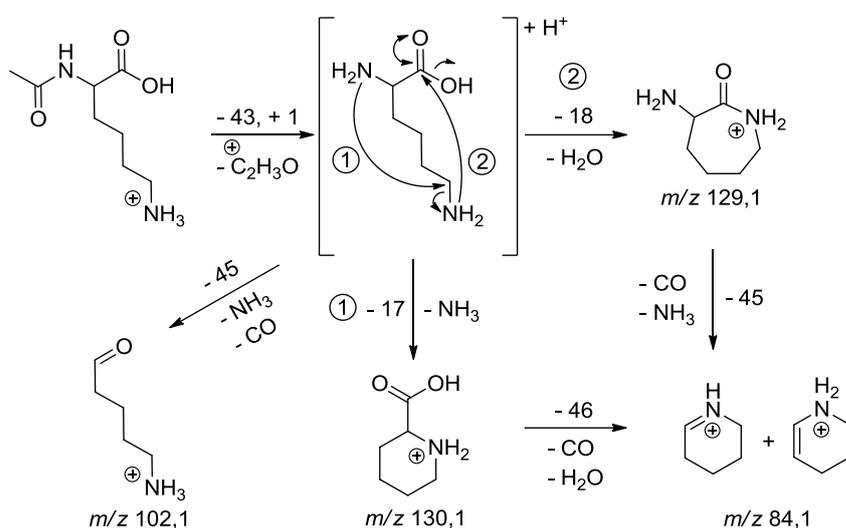


Abb. 52 Bildungswege der charakteristischen Lysin-Fragmentionen  $m/z$  130,1,  $m/z$  129,1,  $m/z$  102,1 und  $m/z$  84,1 in LC-ESI-MS/MS-CID-Experimenten; Weg 1 in Anlehnung an Shek et al. (2006) und Yalcin & Harrison (1996), Weg 2 in Anlehnung an Fenaille et al. (2004)

Eine Differenzierung zwischen (*Z*)- und (*E*)-Konfigurationen bei Doppelbindungen ist anhand von Fragmentierungsmustern nicht möglich. Deshalb wurden Konfigurationen von Doppelbindungen identifizierter Verbindungen, die nicht zusätzlich über dargestellte Standards abgesichert wurden, auf Grund zeichnerischer Vorteile willkürlich dargestellt. In diesen Fällen wurde bei der Benennung nach IUPAC auf die Angabe der Konfiguration verzichtet. Generell ist zu beachten, dass eine Identifizierung von Lipierungsprodukten anhand von Fragmentierungsmustern in der vorliegenden Arbeit sehr gut möglich war und Absicherungen durch dargestellte Standards dies auch belegten. Eine absolute Sicherheit bei Verbindungen, die nicht durch dargestellte Standards abgesichert worden sind, war allerdings nicht gegeben. Die angegebenen Bezeichnungen „M+H<sup>+</sup>“ oder „M<sup>+</sup>“ bezeichnen nachfolgend nicht ausschließlich

die Mutterionen, sondern auch die infolge der Fragmentierung entstandenen Tochterionen und sind somit als generelle Angaben des Protonierungsstatus eines Ions zu verstehen.

#### 4.4.1 Lipierungsprodukte des Hexanals

In Abb. 53 sind das LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm des Inkubationsansatzes aus  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin und Hexanal sowie die charakteristischen Fragmentmuster der zugeordneten Lipierungsprodukte dargestellt.

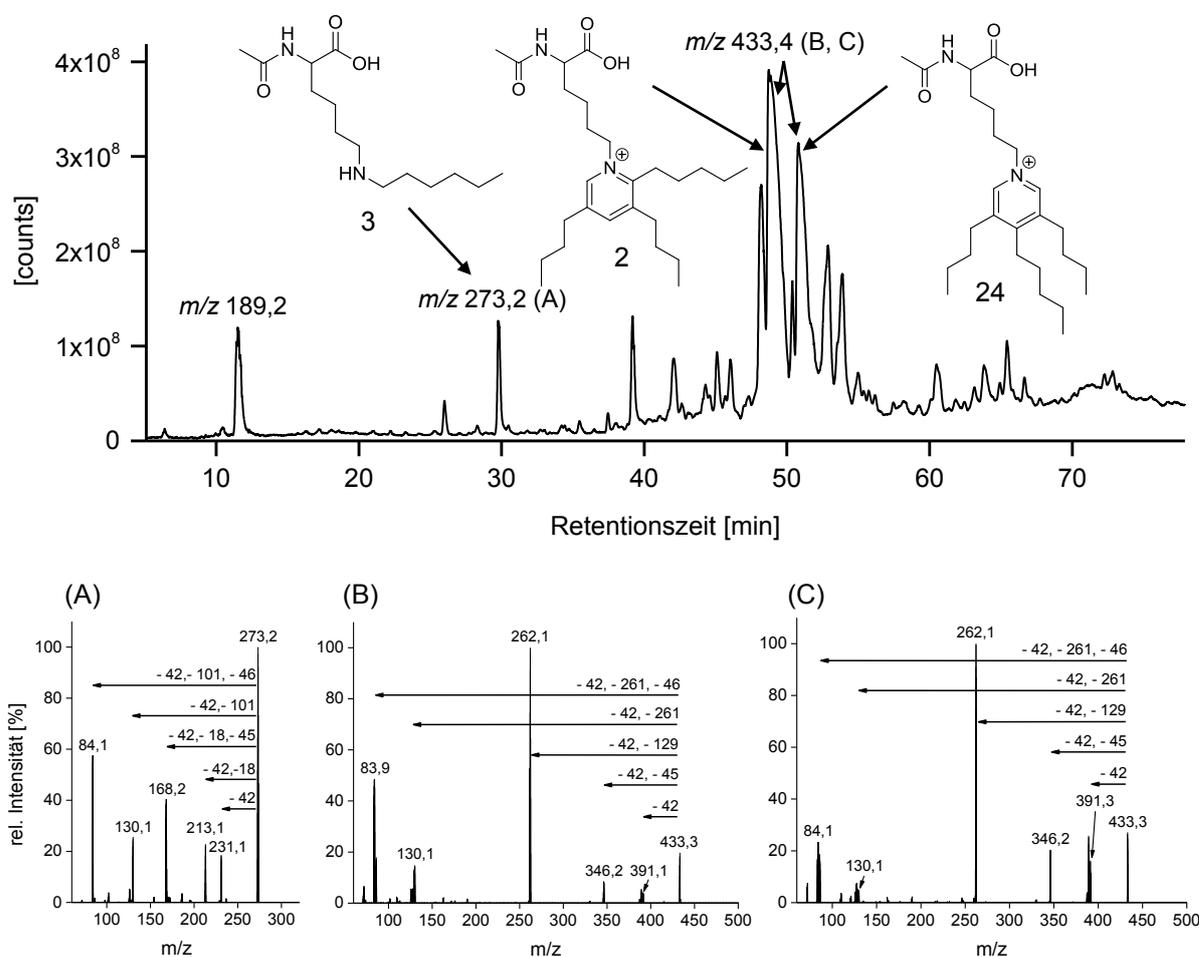


Abb. 53 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit Hexanal (oben) für 4 h bei 75 °C und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionenscans (unten), (A) 2-Acetamido-6-(hexylamino)hexansäure **3** ( $N^{\epsilon}$ -Hexyl-AcLys), (B) 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure **2** (AcLHP 1), (C) 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure **24** (AcLHP 2)

Das Produktion mit  $m/z$  189,2 ( $M+H^+$ ) ( $t_{Ret}$  11,5 min) entsprach dem nicht vollständig umgesetzten  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin, welches eine berechnete monoisotopische Masse von 189,1 g/mol ( $M+H^+$ ) aufweist. Die Identifizierungen der drei Lipierungsprodukte werden im Folgenden ausführlich diskutiert. In den nachfolgenden Kapiteln identifizierte Lipierungs-

produkte wurden analog ausgewertet. In Abb. 54 sind die postulierten Fragmentationen der 2-Acetamido-6-(hexylamino)hexansäure ( $N^{\epsilon}$ -Hexyl-AcLys) und stellvertretend für die beiden Pyridiniumderivate die Fragmentationen der 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (AcLHP 1) angegeben.

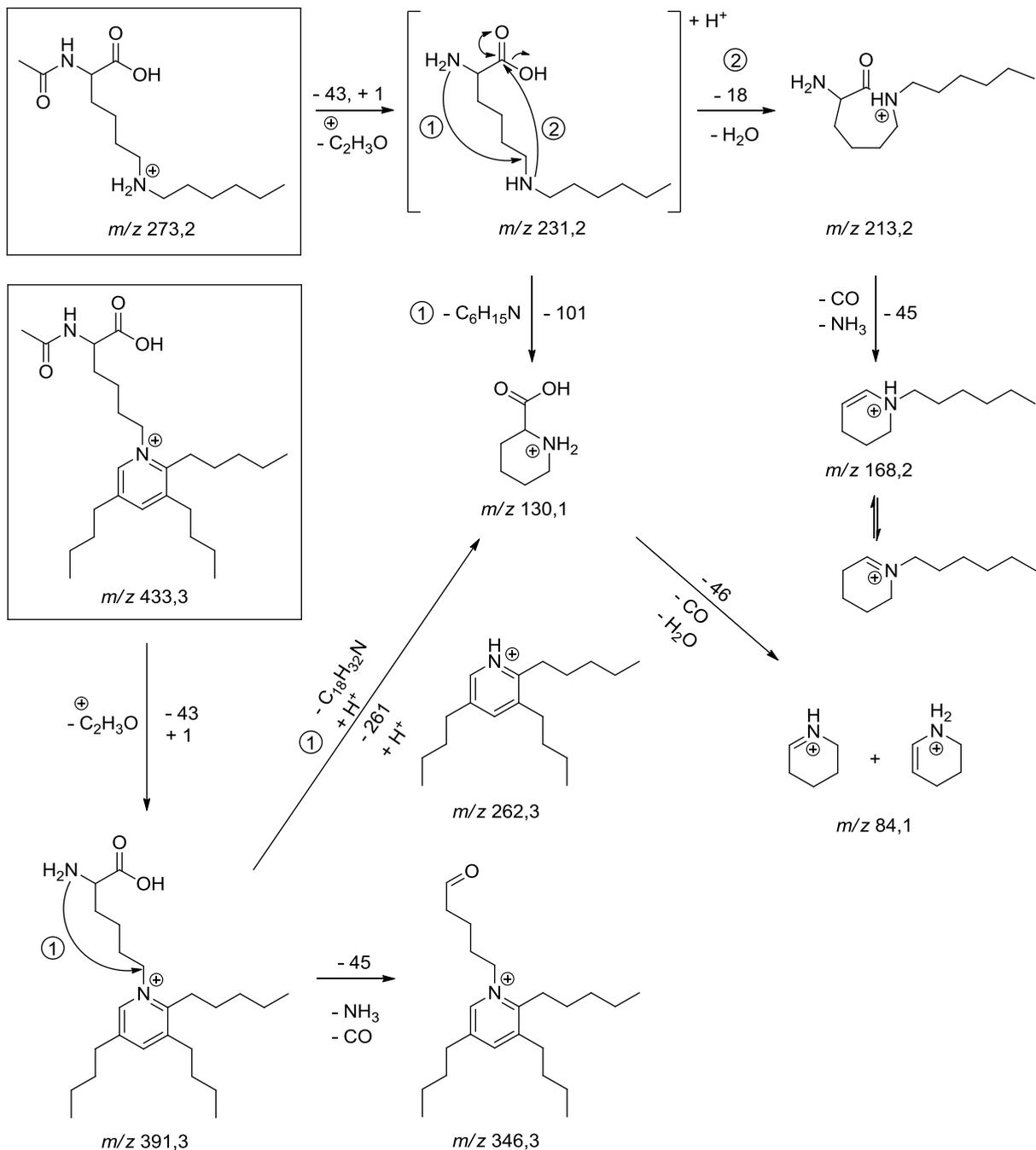


Abb. 54 Erläuterungen der Fragmentierungswege der 2-Acetamido-6-(hexylamino)hexansäure ( $N^{\epsilon}$ -Hexyl-AcLys) mit  $m/z$  273,2 (M+H $^+$ ) sowie der 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (AcLHP 1) mit  $m/z$  433,3 (M $^+$ ) in CID-Experimenten mittels LC-ESI-MS/MS (positiv mode); angegeben sind jeweils die berechneten monoisotopischen Massen

Im Falle der Verbindung mit  $m/z$  273,2 (Abb. 53A,  $t_{\text{Ret}} = 29,8$  min) ließ sich zunächst eine effektive Massenreduktion um -42 u beobachten, die einer Deacetylierung der N $^{\alpha}$ -Aminogruppe

entsprach, wodurch das Ion der entschützten 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure mit  $m/z$  231,1 ( $M+H^+$ ) entstanden ist. Entsprechend des in Abb. 52 angegebenen Fragmentierungswegs 2 (positive Ladung an der  $N^\alpha$ -Aminogruppe) kam es zur Eliminierung von  $H_2O$  (-18 u), wodurch in Analogie zu Fenaille et al. (2004) das entsprechende Caprolactamion mit  $m/z$  213,1 ( $M+H^+$ ) entstanden ist. Das Ion mit  $m/z$  168,2 ( $M+H^+$ ) zeigte eine nachfolgende Abspaltung von CO und  $NH_3$  (-45 u) an, wodurch entsprechend Fenaille et al. (2004) das entsprechende 1-Hexyl-tetrahydropyridin-1-ium gebildet wurde. Das Ion mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) deutete auf eine Fragmentierung entsprechend des in Abb. 52 angegebenen Fragmentierungswegs 1 (positive Ladung an der  $N^\epsilon$ -Aminogruppe) hin, wodurch es in Analogie zu Shek et al. (2006) und Yalcin & Harrison (1996) zur Abspaltung der  $N^\epsilon$ -Aminogruppierung (-101 u) kam. Der weitere Massenverlust von -46 u ließ schließlich eine Eliminierung von CO und  $H_2O$  vermuten, wodurch sich das entsprechende Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) bildete (Shek et al., 2006, Fenaille et al., 2004). Somit ließen die im Produktionenscan erhaltenen Fragmentionen, in Übereinstimmung mit der Literatur (Fenaille et al., 2004), den Rückschluss auf das Vorliegen der **2-Acetamido-6-(hexylamino)hexansäure 3** (nachfolgend als  **$N^\epsilon$ -Hexyl-AcLys** bezeichnet) zu. Diese weist eine berechnete monoisotopische Masse von 273,2 g/mol ( $M+H^+$ ) auf. Nach Darstellung der entschützten 2-Amino-6-(hexylamino)hexansäure (Kap. 3.9.3) wurde zusätzlich über das analoge Fragmentmuster ausgehend von  $m/z$  231,1 ( $M+H^+$ ) das Vorliegen der reduzierten Schiff'schen Base bestätigt.

Die Verbindungen mit  $m/z$  433,4 (Abb. 53B und C,  $t_{Ret} = 49,0$  und  $50,9$  min) zeigten vergleichbare Fragmentionen, die sich lediglich in ihren relativen Signalintensitäten unterschieden. Somit wurde angenommen, dass es sich hierbei um Strukturisomere handelte. Der Massenverlust von -42 u wies zunächst auf eine Deacetylierung der  $N^\alpha$ -Aminogruppe hin, wodurch das Ion der 2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure mit  $m/z$  391,1 ( $M^+$ ) erklärbar war. Die weitere Massenreduktion um -45 u unter Ausbildung des Fragmentions  $m/z$  346,2 ( $M^+$ ) deutete auf eine Abspaltung von  $NH_3$  und CO analog Shek et al. (2006) hin. Entsprechend des Fragmentierungswegs 1 kam es zur Abspaltung des Pyridinium-rests (-261 u), welcher nach Protonierung in Form des Ions mit  $m/z$  262,1 ( $M+H^+$ ) detektiert wurde. Das dabei entstandene Fragmention  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) konnte nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen (Shek et al., 2006, Fenaille et al., 2004). Somit ließen die im Produktionenscan erhaltenen Fragmentionen den Rückschluss auf das Vorliegen von zwei Pyridiniumverbindungen zu, wovon das 1,2,3,5-substituierte Derivat **2** von Kato et al. (1986) in entschützter Form nach Inkubation von Lysin mit Hexanal identifiziert wurde. Nach Suyama & Adachi (1979) ist prinzipiell neben der Bildung eines 1,2,3,5-substituierten Derivats **2** auch die Bildung eines 1,3,4,5-substituierten Derivats möglich. Beide Stellungsisomere weisen die gleiche berechnete

monoisotopische Masse von 433,3 g/mol ( $M^+$ ) auf. Eine zusätzliche Protonierung unter Ausbildung von zwei positiven Ladungen wurde nicht beobachtet. Diese Beobachtung stimmt mit dem Verhalten quartärer Ammoniumverbindungen, beispielsweise aus dem Bereich der Pestizide, überein (Poulsen et al., 2007; Ariffin & Anderson, 2006). Nach Darstellung beider Verbindungen in entschützter Form (Kap. 3.9.4) wurden über analog erhaltene Fragmentmuster, jeweils ausgehend von  $m/z$  391,3 ( $M^+$ ), das Vorliegen der **2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure 2** (nachfolgend benannt als **AcLHP 1**) und der **2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure 24** (nachfolgend benannt als **AcLHP 2**) bestätigt. Die Elutionsreihenfolge konnte wie folgt zugeordnet werden: Bei der zuerst eluierenden Verbindung handelte es sich um AcLHP 1 und bei der nachfolgend eluierenden Verbindung um AcLHP 2. Anhand von UV-Messungen bei  $\lambda = 227$  nm wurde das Bildungsverhältnis von LHP 1 zu LHP 2 zu 1:0,7 abgeschätzt. Somit könnte auch in den Erdnussproben LHP 1 die relevante Verbindung darstellen.

Als Folge der Inkubation von  $N^\alpha$ -Acetyllysin mit Hexanal unter physiologischen Bedingungen in Anwesenheit des Reduktionsmittels  $\text{NaCNBH}_3$  konnten Fenaille et al. (2004) sowohl das monoalkylierte **3** als auch das dialkylierte **4** Reaktionsprodukt massenspektrometrisch identifizieren. Ein mögliche Ursache für das Vorliegen der reduzierten Schiff'schen Base **3** in der vorliegenden Arbeit in Abwesenheit eines extern zugegebenen Reduktionsmittels, könnte die Bildung der Pyridiniumderivate AcLHP 1 und AcLHP 2 dargestellt haben. Deren Bildung erfolgt zunächst über die Schiff'sche Base **1**, gefolgt von Aldolkondensationen unter Einbeziehung von zwei weiteren Molekülen Hexanal und eines Oxidationsschritts (Kato et al., 1986). Die Oxidation kann hierbei sauerstoffinduziert, durch Disproportionierung oder Oxidationsmittel erfolgen (Suyama & Adachi, 1979). Somit war es möglich, dass im Zuge der Bildung der Pyridiniumverbindungen eine gleichzeitige Reduktion der Schiff'schen Base erfolgte. Die Ausbildung der nicht reduzierten Schiff'schen Base **1** oder eines dialkylierten Reaktionsprodukts **4** wurde unter den vorgelegenen Bedingungen und in Abwesenheit extern zugegebener Reduktionsmittel nicht beobachtet.

#### **Ableitung der Darstellungsstrategien**

Nach salzsaurer Hydrolyse des Inkubationsansatzes konnten sowohl die **2-Amino-6-(hexyl-amino)hexansäure 3'** (nachfolgend benannt als  **$N^\epsilon$ -Hexyllysin**) als auch die beiden Pyridiniumderivate **2-Amino-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure 2'** (nachfolgend benannt als **LHP 1**) und **2-Amino-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)hexansäure 24'** (nachfolgend benannt als **LHP 2**) mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert werden. Die Fragmentmuster entsprachen dabei den in Abb. 53 dargestellten Fragmentmustern, jeweils ausgehend von den monoisotopischen Massen der jeweiligen Mutterionen mit  $m/z$  273,2 ( $M+H^+$ ) ( $t_{\text{Ret}} = 30,1$  min), beziehungsweise  $m/z$  391,1 ( $M^+$ ) ( $t_{\text{Ret}} = 45,0$  min und

46,9 min). Die Säurehydrolysestabilitäten des Alkylamins und der Pyridiniumderivate waren in Übereinstimmung mit der Literatur (Ishino et al., 2010; Requena et al., 1997). Somit war für alle drei Derivate eine analoge Freisetzung aus dem Proteinverband möglich. Die Darstellung des N<sup>ε</sup>-Hexyllysins erfolgte durch direkte Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Hexanal unter hydrierenden Bedingungen in Anwesenheit von H<sub>2</sub> und eines Palladium-Kohlenstoff-Katalysators. Dabei zeigte sich in Vorversuchen, dass die Aminokomponente in mindestens dreifachem Überschuss vorliegen sollte, da es sonst zu der von Fenaille et al. (2004) beschriebenen Dialkylierung kam. Nach Entschützung durch salzsaure Hydrolyse erfolgte die Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie. Die Darstellung der Pyridiniumderivate erfolgte ebenfalls durch direkte Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Hexanal. Hierbei wurde ein dreifacher molarer Überschuss der Aldehydkomponente gewählt, um die Ausbeute an Produkt zu erhöhen. Nach salzsaurer Hydrolyse erfolgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC, um eine Trennung der beiden Stellungsisomere zu erreichen. Die Darstellung der stabilisotopenmarkierten Verbindungen erfolgte in Anlehnung hieran unter Verwendung von Hexanal-d<sub>12</sub> (siehe hierzu Kap. 3.9.3 und Kap. 3.9.5).

Abb. 55 zeigt die Strukturen sowie die beobachteten, relevanten heteronuclear multiple bond correlations (HMBCs) von N<sup>ε</sup>-Hexyllysins, LHP 1 und LHP 2.

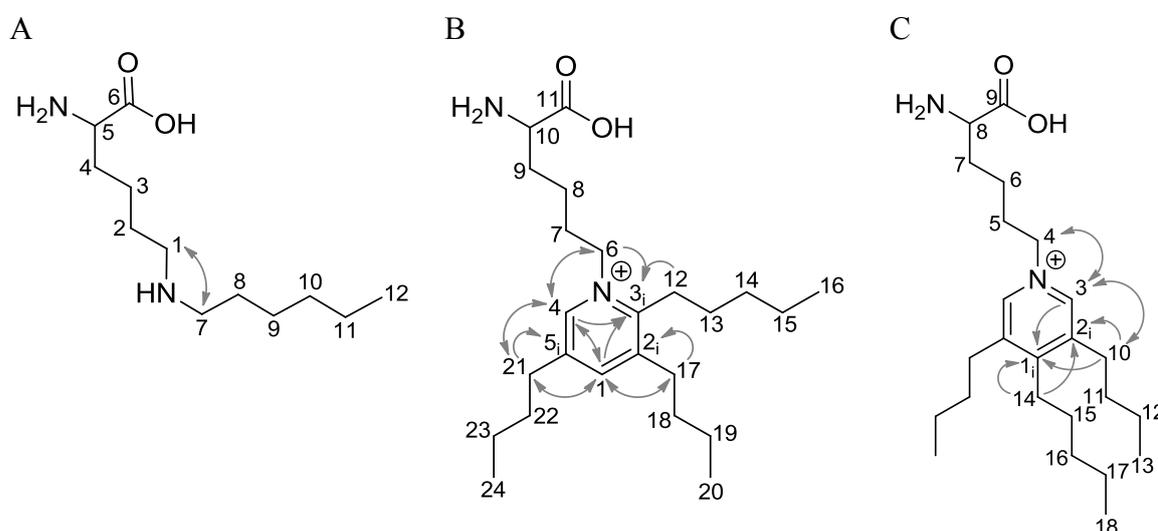


Abb. 55 Strukturen von (A) N<sup>ε</sup>-Hexyllysins **3'**, (B) LHP 1 **2'** und (C) LHP 2 **24'** mit den beobachteten, relevanten HMBCs

Fenaille et al. (2004) identifizierten N<sup>ε</sup>-Hexyllysins **3'** in seiner acetylierten Form **3**. Das von Kato et al. (1986) identifizierte und als 1-(5-Carboxy-5-aminopentyl)-2-pentyl-3,5-dibutylpyridiniumbetain bezeichnete Produkt entsprach dem in der vorliegenden Arbeit identifizierten Produkt LHP 1 **2'**. Die Existenz von LHP 2 **24'** wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

## 4.4.2 Lipierungsprodukte des 2-Heptenals

Abb. 56 zeigt das LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm des Inkubationsansatzes aus  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin und 2-Heptenal sowie die charakteristischen Fragmentmuster der zugeordneten Lipierungsprodukte.

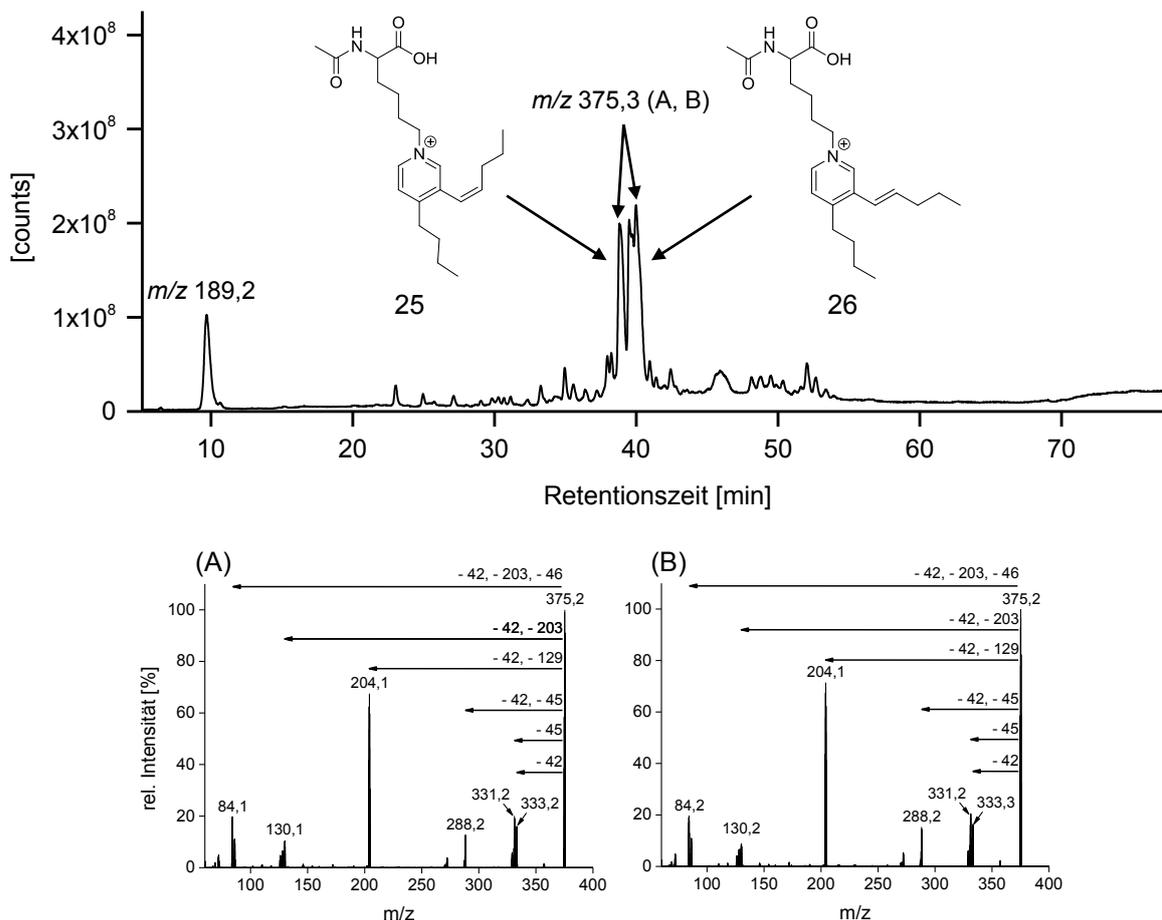


Abb. 56 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit (*Z*)-2-Heptenal (oben) für 4 h bei 75 °C und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionenscans (unten), (A) 2-Acetamido-6-[4-butyl-3-[(*Z*)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure **25** (*Z*-AcBPP), (B) 2-Acetamido-6-[4-butyl-3-[(*E*)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure **26** (*E*-AcBPP)

Neben nicht vollständig umgesetztem  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit  $m/z$  189,2 ( $M+H^+$ ) konnten im Chromatogramm zwei Hauptprodukte identifiziert werden, die jeweils das gleiche Masse/Ladungsverhältnis von  $m/z$  375,3 (Abb. 56A,  $t_{Ret} = 38,8$  min und (B),  $t_{Ret} = 40,0$  min) aufwiesen. Zusätzlich zeigten beide Verbindungen im Produktionenscan vergleichbare Fragmentmuster, wobei sich die Fragmentationen geringfügig bezüglich ihrer relativen Intensitäten unterschieden. Auf Grund abweichender Retentionszeiten wurde das Vorliegen von zwei Stellungsisomeren angenommen. Ishino et al. (2010) konnten nach Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit *trans*-2-Nonenal ebenfalls zwei stellungsisomere Pyridiniumderivate identifizieren. Diese zeigten übertragbare Fragmentmuster im LC-ESI-MS/MS-Produktionen-

scan, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Die Identifizierung beider Verbindungen erfolgte analog Kap. 4.4.1. Die Massenreduktion um -42 u deutete auf eine Deacetylierung hin. Durch direkte Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO aus dem Mutterion konnte die Massenreduktion von -45 u erklärt werden. Das Fragmentation mit m/z 288,2 (M<sup>+</sup>) ergab sich durch Deacetylierung und zusätzliche Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO. Durch Abspaltung des Pyridiniumrests analog des in Abb. 52 und Abb. 54 dargestellten Fragmentierungswegs 1 konnten sowohl das Fragmentation mit m/z 204,1 (M+H<sup>+</sup>), welches dem Pyridiniumrest entsprach, als auch das Fragmentation mit m/z 130,1 (M+H<sup>+</sup>) erklärt werden. Über weitere Abspaltungen von CO und H<sub>2</sub>O (-46 u) aus dem Ion mit m/z 130,1 resultierte schließlich das Tetrahydropyridin-1-ium mit m/z 84,1 (M+H<sup>+</sup>). Nach Darstellung beider Verbindungen in entschützter Form (Kap. 3.9.6) wurde über analog erhaltene Fragmentmuster, jeweils ausgehend von m/z 333,1 (M<sup>+</sup>), das Vorliegen von **2-Acetamido-6-[4-butyl-3-[(Z)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure 25** (nachfolgend benannt als **(Z)-AcBPP**) und **2-Acetamido-6-[4-butyl-3-[(E)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure 26** (nachfolgend benannt als **(E)-AcBPP**) bestätigt. Die Elutionsreihenfolge konnte wie folgt zugeordnet werden: Bei der zuerst eluierenden Verbindung handelte es sich um (Z)-AcBPP und bei der nachfolgend eluierenden Verbindung um (E)-AcBPP. Diese Elutionsreihenfolge war in Übereinstimmung mit entsprechenden Pyridiniumderivaten, die aus Umsetzungen mit (E)-2-Hexenal oder (E)-2-Nonenal hervorgingen (Ishino et al., 2010, Baker et al., 1998). Beide Verbindungen weisen berechnete monoisotopische Massen von 375,3 g/mol (M<sup>+</sup>) auf.

Die Bildung von (Z)-AcBPP, obwohl (E)-2-Heptenal als Reaktionspartner zur Verfügung stand, könnte auf eine Amin-katalysierte Isomerisierung des (E)-2-Heptenals in Anwesenheit der ε-Aminogruppe des N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysins zurückzuführen sein (Ishino et al., 2010). Anhand von UV-Messungen bei λ = 227 nm wurde das Verhältnis von (Z)- zu (E)-AcBPP zu 1:2 abgeschätzt. Grund hierfür könnte die thermodynamisch bevorzugte Struktur des (E)-Derivats sein, oder, dass als Folge der Isomerisierung geringere Stoffmengen an (Z)-2-Heptenal zur Verfügung standen. Analog des von Baker et al. (1998) postulierten Reaktionsweges der Bildung von (Z)- und (E)-Pyridiniumderivaten, die aus der Reaktion von (E)-2-Hexenal und der ε-Aminogruppe des Lysins hervorgingen, kommt es zunächst zur Ausbildung einer Schiff'schen Base. Nach Michael-Addition eines zweiten Moleküls (E)-2-Heptenal kann es zu einer Cyclisierung, gefolgt von einem Oxidationsschritt und schließlich zur Ausbildung der Pyridiniumderivate kommen.

#### **Ableitung der Darstellungsstrategie**

Nach salzsaurer Hydrolyse des Inkubationsansatzes konnten beide Pyridiniumderivate **2-Amino-6-[4-butyl-3-[(Z)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure 25'** (nachfolgend benannt als **(Z)-BPP**) und **2-Amino-6-[4-butyl-3-[(E)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-**

yl]hexansäure **26'** (nachfolgend benannt als (*E*)-BPP) mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert werden. Die Fragmentmuster entsprachen dabei den in Abb. 56 dargestellten Fragmentmustern, jeweils ausgehend von den monoisotopischen Massen der jeweiligen Mutterionen mit  $m/z$  333,1 ( $M^+$ ) ( $t_{Ret}$  34,5 min und 35,5 min). Die Säurehydrolysestabilität der Pyridiniumderivate war in Übereinstimmung mit der Literatur (Ishino et al., 2010). Somit war eine analoge Freisetzung aus dem Proteinverband möglich. Die Darstellung der Pyridiniumderivate erfolgte durch direkte Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit (*E*)-2-Heptenal. Hierbei wurde ein dreifacher molarer Überschuss der 2-Alkenalkkomponente gewählt, um die Ausbeute an Produkt zu erhöhen. Nach salzsaurer Hydrolyse erfolgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC, um eine Trennung der (*Z*)- und (*E*)-Isomere zu erreichen.

Abb. 57 zeigt exemplarisch die Struktur sowie die beobachteten, relevanten HMBCs von (*E*)-BPP. Analoge Kopplungen wurden im Falle des (*Z*)-BPP erhalten. Die Differenzierung zwischen den (*Z*)- und (*E*)-Isomeren erfolgte anhand der  $^1H$  Kopplungskonstanten der Vinylprotonen H-12 und H-13  $J = 11,3$  Hz für das (*Z*)-Derivat und  $J = 15,8$  Hz für das (*E*)-Derivat. Weitere Bestätigung lieferte ein 2D  $^1H/^1H$  NOESY Experiment. Hierbei wurden im Falle des (*Z*)-Derivats NOEs zwischen dem Proton H-3 und den Protonen H-14, H-15 und H-16 (schwach) beobachtet. Weiterhin war kein NOE zwischen den Protonen H-3 und H-13 sowie nur ein schwacher NOE zwischen den Protonen H-12 und H-14 nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten im Falle des (*E*)-Derivats keine NOEs zwischen dem Proton H-3 und den Protonen H-14, H-15 und H-16 beobachtet werden, wohingegen sich starke NOEs zwischen den Protonen H-3 und H-13 sowie H-12 und H-14 zeigten.

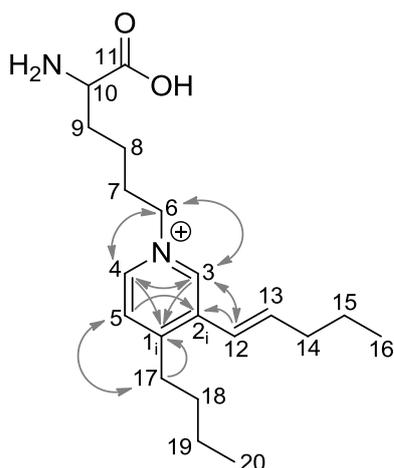


Abb. 57 Struktur von (*E*)-BPP **26'** mit den beobachteten, relevanten HMBCs

Sowohl das (*Z*)- als auch das (*E*)-BPP wurden bisher in der Literatur nicht charakterisiert.

### 4.4.3 Lipierungsprodukte des Acroleins

In Abb. 58 sind das LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm des Inkubationsansatzes aus N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Acrolein sowie die charakteristischen Fragmentmuster der zugeordneten Lipierungsprodukte dargestellt.

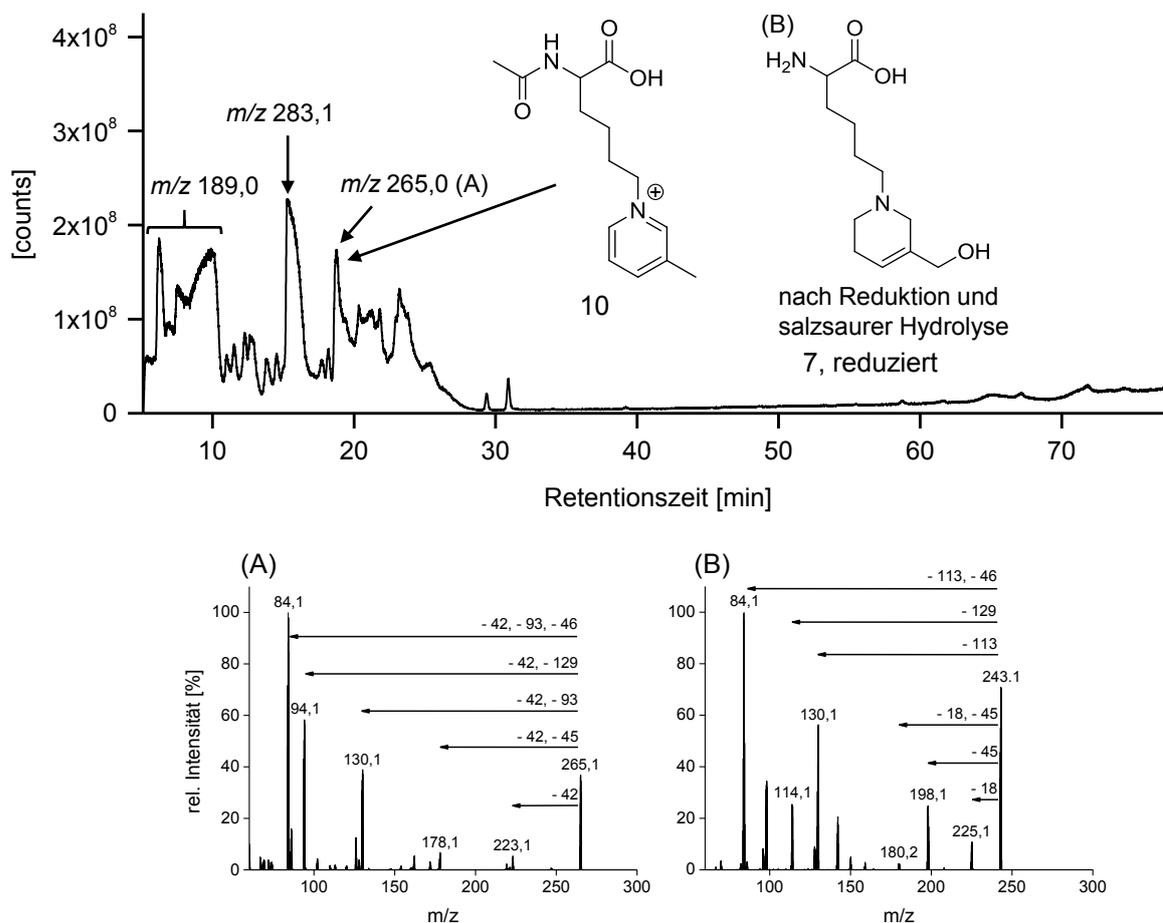


Abb. 58 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Acrolein für 4 h bei 75 °C (oben) und den jeweiligen Fragmenten aus den Produktionsscans (unten), (A) 2-Acetylamino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure **10** (MP-AcLys), (B) 2-Amino-6-[5-(hydroxymethyl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]hexansäure **7, reduziert** (reduziertes FDP-Lys) nach Reduktion und salzsaure Hydrolyse (m/z 243,1, M+H<sup>+</sup>)

Neben nicht vollständig umgesetztem N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit m/z 189,0 (M+H<sup>+</sup>) zeigte sich im Chromatogramm eine Verbindung mit m/z 265,0 (Abb. 58A, t<sub>Ret</sub> = 18,8 min), bei der das acetylierte MP-Lysin-Derivat **10** vermutet wurde. Die Identifizierung erfolgte analog Kap. 4.4.1 anhand der im Produktionsscans erhaltenen Fragmenten: die Massenreduktion um -42 u deutete auf eine Deacetylierung hin; durch nachfolgende Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO (-45 u) konnte das beobachtete Fragmentation mit m/z 178,1 (M<sup>+</sup>) erklärt werden; durch Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 1 in Abb. 52 und Abb. 54 unter Abspaltung des Pyridiniumrests, welcher nach Protonierung mit m/z 94,1 (M+H<sup>+</sup>) beobachtet

wurde, konnte das Fragmentation mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) erklärt werden; durch weitere Fragmentierung des Ions mit  $m/z$  130,1 war das Fragmentation des Tetrahydropyridin-1-iums mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) erklärbar. Somit ließen die im Produktionenscan erhaltenen Fragmentationen den Rückschluss auf das Vorliegen der **2-Acetamido-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure 10** (nachfolgend als **MP-AcLys** bezeichnet) zu. Diese weist eine berechnete monoisotopische Masse von 265,2 g/mol ( $M^+$ ) auf. Nach Darstellung der Verbindung in entschützter Form (Kap. 3.9.7) wurde über das analog erhaltene Fragmentmuster, ausgehend von  $m/z$  223,1 ( $M^+$ ), das Vorliegen des Pyridinium-Derivats bestätigt.

Weiterhin wurde eine Verbindung mit  $m/z$  283,1 ( $t_{Ret} = 15,3$  min) beobachtet, bei der das Vorliegen des acetylierten FDP-Derivats **7** vermutet wurde. Allerdings war eine direkte Identifizierung über den Produktionenscan nicht möglich, da nicht alle Fragmentationen zuordenbar waren. Als Ursache wurde vermutet, dass es hier zu Coelutionen mit Verbindungen gleichen Masse/Ladungsverhältnissen kam. Um die Anteile störender Verbindungen zu reduzieren, erfolgte eine Reduktion des Inkubationsansatzes mit anschließender salzsaurer Hydrolyse. Als Folge zeigte sich im Scan-Chromatogramm eine Verbindung mit dem erwarteten Masse/Ladungsverhältnis des reduzierten, deacetylierten FDP-Derivats mit  $m/z$  243,1 ( $M+H^+$ ) ( $t_{Ret}$  14,1 min). Eine Reduktion der Doppelbindung innerhalb der Ringstruktur erfolgt durch  $NaBH_4$  nicht. Die Identifizierung erfolgte anhand des erhaltenen Fragmentmusters (Abb. 58,B) in Analogie zu Kap. 4.4.1: das Ion mit  $m/z$  225,1 deutete auf einen Cyclisierungsschritt unter Wasserabspaltung (-18 u) analog des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 54 hin; nach weiterer Abspaltung von CO und  $NH_3$  (-45 u) konnte sich das Fragmentation mit  $m/z$  180,2 bilden; der Massenverlust von -45 u, ausgehend vom Mutterion, wies auf eine Abspaltung von  $NH_3$  und CO hin; das Fragmentation mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) deutete auf eine Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 1 in Abb. 54 hin, welches nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte. Gleichzeitig verblieb das protonierte Tetrahydropyridinderivat der ehemaligen  $\epsilon$ -Aminogruppe mit  $m/z$  114,1 ( $M+H^+$ ). Somit ließen die im Produktionenscan erhaltenen Fragmentationen den Rückschluss auf das Vorliegen der **2-Amino-6-[5-(hydroxymethyl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]hexansäure 7, reduziert** (nachfolgend als **reduziertes FDP-Lys bezeichnet**) zu. Diese weist eine berechnete monoisotopische Masse von 243,2 g/mol ( $M+H^+$ ) auf.

Die Bildung des MP-Lysin-Derivats **10** erfolgt durch nukleophilen Angriff am  $C_1$  des Acroleins (siehe Kap. 2.4.2, Abb. 15). Die hierdurch gebildete Schiff'sche Base **9** kann durch Michael-Addition eines weiteren Moleküls Acrolein, zwei nachfolgenden Oxidationsschritten und Cyclisierung zum MP-Lysin-Derivat **10** weiterreagieren (Furuhata et al., 2003). Die detaillierten Oxidations- und Cyclisierungsreaktionen sind bisher allerdings nicht geklärt. Furuhata et al. (2003) identifizierten das aus der Inkubation von  $N^\alpha$ -Acetyllysin mit Acrolein

unter physiologischen Bedingungen hervorgegangene MP-Lysin-Derivat massenspektrometrisch sowie mittels 1D und 2D NMR-Spektroskopie. Erfolgt eine Michael-Addition am C<sub>3</sub>, entsteht zunächst das Propanal-Addukt **6**. Dieses konnte allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden, da unter den verwendeten Bedingungen möglicherweise die Weiterreaktion im Vordergrund stand. Kommt es zu einer erneuten Michael-Addition eines Acroleinmoleküls sowie einer nachfolgenden Aldolkondensation, besteht die Möglichkeit zur Bildung des entsprechenden 3-Formyl-3,4-dehydropiperidino-Derivats **7** (Uchida et al., 1998). Die Ausbildung von **7** erfolgt dabei exklusiv nur nach Reaktion mit Lysinseitenketten (Colzani et al., 2013). So identifizierten Uchida et al. (1998) nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyllysin mit Acrolein unter physiologischen Bedingungen und nachfolgender salzsaurer Hydrolyse das entsprechende N<sup>ε</sup>-(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)lysin (FDP-Lysin). Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten allerdings, dass das FDP-Derivat nach direkter salzsaurer Hydrolyse nicht mehr nachweisbar, sondern eine vorherige Reduktion zur Stabilisierung erforderlich war.

#### Ableitung der Darstellungsstrategie

Als ausgewähltes Lipierungsprodukt des Acroleins wurde das MP-Lysin-Derivat **10** dargestellt, da es sich hierbei um ein stabiles Endprodukt handelt. Nach salzsaurer Hydrolyse des Inkubationsansatzes konnte die entschützte **2-Amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure 10'** (nachfolgend bezeichnet als **MP-Lysin**) mit m/z 223,1 (M<sup>+</sup>) und t<sub>Ret</sub> 16,9 min mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert werden. Das Fragmentmuster entsprach dabei, ausgehend von der monoisotopischen Masse des Mutterions von m/z 223,1 (M<sup>+</sup>), dem in Abb. 58 (A) dargestellten Fragmentmuster. Auf Grund der Säurehydrolysestabilität war eine analoge Freisetzung aus dem Proteinverband möglich. Die Darstellung erfolgte durch direkte Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Acrolein. Hierbei wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Acrolein gewählt, um die Ausbeute an Produkt zu erhöhen. Nach salzsaurer Hydrolyse erfolgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC.

Abb. 59 zeigt die Struktur sowie die beobachteten, relevanten HMBCs von MP-Lysin.

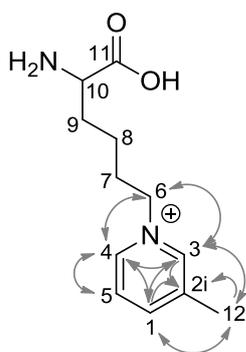


Abb. 59 Struktur von MP-Lysin **10'** mit den beobachteten, relevanten HMBCs

## 4.4.4 Lipierungsprodukte des Malondialdehyds

Abb. 60 zeigt das LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm des Inkubationsansatzes aus N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Malondialdehyd sowie die charakteristischen Fragmentmuster der zugeordneten Lipierungsprodukte.

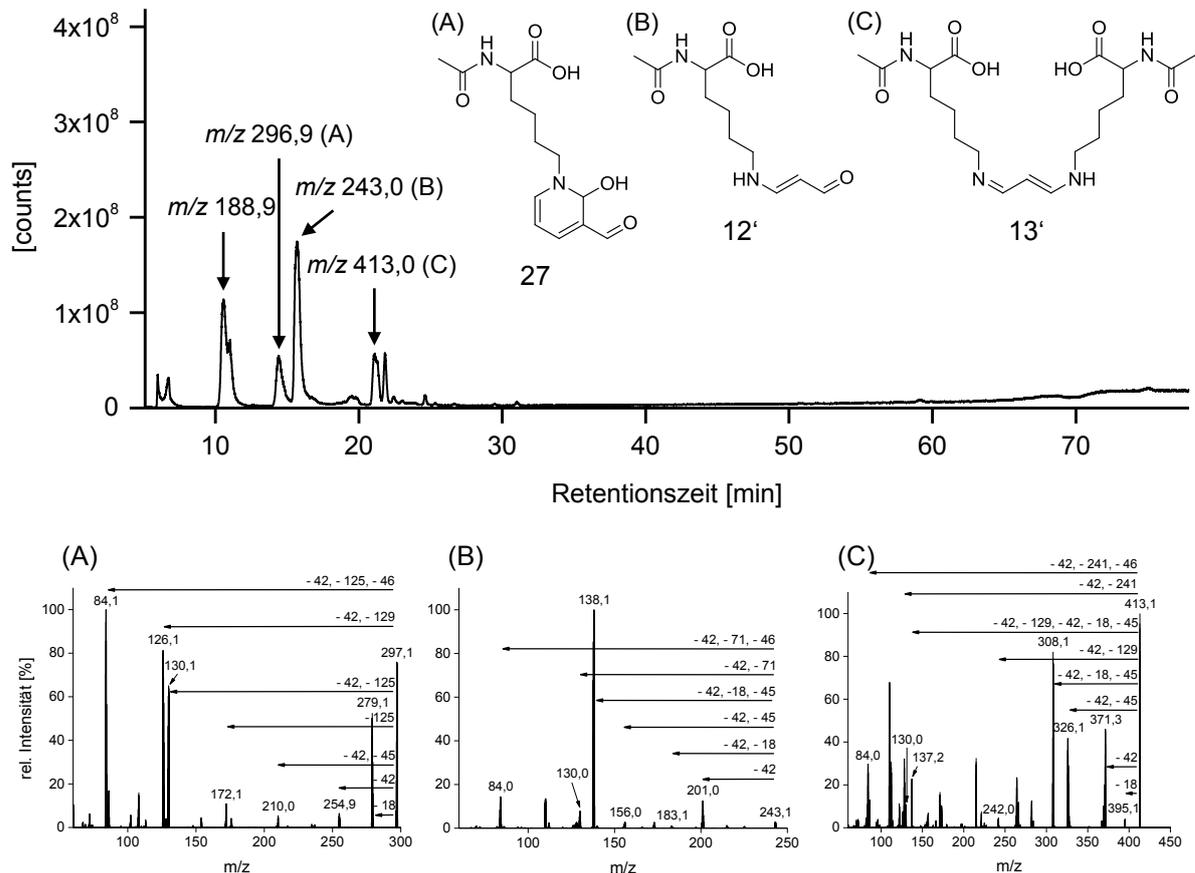


Abb. 60 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Malondialdehyd für 4 h bei 75 °C (oben) und den jeweiligen Fragmenten aus den Produktionsscans (unten), (A) 2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)hexansäure **27**, (B) 2-Acetamido-6-[(3-oxoprop-1-enyl)amino]hexansäure **12'** (N<sup>ε</sup>-Propenal-AcLys), (C) 2-Acetamido-6-[(3-(5-acetamido-6-hydroxy-6-oxo-hexyl)iminoprop-1-enyl)amino]hexansäure **13'** (MDA-Crosslink)

Neben nicht vollständig umgesetztem N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit m/z 188,9 (M+H<sup>+</sup>) zeigte sich im Chromatogramm eine Verbindung mit m/z 296,9 (Abb. 60A, t<sub>Ret</sub> = 14,4 min). Die Identifizierung erfolgte analog Kap. 4.4.1 anhand der im Produktionsscans erhaltenen Fragmentenmuster: die Massenreduktion von -18 u deutete auf eine direkte Fragmentierung unter Verlust von H<sub>2</sub>O analog des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 ohne vorherige Deacetylierung hin; die Massenreduktion um -42 u wies auf eine erfolgte Deacetylierung der Ausgangsverbindung hin; die weitere Reduktion um -45 u wurde der Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO zugeordnet; das Fragmentierung mit m/z 172,1 deutete auf eine direkte Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 1 in Abb. 52 und Abb. 54 ohne vorherige Deacetylierung hin, wobei das Fragmentierung mit m/z 126,1 (M+H<sup>+</sup>) abgespalten wurde (-125 u),

das ebenfalls erkennbar war; erfolgte zuerst die Deacetylierung und nachfolgend die Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 1, so konnte das Fragmentation mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) entstehen, das nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte. Somit konnte das Vorliegen der **2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)hexansäure 27** angenommen werden, die eine berechnete monoisotopische Masse von 297,1 g/mol ( $M+H^+$ ) aufweist. Die Bildung könnte durch Reaktion von zwei MDA-Molekülen und anschließender Cyclisierung erfolgt sein. Ein entsprechendes Reaktionsprodukt ist in der Literatur bisher nicht publiziert. Ein möglicher Reaktionsweg über das Aminopropenal **12'** ist in Abb. 61 dargestellt (Deuber, 2015). Als Folge der Eliminierung von  $H_2O$  besteht die Möglichkeit, dass sich die 2-Acetamido-6-(3-formyl-4-hydroxy-4H-pyridin-1-yl)hexansäure als auch die 2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)hexansäure bilden. Zur eindeutigen Identifizierung und Absicherung ist die Darstellung entsprechender, mittels NMR-Spektroskopie charakterisierter, Standards nötig.

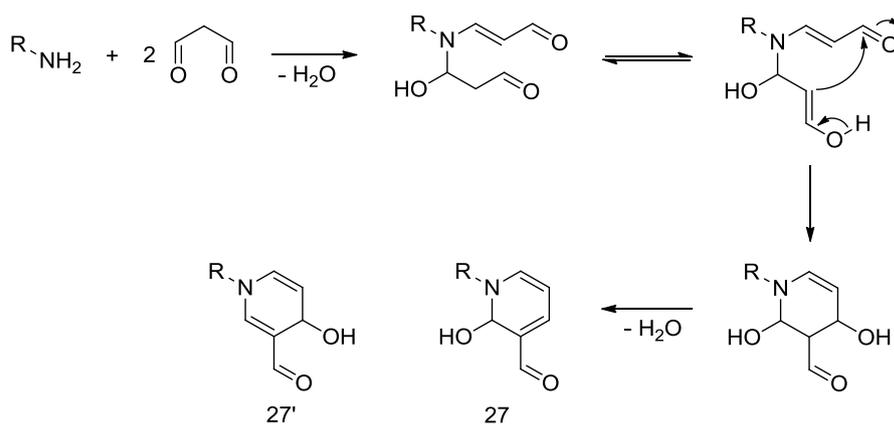


Abb. 61 Postulierter Reaktionsweg der Bildung der 2-Acetamido-6-(3-formyl-4-hydroxy-4H-pyridin-1-yl)hexansäure **27'** beziehungsweise 2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)hexansäure **27**;  $R-NH_2$  -  $\epsilon$ -Aminogruppe des  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysins

Weiterhin zeigte sich im Chromatogramm eine Verbindung mit  $m/z$  243,0 (Abb. 60B) ( $t_{Ret} = 15,7$  min), bei welcher das Vorliegen der Schiff'schen Base **12**, beziehungsweise des entsprechenden Aminopropenals **12'**, vermutet wurde: die Massenreduktion von -42 u deutete auf eine Deacetylierung hin und die weitere Reduktion um -18 u auf eine Abspaltung von  $H_2O$  entsprechend des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54; durch eine weitere Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) konnte das Fragmentation mit  $m/z$  138,1 ( $M+H^+$ ) erklärt werden; das Fragmentation mit  $m/z$  156,0 deutete auf eine Deacetylierung (-42 u) des Mutterions und nachfolgender Abspaltung von  $NH_3$  und CO (-45 u) hin; entsprechend des Fragmentierungswegs 1 nach vorangegangener Deacetylierung (-42 u) konnte das Fragmentation mit  $m/z$  130,0 ( $M+H^+$ ) erklärt werden, welches nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte. Somit konnte die

Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um **12**, beziehungsweise **12'** (**2-Acetamido-6-[(3-oxoprop-1-enyl)amino]hexansäure**, nachfolgend als **N<sup>ε</sup>-Propenal-AcLys** bezeichnet) handeln könnte. Diese weist eine berechnete monoisotopische Masse von 243,1 g/mol ( $M+H^+$ ) auf. Die Bildung erfolgt über die Schiff'sche Base **12**, die im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Aminopropenal **12'** steht (Itakura & Uchida, 2001; Requena et al., 1997; Nair et al., 1981), wobei das Enamin **12'** die bevorzugte Konformation darstellt (Girón et al., 1992). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass in der vorliegenden Arbeit ebenfalls das Aminopropenal **12'** vorlag. Uchida et al. (1997) identifizierten **12'** als Hauptprodukt der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und MDA. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das Produkt nicht säurehydrolysestabil war; es konnte jedoch mittels LC-ESI-MS/MS durch vorangegangene Reduktion in Form des 3-(N<sup>ε</sup>-Lysino)-propan-1-ols ( $m/z$  205,2,  $M+H^+$ ) identifiziert werden. Eine entsprechende Freisetzung aus dem Proteinverband ist somit möglich. Requena et al. (1997) wiesen das N<sup>ε</sup>-Propanol-Addukt sowie sein Artefakt 3-(N<sup>ε</sup>-Lysino)-1-chlorpropan auf analogem Wege mittels GC-MS in LDL-Proben nach.

Bei der im Chromatogramm sichtbaren Verbindung mit  $m/z$  413,0 (Abb. 60C,  $t_{Ret} = 21,1$  min) wurde das Vorliegen eines Quervernetzungsprodukts vermutet, da die Masse auf zwei Moleküle N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, ein Molekül MDA sowie die Abspaltung von zwei Molekülen H<sub>2</sub>O hindeutete. Eine Fragmentierung konnte hierbei allerdings erst bei einer im Vergleich zu den anderen Fragmentierungen hohen Kollisionsspannung von 30 eV erreicht werden, weshalb das Fragmentmuster deutlich mehr Fragmentationensignale aufwies: die Massenreduktion um -18 u wies analog Kap. 4.4.1 auf eine direkte Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 ohne vorherige Deacetylierung hin, wohingegen die Reduktion um -42 u die Deacetylierung anzeigte; das Fragmention mit  $m/z$  326,1 ( $M+H^+$ ) deutete auf eine nachfolgende Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO hin (-45 u); entsprechend des Fragmentierungswegs 2 konnte nach Deacetylierung (-45 u), Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 u) und Abspaltung von CO und NH<sub>3</sub> (-45 u) das Fragmention mit  $m/z$  308,1 ( $M+H^+$ ) erklärt werden; das Fragmention mit  $m/z$  242,0 wurde als Folge einer Deacetylierung (-42 u) und nachfolgender Fragmentierung nach Fragmentierungsweg 1 (-129 u) in Abb. 52 und Abb. 54 zugeordnet; durch weitere Fragmentierung dieses Ions durch eine zweite Deacetylierung (-42 u) und Fragmentierung analog des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 unter Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 u), CO und NH<sub>3</sub> (-45 u) konnte das Fragmention mit  $m/z$  137,0 ( $M+H^+$ ) erklärt werden; nach Deacetylierung (-42 u) und Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 1 (-241 u) ergab sich das Fragmention mit  $m/z$  130,0 ( $M+H^+$ ), welches nach Abspaltung von CO und H<sub>2</sub>O (-46 u) in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte. Somit bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um das Quervernetzungsprodukt **2-Acetamido-6-[(3-(5-acetamido-6-hydroxy-6-oxo-hexyl)-**

**iminoprop1-enyl)amino]hexansäure 13'** handelte. Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 413,2 g/mol ( $M+H^+$ ) auf. Die Bildung erfolgt über einen zweiten nukleophilen Angriff an **12**, wodurch es zur Bildung eines Diimins **13** kommt, welches im Gleichgewicht mit seinem resonanzstabilisierten Enamin **13'** steht (Sayre et al., 2006; Requena et al., 1997; Chio & Tappel, 1969). Requena et al. (1997) konnten **13** beziehungsweise **13'** ebenfalls nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse mittels GC-MS in LDL-Proben nachweisen.

#### 4.4.5 Lipierungsprodukte des 4-Hydroxynonenals

In Abb. 62 sind das LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm des Inkubationsansatzes aus  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin und 4-HNE sowie die charakteristischen Fragmentmuster der zugeordneten Lipierungsprodukte dargestellt.

Neben nicht vollständig umgesetztem  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit  $m/z$  189,1 ( $M+H^+$ ) zeigte sich im Chromatogramm eine Verbindung mit  $m/z$  365,2 (Abb. 62A,  $t_{Ret} = 31,4$  min). Die Identifizierung erfolgte analog Kap. 4.4.1 anhand der im Produktionscan erhaltenen Fragmentmuster: die Massenreduktion um -18 u deutete auf eine direkte Fragmentierung entsprechend des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 ohne vorherige Deacetylierung hin; die Reduktion um -42 u wurde einer Deacetylierung zugeordnet, auf die eine weitere Abspaltung von  $NH_3$  und CO (-45 u) folgte, wodurch das Fragmentation mit  $m/z$  278,1 resultierte; entsprechend des Fragmentierungswegs 1 in Abb. 52 und Abb. 54 konnte es zur Abspaltung des Fragmentions mit  $m/z$  194,2 ( $M+H^+$ ) kommen, das einem protonierten Pyridiniumrest zugeordnet wurde, während das Fragmentation mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) verblieb; nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) aus dem Fragmentation mit  $m/z$  130,1 konnte dieses in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen; das Fragmentation mit  $m/z$  176,1 konnte als Folge einer Eliminierung von  $H_2O$  (-18 u) aus dem Pyridiniumrest entstehen. Somit wurde das Vorliegen des Pyridiniumderivats **2-Acetamido-6-[3-(2-hydroxyheptyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure 28** angenommen. Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 365,2 g/mol ( $M^+$ ) auf. Napetschnig et al. (1988) identifizierten nach Inkubation von 4-Hydroxypentenal und Glycin ein entsprechendes Pyridiniumderivat, welches zur Bildung zwei Moleküle 4-Hydroxypentenal und ein Molekül Glycin benötigte. Der genaue Reaktionsmechanismus war dabei nicht geklärt, allerdings postulierten Napetschnig et al. (1988), dass sich zunächst ein Michael-Addukt oder ein Carbinolamin bildet. Beide Produkte können dann mit einem weiteren Molekül 4-Hydroxypentenal zum Pyridiniumderivat kondensieren, wobei  $H_2O$ ,  $OH^-$  und Acetaldehyd abgespalten werden (Napetschnig et al., 1988). Ein Pyridiniumderivat aus 4-HNE und der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins ist in der Literatur

bisher nicht beschrieben. Im Gegensatz zu dem von Napetschnig et al. (1988) identifizierten Pyridiniumderivat wäre eine Bildung auch innerhalb des Proteinverbands möglich.

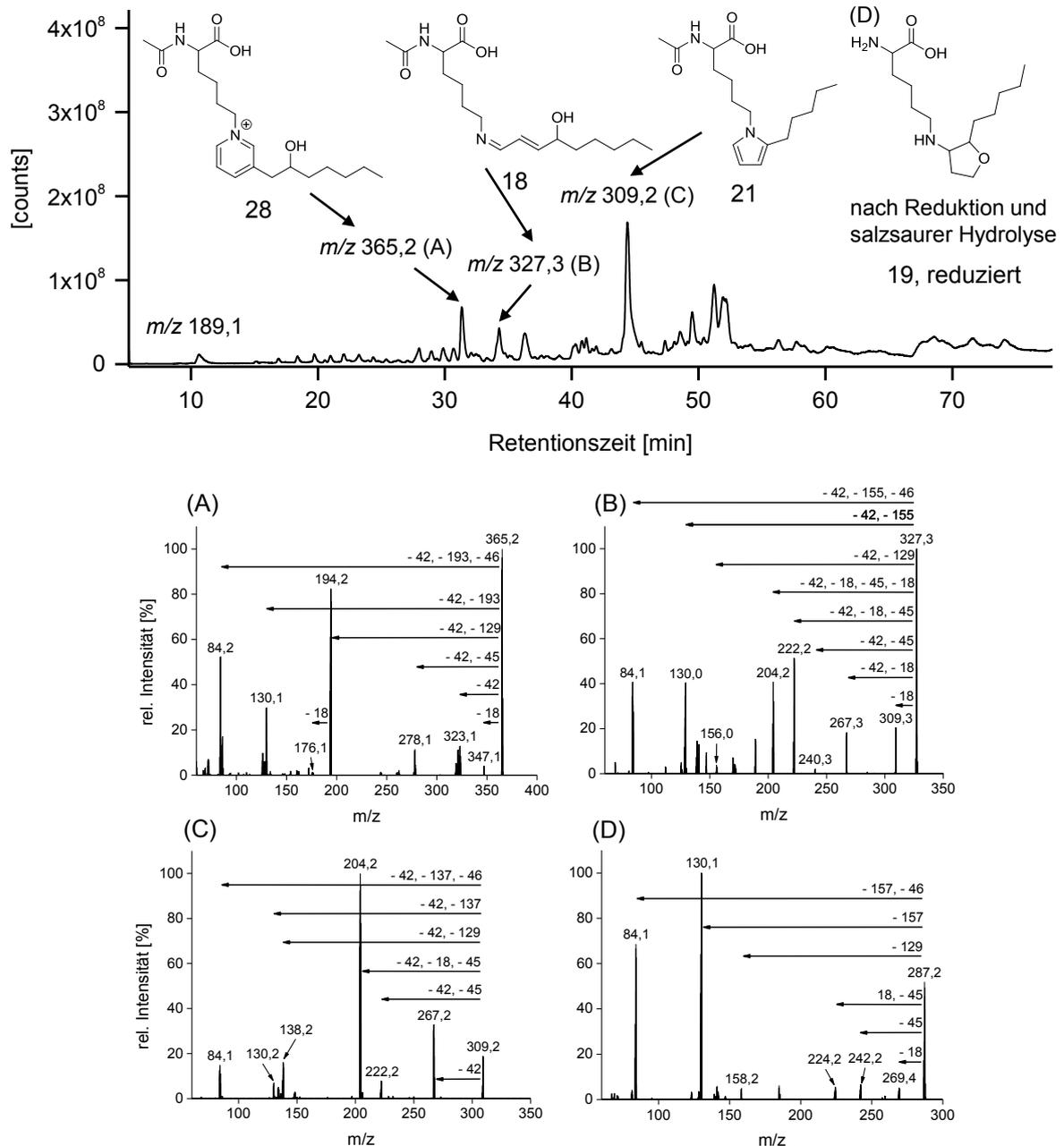


Abb. 62 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit 4-HNE für 4 h bei 75 °C (oben) und den jeweiligen Fragmentmustern aus den Produktionsscans (unten), (A) 2-Acetamido-6-[3-(2-hydroxyheptyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure **28** (Pyridinium-Derivat), (B) 2-Amino-6-[4-(hydroxynon-2-enyliden)amino]hexansäure **18** (Schiff'sche Base), (C) 2-Acetamido-6-(2-pentylpyrrol-1-yl)hexansäure **21** (2-PP-AcLys), (D) 2-Amino-6-[(2-pentyltetrahydrofuran-3-yl)-amino]-hexansäure **19, reduziert** (reduziertes, cyclisiertes Michael-Addukt) nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse ( $m/z$  287,2,  $M+H^+$ )

Weiterhin zeigte sich im Chromatogramm eine Verbindung mit  $m/z$  327,2 (Abb. 62B,  $t_{Ret} = 34,3$  min). Auf Grund der Tatsache, dass die Masse in der Summe jeweils eines Moleküls  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin und 4-HNE abzüglich eines Wassermoleküls entsprach, wurde das

Vorliegen einer Schiff'schen Base **18** vermutet. Die Identifizierung erfolgte analog Kap. 4.4.1: die Massenreduktion um -18 u deutete auf eine direkte Fragmentierung analog des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 ohne vorherige Deacetylierung hin; durch vorangegangene Deacetylierung (-42 u) und nachfolgende Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 u) konnte das Fragmentation mit m/z 267,3 (M+H<sup>+</sup>) erklärt werden, welches nach Abspaltung von CO und NH<sub>3</sub> (-45 u) in das Fragmentation mit m/z 222,2 übergehen konnte; durch zusätzlich Eliminierung von H<sub>2</sub>O (-18 u) kam es zur Bildung des Fragmentations mit m/z 204,2 (M+H<sup>+</sup>); durch Deacetylierung (-42 u) des Mutterions und nachfolgender Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO war das Fragmentation mit m/z 240,2 (M+H<sup>+</sup>) erklärbar; entsprechend des Fragmentierungswegs 1 in Abb. 52 und Abb. 54 konnte es nach Deacetylierung (-42 u) und Abspaltung des ebenfalls nachgewiesenen Fragmentations m/z 156,0 (M+H<sup>+</sup>) zur Bildung des Fragmentations mit m/z 130,0 (M+H<sup>+</sup>) kommen, welches nach Abspaltung von CO und H<sub>2</sub>O (-46 u) in das Tetrahydropyridin-1-ium mit m/z 84,1 (M+H<sup>+</sup>) übergehen konnte. Somit war das Vorliegen der Schiff'schen Base **2-Amino-6-[4-(hydroxy-non-2-enyliden)amino]hexan-säure 18** anzunehmen. Diese weist eine berechnete monoisotopische Masse von 327,2 g/mol (M+H<sup>+</sup>) auf. Ein entsprechendes Derivat wurde bisher in der Literatur nicht identifiziert.

Bei der Verbindung mit m/z 309,2 (Abb. 62C, t<sub>Ret</sub> = 44,4 min) wurde das Vorliegen des 2-Pentylpyrrolderivats **21** angenommen. Die Identifizierung erfolgte analog Kap. 4.4.1: die Massenreduktion um -42 u deutete auf eine Deacetylierung hin; durch nachträgliche Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO (-45 u) konnte das Fragmentation mit m/z 222,2 (M+H<sup>+</sup>) erklärt werden; die Bildung des Fragmentations mit m/z 204,2 (M<sup>+</sup>) war entsprechend des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 (-18 u, -45 u) nach vorheriger Deacetylierung (-42 u) erklärbar; das Fragmentation mit m/z 130,2 (M+H<sup>+</sup>) konnte nach Deacetylierung (-42 u) über den Fragmentierungsweg 1 in Abb. 52 und Abb. 54 und durch Abspaltung des ebenfalls nachgewiesenen Fragmentations mit m/z 138,3 (M+H<sup>+</sup>) entstehen; nach Abspaltung von CO und H<sub>2</sub>O (-46 u) wurde der Übergang in das Tetrahydropyridin-1-ium-Derivat mit m/z 84,1 (M+H<sup>+</sup>) erklärt. Somit war das Vorliegen des 2-Pentylpyrrolderivats **2-Acetamido-6-(2-pentylpyrrol-1-yl)hexansäure 21** (nachfolgend als **2-PP-AcLys** bezeichnet) anzunehmen. Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 309,2 g/mol (M+H<sup>+</sup>) auf. Nach Darstellung der Verbindung in entschützter Form (Kap. 3.9.8) wurde über das analog erhaltene Fragmentmuster, ausgehend von m/z 267,2 (M+H<sup>+</sup>), das Vorliegen des 2-Pentylpyrrol-Derivats **21** bestätigt. Die Bildung erfolgt über die Schiff'sche Base **18** (Nadkarni & Sayre, 1995; Uchida & Stadtman, 1993). Diese kann in das entsprechende Enamin und nach Keto-Enol-Tautomerisierung in das 4-Oxo-Enamin umgelagert werden, wodurch es schließlich zur Cyclisierung unter Ausbildung des 2-Pentylpyrrolderivats **21** kommt (Sayre et al., 1993). Auf Grund des irreversiblen Kondensationsschritts stellt die Verbindung ein advanced lipation end product (ALE) dar (Sayre et al., 2006). Mittels <sup>13</sup>C NMR konnte als Folge einer Inkubation von

BSA mit 4-HNE unter physiologischen Bedingungen (37 °C, pH 7,4) gezeigt werden, dass 20 % des reagierten 4-HNE in Form des 2-Pentylpyrrolderivats vorlagen (Amarnath et al., 1998). Hierdurch wird die Hydrophobizität des Proteins erhöht und es besteht die Möglichkeit zu Pyrrol-induzierten Quervernetzungen (Amarnath et al., 1998).

Auf Grund der Instabilität des Michael-Addukts **19** (Lin et al., 2005; Nadkarni & Sayre, 1995) erfolgte die Identifizierung nach Reduktion und anschließender salzsaurer Hydrolyse in Form des reduzierten, cyclisierten Michael-Addukts analog Requena et al. (1997). Die potentielle Verbindung mit  $m/z$  287,2 ( $M+H^+$ ) eluierte bei  $t_{Ret} = 28,0$  min (Abb. 62D). Die Identifizierung erfolgte analog Kap. 4.4.1: die Massenreduktion um -18 u deutete auf eine Fragmentierung analog des Fragmentierungswegs 2 in Abb. 52 und Abb. 54 hin; die Massenreduktion um -45 u wurde durch Abspaltung von  $NH_3$  und CO erklärt; entsprechend des Fragmentierungswegs 2 konnte es durch Abspaltung von  $H_2O$  (-18 u) sowie CO und  $NH_3$  (-45 u) zur Bildung des Fragmentions mit  $m/z$  224,2 ( $M+H^+$ ) kommen; entsprechend des Fragmentierungswegs 1 kam es zur Bildung der Fragmentionen mit  $m/z$  158,2 ( $M+H^+$ ) und  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ); nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) war der Übergang in das Tetrahydropyridin-1-ium mit  $m/z$  84,1 erklärbar. Somit war das Vorliegen des **reduzierten, cyclisierten Michael-Addukts 2-Amino-6-[(2-pentyltetrahydrofuran-3-yl)amino]hexansäure 19, reduziert** anzunehmen. Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 287,2 g/mol ( $M+H^+$ ) auf.

Nach Inkubation von nativen Erdnussproteinen mit 4-HNE konnte in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden (Kap. 4.3.4), was auf die Bildung eines 4-HNE-induzierten Fluorophors **23** (Xu et al., 1999; Itakura et al., 1998; Xu & Sayre, 1998) zurückgeführt wurde. Dieses konnte jedoch nicht identifiziert werden, was auf die Reaktionsbedingungen zurückzuführen war. Optimale Reaktionsbedingungen zur Bildung des Fluorophors stellen ein Überschuss des Nucleophils im Verhältnis zu 4-HNE von 5-10:1, ein pH-Wert zwischen 7 und 7,5 und ein  $Cu^{2+}$ -Gehalt von 0,5 % bezogen auf 4-HNE dar (Xu et al., 1999). Da im Falle der Inkubation der Erdnussproteine ein pH-Wert von 7,4 vorlag, war eventuell die Fluorophorbildung begünstigt, wohingegen sie im Falle der methanolischen Inkubation nicht im Vordergrund stand.

#### **Ableitung der Darstellungsstrategie**

Als ausgewähltes Lipierungsprodukt des 4-HNE wurde das 2-Pentylpyrrolderivat dargestellt, da es sich um ein stabiles Endprodukt handelt (Sayre et al., 2006). Auf Grund der Säurelabilität wurde zunächst eine basische Hydrolyse mit 2 M NaOH (23 h, 110 °C) durchgeführt, wodurch die entschützte **2-Amino-6-(2-pentylpyrrol-1-yl)hexansäure 21'** (nachfolgend als **2-PPL** bezeichnet) mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert werden konnte ( $t_{Ret}$  21,7 min). Das Fragmentmuster entsprach dabei, ausgehend von der monoisotopischen Masse des Mutterions von  $m/z$  267,2 ( $M+H^+$ ), dem in Abb. 62C dargestellten Fragmentmuster. Auf Grund der

Säurelabilität des Produktes ist eine enzymatische Freisetzung aus dem Proteinverband erforderlich. Da eine direkte Umsetzung von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit 4-HNE zur Bildung vieler Nebenprodukte und Polymerisierungen des Pyrrols führte, wurde eine vierstufige Darstellungsstrategie über eine Paal-Knorr-Pyrrol-Synthese gewählt. Zunächst wurde  $\gamma$ -Nonalacton mittels Lithiumaluminiumhydrid zum Nonan-1,4-diol reduziert. Im Anschluss erfolgte eine Oxidation mittels Pyridiniumchlorochromat zum 4-Oxononanal, welches in einer Paal-Knorr-Pyrrol-Synthese mit N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin zum 2-Pentylpyrrolacetyllysin umgesetzt wurde. Nach Entschützung durch basische Hydrolyse erfolgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC.

Abb. 63 zeigt die Struktur sowie die beobachteten, relevanten HMBCs von 2-PPL.

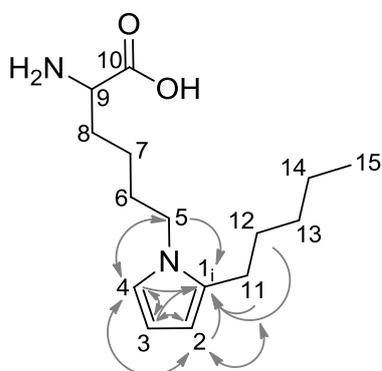


Abb. 63 Struktur von 2-PPL **21'** mit den beobachteten, relevanten HMBCs

#### 4.4.6 Fazit

Anhand von LC-ESI-MS/MS-Messungen konnte das Vorliegen von Lipierungsprodukten, die aus Reaktionen von ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins hervorgingen, identifiziert werden. Des Weiteren wurden als relevant eingestufte Produkte dargestellt, um nachfolgend auf das Vorhandensein in Erdnussproben prüfen zu können. In Abb. 64 und Tab. 51 sind die identifizierten Lipierungsprodukte, die aus der Reaktion mit N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin hervorgingen, als Übersicht dargestellt.

Hieraus wird ersichtlich, dass (1) in Lebensmitteln eine Vielzahl an Lipierungsprodukten erwartet werden kann. Diese können prinzipiell auch aus anderen hier nicht untersuchten Sekundärprodukten hervorgehen. In Abhängigkeit der Kettenlänge der reagierenden Sekundärprodukte sind dabei entsprechend analoge Lipierungsderivate zu erwarten. (2) Weiterhin wurden als prinzipiell relevante Lipierungsprodukte des Lysins die Schiff'sche Base und zwei Pyridiniumderivate des Hexanals, zwei Pyridiniumderivate des 2-Heptenals, das MP-Lysin-Derivat des Acroleins und das 2-Pentylpyrrol-Derivat des 4-HNE eingestuft. Unter

Berücksichtigung der Erkenntnisse aus Kap. 4.3.5 könnten somit (3) MP-Lysin und 2-PPL relevante Lipierungsprodukte in den Erdnussproben darstellen.

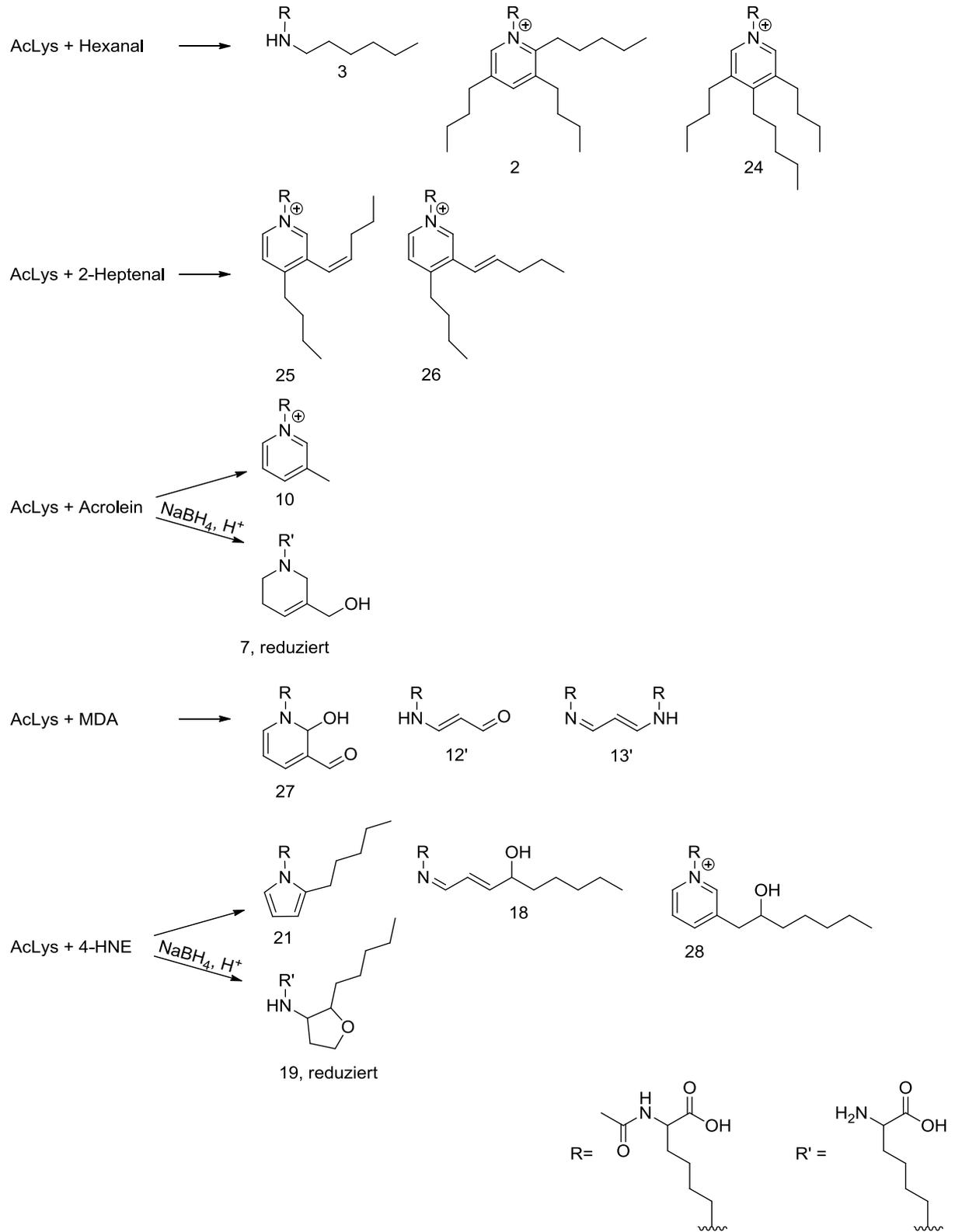


Abb. 64 Übersicht über die mittels LC-ESI-MS/MS identifizierte Lipierungsprodukte, die aus der Reaktion von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin (AcLys) mit ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation hervorgingen.

Tab. 51 Übersicht der mittels LC-ESI-MS/MS identifizierten Lipierungsprodukte, die aus der Reaktion von N<sup>ε</sup>-Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Sekundärprodukten der Lipidperoxidation hervorgingen. Die Absicherung über dargestellte Standards erfolgte jeweils durch Vergleich der Fragmentmuster nach Entschützung der zu identifizierenden Lipierungsprodukte mittels salzsaurer oder basischer Hydrolyse.

Sekundärprodukt	identifiziertes Lipierungsprodukt	bekannt in Literatur	zusätzliche Absicherung über dargestellten Standard
Hexanal	(1) 2-Acetamido-(6-hexyl-amino)hexansäure (N <sup>ε</sup> -Hexyl-AcLys) <b>3</b> , <sup>1)</sup>	ja <sup>3)</sup>	ja
	(2) 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-2-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)-hexansäure (AcLHP 1) <b>2</b> , <sup>1)</sup>	ja <sup>4)</sup>	ja
	(3) 2-Acetamido-6-(3,5-dibutyl-4-pentyl-pyridin-1-ium-1-yl)-hexansäure (AcLHP 2) <b>24</b> , <sup>1)</sup>	nein	ja
2-Heptenal	(4) 2-Acetamido-6-[4-butyl-3-[(Z)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((Z)-AcBPP) <b>25</b> , <sup>1)</sup>	nein	ja
	(5) 2-Acetamido-6-[4-butyl-3-[(E)-pent-1-enyl]pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure ((E)-AcBPP) <b>26</b> , <sup>1)</sup>	nein	ja
Acrolein	(6) 2-Acetamido-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexansäure (MP-AcLys) <b>10</b> , <sup>1)</sup>	ja <sup>5)</sup>	ja
	(7) 2-Amino-6-[5-(hydroxymethyl)-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-yl]hexansäure (reduziertes FDP-Lys) <b>7</b> , <b>red.</b> , <sup>2)</sup>	ja, in Form des nicht-reduzierten Derivats <sup>6)</sup>	nein
MDA	(8) 2-Acetamido-6-(3-formyl-2-hydroxy-2H-pyridin-1-yl)-hexansäure <b>27</b>	nein	nein
	(9) 2-Acetamido-6-[(3-oxoprop-1-enyl)amino]hexansäure (N <sup>ε</sup> -Propenal-AcLys) <b>12'</b>	ja <sup>7)</sup>	nein
	(10) 2-Acetamido-6-[(3-(5-acetamido-6-hydroxy-6-oxo-hexyl)iminoprop-1-enyl)amino]hexansäure (MDA-Lys-Crosslink) <b>13'</b>	ja <sup>8)</sup>	nein
4-HNE	(11) 2-Acetamido-6-[3-(2-hydroxyheptyl)pyridin-1-ium-1-yl]hexansäure <b>28</b> (Pyridinium-Derivat)	nein	nein
	(12) 2-Amino-6-[(4-hydroxynon-2-enyliden)amino]hexansäure (Schiff'sche Base) <b>18</b>	nein	nein

Sekundär- produkt	identifiziertes Lipierungsprodukt	bekannt in Literatur	zusätzliche Absicherung über dargestellten Standard
	(13) 2-Acetamido-6-(2-pentyl- pyrrol-1-yl)hexansäure (2-PP-AcLys) <b>21</b> , <sup>1)</sup>	ja <sup>9)</sup>	ja
	(14) 2-Amino-6-[(2-pentyltetra- hydrofuran-3-yl)amino]hexan- säure <b>19, red.</b> (reduziertes, cyclisiertes Michael-Addukt) <sup>2)</sup>	ja <sup>8)</sup>	nein

<sup>1)</sup> zusätzlich auch in entschützter Form identifiziert, <sup>2)</sup> nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse identifiziert, <sup>3)</sup> Fenaille et al. (2004), <sup>4)</sup> Kato et al. (1986), <sup>5)</sup> Furuhashi et al. (2003), <sup>6)</sup> Uchida et al. (1998), <sup>7)</sup> Nair et al. (1981), <sup>8)</sup> Requena et al. (1997), <sup>9)</sup> Sayre et al. (1993), red. - reduziert

Die Lipierungsprodukte können analog den Maillard-Reaktionsprodukten in Frühphasenprodukte und fortgeschrittene „End“-Produkte (advanced lipation endproducts, ALEs) eingeteilt werden. Im Falle des 4-HNE stellen beispielsweise die Schiff'sche Base und das Michael-Addukt Frühphasenprodukte dar, wohingegen das Pyridinium-Derivat und das 2-Pentylpyrrol-Derivat fortgeschrittene „End“-Produkte darstellen würden, da deren Bildung mehrere Reaktionsschritte benötigt und sie stabilere Produkte darstellen. Obwohl das Pyrrol-Derivat nach Sayre et al. (2006) ein ALE darstellt, sind dennoch Pyrrol-induzierte Quervernetzungen in Anwesenheit von Protonen- oder Lewissäuren als nachfolgende Reaktionen denkbar (Can et al., 2004).

#### 4.5 Quantifizierung von Lipierungsprodukten in modifizierten Erdnussproteinen und in Erdnüssen

Anhand der in Kap. 4.4 abgeleiteten und dargestellten Standards war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, ausgewählte Lipierungsprodukte des Lysins zu quantifizieren. Hierfür sollten Quantifizierungsmethoden mittels LC-ESI-MS/MS entwickelt werden. Weiterhin waren ausgewählte Lipierungsprodukte in den nach Kap. 4.3 mit Sekundärprodukten modifizierten Erdnussproteinen zu quantifizieren, um die jeweiligen Anteile an der Lysinblockierung zu bestimmen und somit Aussagen über die Relevanz der jeweiligen Produkte treffen zu können. Zudem sollten ausgewählte Lipierungsprodukte in den Erdnussproben quantifiziert werden.

### 4.5.1 Analytik

#### Lipierungsprodukte des Hexanals: N<sup>ε</sup>-Hexyllysin (3'), LHP 1 (2') und LHP 2 (24')

Die Quantifizierung der Schiff'schen Base erfolgte nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse in Form des N<sup>ε</sup>-Hexyllylins mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung des dargestellten internen Standards N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> (Kap. 3.9.3). Die beiden Pyridiniumderivate LHP 1 und LHP 2 wurden direkt nach salzsaurer Hydrolyse mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse unter Verwendung der dargestellten internen Standards LHP 1-d<sub>29</sub> und LHP 2-d<sub>29</sub> (Kap. 3.9.5) quantifiziert. In Abb. 65 sind die mittels LC-ESI-MS/MS im Produktionenscan erhaltenen Massenspektren der verwendeten internen Standards N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> und LHP 1-d<sub>29</sub> dargestellt, welche den in Kap. 4.4.1, Abb. 53 erläuterten Fragmentierungswegen folgten. Das Fragmentmuster des LHP 2-d<sub>29</sub> entsprach dem Fragmentmuster des LHP 1-d<sub>29</sub> und diejenigen von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1 und LHP 2 den in Kap. 4.4.1 in Abb. 53 dargestellten Fragmenten, jeweils ausgehend von m/z 231,1 (M+H<sup>+</sup>) beziehungsweise m/z 391,3 (M<sup>+</sup>).

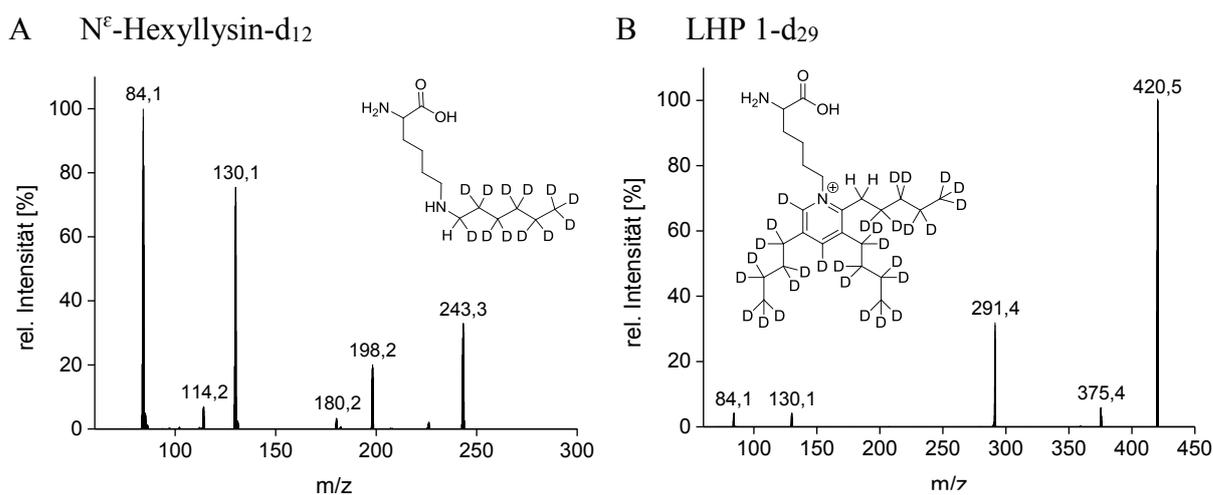
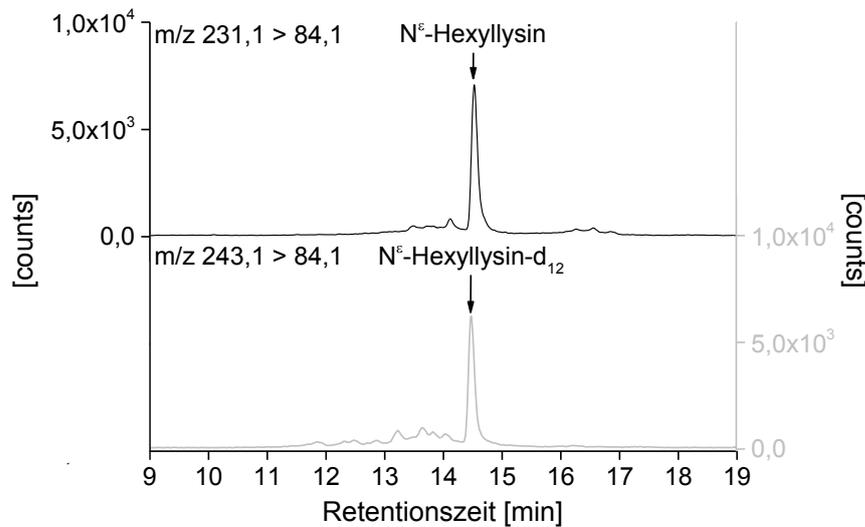


Abb. 65 LC-ESI-MS/MS-Produktionenspektren des (A) N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> und (B) LHP 1-d<sub>29</sub>

Die Fragmentzuordnungen der internen Standards erfolgten analog Kap. 4.4. Das Ion mit m/z 243,3 des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> (Abb. 65A) entsprach dem Mutterion, das eine berechnete monoisotopische Masse von 243,3 g/mol (M+H<sup>+</sup>) aufweist. Weiterhin zeigten sich ein Fragmention mit m/z 198,2 (M+H<sup>+</sup>), das einer Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO (-45 u) zuzuordnen war, sowie ein Fragmention mit m/z 180,2 (M+H<sup>+</sup>), welches einer Abspaltung von H<sub>2</sub>O, CO und NH<sub>3</sub> (-63 u) zugeordnet wurde. Weiterhin waren Fragmentionen mit m/z 114,2 (M+H<sup>+</sup>) des abgespaltenen deuterierten ε-Aminorests und des verbliebenen cyclisierten Fragmentions mit m/z 130,1 (M+H<sup>+</sup>) erkennbar. Dieses konnte nach Abspaltung von H<sub>2</sub>O und CO (-46 u) in das Fragmention mit m/z 84,1 (M+H<sup>+</sup>) übergehen.

A N<sup>ε</sup>-Hexyllysin

## B LHP 1

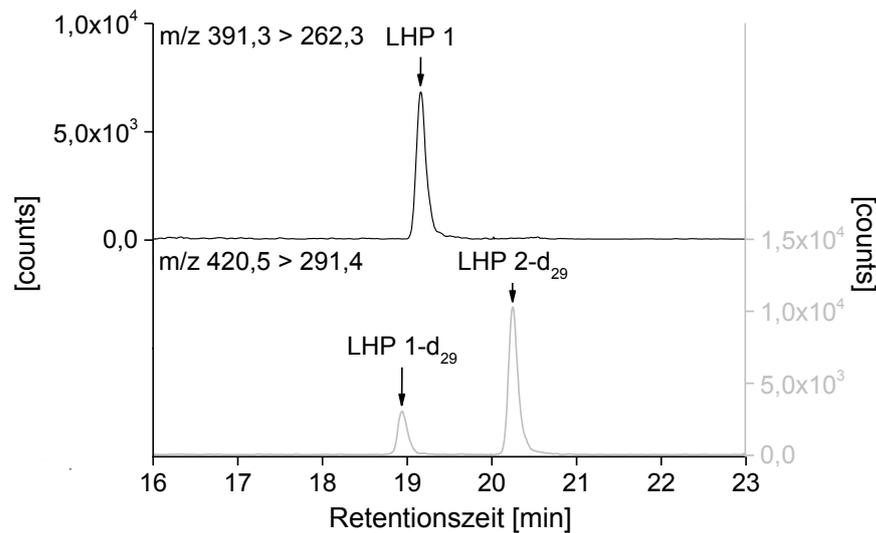


Abb. 66 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von (A) N<sup>ε</sup>-Hexyllysin und (B) LHP 1 in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe mit den extrahierten Übergängen (A) m/z 231,1 > 84,1 für N<sup>ε</sup>-Hexyllysin (schwarz) und m/z 243,1 > 84,1 für N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> (grau) sowie (B) m/z 391,3 > 262,3 für LHP 1 (schwarz) und m/z 420,5 > 291,4 für LHP 1-d<sub>29</sub> und LHP 2-d<sub>29</sub> (grau)

Die Übergänge von m/z 231,1 nach 84,1 (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin) und m/z 243,3 nach 84,1 (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub>) dienten als Quantifier und die Übergänge von m/z 231,1 nach 130,1 (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin) und m/z 243,3 nach 130,1 (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub>) als Qualifier.

Analog entsprach das Ion mit m/z 420,5 des **LHP 1-d<sub>29</sub>** (Abb. 65B) dem Mutterion, welches eine berechnete monoisotopische Masse von m/z 420,5 g/mol (M<sup>+</sup>) aufweist. Das LHP 1-d<sub>29</sub> zeigte Fragmentationen einer Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO (-45 u), des abgespaltenen deuterierten Pyridiniumrings mit m/z 291,4 (M+H<sup>+</sup>) und des verbleibenden cyclisierten Fragmentations mit m/z 130,1 (M+H<sup>+</sup>). Dieses konnte nach Abspaltung von CO und H<sub>2</sub>O in das Fragmentation mit m/z 84,1 (M+H<sup>+</sup>) übergehen.

Die Übergänge von  $m/z$  391,3 nach 262,3 (LHP 1 und LHP 2) und  $m/z$  420,5 nach 291,4 (LHP 1-d<sub>29</sub> und LHP 2-d<sub>29</sub>) dienten als Quantifier und die Übergänge von  $m/z$  391,3 nach 84,1 (LHP 1 und LHP 2) und  $m/z$  420,5 nach 84,1 (LHP 1-d<sub>29</sub> und LHP 2-d<sub>29</sub>) als Qualifier. Ein beispielhaftes LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramm der Quantifizierung von N<sup>ε</sup>-Hexyl-lysine und LHP 1 in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe ist in Abb. 66 dargestellt. Im Falle der Pyridiniumderivate zeigte sich, dass die stabilisotopenmarkierten Standards etwa 0,3 min eher eluierten als die Analyten. Mögliche Ursache könnte hierbei der hohe Deuterierungsgrad in Verbindung mit Matrixeffekten gewesen sein, da die Retentionszeiten in einer Mischung aus internem Standard und Analysenstandard nahezu identisch waren.

### Lipierungsprodukte des 2-Heptenals: (*Z*)-BPP (25') und (*E*)-BPP (26')

Die beiden Pyridiniumderivate (*Z*)-BPP und (*E*)-BPP wurden direkt nach salzsaurem Hydrolyse quantifiziert. Als interner Standard diente N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin und die Quantifizierung erfolgte mittels Matrixkalibrierung. In Abb. 67 ist das mittels LC-ESI-MS/MS im Produktionenscan erhaltene Massenspektrum des verwendeten internen Standards N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin dargestellt. Die Fragmentmuster des (*Z*)-BPP und (*E*)-BPP entsprachen den in Kap. 4.4.2, Abb. 56 dargestellten Fragmentmustern, jeweils ausgehend von  $m/z$  333,3 ( $M^+$ ).

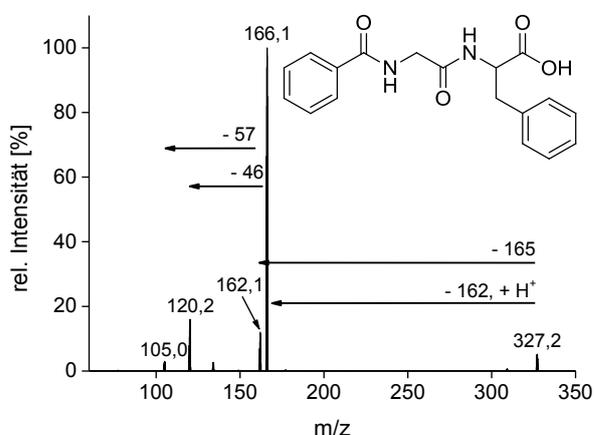


Abb. 67 LC-ESI-MS/MS-Produktionenspektrum des N-Benzoylglycyl-L-phenylalanins

Nach Spaltung der Peptidbindung zwischen Glycin und Phenylalanin verblieb der Phenylalanylrest mit  $m/z$  166,1 ( $M+H^+$ ) (Abb. 67) sowie der Benzoylglycylrest mit  $m/z$  162,1 ( $M^+$ ). Durch Abspaltung von H<sub>2</sub>O und CO (-46 u) aus dem Fragmentation mit  $m/z$  166,1 analog Shek et al. (2006) konnte das Fragmentation mit  $m/z$  120,2 ( $M^+$ ) zugeordnet werden. Das Fragmentation mit  $m/z$  105,0 ( $M^+$ ) wurde dem abgespaltenen Benzoylion zugeordnet. Die berechnete monoisotopische Masse des N-Benzoylglycyl-L-phenylalanins beträgt  $m/z$  327,1 g/mol ( $M+H^+$ ).

Die Übergänge von  $m/z$  333,3 nach 204,2 ((*Z*)- und (*E*)-BPP) und  $m/z$  327,1 nach 166,1 (N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin) dienten als Quantifier und die Übergänge von  $m/z$  333,3

nach 84,1 ((*Z*)- und (*E*)-BPP) und  $m/z$  327,1 nach 105,1 (N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin) als Qualifier.

Da beide Pyridiniumderivate in den Erdnussproben nicht nachweisbar waren, zeigt Abb. 68 ein beispielhaftes Chromatogramm einer mit 2-Heptenal im Verhältnis 0,1:1 modifizierten Erdnussproteinprobe.

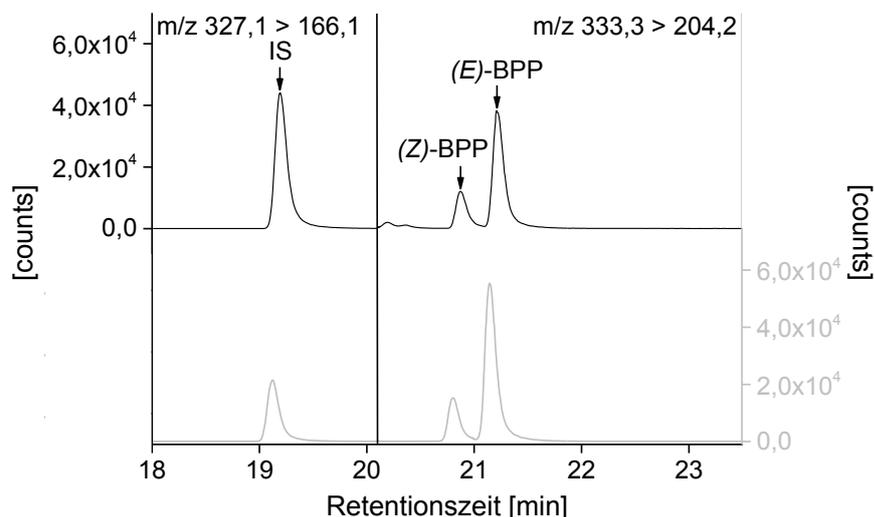


Abb. 68 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von (*Z*)- und (*E*)-BPP in einer mit 2-Heptenal im Verhältnis 0,1:1 (2-Heptenal:Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren) modifizierten Erdnussproteinprobe (schwarz) und eines Matrixkalibrierpunkts (grau) mit den extrahierten Übergängen  $m/z$  327,1 > 166,1 des internen Standards (IS) N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin im ersten Zeitfenster und  $m/z$  333,3 > 204,2 für (*Z*)- und (*E*)-BPP im zweiten Zeitfenster

#### Lipierungsprodukt des Acroleins: MP-Lysin (10<sup>6</sup>)

Das Pyridiniumderivat MP-Lysin wurde direkt nach salzsaurer Hydrolyse mittels Matrixkalibrierung quantifiziert. Als interner Standard diente N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin. Das mittels LC-ESI-MS/MS im Produktionenscan erhaltene Massenspektrum des verwendeten internen Standards N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin ist in Abb. 67 dargestellt. Das Fragmentmuster des MP-Lysins entsprach dem in Kap. 4.4.3, Abb. 58 dargestellten Fragmentmuster, ausgehend von  $m/z$  223,1 ( $M^+$ ).

Die Übergänge von  $m/z$  223,1 nach 84,1 (MP-Lysin) und  $m/z$  327,1 nach 166,1 (N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin) dienen als Quantifier und die Übergänge von  $m/z$  223,1 nach 94,1 (MP-Lysin) und  $m/z$  327,1 nach 105,1 (N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin) als Qualifier. Da das MP-Lysin und der interne Standard zur selben Zeit eluierten, wurden alle vier Übergänge innerhalb eines Zeitfensters erfasst.

Ein beispielhaftes LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramm der Quantifizierung von MP-Lysin in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe ist in Abb. 69 dargestellt.

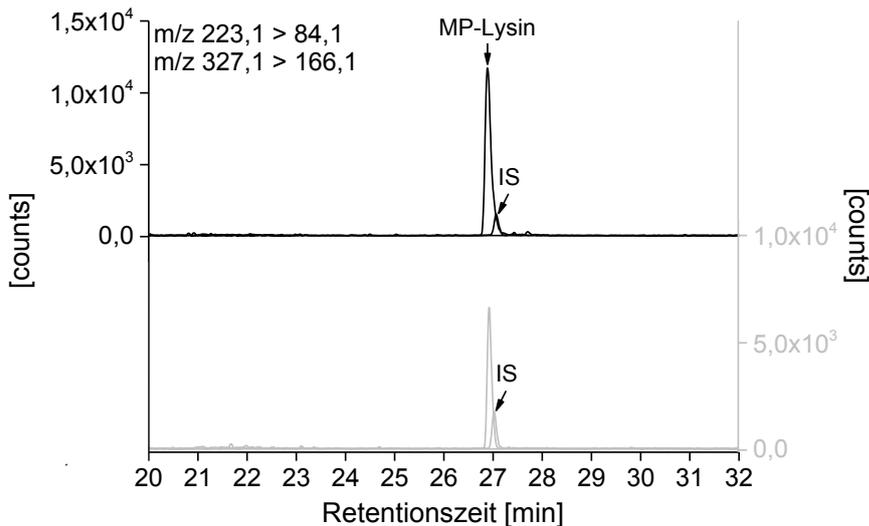


Abb. 69 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von MP-Lysin in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe (schwarz) und eines Matrixkalibrierpunkts (grau) mit den extrahierten Übergängen  $m/z$  223,1 > 84,1 des MP-Lysins und  $m/z$  327,1 > 166,1 des internen Standards (IS) N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin

#### Lipierungsprodukt des 4-Hydroxynonenals: 2-PPL (21‘)

Die Quantifizierung des 2-PPL erfolgte auf Grund der Säurelabilität nach enzymatischer Hydrolyse. Als interner Standard diente N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin. Die Quantifizierung erfolgte mittels Matrixkalibrierung. Das mittels LC-ESI-MS/MS im Produktionenscan erhaltene Massenspektrum des verwendeten internen Standards N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin ist in Abb. 67 dargestellt. Das Fragmentmuster des 2-PPL entsprach dem in Kap. 4.4.5, Abb. 62 dargestellten Fragmentmuster, ausgehend von  $m/z$  267,2 ( $M+H^+$ ).

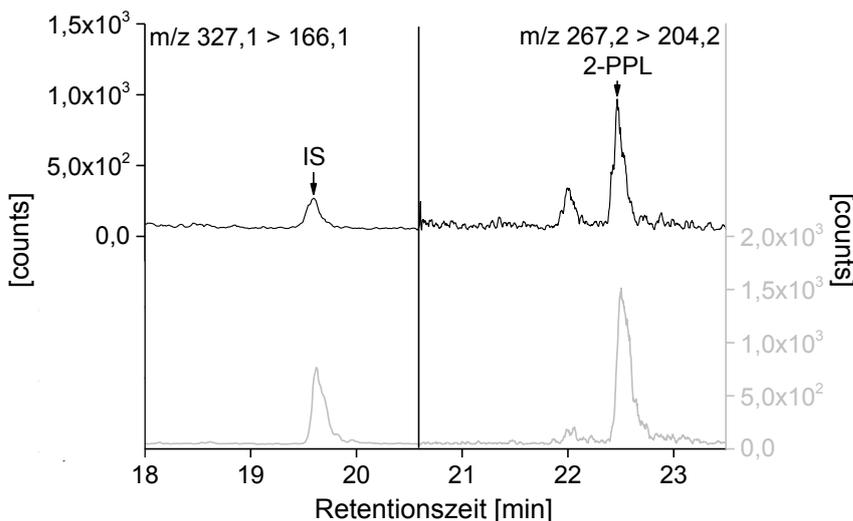


Abb. 70 LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von 2-PPL in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe (schwarz) und eines Matrixkalibrierpunkts (grau) mit den extrahierten Übergängen  $m/z$  327,1 > 166,1 des internen Standards (IS) N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin und  $m/z$  267,2 > 204,2 des 2-PPL

Die Übergänge von  $m/z$  267,2 nach 204,2 (2-PPL) und  $m/z$  327,1 nach 166,1 (N-Benzoyl-glycyl-L-phenylalanin) dienten als Quantifier und die Übergänge von  $m/z$  267,1 nach 84,1 (2-PPL) und  $m/z$  327,1 nach 105,1 (N-Benzoylglycyl-L-phenylalanin) als Qualifier.

Ein beispielhaftes LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramm der Quantifizierung von 2-PPL in einer bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnussprobe ist in Abb. 70 dargestellt.

Nachfolgend sind die nach Kap. 3.13 bestimmten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-, LHP 1- und LHP 2-, (Z)- und (E)-BPP-, MP-Lysin- und 2-PPL-Analytik angegeben (Tab. 52).

Tab. 52 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-, LHP 1- und LHP 2-, (Z)- und (E)-BPP-, MP-Lysin- und 2-PPL-Analytik, jeweils angegeben bezogen auf 100 g Erdnussprotein und 100 g Erdnussprobe

	Nachweisgrenze		Bestimmungsgrenze	
	μmol/100 g Protein	μmol/100 g Erdnuss	μmol/100 g Protein	μmol/100 g Erdnuss
N <sup>ε</sup> -Hexyllysin <b>3'</b>	0,63	2,65	1,05	4,41
LHP 1 <b>2'</b> und LHP 2 <b>24'</b>	0,0001	0,0004	0,0002	0,0006
(Z)- und (E)-BPP, <b>25'</b> und <b>26'</b>	0,04 <sup>1)</sup>	-	0,07 <sup>1)</sup>	-
MP-Lysin <b>10'</b>	0,07	0,27	0,11	0,46
2-PPL <b>21'</b>	0,01	0,05	0,02	0,09

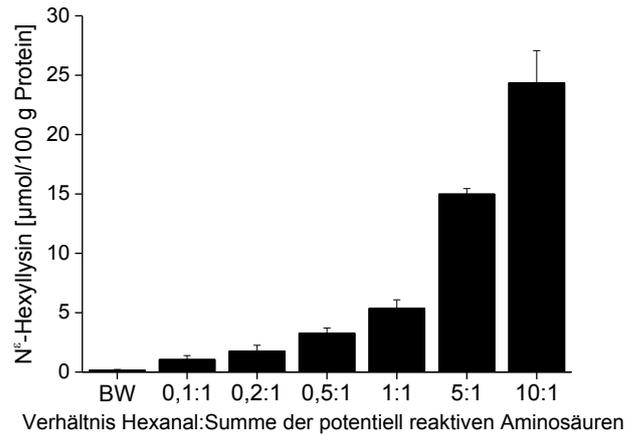
<sup>1)</sup> bestimmt in Erdnussproteinextraktmatrix

## 4.5.2 Quantifizierung

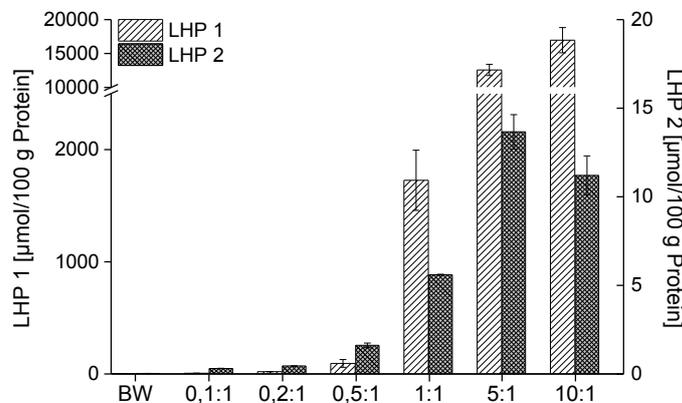
### 4.5.2.1 Hexanal-Lipierungsprodukte: N<sup>ε</sup>-Hexyllysin **3'**, LHP 1 **2'** und LHP 2 **24'**

#### Modifizierte Erdnussproteine

In Abb. 71 sind die quantifizierten Gehalte an N<sup>ε</sup>-Hexyllysin **3'**, LHP 1 **2'** und LHP 2 **24'** in den mit Hexanal inkubierten Erdnussproteinen sowie die jeweiligen berechneten Anteile am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert dargestellt. Alle drei Hexanal-Lipierungsprodukte konnten in den mit Hexanal modifizierten Erdnussproteinen quantifiziert werden. Die Stoffmengen nahmen dabei jeweils in Abhängigkeit der Stoffmenge an Hexanal zu. Das **LHP 1** (Abb. 71B) stellte dasjenige Produkt dar, welches bevorzugt gebildet wurde. Der Gehalt betrug im 10:1-Ansatz 16,97 mmol/100 g Protein. Dies entsprach einer Lysinblockierung von 306,8 mmol/mol Lysin.

A N<sup>ε</sup>-Hexyllysin

## B LHP 1



## C erklärbarer Lysinverlust

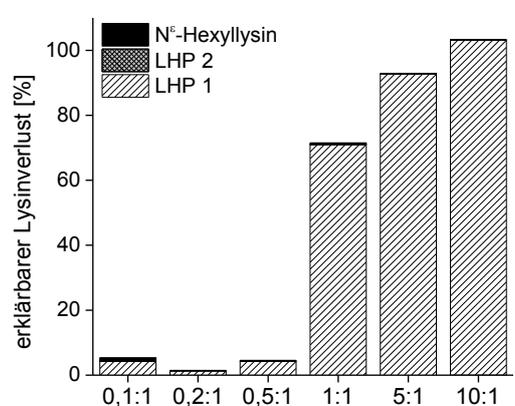


Abb. 71 Mittels LC-ESI-MS/MS in den mit Hexanal inkubierten Erdnussproteinen quantifizierte Gehalte an (A) N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, (B) LHP 1 und LHP 2 sowie (C) den jeweiligen berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert

Demgegenüber wurden **LHP 2** (Abb. 71B) und **N<sup>ε</sup>-Hexyllysin** (Abb. 71A) in Stoffmengen gebildet, die um den Faktor 1500 geringer als die des LHP 1 lagen und erreichten im 10:1-Ansatz Gehalte von jeweils 0,01 und 0,02 mmol/100 g Protein. Dies entsprach jeweils Lysinblockierungen von 0,2 und 1,4 mmol/mol Lysin. Die Schiff'sche Base als Vorstufe der Pyridiniumderivate (Kato et al., 1986; Suyama & Adachi, 1979) stellt somit ein kurzlebiges Intermediat dar, welches schnell weiter reagiert. Ursächlich hierfür könnte die Ausbildung des stabilen Pyridiniumrings sein. Anhand der berechneten Anteile am Lysinverlust wurde gezeigt, dass bis zum 0,5:1-Ansatz nur etwa 5 % der Lysinabnahme durch die Bildung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1 und LHP 2 erklärt werden konnten, wohingegen beim 10:1-Ansatz die Lysinabnahme vollständig erklärbar war. Ursache hierfür könnte gewesen sein, dass bei geringen Hexanal-Konzentrationen Lipierungsprodukte wie die Pyridiniumderivate in ihren Vorstufen vorlagen und somit nicht erfasst wurden, wohingegen bei höheren Konzentrationen die Gleichgewichte auf den Seiten der Endprodukte lagen. Somit waren bei niedrigen und damit

lebensmittelrelevanteren Hexanal-Konzentrationen ebenfalls nur geringe Umsatzraten zu den hier quantifizierten Lipierungsprodukten zu erwarten.

### Erdnüsse

In Abb. 72 sind die in den Erdnussproben quantifizierten Gehalte an N<sup>ε</sup>-Hexyllysin **3'** und LHP 1 **2'** dargestellt.

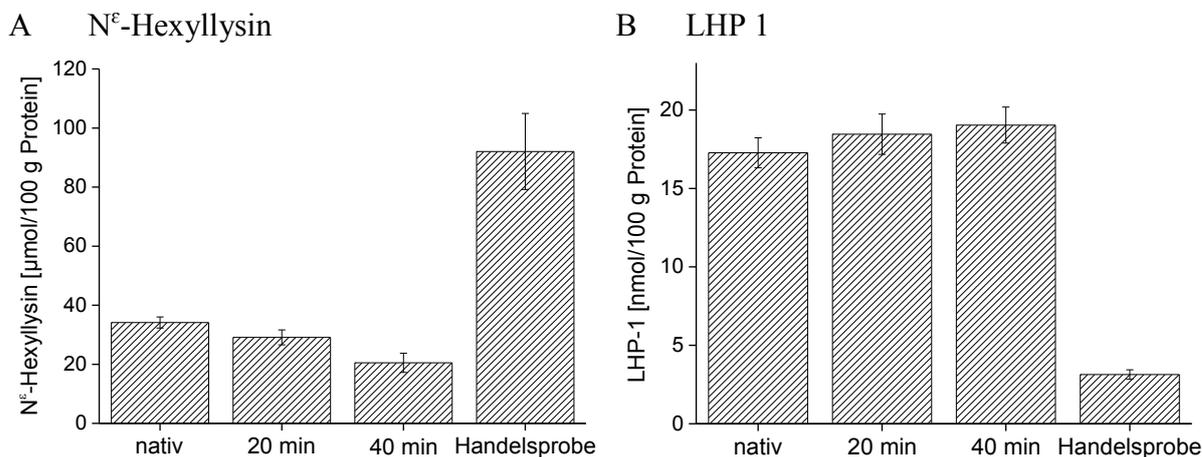


Abb. 72 Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an (A) N<sup>ε</sup>-Hexyllysin (n = 3) und (B) LHP 1 (n = 4) in den nativen und bei 170 °C gerösteten Erdnussproben sowie der Handelsprobe

Sowohl N<sup>ε</sup>-Hexyllysin als auch LHP 1 konnten erstmalig direkt in Erdnussproben quantifiziert werden. Im Falle des **N<sup>ε</sup>-Hexyllysin**s (Abb. 72A) wurde als Folge der Röstung eine Abnahme der Stoffmenge von 34,2 auf 20,5 μmol/100 g Protein verzeichnet. Dies entsprach Gehalten von 18,3 bis 11,1 mg/kg Erdnuss und Lysinblockierungen von 1,1 bis 0,6 mmol/mol Lysin. Somit wurden als Folge der Röstung für 20 und 40 min jeweils 5,0 μmol und 8,6 μmol Lysin/100 g Protein frei oder zu nachfolgenden Reaktionsprodukten der Schiff'schen Base umgesetzt. Ein möglicher Abbau der Schiff'schen Base könnte auf deren Instabilität zurückzuführen sein, die möglicherweise unter Hitzeeinwirkung wieder in ihre Edukte zerfiel. Auf Grund des Siedepunkts des Hexanals von 130 °C (Sigma-Aldrich, 2012) könnte dieses sich in Folge der Röstung bei 170 °C verflüchtigt haben, wodurch sich das Reaktionsgleichgewicht der Bildung der Schiff'schen Base auf die Seite der Edukte verschoben haben könnte. Bestätigt wurde diese Vermutung durch die Quantifizierung der Pyridiniumderivate. Hierbei zeigte sich einerseits, dass keine Zunahme des Gehalts an LHP 1 in Folge der Röstung erfolgte und andererseits das LHP 2 nicht nachweisbar war. Dies war in Übereinstimmung mit der Quantifizierung beider Derivate in den mit Hexanal modifizierten Erdnussproteinen (Abb. 71B). Hierbei wurde das LHP 2 in Gehalten um den Faktor 1500 geringer als die des LHP 1 quantifiziert. Die Handelsprobe wies 92,1 μmol N<sup>ε</sup>-Hexyllysin/100 g Protein, entsprechend 61,1 mg/kg Erdnuss auf. Die Stoffmengen des quantifizierten **LHP 1** (Abb. 72B) lagen um den Faktor 2000 unter den Stoffmengen des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin. Die ausbleibende Zunahme des Gehalts an LHP 1 in Folge der Röstung könnte durch die Tatsache erklärbar sein, dass es durch die Röstung zu

Abnahmen der Stoffmengen der Vorstufe N<sup>ε</sup>-Hexyllysin kam, weshalb auch das Gleichgewicht zwischen der Schiff'schen Base und dem Pyridiniumderivat auf der Seite der Schiff'schen Base gelegen haben dürfte. Diese wurde wiederum während der Röstung abgebaut, weshalb ein Grundgehalt an Pyridiniumderivaten festgestellt wurde, der nicht in Abhängigkeit der Röstzeit zunahm. Somit konnte die Vermutung, dass Intermediate zwischen der Schiff'schen Base und den Pyridiniumderivaten vorlagen, ausgeschlossen werden. Die Mittelwerte der quantifizierten Gehalte an LHP 1 betragen in den nativen und den bei 170 °C für 40 min gerösteten Erdnüssen jeweils 17,3 und 19,0 nmol/100 g Protein, entsprechend 15,6 bis 17,5 µg/kg Erdnuss. Dies entsprach Lysinblockierungen von jeweils 0,6 µmol/mol Lysin. Die Handelsprobe wies 3,1 nmol/100 g Protein, entsprechend 9,0 µg/kg Erdnuss auf. Generell lagen die Gehalte an N<sup>ε</sup>-Hexyllysin und LHP 1 der Handelsprobe in vergleichbaren Größenordnungen wie die der im Labormaßstab gerösteten Erdnüsse.

Eine Lysinmodifizierung durch Hexanal-Lipierungsprodukte erfolgte somit als Folge der Erdnussröstung nicht.

Zielinski et al. (2001) bestimmten in einem Homogenisat aus Hähnchenschenkelfleisch und PBS-Puffer, welches auf 50 °C erhitzt wurde, in Abhängigkeit der Erhitzungszeit nach Reduktion mit NaCNBH<sub>3</sub> eine Zunahme der Gehalte des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin **3** mittels ELISA über mono- und polyklonale Antikörper. Die Gehalte lagen hierbei in einem Bereich, angegeben als Hexanal-Äquivalente, von 5-61 nmol/g Fleisch. Wird ein Proteingehalt von 18,2 % zugrunde gelegt (Souci et al., 2008), ergeben sich 3-34 µmol/100 g Protein. Somit sind die von Zielinski et al. (2001) und die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Werte (34,2-20,5 µmol/100 g Protein) vergleichbar. Allerdings unterscheiden sich die Werte von Zielinski et al. (2001) teilweise um den Faktor 3 in Abhängigkeit der Verwendung von mono- oder polyklonalen Antikörpern. Weiterhin zeigten die monoklonalen Antikörper, die gegen Hexanal-BSA-Addukte erzeugt wurden, Kreuzreaktivitäten gegenüber Hühnerserumalbumin, welches durch Pentanal, Heptanal und 2-Hexenal modifiziert wurde, im Bereich von 38-77 %. Die polyklonalen Antikörper wurden dahingehend nicht getestet. Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass ausschließlich N<sup>ε</sup>-Hexyllysin erfasst wurde. Da das Fleischhomogenisat bei milden Temperaturen erhitzt wurde, ist anzunehmen, dass die Verflüchtigung des Hexanals reduziert war und es zu einer Neubildung des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin kommen konnte. Somit wurde geschlussfolgert, dass in Lebensmitteln, die unter milden Bedingungen erwärmt oder gelagert werden (T < 130 °C), Zunahmen an N<sup>ε</sup>-Hexyllysin und somit auch an LHP 1 zu erwarten sind. In Lebensmitteln, die bei höheren Temperaturen erhitzt werden, sind auf Grund der Verflüchtigung des Hexanals hingegen Abnahmen an N<sup>ε</sup>-Hexyllysin und gleich bleibende Gehalte an LHP 1 zu erwarten.

4.5.2.2 2-Heptenal-Lipierungsprodukte: (*Z*)- und (*E*)-BPP (25', 26')**Modifizierte Erdnussproteine**

In Abb. 73 sind die quantifizierte Gehalte an (*Z*)- und (*E*)-BPP (25', 26') in den mit 2-Heptenal inkubierten Erdnussproteinen sowie die jeweiligen berechneten Anteile am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert dargestellt.

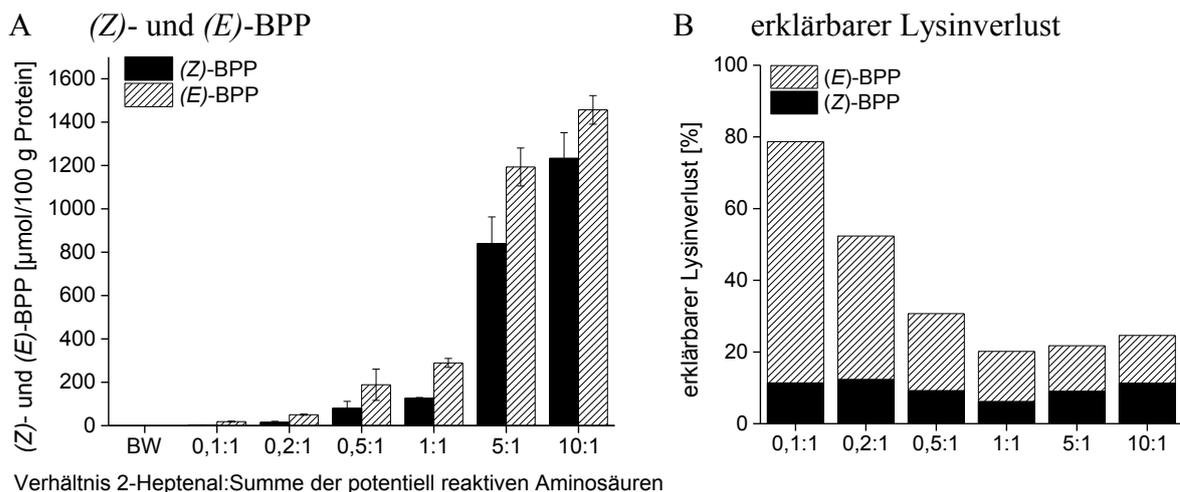


Abb. 73 (A) Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an (*Z*)- und (*E*)-BPP in den mit 2-Heptenal inkubierten Erdnussproteinen sowie (B) den jeweiligen berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert

Sowohl das (*Z*)- als auch das (*E*)-BPP konnten in den mit 2-Heptenal modifizierten Erdnussproteinen quantifiziert werden, wobei die Stoffmengen in Abhängigkeit der zugegebenen Stoffmenge an 2-Heptenal zunahmen (Abb. 73A). Dabei stellte das (*E*)-BPP dasjenige Produkt dar, welches bevorzugt gebildet wurde. Diese Beobachtung stimmt mit den Identifizierungsversuchen der Lipierungsprodukte nach Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit 2-Heptenal überein (Kap. 4.4.2). Anhand von UV-Messungen wurde hierbei ein Verhältnis von (*Z*)- zu (*E*)-AcBPP von 1:2 abgeschätzt. Mögliche Ursache könnte die thermodynamisch bevorzugte Struktur des (*E*)-Derivats gewesen sein. Die Stoffmengen an (*Z*)- und (*E*)-BPP betragen im 10:1-Ansatz jeweils 1,23 und 1,46 mmol/100 g Protein. Dies entsprach maximalen Lysinblockierungen von jeweils 93,5 und 110,5 mmol/mol Lysin. Anhand der berechneten Anteile des Lysinverlusts (Abb. 73B) zeigte sich zum einen, dass das (*Z*)-Derivat einen nahezu konstanten Prozentsatz von 10 % zur Lysinblockierung beitrug. Das (*E*)-Derivat hingegen hat vor allem bei niedrigen Konzentrationen an 2-Heptenal in deutlich höheren Anteilen zur Lysinblockierung beigetragen. Zum anderen zeigte sich, dass bei den gering modifizierten Proteinen nahezu 80 % des Lysinverlusts durch die Bildung beider Pyridiniumderivate erklärt werden konnte, wohingegen bei höheren Konzentrationen an 2-Heptenal andere als die hier untersuchten Reaktionsprodukte relevant gewesen sein durften. Generell möglich wäre die

Bildung von Michael- und Schiff'sche Base-Addukten, Intermediaten der Pyridiniumderivate oder auch die Ausbildung von Quervernetzungsprodukten, wie mittels SDS-PAGE (Kap. 4.3.2, Abb. 46) beobachtet wurde. Hierzu beigetragen haben könnte die Ausbildung einer Schiff'schen Base und eines Michael-Addukts an demselben Molekül 2-Heptenal oder eine Quervernetzung über Dihydropyridine, welche Vorstufen der Pyridiniumderivate darstellen, durch eine Michael-Addition an eine Schiff'schen Base (Baker et al., 1998).

### **Erdnüsse**

Im Falle der Erdnussproben konnte weder das (*Z*)- noch das (*E*)-BPP nachgewiesen werden. Auch ein Versuch der Aufkonzentrierung der Pyridiniumderivate mittels schwachem Kationenaustauscher führte nicht zu einem eindeutigen Nachweis der Verbindungen. Anhand der modifizierten Erdnussproteine wurde die Nachweisgrenze zu 0,04  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$  Protein abgeschätzt. Somit wurde vermutet, dass die Gehalte an (*Z*)- und (*E*)-BPP, im Falle ihrer Bildung, in den Erdnussproben niedriger liegen. Da anhand der modifizierten Erdnussproteine gezeigt wurde, dass vor allem bei geringen Gehalten an 2-Heptenal der Lysinverlust nahezu vollständig durch die Bildung dieser beiden Pyridiniumderivate erklärt werden konnte, war anzunehmen, dass diese auch in den Erdnussproben Hauptaddukte darstellen könnten. Überträgt man die Ergebnisse der Quantifizierung der Hexanal-Pyridiniumderivate, könnte allerdings auch im Falle des 2-Heptenals eine Weiterreaktion der als Vorstufe nötigen Schiff'schen Base gehemmt sein. Eine Quantifizierung in den Erdnussproben könnte eventuell mittels empfindlicheren massenspektrometrischer Geräten gelingen, wobei die zu erwartenden Gehalte sehr niedrig sein dürften. Ein möglicher Beitrag zur Lysinblockierung würde somit ebenfalls sehr gering ausfallen. Anhand der Quantifizierungen in den modifizierten Erdnussproteinen ließ sich allerdings abschätzen, dass in Lebensmitteln bevorzugt das (*E*)-BPP zu erwarten ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es bei niedrigen Konzentrationen an 2-Heptenal auch zu Histidin-Modifizierungen kommt (siehe hierzu Kap. 4.3.2).

#### **4.5.2.3 Acrolein-Lipierungsprodukt: MP-Lysin 10'**

##### **Modifizierte Erdnussproteine**

In Abb. 74 sind die quantifizierten Gehalte an MP-Lysin 10' in den mit Acrolein inkubierten Erdnussproteinen sowie die jeweiligen berechneten Anteile am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert dargestellt. Als Folge der Inkubation der Erdnussproteine mit Acrolein konnte das Lipierungsprodukt MP-Lysin nachgewiesen werden. Anhand der Quantifizierung (Abb. 74A) und des hierüber berechneten erklärbaren Lysinverlusts (Abb. 74B) zeigte sich, dass bei geringen Konzentrationen an Acrolein im 0,1:1-Ansatz der Lysinverlust nahezu

vollständig (96 %) durch die Bildung des MP-Lysins erklärbar war. In den Ansätzen 0,2:1 bis 1:1 waren etwa 60 % des Lysinverlusts erklärbar. Dies deutet auf eine konstante Bildungsrate des MP-Lysins hin. Ab dem 5:1-Ansatz zeigte sich, dass nur noch 10 % des Lysinverlusts erklärt werden konnten. Somit kam es bei einer hohen Konzentration an Acrolein zur Bildung weiterer Lipierungsprodukte oder deren Intermediate. Die Stoffmenge an MP-Lysin hat im 1:1-Ansatz 6,61 mmol/100 g Protein betragen und entsprach einer Lysinblockierung von 212,3 mmol/mol Lysin. Im 5:1-Ansatz betrug die Stoffmenge an MP-Lysin hingegen 1,89 mmol/100 g Protein, was einer Lysinblockierung von 71,5 mmol/mol Lysin entsprach. Somit sollte in Lebensmitteln bei geringen Gehalten an Acrolein MP-Lysin das Hauptlipierungsprodukt darstellen.

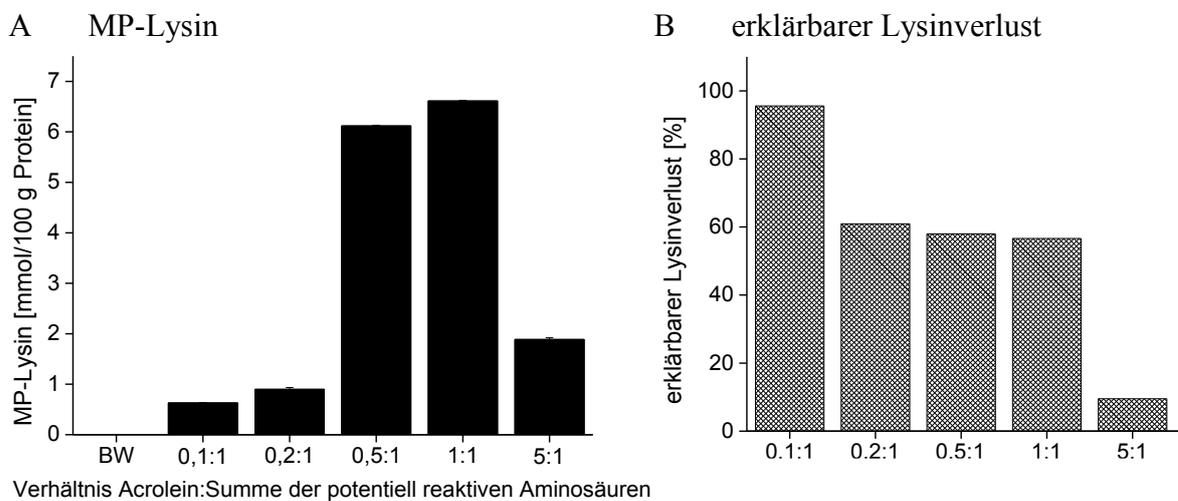


Abb. 74 (A) Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an MP-Lysin in den mit Acrolein inkubierten Erdnussproteinen sowie (B) den jeweiligen berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert

## Erdnüsse

In Abb. 75 sind die in den Erdnussproben quantifizierte Gehalte an MP-Lysin **10'** dargestellt. MP-Lysin konnte erstmalig in Lebensmitteln allgemein und in den Erdnussproben im Speziellen quantifiziert werden. Dabei zeigte sich eine Zunahme der quantifizierten Stoffmengen in Abhängigkeit des Röstprozesses von 0,1 auf 19,7  $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$ . Dies entsprach 0,03 bis 10,2 mg/kg Erdnuss. Zwischen den nativen und für 20 min gerösteten Erdnüssen war eine Zunahme des MP-Lysins um den Faktor 37 festzustellen und zwischen den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen um den Faktor 9. Da in den nativen Erdnüssen kein freies Acrolein nachweisbar war (Kap. 4.2.2.2), musste das für die Bildung des MP-Lysins benötigte Acrolein während des Röstprozesses entstanden sein und direkt weiterreagiert haben. Dies kann auf die hohe Reaktivität des Acroleins zurückgeführt werden (siehe Kap. 4.3.2; Esterbauer et al., 1991).

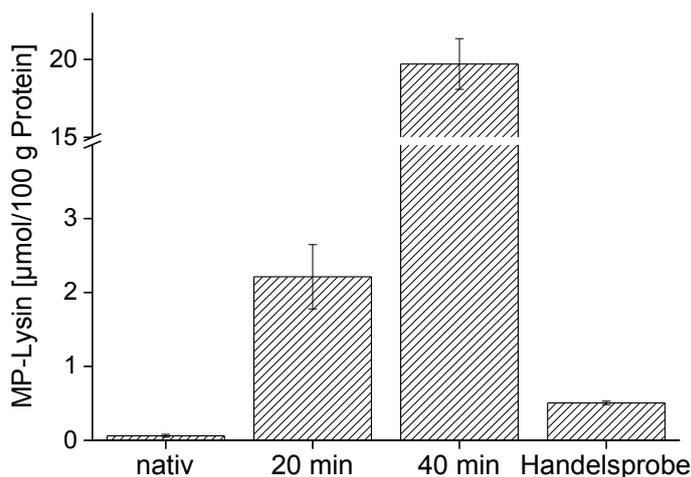


Abb. 75 Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an MP-Lysin in den nativen und bei 170 °C gerösteten Erdnussproben sowie der Handelsprobe

Unter Berücksichtigung der in Kap. 4.2.2.2 quantifizierten Gehalte an freiem Acrolein ergaben sich abgeschätzte Acroleinumsatzraten zu MP-Lysin für die 20 und 40 min gerösteten Erdnussproben von jeweils 39 und 72 %. Hierbei konnte Acrolein, welches zu anderen Lipierungsprodukten als MP-Lysin abreagiert hatte, nicht berücksichtigt werden. Allgemein konnte abgeschätzt werden, dass das gebildete Acrolein in relevanten Mengen zu MP-Lysin umgesetzt wurde und Reaktionen mit anderen Aminosäureseitenketten nicht überwogen haben. Dies konnte anhand der Inkubation von nativen Erdnussproteinen mit Acrolein (Kap. 4.3.2, Abb. 46) ebenfalls beobachtet werden, da es hierbei vor allem zu Lysinmodifizierungen gekommen ist und bei geringen Stoffmengen an Acrolein nahezu ausschließlich Lysinseitenketten modifiziert wurden. In diesem Zusammenhang wurde bereits diskutiert, dass MP-Lysin bei niedrigen und somit lebensmittelrelevanteren Konzentrationen an Acrolein (siehe Kap. 2.3.3, Tab. 5) das Hauptlipierungsprodukt darstellen sollte. Möglichkeiten für weitere Lipierungsprodukte des Acroleins wären beispielsweise die Bildung des in Kap. 4.4.3 identifizierten FDP-Derivats **7** sowie des hieraus hervorgehenden, quervernetzenden Thioethers **8** (Furuhata et al., 2002). In der Handelsprobe wurden 0,5 µmol/100 g Protein, entsprechend 0,3 mg/kg Erdnuss, quantifiziert. Somit wies die Handelsprobe Gehalte an MP-Lysin auf, die zwischen denjenigen der nativen und bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnüssen lagen. Ursache hierfür könnten unterschiedliche Stadien der Lipidperoxidation der jeweiligen zur Röstung eingesetzten Erdnüsse gewesen sein. Die Lysinblockierung durch MP-Lysin betrug für die nativen und für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse jeweils 0,002, 0,1 und 0,6 mmol/mol Lysin und der erklärable Lysinverlust für die 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse jeweils 0,05 % und 0,13 %.

Ein Nachweis oder eine Quantifizierung des MP-Lysins in Lebensmitteln ist in der Literatur bisher nicht erfolgt. Maeshima et al. (2012) konnten MP-Lysin mittels LC-ESI-MS/MS über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse in oxidiertem LDL, welches einer *in vitro* Oxidation

für 24 h an  $\text{Cu}^{2+}$  bei 37 °C ausgesetzt war, quantifizieren. Hierbei konnten 0,06 mol MP-Lysin/mol LDL bestimmt werden, wodurch 1 % des Lysinverlusts erklärt wurde. Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Anteil am Lysinverlust in den gerösteten Erdnussproben liegt somit unter dem von Maeshima et al. (2012) in oxLDL bestimmten Anteil.

#### 4.5.2.4 4-Hydroxynonenal-Lipierungsprodukt: 2-PPL 21'

##### Modifizierte Erdnussproteine und modifiziertes Ara h 1

In Abb. 76 sind die quantifizierten Gehalte an 2-PPL 21' in den mit 4-HNE inkubierten Erdnussproteinen und des Ara h 1 sowie die jeweiligen berechneten Anteile am Lysinverlust bezogen auf den Inkubationsblindwert dargestellt.

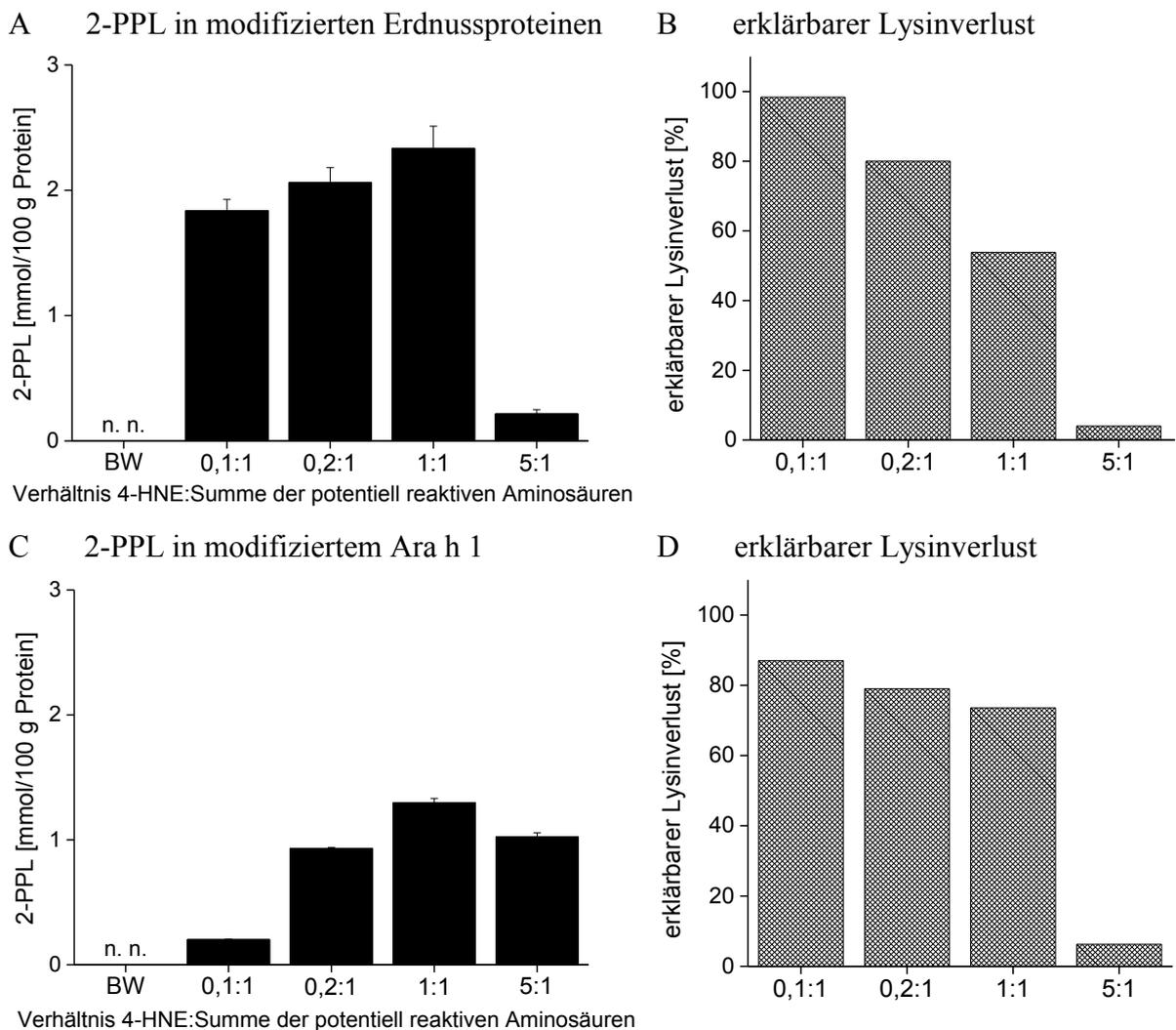


Abb. 76 (A) Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an 2-PPL in den mit 4-HNE inkubierten Erdnussproteinen sowie (B) den berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Erdnussprotein-Inkubationsblindwert, (C) den quantifizierten Gehalten an 2-PPL in dem mit 4-HNE inkubierten Ara h 1 sowie (D) den berechneten Anteilen am Lysinverlust bezogen auf den Ara h 1-Inkubationsblindwert, n. n. - nicht nachweisbar

In den mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteinen und dem analog modifizierten Ara h 1 konnte das Lipierungsprodukt 2-PPL nachgewiesen werden. Anhand der Quantifizierung zeigte sich in beiden Inkubationsreihen (Abb. 76A und C), dass bis zum 1:1-Ansatz die Stoffmenge an 2-PPL in Abhängigkeit der Stoffmenge an 4-HNE gebildet wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bildung des 2-PPL eintrat, sobald 4-HNE anwesend war. Eine Erhöhung der Stoffmenge an 4-HNE führte zu einer geringen Nachbildung an 2-PPL bis zum 1:1-Ansatz. In der Inkubationsreihe der Erdnussproteine betrug die Stoffmenge an 2-PPL im 1:1-Ansatz 2,33 mmol/100 g Protein und in der Ara h 1-Inkubationsreihe 1,3 mmol/100 g Protein. Dies entsprach jeweils Lysinblockierungen von 97,9 und 31,9 mmol/mol Lysin. Generell hat somit das modifizierte Ara h 1 im Vergleich zu den modifizierten Erdnussproteinen geringere Gehalte an 2-PPL und Lysinblockierungen aufgewiesen. Dies lässt auf eine verringerte Zugänglichkeit der Lysinreste des Ara h 1 im Vergleich zu anderen Erdnussproteinen schließen, was in Übereinstimmung mit den beobachteten Lysinabnahmen steht (Kap. 4.3.4, Abb. 50A). Anhand der SDS-PAGE (Kap. 4.3.4, Abb. 50C) wurde festgestellt, dass es im Falle der Inkubation des Ara h 1 zu stärkeren Oligomerisierungen als bei der Inkubation der Erdnussproteine kam. Dies ließ die Vermutung zu, dass das Ara h 1 bereits ohne Reaktion mit 4-HNE in höheren, nicht kovalent vernetzten oligomeren Formen vorlag, wodurch möglicherweise die Zugänglichkeit der Lysinseitenketten reduziert war. Die Eigenschaft des Ara h 1 zur Ausbildung von Oligomeren ist in der Literatur beschrieben (van Boxtel et al., 2006; Maleki et al., 2000b). Der 5:1-Ansatz wies in beiden Inkubationsreihen deutlich geringere Stoffmengen an 2-PPL von jeweils 0,22 und 1,02 mmol/100 g Protein auf. Dies entsprach Lysinblockierungen von jeweils 10,0 und 40,9 mmol/mol Lysin. Anhand der berechneten erklärbaren Lysinverluste (Abb. 76B und D) zeigte sich für die Erdnussproteine und das Ara h 1, dass bei niedrigen Konzentrationen an 4-HNE der Lysinverlust nahezu vollständig durch die Bildung des 2-PPL erklärbar war. Im Falle des 0,1:1-Ansatzes betrug der erklärbare Lysinverlust bei den Erdnussproteinen und des Ara h 1 jeweils 98 % und 87 %. Somit konnte auch eine mögliche Polymerisierung des 2-PPL analog Can et al. (2004) unter den sauren Bedingungen während der ersten Stufe der enzymatischen Hydrolyse bei pH 2 ausgeschlossen werden. Bei höheren Konzentrationen an 4-HNE mussten hingegen weitere Reaktionsprodukte bevorzugt gebildet worden sein, weshalb die Stoffmenge an 2-PPL in den 5:1-Ansätzen geringer als in den 1:1-Ansätzen war. Auf der einen Seite ist bei höheren Konzentrationen an 4-HNE eine Oxidation oder eine Polymerisierung über eine Aldolkondensationsreaktion denkbar, wodurch die für eine Reaktion zur Verfügung stehende Stoffmenge an 4-HNE reduziert gewesen wäre. Auf der anderen Seite ist bei höheren Konzentrationen an 4-HNE die Bildung weiterer Lipierungsprodukte möglich. Hierzu könnte das unter Kap. 4.4.5 identifizierte Pyridinium-Derivat, die Schiff'sche Base oder auch das Michael-Addukt zählen. Fluoreszenzmessungen der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine (Kap. 4.3.4, Abb. 50) erbrachten den Hinweis, dass es ab dem 1:1-Ansatz zur Ausbildung des

von Xu et al. (1999) beschriebenen Fluorophors **23** kam. Generell könnte somit das 2-PPL ein kinetisch kontrolliertes Reaktionsprodukt darstellen, wohingegen bei höheren Konzentrationen an 4-HNE die Reaktion möglicherweise auf der Schiff'schen Base als Vorstufe stehen bleiben und somit bevorzugt andere Reaktionsprodukte gebildet werden könnten.

### Ergebnisse

In Abb. 77 sind die in den Erdnussproben quantifizierten Gehalte an 2-PPL **21'** dargestellt.

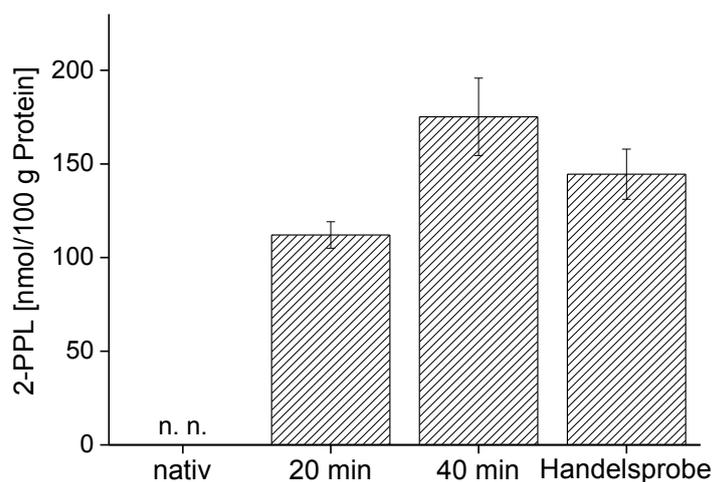


Abb. 77 Mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an 2-PPL in den nativen und bei 170 °C gerösteten Erdnussproben sowie der Handelsprobe (n = 3), n. n. - nicht nachweisbar

2-PPL konnte erstmalig massenspektrometrisch in Lebensmitteln quantifiziert werden. In den nativen Erdnüssen war kein 2-PPL nachweisbar, die Stoffmenge steigt allerdings in Abhängigkeit der Röstdauer an. In den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen wurden jeweils 112,1 und 175,1 nmol 2-PPL/100 g Protein quantifiziert. Dies entsprach jeweils 299,5 und 468,0 µg/kg Erdnuss und einer jeweiligen Lysinblockierung von 3,5 und 5,5 µmol/mol Lysin. Die Handelsprobe wies 144,5 nmol 2-PPL/100 g Protein, entsprechend 386,2 µg/kg Erdnuss auf und zeigte somit vergleichbare Gehalte, wie die im Labormaßstab bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnüsse. Anhand der Abnahme an freiem 4-HNE als Folge der Erdnussröstung (Kap. 4.2.2.2) ließen sich in den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen jeweils 1 und 2 % des 4-HNE-Verlusts durch die Bildung des 2-PPL erklären. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass 2-PPL auch über eine Paal-Knorr-Reaktion bei Anwesenheit von 4-Oxononanal entstehen kann und es zu einer 4-HNE-Neubildung in Folge der Röstung gekommen sein könnte. In Kap. 4.3.4, Abb. 49 wurde festgestellt, dass es bei geringen Konzentrationen an 4-HNE ausschließlich zu Lysinmodifizierungen kam. Somit kann abgeschätzt werden, dass als Folge des Erdnussröstens ebenfalls vor allem Lysinseitenketten modifiziert werden sollten. Werden die nach Inkubation der Erdnussproteine mit 4-HNE erhaltenen Erkenntnisse auf die Erdnüsse übertragen, kann weiter geschlussfolgert werden, dass in Anwesenheit niedriger Konzentrationen an 4-HNE vor allem 2-PPL gebildet werden sollte (Kap. 4.5.2.4, Abb. 76). In

geringeren Stoffmengen waren auch weitere Lipierungsprodukte, wie sie in Kap. 4.4.5 identifiziert wurden, zu erwarten. Weiterhin kann es zur Bildung des quervernetzenden Fluorophors **23** (Xu et al., 1999) oder des ebenfalls quervernetzenden Schiff'sche Base-Michael-Addukts **22**, beziehungsweise seines Hemiacetals **22'** (Nadkarni & Sayre, 1995; Uchida & Stadtman, 1993) gekommen sein. Sayre et al. (1993) stellten fest, dass es in Folge einer Erhitzung von 4-HNE mit primären Aminen nur im Spurenbereich zur Bildung von Pyrrolen kam und hauptsächlich das Kondensationsprodukt des 4-HNE 2-Pentylfuran gebildet wurde. Hierdurch könnte es in Folge der hohen Rösttemperatur und in Anwesenheit der Erdnussproteine ebenfalls zu einem Abbau des bereits in den nativen Erdnüssen vorliegenden freien 4-HNE gekommen und die Weiterreaktion zum 2-PPL somit unterbunden worden sein. Hieraus lässt sich ableiten, dass in weniger stark erhitzten Lebensmitteln oder länger gelagerten Lebensmitteln höhere Stoffmengen an 2-PPL gebildet werden könnten.

Lynch et al. (2001) konnten mittels ELISA in Rinder- und Schweineliposomen, Rindermicrosomen und Rindfleisch 4-HNE-Lipierungsprodukte identifizieren. Aussagen über die genaue als Antigen fungierende Struktur wurden allerdings nicht getätigt und es erfolgte keine Quantifizierung, sondern ein Vergleich von Absorptionszunahmen im ELISA. Weiterhin konnten Lynch et al. (2001) in Abhängigkeit der Lagerdauer in den Rindfleischproben eine Absorptionszunahme der 4-HNE-Addukt-Gehalte feststellen, was mit obiger Vermutung korreliert. In Proteinextrakten aus rohen und gerösteten Erdnüssen konnten ebenfalls mittels ELISA 4-HNE-Addukte nachgewiesen werden, die sich allerdings bezüglich ihrer Absorptionswerte nicht signifikant unterschieden (Chung et al., 2002; Chung & Champagne, 2001). Da als Folge einer Erdnussröstung die Proteinlöslichkeit reduziert wird (Kopper et al., 2005), ist fraglich, inwieweit hierbei lipierte Proteine in den Extrakt übergehen konnten. Eine direkte Quantifizierung des 2-PPL unter Verwendung chemisch charakterisierter Standards ist in der Literatur bisher nicht erfolgt.

#### 4.5.2.5 Diskussion

In Tab. 53 sind die jeweiligen Lysinblockierungen und erklärbaren Anteile am Lysinverlust der gerösteten Erdnüsse durch die quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte Fruktose-Lysin (Fru-Lys), Pyrralin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) sowie der quantifizierten Lipierungsprodukte N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1, MP-Lysin und 2-PPL vergleichend gegenübergestellt.

Tab. 53 Lysinblockierungen und erklärbare Anteile am Lysinverlust der bei 170 °C für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse durch die Maillard-Reaktionsprodukte Fru-Lys, Pyrralin und CML sowie die Lipierungsprodukte N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1, MP-Lysin und 2-PPL, jeweils bezogen auf die nach salzsaurer Hydrolyse erhaltenen Stoffmengen an Lysin

Quantifiziertes Produkt	Lysinblockierung [mmol/mol Lysin]		Anteil am Lysinverlust [%]	
	20 min	40 min	20 min	40 min
Fru-Lys	16,6	30,7	7,3	1,0
Pyrralin	8,4	23,8	6,3	3,6
CML	2,0	3,6	1,4	0,4
N <sup>ε</sup> -Hexyllysin	1,0	1,0	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>
LHP 1	0,001	0,001	- <sup>1)</sup>	- <sup>1)</sup>
MP-Lysin	0,07	0,61	0,05	0,13
2-PPL	0,004	0,005	0,002	0,001

<sup>1)</sup> keine Zunahme in Folge der Erdnusströstung und somit kein Beitrag zum Lysinverlust

Die Lipierungsprodukte trugen generell in geringerem Maße zur **Lysinblockierung** bei als die Maillard-Reaktionsprodukte. Werden CML und MP-Lysin verglichen, so trug das MP-Lysin in den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen zu Lysinblockierungen bei, die jeweils um die Faktoren 30 und 6 niedriger lagen als die des CML. Anhand der berechneten **Anteile am Lysinverlust** zeigte sich, dass das MP-Lysin innerhalb der Gruppe der untersuchten Lipierungsprodukte den größten Beitrag leistete und somit in den gerösteten Erdnüssen als relevantestes Lipierungsprodukt identifiziert werden konnte. Demgegenüber hat die Bildung des 2-PPL nur sehr geringfügig zum Lysinverlust beigetragen. Auffällig war, dass im Falle des MP-Lysins der Anteil des Lysinverlusts auch bei den für 40 min gerösteten Erdnüssen zunahm, wohingegen bei den weiteren quantifizierten Produkten der erklärbare Anteil am Lysinverlust abnahm. Dies deutete auf eine exponentielle Zunahme der MP-Lysin-Bildung in Abhängigkeit der Röstzeit hin, wohingegen die Bildung der weiteren Produkte ein Plateau erreicht haben musste. Somit könnte das MP-Lysin auch für länger erhitzte Lebensmittel einen geeigneten Parameter zur Beurteilung der Erhitzung und des Zustandes der Lipidperoxidation darstellen. Im Falle der Pyridiniumderivate LHP 1 und MP-Lysin könnte es durch die Rösttemperatur von 170 °C zum Abbau und als Folge zur Freisetzung der entsprechenden Pyridine gekommen sein (Suyama & Adachi, 1980; Suyama & Adachi, 1979). Somit könnten die Gehalte der Pyridiniumderivate geringer erfasst worden sein, als diese im Zuge der Röstung ursprünglich gebildet wurden, woraus ein bisher nicht erklärbarer Lysinverlust resultieren würde. Als mögliches Lysinderivat könnte hierbei Norleucin entstanden sein.

Die Handelsproben wiesen Gehalte an Lipierungsprodukten auf, die vergleichbar mit den Gehalten der im Labormaßstab gerösteten Erdnüssen waren. Ein direkter Vergleich war allerdings nicht möglich, da der **Oxidationszustand** der zur industriellen Röstung eingesetzten, ungerösteten Erdnüsse nicht bekannt war. Unter der Annahme vergleichbarer Röstbedingungen

würden Unterschiede in den jeweiligen Lipidperoxidationsstadien, der im Labormaßstab und zur industriellen Röstung eingesetzten Erdnüsse, zu unterschiedlich ablaufenden Lipierungsreaktionen führen. Dies stellt einen Unterschied zur Maillard-Reaktion dar, da die hierbei zur Reaktion benötigten Zuckerkomponenten in der Regel bereits als Edukte vorliegen, wohingegen im Falle der Lipierungsreaktionen die Sekundärprodukte in jedem Fall erst gebildet werden müssen. Somit ist es naheliegend, dass es in identischen Lebensmitteln, welche sich allerdings in ihren Stadien der Lipidperoxidation unterscheiden (beispielsweise durch unterschiedliche Lagertemperatur, Lagerdauer, UV-Bestrahlung), im Zuge ihrer Prozessierung oder Lagerung zu unterschiedlichen Gehalten an Lipierungsprodukten kommen kann.

Der durch die quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte **erklärbare Lysinverlust** betrug für die für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse jeweils 14 und 9 % (Kap. 4.1.2). Unter Einbeziehung der quantifizierten Gehalte an Lipierungsprodukten ergaben sich erklärbare Anteile der Lysinverluste von jeweils 17 und 11 %. Somit konnten durch die quantifizierten Lipierungsprodukte Beiträge von jeweils 3 und 2 % des jeweiligen Gesamtlysinverlusts erklärt werden. Im Vergleich mit den Maillard-Reaktionsprodukten sind die Stoffmengen der jeweiligen Lipierungsprodukte als gering einzustufen. Wird allerdings die Vielzahl an Sekundärprodukten betrachtet, die als Folge der Lipidperoxidation während des Erdnussröstens entstehen (Kap. 4.2; Liu et al., 2011; Chetschik et al., 2008; Matsui et al., 1998; Brown et al., 1972), so ist die Bildung einer Vielzahl entsprechender Lipierungsprodukte denkbar. Die Summe der Einzelprodukte könnte somit einen höheren Beitrag zu der bisher nicht erklärbaren Lysinmodifizierung leisten. Weitere **Ursachen für geringe Gehalte an Lipierungsprodukten** könnten (1) in der Flüchtigkeit der Sekundärprodukte oder (2) einer Hemmung der Lipidperoxidation gelegen haben. Hemmend könnte hierbei das Vorhandensein natürlicher Antioxidantien wie Tocopherole gewirkt haben. Die Gehalte an Gesamttocopherol und  $\alpha$ -Tocopherol betragen jeweils bis zu 19 und 10 mg/100 g Erdnuss (Souci et al., 2008; Maguire et al., 2004). Weiterhin könnten (3) antioxidativ wirksame Lipierungsprodukte eine Rolle gespielt haben. Hwang et al. (2001) rösteten Erdnüsse bei 180 °C bis zu 60 min und konnten in Abhängigkeit der Röstdauer eine Zunahme der antioxidativen Kapazität beobachten. Chiou et al. (1993) erhitzten Erdnussöl in An- und Abwesenheit von entfettetem Erdnusspulver und beobachteten in Anwesenheit des Erdnusspulvers eine Reduktion der Bildung konjugierter Diene. Ursächlich könnte die antioxidative Wirkung der Lipierungsprodukte gewesen sein, die für Pyrrole, Dihydropyridine, Pyridiniumverbindungen und Michael-Addukte des Histidins gezeigt wurde (Zamora & Hidalgo, 2009; Alaiz et al., 1996; Alaiz et al., 1995c). Da diese Produkte in der Lage sind, die Lipidperoxidation in Anwesenheit von Proteinen zu hemmen, wird in diesem Zusammenhang von einem „Feedback-Inhibierungsmechanismus“ gesprochen (Zamora & Hidalgo, 2009). Weiterhin enthalten Erdnüsse antioxidativ wirksame Reduktone

(Hydroxycarbonylverbindungen mit zwei bis fünf C-Atomen), deren Gehalte in den nativen Erdnüssen zwischen 0,7 und 1,3 % liegen (Vercellotti et al., 1995).

Eine weitere **Ursache für den nicht erklärbaren Lysinverlust** von 83 % und 89 % in den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen könnten neben nicht erfassten Maillard- und Lipierungsprodukten **direkte radikalische Modifizierungen** von Aminosäuren im Proteinverband durch Radikale der Lipidperoxidation dargestellt haben. Wie bereits in Kap. 4.1.2 diskutiert, beobachteten Roubal & Tappel (1966), dass eine wässrige Inkubation von peroxidiertem Ethylarachidonat mit  $\gamma$ -Globulin bei 37 °C zu einem Ausfallen des Proteins und einem Lysinverlust von 59 % führte. Hierfür könnten Radikalreaktionen als auch Reaktionen mit Sekundärprodukten der Lipidperoxidation verantwortlich gewesen sein (Gardner, 1979). Im Falle der Radikalreaktionen können entsprechend Kap. 2.3.1 Radikale von Fettsäurehydroperoxy- und Fettsäurehydroxyradikale an die Aminosäureseitenketten der Proteine übertragen werden (Kap. 4.1.2, Abb. 33), (Gardner, 1979). In trockenen Systemen wie den Erdnüssen könnte es als Folge vor allem zu Proteinspaltungen kommen (Gardner, 1979), die nach Stadtman & Levine (2003) und Garrison (1987) unter anderem durch  $\alpha$ -Amidierung oder den Diamid-Reaktionsweg erfolgen können. Diese wurden allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet (Kap. 4.3.4, Abb. 51). Weiterhin sind radikalinduzierte Proteinquervernetzungen möglich (Stadtman & Levine, 2003; Özben, 1998). Abb. 78 zeigt den prinzipiellen radikalinduzierten Verlauf der Oxidation einer Aminosäure im Proteinverband nach Stadtman & Levine (2003) und Özben (1998).

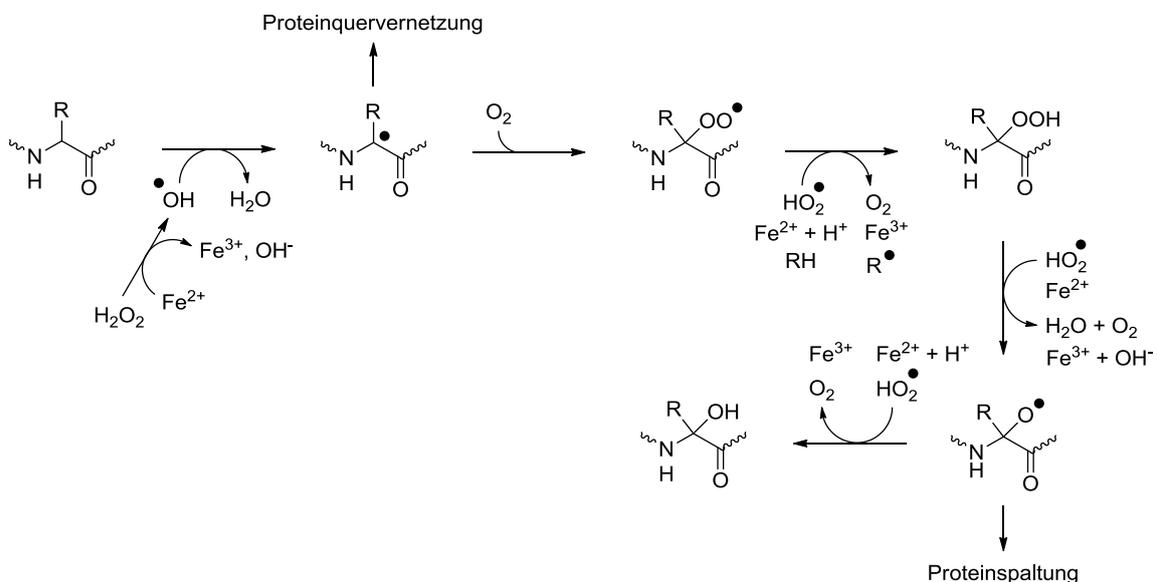


Abb. 78 Prinzipieller radikalinduzierter Verlauf der Oxidation einer Aminosäure im Proteinverband nach Stadtman & Levine (2003) und Özben (1998), R - Aminosäureseitenkette

Die Reaktion wird durch die Abstraktion eines  $\alpha$ -Wasserstoffatoms einer beliebigen Aminosäure induziert. Das hierbei entstehende Radikal kann entweder mit einem weiteren Radikal unter Ausbildung eines Quervernetzungsprodukts weiterreagieren oder es kann andererseits

Sauerstoff addiert werden, wodurch ein Alkylperoxyradikal resultiert. Dieses kann mit einem protonierten Superoxidanion ( $\text{HO}_2^-$ ),  $\text{Fe}^{2+}$  oder durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms aus einem anderen Molekül zum Alkylperoxid weiter reagieren. Das Alkylperoxid kann mit  $\text{HO}_2^-$  oder  $\text{Fe}^{2+}$  zum Alkoxyradikal umgesetzt werden, wodurch eine Proteinspaltung möglich ist, oder unter weiterer Einwirkung von  $\text{HO}_2^-$  oder  $\text{Fe}^{2+}$  zum Hydroxyderivat reagieren. (Stadtman & Levine, 2003; Özben, 1998)

Weiterhin wurde gezeigt, dass Aminosäureseitenketten von Lysin, Arginin, Prolin und Threonin metallionenkatalysiert in die jeweiligen Carbonylderivate 6-Oxo-norleucin (Lysin), 5-Oxo-norvalin (Arginin und Prolin) und 2-Amino-3-oxobutansäure (Threonin) und der Imidazolring des Histidins zu 2-Oxo-Histidin umgesetzt werden können (Stadtman & Levine, 2003; Uchida, 2003b). Methionin kann über Methioninsulfoxid bis zum Methioninsulfon oxidiert werden (Vogt, 1995).

Auf Grund der Vielzahl an möglichen Sekundärprodukten besteht zudem die Möglichkeit, der **Bildung heterogener Lipierungsprodukte**. Heterogene Lipierungsprodukte zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu homogenen Lipierungsprodukten neben dem ursprünglichen Nukleophil aus mehreren unterschiedlichen Carbonylverbindungen aufgebaut sind. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass es nach der Abspaltung der Sekundärprodukte aus der Fettsäure zu **Lipierungsreaktionen des am Glycerol verbleibenden, oxidativ gespaltenen Fettsäurerests**, der ebenfalls reaktive Carbonylgruppierungen aufweisen kann, kommt. Bezüglich dieser beiden Möglichkeiten wurden orientierende Untersuchungen durchgeführt, die in den nachfolgenden Kapiteln 4.5.3 und 4.5.4 vorgestellt werden.

### 4.5.3 Heterogene Lipierungsprodukte

Die Untersuchung der Bildung heterogener Lipierungsprodukte erfolgte am Beispiel einer methanolischen Inkubation von Hexanal, Nonanal und  $\text{N}^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin in jeweils äquimolaren Stoffmengen für 4 h bei 75 °C. Da Aldehyde als Reaktionspartner eingesetzt wurden, war auf Grundlage von Kap. 4.4.1 die Bildung der entsprechenden Monoalkylierungsprodukte und Pyridiniumderivate zu erwarten. In Abb. 79 ist das erhaltene LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm sowie die charakteristischen Fragmentmuster der zugeordneten Lipierungsprodukte dargestellt. Im Falle der Pyridiniumderivate mit gleichem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) wurde exemplarisch jeweils das Fragmentmuster des zuerst eluierten Pyridiniumderivats dargestellt. Die später eluierten Pyridiniumderivate mit gleichen Masse/Ladungsverhältnissen wiesen jeweils analoge Fragmentierungsmuster auf, die sich nur in den relativen Intensitäten der Fragmentationen unterschieden. Die Identifizierungen erfolgten anhand der LC-ESI-MS/MS-Fragmentmuster analog Kap. 4.4.

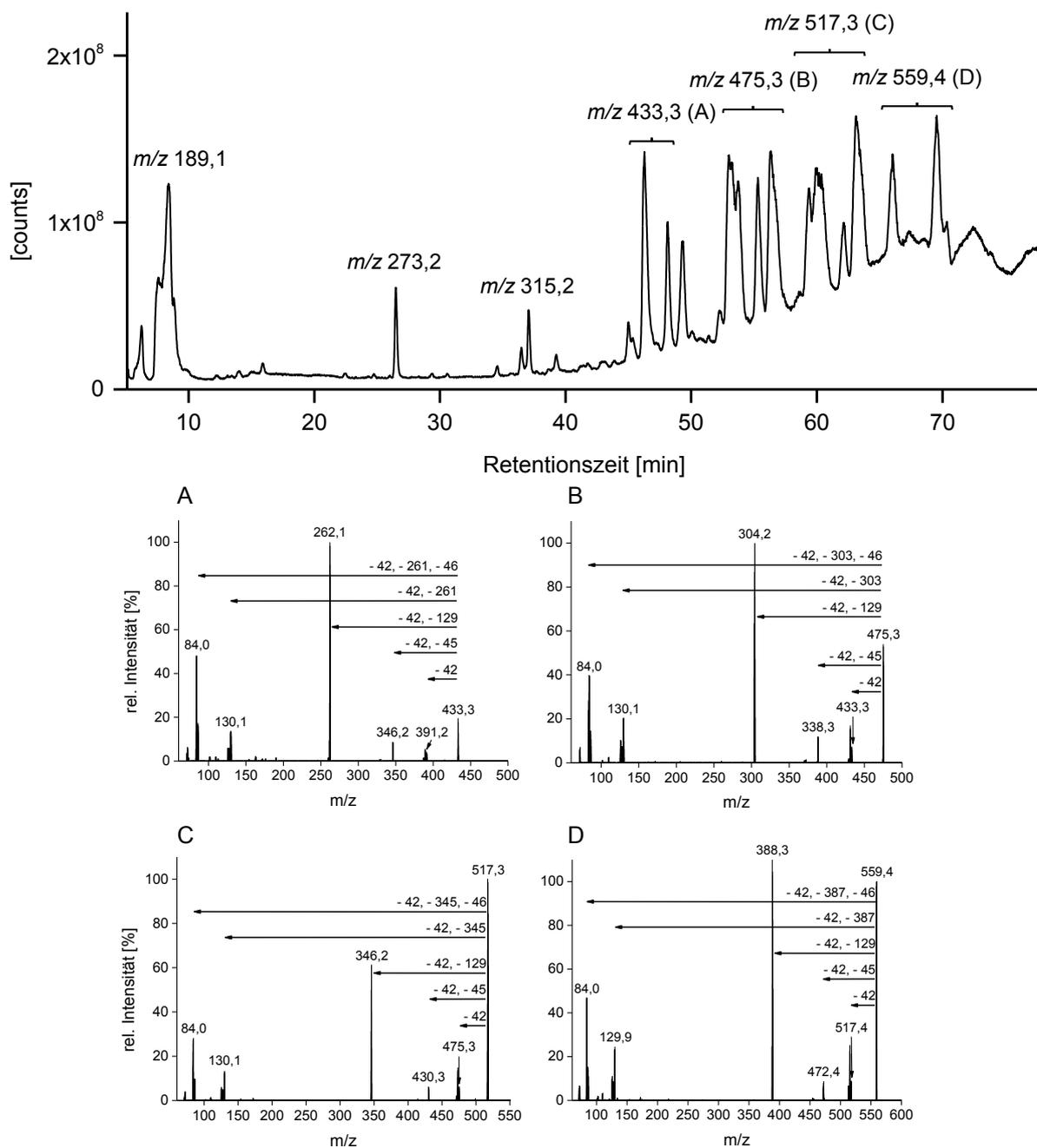


Abb. 79 LC-ESI-MS/MS-Scan-Chromatogramm der Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin mit Hexanal und Nonanal (oben) und der jeweiligen Fragmentmuster der Pyridiniumderivate aus den Produktionenscans (unten), (A)  $m/z$  433,3, (B)  $m/z$  475,3, (C)  $m/z$  517,3 und (D)  $m/z$  559,4

Neben nicht vollständig umgesetztem  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin ( $t_{\text{Ret}} = 8,3$  min) mit  $m/z$  189,1 ( $M+H^+$ ), wurden die beiden Verbindungen mit  $m/z$  273,2 ( $t_{\text{Ret}} = 26,5$  min) und  $m/z$  315,2 ( $t_{\text{Ret}} = 37,1$  min) jeweils analog Kap. 4.4.1, Abb. 53A den Monoalkylierungsprodukten ( $M+H^+$ ) des Hexanals beziehungsweise Nonanals mit  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin zugeordnet (Abb. 80A). Diese weisen berechnete monoisotopische Massen von jeweils 273,2 g/mol ( $M+H^+$ ) und 315,3 g/mol ( $M+H^+$ ) auf. Bei den nachfolgend eluierten Verbindungen mit  $m/z$  433,3 ( $M^+$ ,  $t_{\text{Ret}} = 46,2$  und 48,1 min) (Abb. 79A) handelte es sich auf Grund von mit Kap. 4.4.1, Abb. 53B und C übereinstimmenden Fragmentmustern um die beiden homogenen Pyridiniumderivate AcLHP 1 und

AcLHP 2 (Abb. 80B). Diese weisen berechnete monoisotopische Massen von jeweils 433,3 g/mol ( $M^+$ ) auf.

Im Bereich zwischen  $t_{\text{Ret}} = 53,0$  und  $56,3$  min zeigten sich im Produktionenscan fünf Verbindungen mit jeweils  $m/z$  475,3 ( $M^+$ ), deren Fragmentationen (Abb. 79B) über analoge Fragmentierungsrouten zugeordnet werden konnten wie im Falle von AcLHP 1 und AcLHP 2 (siehe Kap. 4.4.1). Hierbei konnten heterogene Pyridiniumderivate identifiziert werden, die sich aus jeweils einem Molekül  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysin und Nonanal sowie zwei Molekülen Hexanal zusammensetzten. Möglich war somit die Bildung von fünf heterogenen Isomeren, die sich aus jeweils drei AcLHP 1-Analoga und zwei AcLHP 2-Analoga zusammensetzten (Abb. 80C). Die berechneten monoisotopischen Massen betragen jeweils 475,4 g/mol ( $M^+$ ).

Im Bereich zwischen  $t_{\text{Ret}} = 59,4$  und  $63,2$  min zeigten sich im Produktionenscan ebenfalls fünf Verbindungen mit jeweils  $m/z$  517,3 ( $M^+$ ), deren Fragmentationen (Abb. 79C) über analoge Fragmentierungsrouten zugeordnet werden konnten wie im Falle von AcLHP 1 und AcLHP 2. Somit konnten erneut heterogene Pyridiniumderivate identifiziert werden, die sich aus jeweils einem Molekül  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysin und Hexanal sowie zwei Molekülen Nonanal zusammensetzten. Möglich war hierbei erneut die Bildung von fünf heterogenen Isomeren, die sich aus jeweils drei AcLHP 1-Analoga und zwei AcLHP 2-Analoga zusammensetzten (Abb. 80D). Die berechneten monoisotopischen Massen betragen jeweils 517,4 g/mol ( $M^+$ ).

Bei  $t_{\text{Ret}} = 66,1$  und  $69,5$  min eluierten zwei Verbindungen mit jeweils  $m/z$  559,4 ( $M^+$ ). Die jeweils übereinstimmenden Fragmentationen (Abb. 79D) wurden über analoge Fragmentierungsrouten zugeordnet wie im Falle von AcLHP 1 und AcLHP 2. Hierüber konnten zwei homogene Pyridiniumderivate, ausgehend von  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysin und Nonanal identifiziert werden, die analog AcLHP 1 und AcLHP 2 zusammengesetzt waren (Abb. 80B). Die berechneten monoisotopischen Massen betragen jeweils 559,5 g/mol ( $M^+$ ). Im Falle der neu identifizierten Pyridiniumderivate konnte keine Zuordnung bezüglich der Elutionsreihenfolge erfolgen, da dies nur über die jeweiligen Standardsubstanzen möglich gewesen wäre.

Somit konnten sich aus der Reaktion von  $N^\alpha$ -Acetyl-L-lysin mit Hexanal und Nonanal 2 monoalkylierte Produkte, 4 homogene und 10 heterogene Pyridiniumderivate bilden. Als Folge bestand somit die Möglichkeit zur Bildung von 16 Lipierungsprodukten. Prinzipiell können die Pyridiniumderivate auch aus drei heterogenen Aldehyden unter Einbeziehung der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins hervorgehen. Hierdurch würde die Möglichkeit zur Bildung von 51 Lipierungsprodukten bestehen. Wie in Kap. 4.2 gezeigt und auch in der Literatur beschrieben (Liu et al., 2011; Chetschik et al., 2008), entsteht als Folge des Erdnussröstens eine Vielzahl an potentiell reaktiven Sekundärprodukten. Da die Bildung heterogener Lipierungsprodukte unter Einbeziehung weiterer Sekundärprodukte, wie beispielsweise weiteren Aldehyden und 2-Alkenalen, denkbar ist, besteht die Möglichkeit, dass eine Vielzahl von Lipierungsprodukten

resultieren könnte. Hierdurch würde die Stoffmenge an Sekundärprodukt zur Ausbildung homogener Lipierungsprodukte reduziert werden. Dies könnte eine mögliche Ursache für die geringen Gehalte der in den Erdnüssen quantifizierten Stoffmengen an Lipierungsprodukten darstellen. Anhand dieses Modells konnte erstmals gezeigt werden, dass es zur Bildung heterogener Lipierungsprodukte kommen kann.

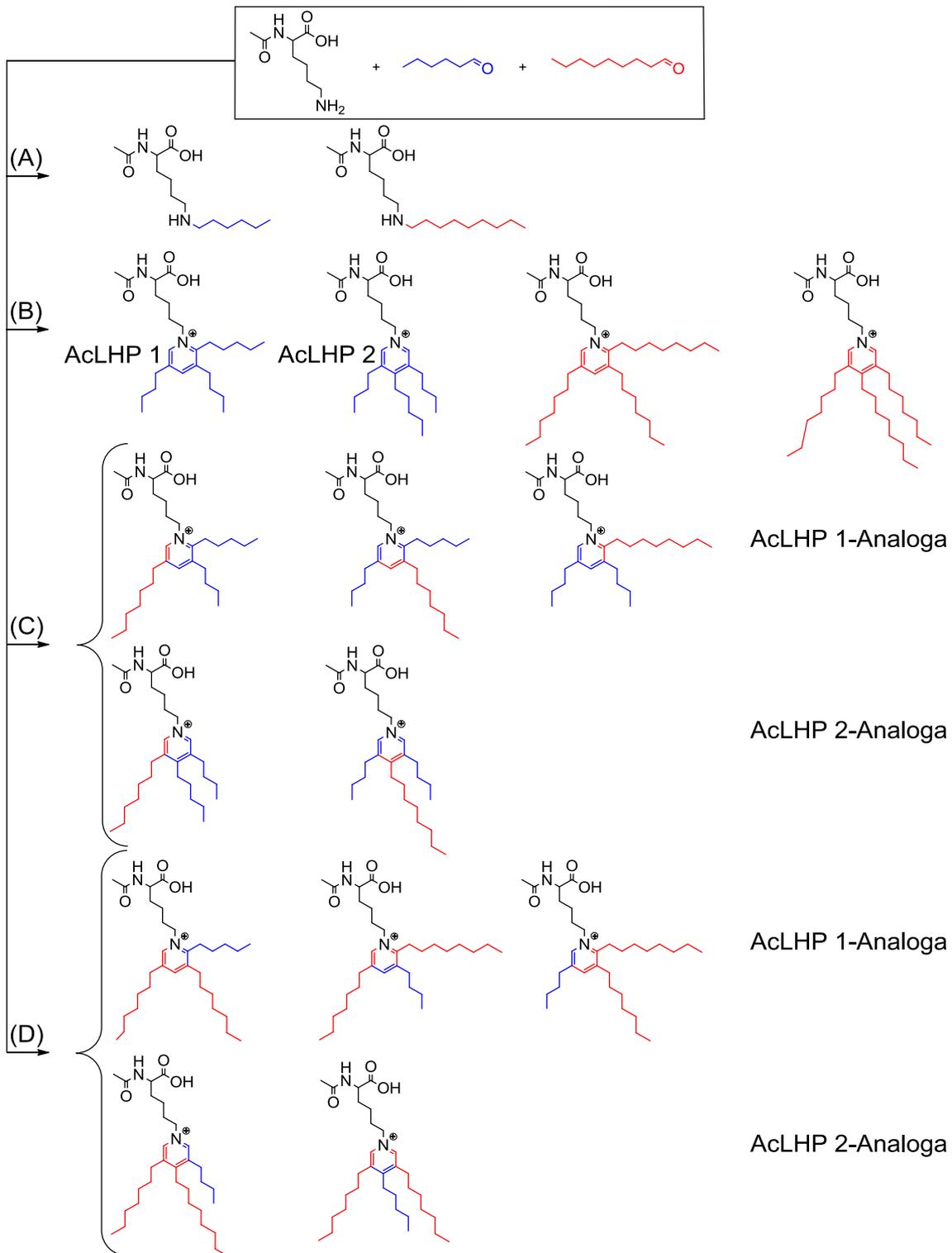


Abb. 80 Postulierte Reaktionsprodukte, die aus der Inkubation von  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin, Hexanal und Nonanal in jeweils äquimolaren Stoffmengen hervorgingen

#### 4.5.4 Lipierungsreaktionen des am Glycerol verbleibenden, oxidativ gespaltenen Fettsäurerests

Zur Untersuchung der Reaktionsmöglichkeit des nach der Abspaltung eines Sekundärprodukts am Glycerol verbleibenden Fettsäurerests mit Nucleophilen im Sinne einer Lipierungsreaktion, wurden N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Linolsäuremethylester in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) unter milden oxidativen Bedingungen bei 37 °C für 2,5 h in Anlehnung an Refsgaard et al. (2000) inkubiert. Linolsäure wurde gewählt, da diese die Hauptfettsäure in Erdnüssen darstellt (Maguire et al., 2004). Im Zuge der Inkubation entstandene flüchtige Sekundärprodukte wurden nach einer Hexanextraktion mittels GC-MS (EI) über die NIST-Datenbank identifiziert (NIST). Die Identifizierung der Lipierungsprodukte erfolgte anhand von LC-ESI-MS/MS-Fragmentmustern analog Kap. 4.4. Da als Folge der Lipidperoxidation von Linolsäure unter anderem Hexanal und 4-HNE zu erwarten waren (Spickett, 2013; Esterbauer et al., 1991; Esterbauer et al., 1990a), deren Lipierungsprodukte in der vorliegenden Arbeit bereits identifiziert worden sind (Kap. 4.4.1 und 4.4.5), wurde der Fokus der Untersuchungen auf die Bildung dieser beiden Sekundärprodukte sowie den hieraus hervorgehenden Lipierungsprodukten gelegt. Zur quantitativen Überführung potentiell gebildeter Schiff'scher Basen in die entsprechenden Monoalkylierungsprodukte wurde ein Aliquot des Inkubationsansatzes mittels NaBH<sub>4</sub> reduziert. In Abb. 81 ist das erhaltene GC-MS (EI)-Scan-Chromatogramm des Hexanextrakts mit den über die NIST-Datenbank identifizierten Verbindungen dargestellt.

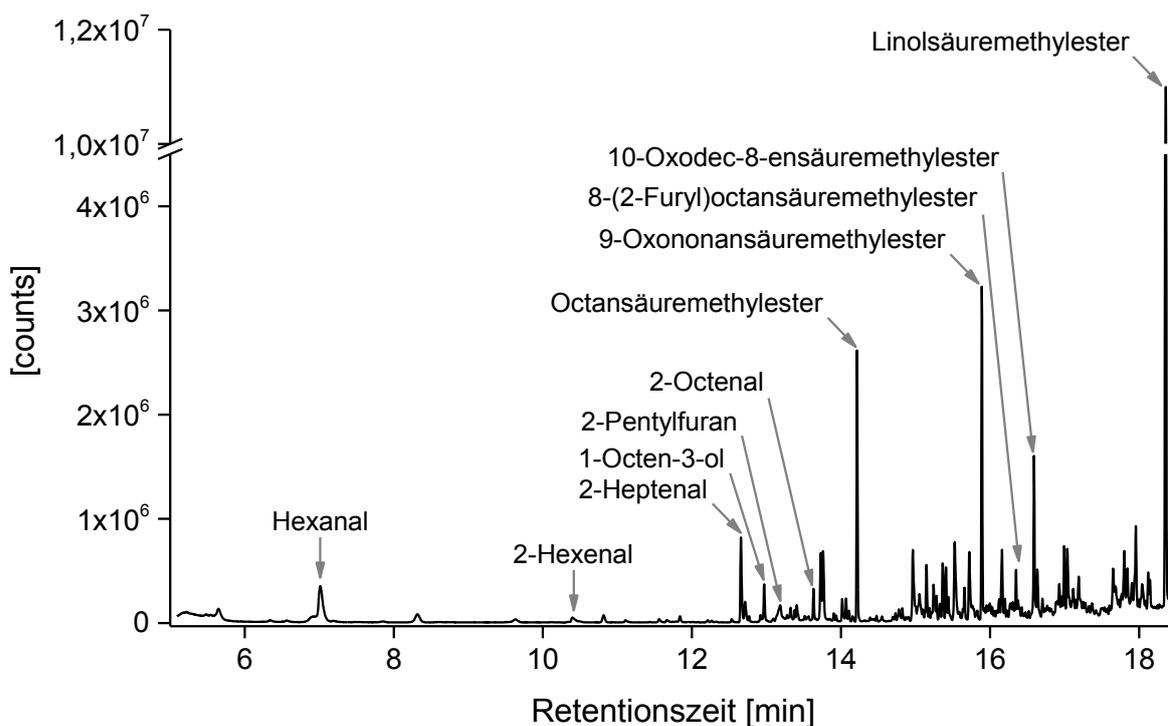


Abb. 81 GC-MS (EI)-Scan-Chromatogramm flüchtiger Verbindungen des Hexan-Extrakts der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Linolsäuremethylester

Neben Hexanal war auch 2-Pentylfuran, welches das im GC-Injektor thermisch induziert gebildete Kondensationsprodukt des 4-HNE darstellt, nachweisbar. Des Weiteren wurde der als Folge der oxidativen Abspaltung von Hexanal aus Linolsäuremethylester verbleibende 9-Hydroxy-12-oxododec-10-ensäuremethylester analog der Kondensation des 4-HNE in Form seines Kondensationsprodukts 8-(2-Furyl)octansäuremethylester identifiziert. Ebenfalls war der als Folge der oxidativen Abspaltung von 4-HNE verbleibende 9-Oxononansäuremethylester nachweisbar. Diese Beobachtungen waren in Übereinstimmung mit der Literatur (Spickett, 2013). In Abb. 82 ist die Bildung oben genannter Sekundärprodukte als Folge der oxidativen Spaltung des Linolsäuremethylesters schematisch dargestellt.

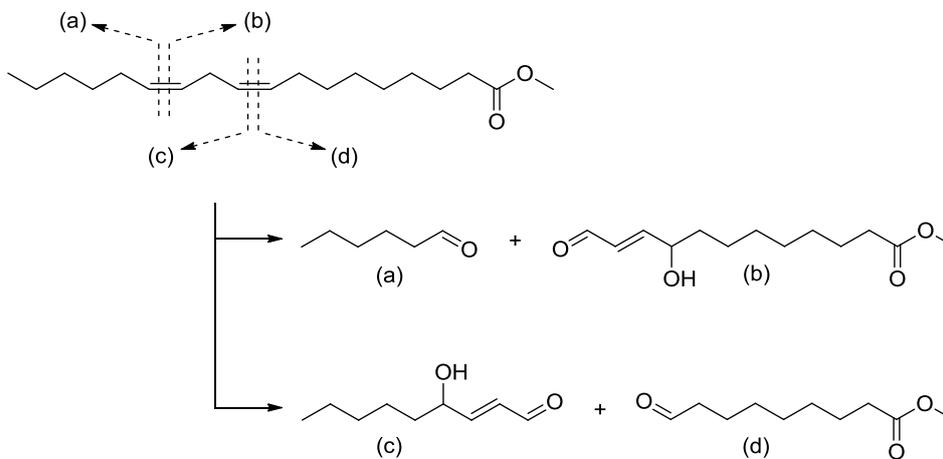


Abb. 82 Schematische Darstellung der Bildung von (a) Hexanal, (b) 9-Hydroxy-12-oxododec-10-ensäuremethylester, (c) 4-HNE und (d) 9-Oxononansäuremethylester als Folge der oxidativen Spaltung von Linolsäuremethylester in Anlehnung an Spickett (2013)

Interessanterweise verbleibt nach der Abspaltung eines Aldehyds eine 4-Hydroxyalkenalgruppierung und nach Abspaltung eines 4-Hydroxyalkenals eine Aldehydgruppierung am Fettsäurerest zurück. Somit verhalten sich diese Verbindungen zueinander jeweils komplementär. Sayre et al. (2006) beschrieben diesen Effekt als „mirror image processing“. Somit waren neben der Bildung der in der vorliegenden Arbeit bereits bekannten Lipierungsprodukte aus Hexanal und 4-HNE mit N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin auch die Bildung von Lipierungsprodukten, die aus 9-Hydroxy-12-oxododec-10-ensäuremethylester und 9-Oxononansäuremethylester hervorgehen, möglich. Da in Kap. 4.5.2.1, Abb. 72A gezeigt wurde, dass in den Erdnussproben im Falle der Lipierungsprodukte des Hexanals die Schiff'sche Base (quantifiziert in Form des N<sup>ε</sup>-Hexyllysins) in höheren Konzentrationen als LHP 1 und LHP 2 gebildet wurde, lag der Fokus im Falle der Lipierungsprodukte der Aldehyde auf den nach Reduktion erhaltenen Monoalkylierungsprodukten. Im Falle der 4-Hydroxyalkenale lag der Fokus auf den Pyrrol-Derivaten (analog zu Kap. 4.4.5 und 4.5.2.4).

Abb. 83 zeigt die mittels LC-ESI-MS/MS erhaltenen Fragmentmuster der nach Reduktion identifizierten 2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]hexansäure sowie der 2-Acetamido-6-[2-(8-methoxy-8-oxo-octyl)pyrrol-1-yl]hexansäure.

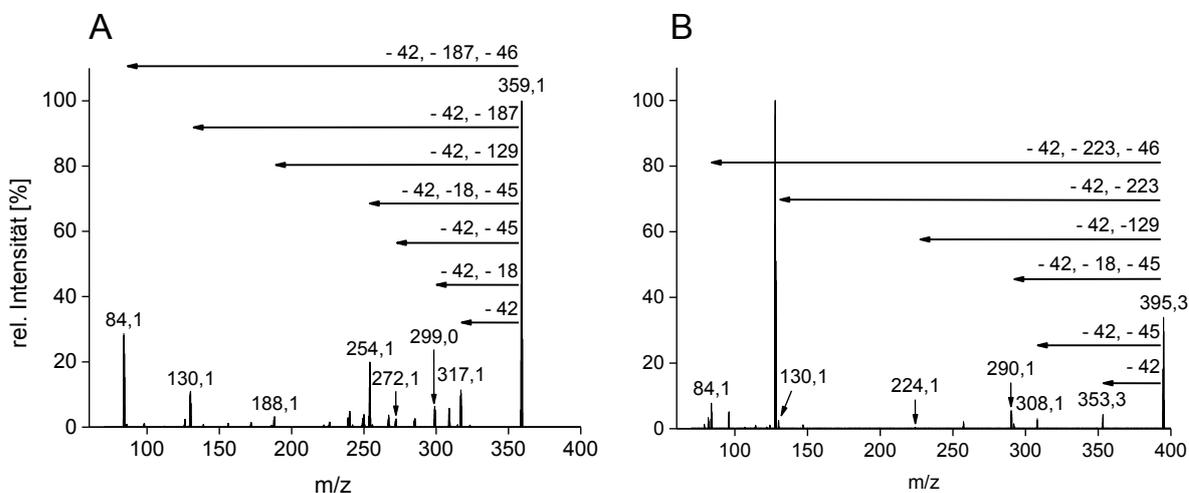


Abb. 83 Mittels LC-ESI-MS/MS erhaltene Fragmentmuster der (A) nach Reduktion identifizierten 2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]hexansäure und (B) 2-Acetamido-6-[2-(8-methoxy-8-oxo-octyl)pyrrol-1-yl]hexansäure

Das aus Hexanal und  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin nach Reduktion hervorgegangene Lipierungsprodukt  $N^{\epsilon}$ -Hexyl-AcLys (Abb. 84(3)) wies ein  $m/z$  von 273,2 ( $M+H^+$ ) auf und zeigte ein identisches Fragmentierungsmuster wie unter Kap. 4.4.1, Abb. 53A dargestellt. Das Lipierungsprodukt 2-PP-AcLys, hervorgegangen aus 4-HNE und  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin (Abb. 84(21)), wies ein  $m/z$  von 309,2 ( $M+H^+$ ) auf und zeigte ein identisches Fragmentierungsmuster wie unter Kap. 4.4.5, Abb. 62C dargestellt. Somit konnten die beiden bereits in Kap. 4.4.1 und 4.4.5 aus Hexanal und 4-HNE hervorgegangenen Lipierungsprodukte  $N^{\epsilon}$ -Hexyl-AcLys und 2-PP-AcLys identifiziert werden.

Im Falle der Verbindung mit  $m/z$  359,1 ( $M+H^+$ ) wurde entsprechend Kap. 4.4, Abb. 52 und Abb. 54 der Masseverlust um -42 u einer Deacetylierung zugeordnet; entsprechend des Fragmentierungswegs 1 konnte das Fragmentation mit  $m/z$  299,0 ( $M+H^+$ ) nach Deacetylierung (-42 u) und Abspaltung von  $H_2O$  (-18 u) resultieren, welches schließlich nach zusätzlicher Abspaltung von CO und  $NH_3$  (-45 u) in das Fragmentation mit  $m/z$  254,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte; das Fragmentation mit  $m/z$  272,1 wurde als Folge einer Deacetylierung (-42 u) und nachfolgender Abspaltung von  $NH_3$  und CO (-45 u) erklärt; entsprechend des Fragmentierungswegs 1 (Kap. 4.4, Abb. 52 und Abb. 54) konnte nach Deacetylierung (-42 u) und Abspaltung des nach Protonierung erhaltenen Fragmentations mit  $m/z$  188,1 ( $M+H^+$ ) das Fragmentation mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) resultieren, welches nach Abspaltung von CO und  $H_2O$  (-46 u) in das Fragmentation mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte. Die Fragmentierungswege waren analog denen des  $N^{\epsilon}$ -Hexyl-AcLys. Somit wurde nach Reduktion das Vorliegen des Lipierungsprodukts aus 9-Oxononansäuremethylester (Abb. 82d) und  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin

**2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]hexansäure** angenommen (Abb. 84(30)).

Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 359,2 g/mol ( $M+H^+$ ) auf.

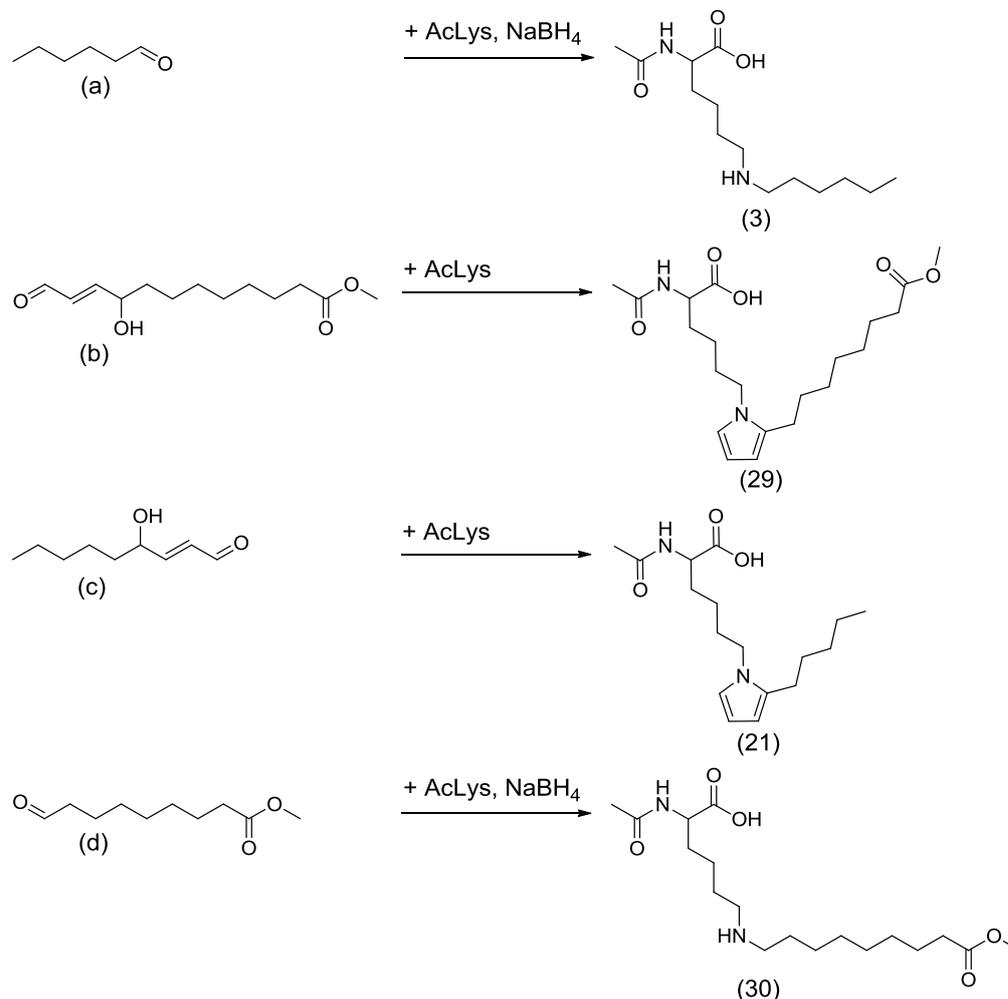


Abb. 84 Mittels LC-ESI-MS/MS identifizierte Lipierungsprodukte als Folge der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Linolsäuremethylester: aus Hexanal (a) hervorgegangenes N<sup>ε</sup>-Hexyl-AcLys (3), aus 9-Hydroxy-12-oxododec-10-ensäuremethylester (b) hervorgegangene 2-Acetamido-6-[2-(8-methoxy-8-oxo-octyl)pyrrol-1-yl]hexansäure (29), aus 4-HNE (c) hervorgegangenes 2-PP-AcLys (21) sowie aus 9-Oxononansäuremethylester (d) hervorgegangene 2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]hexansäure (30)

Im Falle der Verbindung mit  $m/z$  395,3 ( $M+H^+$ ) wurde entsprechend Kap. 4.4, Abb. 52 und Abb. 54 der Masseverlust um -42 u einer Deacetylierung zugeordnet; durch nachfolgende Abspaltung von NH<sub>3</sub> und CO (-45 u) konnte das Fragmentation mit  $m/z$  308,1 ( $M+H^+$ ) resultieren; entsprechend des Fragmentierungswegs 2 ergab sich nach einer Deacetylierung (-42 u), Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 u) und Abspaltung von CO und NH<sub>3</sub> (-45 u) das Fragmentation mit  $m/z$  290,1 ( $M+H^+$ ); über den Fragmentierungsweg 1 kam es nach der Deacetylierung zur Abspaltung des nach Protonierung erhaltenen Fragmentations mit  $m/z$  224,1 ( $M+H^+$ ) und das Fragmentation mit  $m/z$  130,1 ( $M+H^+$ ) resultierte, welches schließlich nach Abspaltung von CO und NH<sub>3</sub> (-45 u) in das Fragmentation mit  $m/z$  84,1 ( $M+H^+$ ) übergehen konnte. Die Fragmentierungswege entsprachen somit denen des 2-PP-AcLys. Das nicht zuordenbare Signal

des Fragmentions mit  $m/z$  127,8 könnte aus einer zur gleichen Zeit eluierten Verbindung mit ebenfalls  $m/z$  395,3 resultiert haben. Da alle weiteren Fragmentionen zugeordnet werden konnten und alle erwarteten Fragmentionen vorlagen, wurde das Vorliegen des Lipierungsprodukts **2-Acetamido-6-[2-(8-methoxy-8-oxo-octyl)pyrrol-1-yl]hexansäure** aus 9-Hydroxy-12-oxododec-10-ensäuremethylester und  $N^{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin (Abb. 84(**29**)) identifiziert. Dieses weist eine berechnete monoisotopische Masse von 395,2 g/mol ( $M+H^+$ ) auf.

Somit konnte gezeigt werden, dass prinzipiell Reaktionen des am Glycerol verbleibenden, oxidativ gespaltenen Fettsäurerests mit Nukleophilen möglich sind. Wird dieser Reaktionsweg auf Triacylglyceride übertragen, die als Folge des Erdnussröstens oxidativ gespalten werden, so könnten hierdurch nicht flüchtige Sekundärprodukte entstehen, die während des Röstens nicht aus den Erdnüssen entweichen können. Diese Produkte könnten mit den Aminosäureseitenketten der Erdnussproteine Lipierungsreaktionen eingehen und somit einen Beitrag zu dem bisher nicht erklärbaren Lysinverlust leisten. Des Weiteren wären intra- und intermolekulare Proteinquervernetzungen durch die Reaktion von beispielsweise zwei oxidativ gespaltenen Fettsäureresten innerhalb desselben Moleküls Triacylglycerid und zwei Aminosäureseitenketten denkbar. Hierdurch könnten kovalent verbundene Protein-Lipid-Komplexe entstehen, die einen Einfluss auf die als Folge des Erdnussröstens beschriebene Abnahme der Proteinlöslichkeit (Kopper et al., 2005) haben könnten. Hidalgo & Zamora (2000) beschrieben, dass eine Inkubation von Proteinen mit peroxidierten Lipiden zu kovalenten Protein-Lipid-Bindungen führte. Diese wurden allerdings chemisch nicht näher charakterisiert. Als Folge einer Inkubation von 13-Hydroperoxylinolensäure mit Cystein und  $N^{\alpha}$ -Acetylcystein wurden entsprechende Thiol-Lipid-Addukte am  $C_9$  der Fettsäure identifiziert (Gardner, 1979). Kaur et al. (1997) konnten immunochemisch eine signifikante Zunahme der Pyrrol-Struktur **29** der Abb. 84 in Plasmaproben gesunder (169 pmol/ml) und an Nierenerkrankungen oder Atherosklerose (jeweils 209 pmol/ml) leidenden Patienten quantifizieren. Kawai et al. (2003) identifizierten nach der Inkubation von N-Benzoylglycyllysin mit Linolsäure unter oxidativen Bedingungen das Lysinaddukt  $N^{\epsilon}$ -(Azelayl)lysin mittels LC-MS. Dieses ging aus der Reaktion mit Fettsäurehydroperoxiden hervor und zeigt somit ebenfalls, dass ein Fettsäurerest kovalent an einen Aminosäurerest gebunden werden kann (Kato & Osawa, 2010). Immunochemisch konnten sie dieses Lipierungsprodukt in atherosklerotischen Läsionen von Hasen nachweisen, wobei keine Quantifizierung erfolgte.

Die Analytik entsprechender Lipierungsprodukte könnte bessere Auskünfte bei physiologischen Fragestellungen liefern, da diese im Gegensatz zu den freien Sekundärprodukten oder deren Lipierungsprodukten direkt am Entstehungsort der Oxidation gebildet und verbleiben dürften. Prinzipiell wären auch Auswirkungen auf die Struktur und somit die Fluidität von Zellmembranen denkbar.

### 4.5.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Lipierungsprodukte in modifizierten Erdnussproteinextrakten und Lebensmitteln (Erdnüssen) direkt mittels LC-ESI-MS/MS unter Verwendung chemisch charakterisierter Standards quantifiziert. In den Erdnussproben konnten N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1, MP-Lysin und 2-PPL quantifiziert werden.

In Tab. 54 sind die in den bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnüssen sowie der Handelsprobe quantifizierten Gehalte der Lipierungsprodukte zusammengefasst.

Tab. 54 Quantifizierte Gehalte der Lipierungsprodukte in den bei 170 °C für 20 min gerösteten Erdnüssen sowie der Handelsprobe

Lipierungsprodukt	Erdnüsse [μmol/100 g Protein]	Handelsprobe [μmol/100 g Protein]
N <sup>ε</sup> -Hexyllysin <b>3'</b>	29,1 ± 2,5	92,1 ± 12,9
LHP 1 <b>2'</b>	0,02 ± 0,001	0,003 ± 0,0003
MP-Lysin <b>10'</b>	2,2 ± 0,4	0,4 ± 0,02
2-PPL <b>21'</b>	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01

Die Gehalte des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin nahmen innerhalb der Erdnussröstreihe ab und die Gehalte an LHP 1 zeigten keine signifikante Änderung. Im Falle des MP-Lysins und des 2-PPL konnten Zunahmen in Abhängigkeit der Röstzeit festgestellt werden. Die für 20 min gerösteten Erdnüsse zeigten im Vergleich mit der Handelsprobe Gehalte ähnlicher Größenordnungen (Tab. 54). Hierbei ist zu beachten, dass die oxidative Vorbelastung einer Probe einen entscheidenden Einfluss auf den Ablauf der Lipidperoxidation während der Röstung und somit auf die Bildung der Lipierungsprodukte haben dürfte. Der Oxidationszustand der zur industriellen Röstung eingesetzten Erdnüsse war nicht bekannt. Da die Bildung der Lipierungsprodukte eine Bildung der entsprechenden Sekundärprodukte voraussetzt, könnten Lipierungsprodukte somit eine Aussage über den Fortschritt des Oxidationsstatus eines Lebensmittels zulassen. Im Falle der Erdnussproben könnte MP-Lysin eine relevante Markerverbindung darstellen, da eine Zunahme in Abhängigkeit der Röstdauer verzeichnet wurde und die Gehalte höher als im Falle des 2-PPL lagen. Generell stellen stabile Lipierungsprodukte bessere Markerverbindungen dar als die freien Sekundärprodukte, da diese nicht flüchtig sind oder weiter reagieren.

Im Vergleich zu den Maillard-Reaktionsprodukten sind die Gehalte an Lipierungsprodukten als gering einzustufen (Kap. 4.5.2.5). Der erklärbare Lysinverlust durch die Bildung von Lipierungs- und Maillard-Reaktionsprodukten betrug für die für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse 17 beziehungsweise 11 %. Als **mögliche Ursachen für die geringen Gehalte an Lipierungsprodukten** können angesehen werden: (1) die Bildung einer Vielzahl an Sekundärprodukten während der Erdnussröstung (Liu et al., 2011; Chetschik et al., 2008; Matsui et al.,

1998; Brown et al., 1972) kann zu einer Vielzahl unterschiedlicher Lipierungsprodukte führen; (2) die Flüchtigkeit vor allem kurzkettiger Sekundärprodukte, die als Folge nicht mehr für Lipierungsreaktionen zur Verfügung stehen; (3) das Vorhandensein natürlicher Antioxidantien wie Tocopherole (Souci et al., 2008; Maguire et al., 2004) sowie (4) antioxidativ wirksamer Lipierungsprodukte, die die Bildung von Lipierungsprodukten über einen Feedback-Mechanismus inhibieren (Zamora & Hidalgo, 2009; Alaiz et al., 1996; Alaiz et al., 1995c); (5) direkte radikalische Modifizierungen von Aminosäureseitenketten (Gardner, 1979) können zu Proteinspaltungen unter anderem durch  $\alpha$ -Amidierung oder den Diamid-Reaktionsweg (Stadtman & Levine, 2003; Garrison, 1987) sowie direkten oxidativen Aminosäureseitenkettenmodifizierungen führen (Stadtman & Levine, 2003; Vogt, 1995); (6) die Bildung von heterogenen Lipierungsprodukten, wie erstmalig in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Reaktion von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit Hexanal und Nonanal gezeigt (Kap. 4.5.3) und (7) Reaktionen des am Glycerol verbleibenden, oxidativ gespaltenen Fettsäurerests, die erstmalig in der vorliegenden Arbeit konkret als Folge der Inkubation von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Linol säuremethylester unter oxidativen Bedingungen gezeigt wurden (Kap. 4.5.4). Auf Grund der Vielzahl an möglichen Lipierungsprodukten könnten somit die im Vergleich zu den Maillard-Reaktionsprodukten geringen Gehalte an einzelnen Lipierungsprodukten erklärt werden. Die Summe der Einzelprodukte könnte hingegen einen relevanten Beitrag für den Gesamtlysinverlust leisten.

## 4.6 Lipierungsreaktionen im physiologischen Kontext

### 4.6.1 Einfluss der Lipierung von Erdnussproteinen auf das allergene Potential

Als Folge des Erdnussröstens ist es zur Bildung von Lipierungsprodukten gekommen (Kap. 4.5), über deren Einfluss auf das allergene Potential von Erdnüssen bisher allerdings in der Literatur keine Erkenntnisse existieren. Aus diesem Grund waren weitere Ziele der vorliegenden Arbeit, mittels ELISA und Western Blots den Einfluss der Lipierung auf das IgE-Bindungsvermögen zu untersuchen. Weiterhin sollte anhand einer simulierten gastrointestinalen Verdauung die Beeinflussung der Verdaubarkeit der Erdnussproteine als Folge der Lipierung untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden exemplarisch anhand der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine und Ara h 1 durchgeführt (Kap. 4.3.4).

## 4.6.1.1 ELISA und Western Blots

**ELISA**

Zur Untersuchung des Einflusses der Lipierung auf die IgE-Bindungseigenschaften wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Da Ara h 1 in PBS-Puffer nicht löslich ist, wurde der ELISA nur mit den modifizierten Erdnussproteinextrakt-Proben durchgeführt. Als Antikörper wurden zwei monoklonale Antikörper mouse anti-Ara h 1 und rabbit anti-Ara h 2 sowie drei Seren von Erdnussallergikern FM 007, US 4 und US 6 eingesetzt. Des Weiteren wurde als Kontrolle das Serum eines Nicht-Allergikers mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Signalintensitäten (optische Dichte) relativ zueinander bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . In Abb. 85 sind die Ergebnisse des ELISA dargestellt.

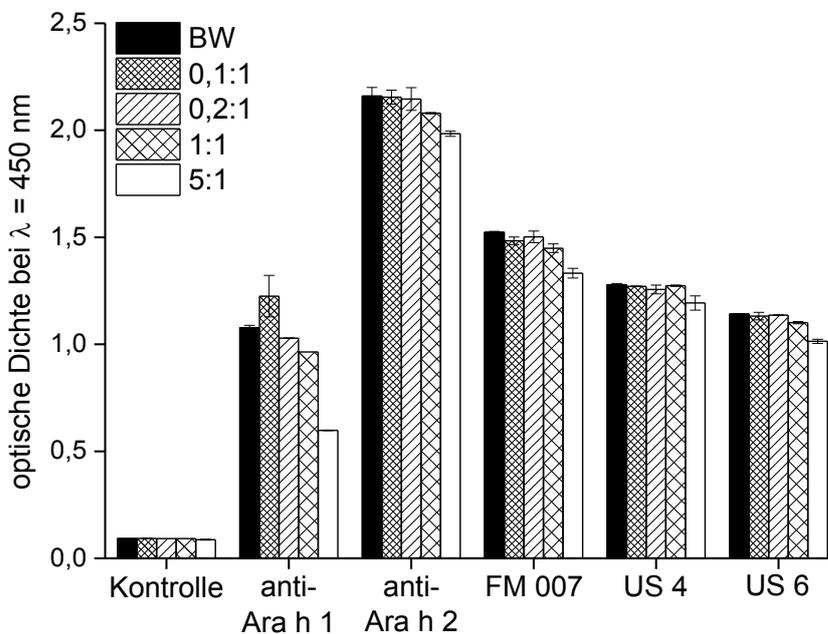


Abb. 85 ELISA der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine (4-HNE : Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren)

Das Serum des Nicht-Allergikers (Kontrolle) zeigte keine signifikante IgE-Bindung, wodurch unspezifische Bindungsreaktionen ausgeschlossen werden konnten. Anhand des spezifischen, monoklonalen Antikörpers gegen Ara h 1 wurde im 5:1-Inkubationsansatz eine Abnahme der Bindungsintensität um 45 % beobachtet. Diese war auf die Ausbildung von Oligomeren und einer damit einhergehenden reduzierten Löslichkeit des Ara h 1 zurückzuführen, wie sie bereits in Kap. 4.3.4, Abb. 49B mittels SDS-PAGE beobachtet wurde. Als Folge könnte es im Zuge der Aufarbeitung durch die Zentrifugation zu einer Abtrennung der höhermolekularen Aggregate gekommen sein. Im Falle des monoklonalen anti-Ara h 2-Antikörpers konnte ebenfalls bei dem 5:1-Inkubationsansatz eine geringe Abnahme der optischen Dichte beobachtet werden, die auf eine geringe Reduktion des Ara h 2-Anteils als Folge einer

Aggregation hindeutete. Prinzipiell bestand die Möglichkeit, dass diejenigen Epitope des Ara h 1 beziehungsweise Ara h 2, gegen welche die monoklonalen Antikörper gerichtet waren, als Folge der Lipierung oder damit induzierter Proteinumfaltungen unzugänglich wurden. Da allerdings auch die Allergikerseren FM 007, US 4 und US 6, welche polyklonale Antikörper enthielten, analoge, allerdings nicht signifikante, Tendenzen bei Betrachtung des 5:1-Inkubationsansatzes zeigten, stand als Ursache das Unlöslichwerden der Proteine im Vordergrund.

Generell kann somit die Aussage getroffen werden, dass eine Lipierung der Erdnussproteine durch 4-HNE zu keiner signifikanten Beeinflussung des Antikörperbindungsvermögens führt. Auch Wellner (2012a) konnte mittels Western Blot keine signifikante Beeinflussung des IgE-Bindungsvermögens als Folge einer gezielten Glykierung der isolierten Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 2 mit Glukose und Fruktose feststellen. Lediglich anhand eines Histaminfreisetzungstests konnten Hinweise abgeleitet werden, dass Extrakte aus gerösteten Erdnüssen zu einer höheren Histaminfreisetzung im Vergleich zu den rohen Erdnüssen führen könnten. Hierdurch wurde geschlussfolgert, dass eine Glykierung der Erdnusshauptallergene Ara h 1 und Ara h 2 nicht zur Bildung von Neoepitopen führte (Wellner, 2012a). Allerdings wurde der Hinweis erhalten, dass weitere während der Röstung ablaufende Reaktionen das allergene Potential beeinflussen könnten (Wellner, 2012a). Somit scheinen weder gezielte Lipierungs- noch Maillard-Reaktionen das Antikörperbindungsvermögen der modifizierten Erdnussproteine zu beeinflussen.

Da Lysin Bestandteil von 10 der 23 linearen Epitope des Hauptallergens Ara h 1 ist (Burks et al., 1997), besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass Lysinseitenketten innerhalb der Epitope posttranslational modifiziert werden können. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Veränderung einer einzelnen Aminosäure innerhalb eines Epitops des Ara h 1 und Ara h 2 das Antikörperbindungsvermögen von Allergikerseren beeinflussen kann (Shin et al., 1998; Stanley et al., 1997). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Modifizierungen der Lipierungs- und Maillard-Reaktionen entweder nicht innerhalb der Epitope erfolgten oder die resultierenden Produkte die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung nicht beeinflussten.

### **Western Blots**

Anhand von Western Blots sollten Auswirkungen der Lipierung auf die IgE-Bindungen der einzelnen Erdnussproteine innerhalb des Erdnussproteinextrakts untersucht werden. Weiterhin sollten Erkenntnisse darüber erhalten werden, ob die quervernetzten Proteine ebenfalls durch die Antikörper gebunden werden können. Hierüber sollten erste Erkenntnisse im Zusammenhang mit einer möglichen Verdauungsresistenz abgeleitet werden. Verwendung fanden hierbei die nicht zentrifugierten Probelösungen, um Verluste auf Grund von

Proteinaggregationen zu reduzieren. Als Primärantikörper wurden die Erdnussallergikerseren US 4 und US 6 eingesetzt. In Abb. 86 sind die erhaltenen Western Blots dargestellt.

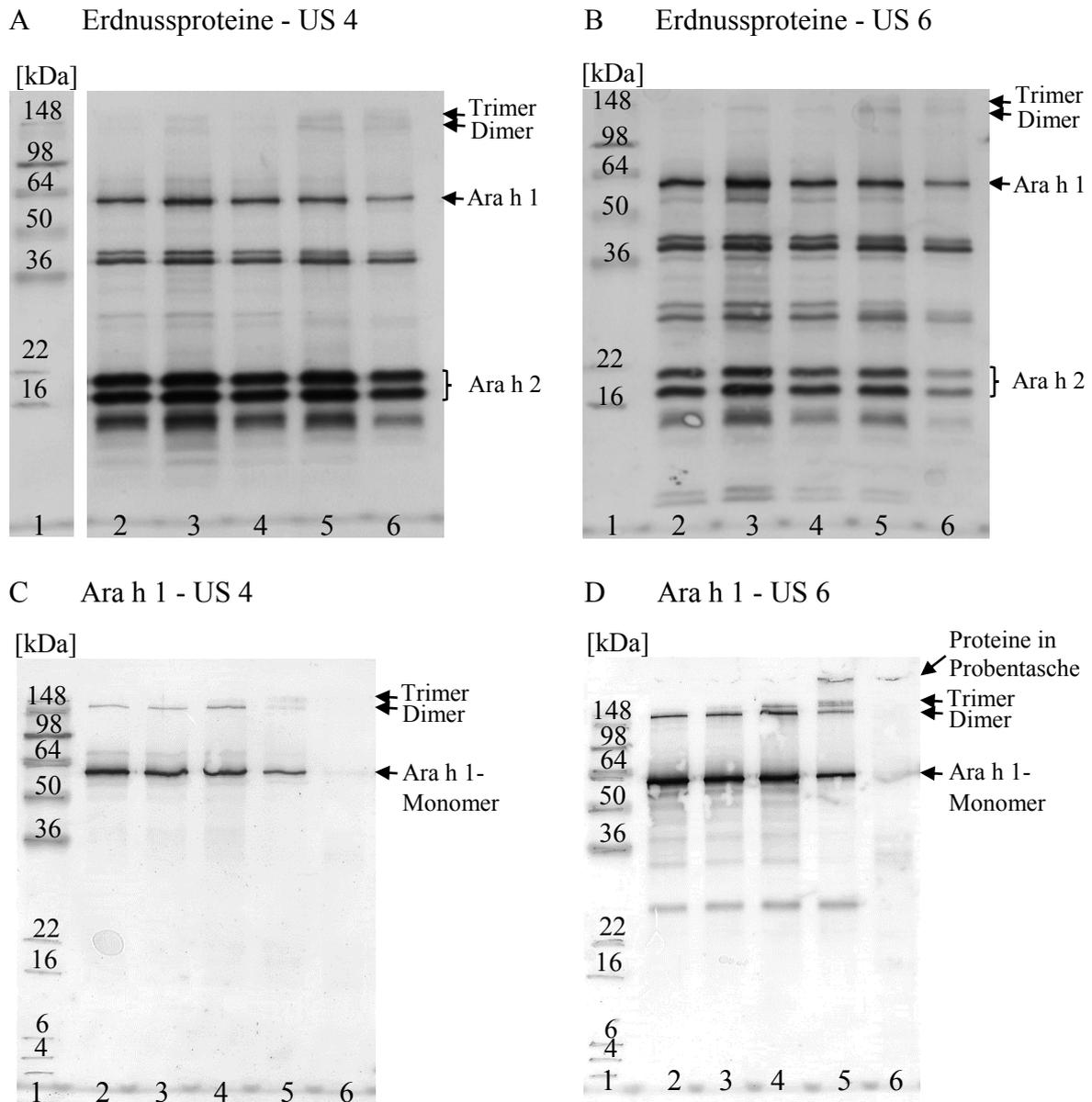


Abb. 86 Western Blots der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine und des mit 4-HNE modifizierten Ara h 1; (A) und (C): Verwendung des Erdnussallergikerserums US 4, (B) und (D): Verwendung des Erdnussallergikerserums US 6; Lane 1 - Marker, 2 - Blindwert, 3 - 0,1:1, 4 - 0,2:1, 5 - 1:1, 6 - 5:1 (Verhältnis 4-HNE : Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren)

Im Falle der modifizierten Erdnussproteine (Abb. 86A und B) war erkennbar, dass vor allem die beiden Erdnusshauptallergene Ara h 1 und Ara h 2 durch die in den Allergikerseren enthaltenen Antikörper gebunden wurden. Weiterhin war ersichtlich, dass beide Allergikerseren auch Antikörper gegen weitere Erdnussproteine enthielten. In Abhängigkeit des Modifizierungsgrads konnten Abnahmen der Intensitäten der Ara h 1- und Ara h 2-Banden beobachtet werden. Dies wurde besonders beim 5:1-Inkubationsansatz deutlich, wodurch vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden wie bereits mittels SDS-PAGE gezeigt (Kap. 4.3.4,

Abb. 49B). Die scheinbare Verringerung der Antikörperbindung war somit analog auf eine Aggregation der Proteine und ein damit einhergehendes Unlöslichwerden zurückzuführen. Dies konnte bereits bei der Probenaufarbeitung durch nicht vollständiges Lösen der Proteine im 5:1-Inkubationsansatz beobachtet werden. Ab dem 0,1:1-Inkubationsansatz waren Proteinaggregate im Western Blot sichtbar, die Molmassen der Ara h 1-Di- und Trimere aufwiesen. Im Falle des modifizierten Ara h 1 (Abb. 86C und D) konnte ebenfalls eine Zunahme der Intensität der Ara h 1-Dimerbande in Abhängigkeit des Modifizierungsgrads beobachtet werden. Das Vorliegen der Ara h 1-Dimerbande im Blindwert wurde auf eine unvollständige Reduktion zurückgeführt. Weiterhin konnte ab dem 1:1-Inkubationsansatz die Ausbildung einer Ara h 1-Trimerbande beobachtet werden. Im 5:1-Ansatz war die Proteinaggregation so ausgeprägt, dass die Banden nur noch mit sehr geringer Intensität wahrgenommen werden konnten. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der SDS-PAGE in Kap. 4.3.4, Abb. 50C überein. Des Weiteren zeigten sich im Falle des Blots in Abb. 86D, dass in den Probenauftragetaschen Proteinaggregate verblieben sind, die auf Grund ihrer Molekülgröße nicht in das Gel eintreten konnten. Diese waren in den Blots der Abb. 86A bis C nicht erkennbar, da hier die Probenauftragetaschen nicht mit geblottet wurden. Interessanterweise wurden sowohl bei den modifizierten Erdnussproteinen als auch im Falle des modifizierten Ara h 1 die Ara h 1-Dimere, -Trimere und -Oligomere durch die Antikörper aus den Allergikerseren gebunden. Somit waren die Epitope dieser lipierungsinduzierten Ara h 1-Aggregate für die Antikörper zugänglich. Da eine Oligomerisierung von Proteinen im Allgemeinen und des Ara h 1 im Speziellen die Verdaubarkeit im Vergleich zu den Proteinmonomeren reduzieren kann (Bogh et al., 2012; van Boxtel et al., 2006; Maleki et al., 2000b), könnte die Ausbildung lipierungsinduzierter Proteinaggregate das allergene Potential der Erdnussproteine erhöhen.

#### 4.6.1.2 Simulierter gastrointestinaler Verdau

Um den Einfluss der Lipierung und der Zubereitungsform der Erdnüsse auf die Verdaubarkeit der Erdnussproteine zu untersuchen, wurde eine simulierte gastrointestinale Verdauung durchgeführt. Hierzu wurde ein vereinfachtes Modell gewählt, welches sich auf die proteolytischen Verdauungsvorgänge im Magen (Pepsin) und Dünndarm (Corolase PP, Pankreasenzymextrakt) beschränkte. Hierüber sollten prinzipielle Unterschiede in der Verdaubarkeit aufgezeigt werden. Die methodische Grundlage stellte dabei die Arbeit von Hernández-Ledesma et al. (2004) dar, wobei einige Modifizierungen vorgenommen wurden. Die Pepsinaktivität wurde um den Faktor 10 für die Erdnussproben und um den Faktor 50 für die reinen, modifizierten Proteine reduziert. Des Weiteren wurde der Magenverdau auf 90 min

und der Dünndarmverdau auf 60 min verkürzt, da die M-Zellen der Peyer-Plaques, welche Peptide resorbieren können, bereits nach 16 min Transitzeit erreicht werden (Eiwegger et al., 2006). Die Corolaseaktivität wurde bei den Erdnussproben zusätzlich um den Faktor 10 reduziert. Die Probenahmen erfolgten im Falle des Pepsin- und Corolaseverdaus jeweils nach 5, 30 und 90 Minuten, beziehungsweise 5, 16 und 60 Minuten. Die aus dem Verdau der modifizierten Erdnussproteine erhaltenen Proben wurden anschließend freundlicherweise am Paul-Ehrlich-Institut (Langen) von Maren Krause mittels Western Blot unter Verwendung der monoklonalen Ara h 1-Antikörper und des Erdnussallergikerserums US 6 untersucht.

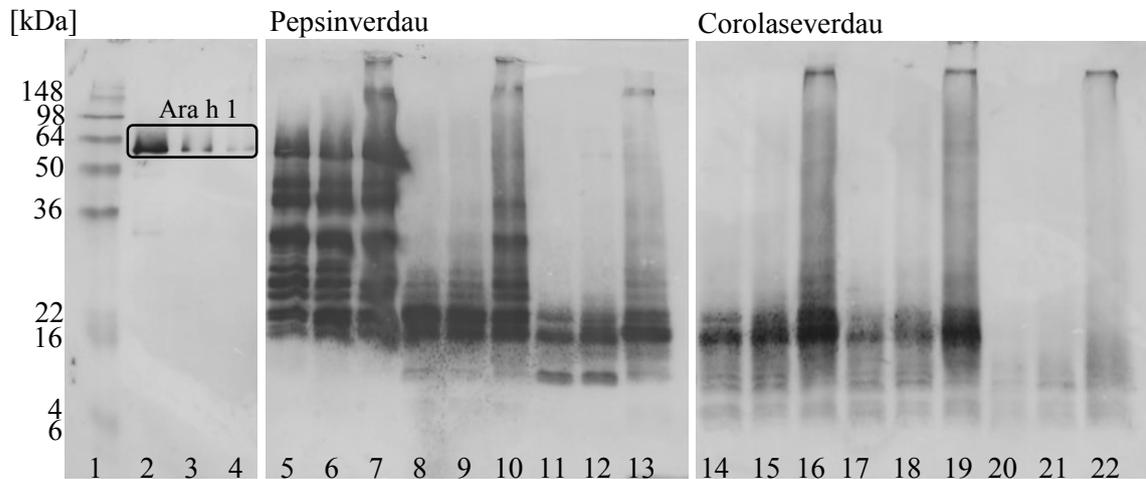
### **Modifizierte Erdnussproteine**

In Abb. 87 sind die erhaltenen Western Blots der mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine nach simulierter gastrointestinaler Verdauung dargestellt.

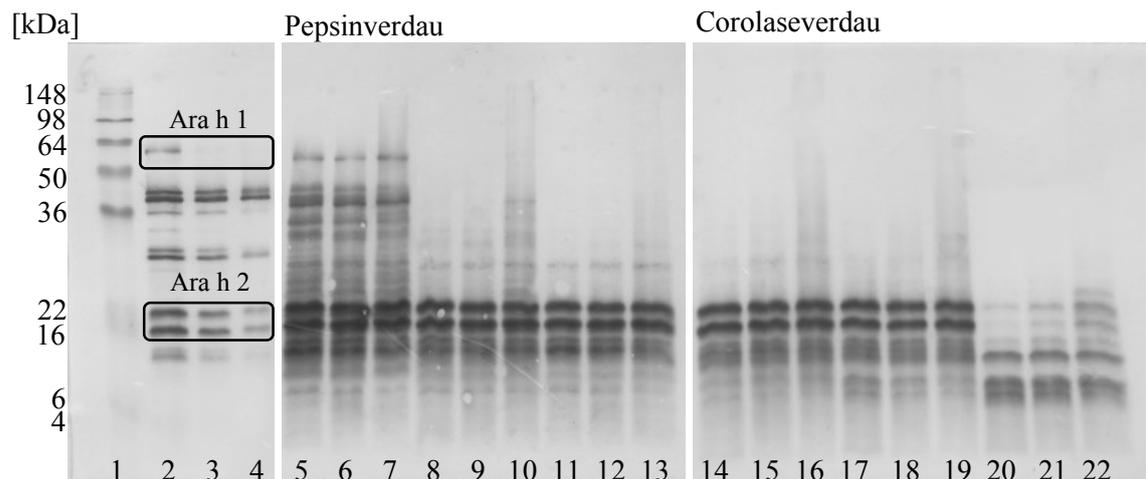
Bei Verwendung der **Ara h 1-Antikörper** (Abb. 87A) war bei den nicht verdauten Proben (Lanes 2 bis 4) nur die Ara h 1-Monomerbande im Bereich von 64 kDa sichtbar, deren Intensität mit zunehmendem Modifizierungsgrad abnahm. Diese Abnahme der Ara h 1-Bandenintensität konnte auch bei Verwendung des Erdnussallergikerserums US 6 (Abb. 87B, Lanes 2 bis 4) beobachtet werden. Die Ergebnisse waren somit mit den bereits erhaltenen Ergebnissen der SDS-PAGE vergleichbar (Kap. 4.3.4, Abb. 49B und Abb. 50C). Bei weiterer Betrachtung der Blots unter Verwendung der Ara h 1-Antikörper waren als Folge des Pepsinverdaus bis 90 min (Lanes 5 bis 13) Peptide erkennbar, die Abbauprodukte des Ara h 1 darstellten. Auch Eiwegger et al. (2006) konnten als Folge eines simulierten gastrointestinalen Verdaus einen schnellen Abbau des Ara h 1 zu stabilen kurzkettigen Peptiden feststellen. Dabei traten in der vorliegenden Arbeit verschmierte Bereiche innerhalb der Lanes auf, die auf die Entstehung einer Vielzahl von Peptiden mit sich geringfügig unterscheidenden molaren Massen hindeuteten. Dieser verschmierte Bereich war bei der 5:1-Probe am deutlichsten ausgeprägt. Als Folge des Verdaus mit Corolase PP (Lanes 14 bis 22) konnte der Abbau des Ara h 1 weiter verfolgt werden. Da die entstandenen Peptide im Western Blot sichtbar waren, ließ dies Rückschlüsse zu, dass diese noch intakte Epitope aufwiesen. Diese Ergebnisse stimmten mit den Studien von Eiwegger et al. (2006) überein, die ebenfalls nach simuliertem gastrointestinalen Verdau die IgE-Bindung der entstandenen Peptide aufzeigen konnten. Interessanterweise konnten deutliche Unterschiede zwischen den Proben der nicht modifizierten Erdnussproteine und der im Stoffmengenverhältnis 0,2:1 und 5:1, bezogen auf die potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin, mit 4-HNE inkubierten Proben festgestellt werden. So zeigte sich über den gesamten Verlauf des simulierten Verdaus, dass die nicht modifizierten Erdnussproteine schneller zu niedermolekularen Peptiden degradiert werden konnten als die mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine. Besonders deutlich wurde dies bei

Betrachtung der im Verhältnis 5:1 inkubierten Probe, da hier auch nach Corolaseverdau für 60 min (Lane 22) ein verschmierter Bereich über die gesamte Lane erkennbar war.

### A Ara h 1-Antikörper



### B Erdnussallergikerserum US 6



1	Marker	5	BW, Pepsinverdau 5 min	14	BW, Corolaseverdau 5 min
2	BW	6	0,2:1, Pepsinverdau 5 min	15	0,2:1, Corolaseverdau 5 min
3	0,2:1	7	5:1, Pepsinverdau 5 min	16	5:1, Corolaseverdau 5 min
4	5:1	8	BW, Pepsinverdau 30 min	17	BW, Corolaseverdau 16 min
		9	0,2:1, Pepsinverdau 30 min	18	0,2:1, Corolaseverdau 16 min
		10	5:1, Pepsinverdau 30 min	19	5:1, Corolaseverdau 16 min
		11	BW, Pepsinverdau 90 min	20	BW, Corolaseverdau 60 min
		12	0,2:1, Pepsinverdau 90 min	21	0,2:1, Corolaseverdau 60 min
		13	5:1, Pepsinverdau 90 min	22	5:1, Corolaseverdau 60 min

Abb. 87 Western Blots der simuliert gastrointestinal verdauten, mit 4-HNE modifizierten Erdnussproteine (4-HNE:Summe der potentiell reaktiven Aminosäuren), A - Verwendung von Ara h 1-Antikörpern, B - Verwendung des Erdnussallergikerserums US 6

Weiterhin zeigten sich bei der 5:1-Probe hochmolekulare Ara h 1-Aggregate im Übergang vom Sammelgel ins Trenngel, die bei den unverdauten Proben nicht erkennbar waren. Auch bei Betrachtung der Lanes der 0,1:1-Probe zeigte sich ein verschmierter Bereich, der Peptide mit größeren Molmassen als die der Ausgangsproteine aufwies. Dies deutete darauf hin, dass sich in den Probenflaschen, die nicht mit geblottet werden konnten, höhermolekulare Ara h 1-Aggregate befunden haben, aus denen über den Zeitraum des Verdaus Peptide freigesetzt wurden, die nachfolgend zu kurzkettigeren Peptiden abgebaut werden konnten. Die Beobachtung, dass auch nach simuliertem Dünndarmverdau für 60 min im Falle des nicht modifizierten Ara h 1 (Lane 20) niedermolekulare Peptide erkennbar waren, stimmt mit der in der Literatur für Ara h 1 beschriebenen Verdauungsresistenz überein (Maleki et al., 2000b).

Bei Verwendung des **Erdnussallergikerserums US 6** (Abb. 87B) konnten ebenfalls die bereits beschriebenen Unterschiede in der Verdaubarkeit festgestellt werden. Die nicht modifizierten Proteine wiesen generell Peptide mit niedrigeren molaren Massen als die im Verhältnis 0,2:1 modifizierte Probe auf, wohingegen die im Verhältnis 5:1 modifizierte Probe Peptide mit den höchsten Molmassen zeigte. Interessanterweise wiesen die nicht verdauten Proben 0,2:1 und 5:1 (Lanes 3 und 4) nur sehr geringe Intensitäten der Ara h 1-Banden auf, die allerdings nach einem Pepsinverdau von 5 min vergleichbar mit der Ara h 1-Bandenintensität der nicht modifizierten Probe waren. Weiterhin konnten, wie bereits bei Verwendung der Ara h 1-Antikörper, bei den Verdauungsansätzen der 5:1-Probe verschmierte Bereiche bis zum Beginn des Spacergels beobachtet werden. Dies bestätigte die vorherige Beobachtung, dass in den Probenauftragetaschen Proteinaggregate vorlagen, die auf Grund ihrer Molekülgröße nicht in das Gel eintreten konnten und im Zuge der Verdauung sukzessive degradiert wurden. Wie bereits diskutiert, waren diese Aggregate unter anderem aus Ara h 1-Monomeren aufgebaut. Somit könnten die von den Antikörpern des Allergikerserums erkannten Peptide innerhalb der verschmierten Bereiche Aggregate darstellen, die aus Ara h 1-Proteinen oder -Peptiden aufgebaut waren. Das Ara h 2, welches mit seiner charakteristischen Doppelbande im Bereich zwischen 16 und 22 kDa erkennbar war, zeigte im Vergleich zum Ara h 1 eine noch höhere Verdauungsresistenz und war auch in den Corolaseverdauansätzen nach 16 min noch erkennbar. Für diese Verdauungsresistenz wird das Vorhandensein von intramolekularen Disulfidbrücken verantwortlich gemacht (Sen et al., 2002). Interessanterweise zeigten sich in den Corolaseverdauansätzen nach 60 min Unterschiede in den Bandenintensitäten des Ara h 2 der drei Proben. So wies die nicht modifizierte Probe (Lane 20) die geringste Bandenintensität auf, die jedoch mit zunehmendem Modifizierungsgrad zunahm (Lanes 21 und 22). Dies deutete einerseits darauf hin, dass in den hochmolekularen Proteinaggregaten auch Ara h 2 involviert war, welches im Zuge des Verdaus analog des Ara h 1 ebenfalls kontinuierlich freigesetzt wurde. Andererseits könnte die Verdaubarkeit des Ara h 2 als Folge der Lipierung reduziert

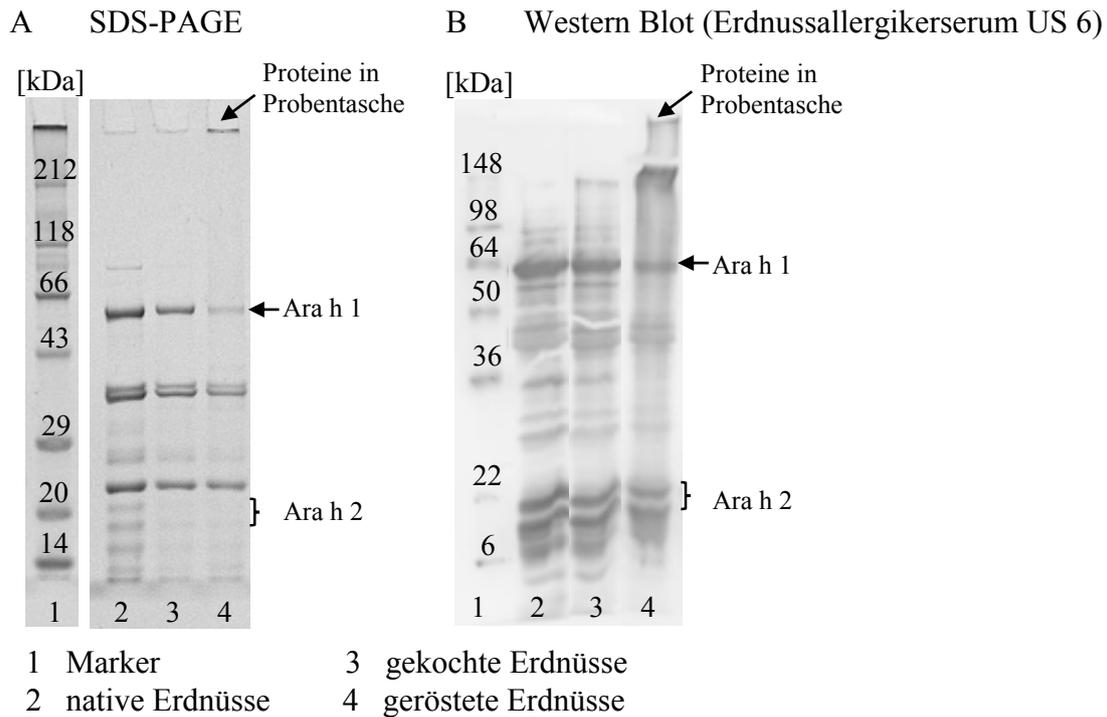
worden sein. Denkbar wäre eine Hydrophobisierung oder Umfaltung des im Vergleich zum Ara h 1 kleineren Proteins, woraus eine reduzierte Enzymzugänglichkeit resultieren könnte.

### **Native, gekochte und geröstete Erdnüsse**

Die Zubereitungsformen von Erdnüssen unterscheiden sich in den USA und China. In den USA werden Erdnüsse überwiegend geröstet verzehrt, in China in der Regel gekocht oder frittiert (Cong et al., 2008; Beyer et al., 2001). Die in der Literatur veröffentlichten Studien bezüglich der Auswirkungen auf die IgE-Bindungseigenschaften gekochter und gerösteter Erdnüsse im Vergleich zu den nativen Erdnüssen zeigen widersprüchliche Ergebnisse (Blanc et al., 2011; Mondoulet et al., 2003; Maleki et al., 2000a; Koppelman et al., 1999). Auf Grund des unterschiedlichen Eintrags an thermischer Energie ist es naheliegend, dass sich das Ausmaß der bei der Zubereitung der Erdnüsse ablaufenden Reaktionen (beispielsweise Lipierungs- und Maillard-Reaktionen) unterscheidet. Auf Grund hieraus möglicherweise resultierender unterschiedlicher Verdaubarkeiten könnten differierende Zubereitungsarten im Zusammenhang mit dem unterschiedlich häufigen Auftreten der Erdnussallergie in den USA und China stehen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit native, gekochte sowie geröstete Erdnüsse elektrophoretisch und mittels Western Blot untersucht, die Aminosäurezusammensetzungen verglichen sowie die Proben simuliert gastrointestinal verdaut. In Abb. 88 sind die Ergebnisse der SDS-PAGE, des Western Blots und der Aminosäureanalyse dargestellt.

Die gekochten Erdnüsse unterschieden sich bezüglich der Bandenintensitäten der einzelnen Proteine geringfügig von den nativen, ungerösteten Erdnüssen (Abb. 88A). Geringe Intensitätsabnahmen der Ara h 1- und Ara h 2-Banden waren zu beobachten. Turner et al. (2014) und Mondoulet et al. (2003) beobachteten als Folge des Kochens von Erdnüssen eine Extraktion der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7 in das Kochwasser. Im Falle der gerösteten Erdnüsse konnten, wie bereits in Kap. 4.3, Abb. 51 diskutiert, deutliche Intensitätsabnahmen der Ara h 1- und Ara h 2-Banden festgestellt werden. Des Weiteren war ein verschmierter Bereich ab 30 kDa bis zur Probenauftragetasche erkennbar, in welcher zudem Proteinaggregate vorlagen, die auf Grund ihrer Molekülgröße nicht in das Gel eintreten konnten. Dies war bei den nativen und gekochten Erdnüssen nicht zu beobachten. Die Proteine innerhalb des verschmierten Bereichs und in der Probenauftragetasche wurden von den Antikörpern eines Erdnussallergikerserums (US 6) erkannt (Abb. 88B). Dieser verschmierte Bereich war bei den gekochten Erdnüssen deutlich geringer ausgeprägt. Hierdurch wurde nochmals der Unterschied zwischen den gekochten und den gerösteten Erdnüssen bezüglich der Ausbildung höhermolekularer Aggregate bestätigt und andererseits wurde deutlich, dass die aggregierten Proteine immer noch zugängliche Epitope aufwiesen. Die Ergebnisse waren mit den Ergebnissen des Western Blots der gezielten Lipierung der Erdnussproteine durch 4-HNE vergleichbar (Abb. 86A und B). Anhand der Aminosäurezusammensetzung (Abb. 88C) zeigte

sich, dass sich die gekochten Erdnüsse bezüglich ihrer Gehalte an den potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin nicht signifikant von den nativen Erdnüssen unterscheiden. Bei den gerösteten Erdnüssen betrugen die Aminosäureabnahmen von Cystein, Histidin und Lysin jeweils 17 %, 14 % und 21 %. Die Gehalte an Arginin unterschieden sich nicht signifikant von den nativen Erdnüssen. Wie bereits in Kap. 4.1.1, Abb. 31 gezeigt, wies die Handelsprobe eine vergleichbare Aminosäurezusammensetzung wie die im Labormaßstab für 20 min gerösteten Erdnüsse auf.



C Aminosäureanalyse

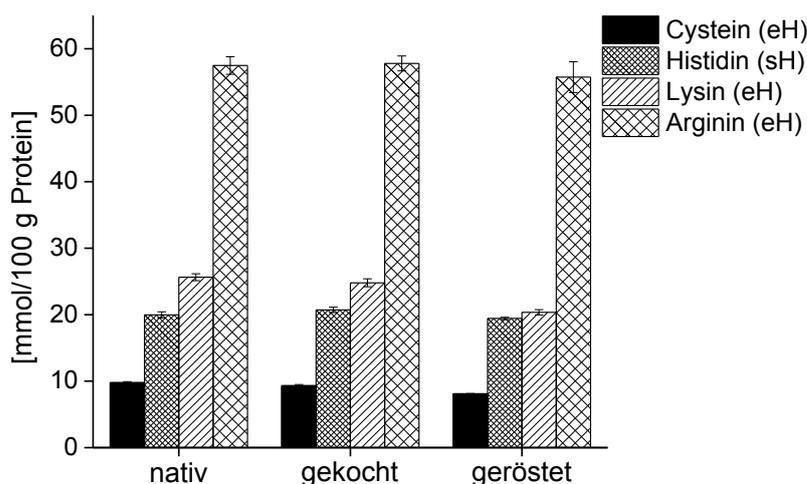


Abb. 88 (A) SDS-PAGE (reduziert, isokratisch, 9 % Acrylamid), (B) Western Blot (reduziert) unter Verwendung des Erdnussallergikerserums US 6 und (C) Aminosäurezusammensetzungen der nativen, gekochten (100 °C, 20 min) und gerösteten (170 °C, 20 min) Erdnussproben, eH - nach enzymatischer Hydrolyse bestimmt, sH - nach salzsaurer Hydrolyse bestimmt

Somit wird deutlich, dass die Zubereitungsart der Erdnüsse einen Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung hat. Hierdurch kann der Rückschluss erfolgen, dass sich die als Folge der Zubereitung ablaufenden Reaktionen ebenfalls unterscheiden haben müssen. Als Folge des Erdnusskochens konnten keine quervernetzten Proteine beobachtet werden und die Aminosäuregehalte unterschieden sich nicht von denjenigen nativer Erdnüsse. Somit mussten in Folge des Kochens im Vergleich zur Röstung Reaktionen wie Lipierungs- oder Maillard-Reaktionen in geringerem Maße ablaufen sein. Die als Folge des Röstens entstandenen Proteinaggregate könnten, wie bereits zuvor anhand der simulierten gastrointestinalen Verdauung der gezielt mit 4-HNE lipierten Erdnussproteine (Kap. 4.6.1.2, Abb. 87) gezeigt, die Verdaubarkeit gerösteter Erdnüsse reduzieren.

Um den Einfluss der Zubereitung auf die Verdaubarkeit zu untersuchen, wurden die Erdnussproben simuliert gastrointestinal verdaut und nachfolgend mittels SDS-PAGE untersucht. In Abb. 89 sind die erhaltenen Elektropherogramme dargestellt.

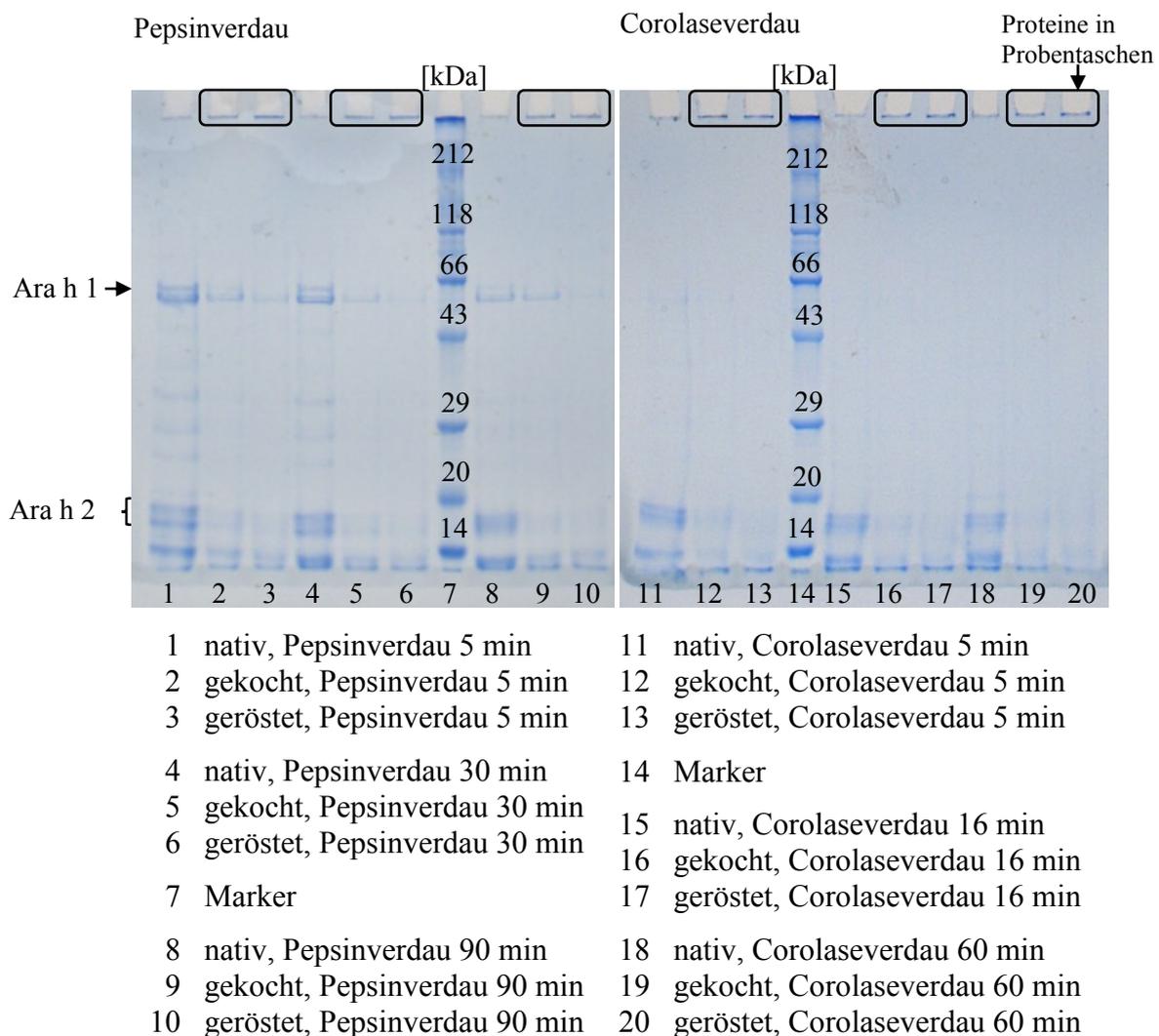


Abb. 89 SDS-PAGE der simuliert gastrointestinal verdauten nativen, gekochten (100 °C, 20 min) und gerösteten (170 °C, 20 min) Erdnussproben (nicht reduziert, isokratisch, 9 % Acrylamid)

Beim Vergleich der nativen, gekochten und gerösteten Proben nach 5-minütigem Pepsinverdau (Abb. 89, Lanes 1 bis 3) zeigte sich, dass die Intensitäten der Proteine und Peptide, die innerhalb der Lanes erkennbar waren, in folgende Reihenfolge gebracht werden konnten: native Erdnüsse > gekochte Erdnüsse > geröstete Erdnüsse. Dies ließ den Rückschluss zu, dass die Proteinextraktion aus den ungerösteten Erdnüssen in das wässrige Verdauungsmedium mit höherer Ausbeute verlief, als dies bei den gerösteten Erdnüssen erfolgte. Bei den gekochten Erdnüssen zeigte sich die Bande des Ara h 1 mit höherer Intensität als bei den gerösteten Erdnüssen, weshalb die Proteinextraktionsausbeute zwischen der der ungerösteten und den gerösteten Erdnüssen eingestuft wurde. Weiterhin waren bei den gekochten und gerösteten Erdnüssen Proteine in den Probenauftragetaschen erkennbar, wobei die Intensität bei den gerösteten Erdnüssen höher war. Somit deuteten die gut sichtbaren Protein- und Peptidbanden bei den ungerösteten Erdnüssen auf niedermolekulare Proteine und Peptide sowie eine gute Extrahierbarkeit aus den zur Verdauung eingesetzten Erdnussproben hin, wodurch diese für die Verdauungsenzyme zugänglich waren. Im Gegensatz dazu wies bei den gerösteten Erdnüssen die geringe Freisetzung aus den Proteinaggregaten auf eine geringere Extrahierbarkeit auf Grund der Bildung hochmolekularer Proteinaggregate und somit eine geringere Zugänglichkeit für die Verdauungsenzyme hin. Anhand der nachfolgenden Pepsin-Verdauungsschritte (Lanes 4 bis 10) wurde deutlich, dass die extrahierten Proteine aller Proben abgebaut wurden. Im Falle der gerösteten Erdnüsse zeigte sich nach 90-minütigem Verdau (Lane 10), dass die Bande des Ara h 1 nicht mehr erkennbar war. Dies deutete darauf hin, dass im Falle der gerösteten Erdnüsse keine weitere Proteinextraktion aus den Proteinaggregaten erfolgte, sondern die bereits zu Beginn extrahierbaren Proteine abgebaut wurden. Im Falle der gekochten Erdnüsse (Lane 9) war die Bande des Ara h 1 nach 90-minütigem Pepsinverdau noch erkennbar und vergleichbar mit der Intensität der nativen Erdnüsse (Lane 8). Dies ließ den Rückschluss zu, dass im Falle der gekochten und nativen Erdnüsse eine kontinuierliche Proteinextraktion aus den Erdnüssen erfolgt ist. Als Folge des Corolaseverdau (Lanes 11 bis 20) wurden die Proteine und Peptide der nativen und gekochten Erdnussproben (Lanes 11 und 12) weiter abgebaut. Eine weitere Freisetzung der Proteine aus den Aggregaten der gekochten und gerösteten Erdnüsse wurde nicht beobachtet. Dies wurde anhand der in den Probenauftragetaschen verbliebenen Proteinaggregate nach 60-minütigem Corolaseverdau sichtbar. Im Falle der gerösteten Erdnüsse (Lane 20) zeigten diese eine höhere Intensität als bei den gekochten Erdnüssen (Lane 19). Zusätzlich wurden die Proben mittels Western-Blot unter Verwendung des Erdnussallergikerserums US 6 untersucht. Dabei zeigte sich ein analoges Bild wie in Abb. 89 dargestellt, wobei die Probenauftragetaschen allerdings nicht mit geblottet werden konnten, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob diese hochmolekularen Proteine oder Peptide von den Antikörpern gebunden wurden.

Die Reihenfolge der Verdaubarkeit der untersuchten Erdnussproben ließ sich somit wie folgt angeben: native Erdnüsse > gekochte Erdnüsse > geröstete Erdnüsse. Mögliche Ursachen für die abnehmende Verdaubarkeit in Abhängigkeit des Eintrags thermischer Energie könnten Lipierungs- und Maillard-Reaktionen gewesen sein. Hierdurch verursachte Proteinmodifizierungen können die Verdaubarkeit der Erdnussproben verringern (siehe hierzu Kap. 2.2.4). Kopper et al. (2005) zeigten, dass eine Zugabe von  $\alpha$ -Amylase zu Peptidasen die Verdaubarkeit gerösteter Erdnüsse verbesserte, da hierdurch hochmolekulare Aggregate abgebaut werden konnten. Da es sich bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Corolase PP um ein Pankreasenzymgemisch handelte, welches somit auch  $\alpha$ -Amylase enthielt (Heinrich et al., 2014), konnte ausgesagt werden, dass ein natürliches Verhältnis von  $\alpha$ -Amylase zu Peptidasen die Proteinaggregate nicht vollständig abbauen konnte. Maleki et al. (2014) zeigten anhand wässriger Proteinextrakte roher, gekochter und gerösteter Erdnüsse, dass die Verdaubarkeiten der extrahierten rohen und gekochten Proteine vergleichbar waren, wohingegen die Proteine aus gerösteten Erdnüssen schlechter verdaut werden konnten.

Im Falle der in der vorliegenden Arbeit gerösteten Erdnüsse konnte keine definitive Aussage darüber erfolgen, wodurch die Proteinquervernetzungen, die zur Aggregatbildung führten, induziert wurden. Wie allerdings anhand der gezielten Modifizierung der Erdnussproteine durch 4-HNE gezeigt wurde, waren lipierungs-induzierte Proteinaggregate schlechter verdaubar als die nicht modifizierten Proteine. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Sekundärprodukte, wie Acrolein, MDA und 4-HNE, in den Erdnüssen nachgewiesen werden konnten (Kap. 4.2), die in der Lage sind, Erdnussproteine quervernetzen (Kap. 4.3). Somit könnten auch die als Folge der Erdnussröstung beobachteten Proteinaggregate (4.6.1.2, Abb. 88A) zumindest teilweise lipierungs-induziert quervernetzt gewesen sein.

Weiterhin könnten auch Reaktionen zwischen Proteinen und Lipiden die Verdaubarkeit negativ beeinflusst haben (siehe hierzu Kap. 4.5.4). Einerseits könnte hierdurch die Zugänglichkeit der Verdauungsenzyme und andererseits auch die Extrahierbarkeit der Proteine in das Verdauungsmedium auf Grund der erhöhten Hydrophobizität reduziert worden sein. Trotz des in der vorliegenden Arbeit verwendeten einfachen Verdauungsmodells konnten erste Hinweise bezüglich der Unterschiede in der Verdaubarkeit gekochter und gerösteter Erdnüsse erhalten werden. Eine weitere Annäherung des Verdauungsmodells an den menschlichen gastrointestinalen Verdau, beispielsweise durch Verwendung von Gallensalzen, könnte die Aktivität der in der Corolase enthaltenen Lipasen erhöhen und somit noch detailliertere Informationen liefern. Direkte Untersuchungen bezüglich der Verdaubarkeit unterschiedlich zubereiteter Erdnüsse sind bisher in der Literatur nicht veröffentlicht.

### 4.6.1.3 Fazit

Mittels ELISA und Western-Blots wurde gezeigt, dass eine **gezielte Lipierung der nativen Erdnussproteine mit 4-HNE** das Antikörperbindungsvermögen nicht beeinflusste. Somit konnte die Bildung von Neoepitopen ausgeschlossen werden. Analoge Ergebnisse erhielt Wellner (2012a) nach gezielter Glykierung von Erdnussproteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde in Abhängigkeit des Modifizierungsgrads die Ausbildung höhermolekularer Proteinaggregate beobachtet. Die als Folge des Verdaus modifizierter Erdnussproteine entstandenen Peptide wurden durch Antikörper eines Erdnussallergikerserums erkannt. Rückschließend wiesen diese Peptide demnach intakte Epitope auf. Weiterhin wurde in Abhängigkeit des Modifizierungsgrads eine erhöhte Verdauungsresistenz festgestellt, welche auf die Ausbildung der eingangs erwähnten höhermolekularen Proteinaggregate zurückgeführt werden konnte. In diesen Aggregaten wurde mittels Ara h 1-Antikörpern das Vorhandensein von Ara h 1 nachgewiesen. Weiterhin wurden Hinweise dahingehend erhalten, dass auch Ara h 2 involviert war.

Die Erdnussallergie tritt in den USA mit höherer Wahrscheinlichkeit auf als in China (Beyer et al., 2001) und Erdnüsse zählen in Asien nicht zu den Hauptnahrungsmittelallergenen (Beyer et al., 2001; Hill et al., 1997). Die Verzehrsmengen sind allerdings mit jeweils 3 kg pro Einwohner und Jahr vergleichbar und ein unterschiedlicher Genpool konnte nicht als Ursache ausgemacht gemacht werden (Beyer et al., 2001). Ursächlich wird die Zubereitungsform der Erdnüsse diskutiert. In den USA werden Erdnüsse überwiegend geröstet verzehrt, wohingegen sie in China gekocht oder frittiert werden (Beyer et al., 2001). Somit ist die Vermutung naheliegend, dass auf Grund des geringeren Eintrags an thermischer Energie beim Erdnusskochen im Vergleich zur Röstung chemische Reaktionen weniger ausgeprägt ablaufen und sich dies unterschiedlich auf das allergene Potential auswirken könnte. Mittels Elektrophorese und Western Blot konnte gezeigt werden, dass es als Folge der **Erdnussröstung** zur Ausbildung von Proteinaggregaten kam, die sich in einem verschmierten Bereich auf dem Elektrophoreseigel zeigten und teilweise auf Grund ihrer Molekülgröße nicht in das Gel eintreten konnten wodurch sie in den Probenauftragetaschen verblieben. Diese Proteinaggregate wurden durch Antikörper eines Erdnussallergikerserums erkannt. Die Ergebnisse waren somit mit den Ergebnissen des Western Blots der Lipierung der Erdnussproteine mit 4-HNE vergleichbar. Weiterhin waren deutliche Reduktionen der Bandenintensitäten des Ara h 1, Ara h 2 sowie weiterer Erdnussproteine erkennbar. Die gekochte Probe zeigte keine Proteinaggregate in der Probenauftragetasche und lag bezüglich ihrer Proteinbandenintensitäten zwischen denjenigen nativer und gerösteter Erdnüsse. Hierbei dürfte vor allem eine Extraktion von Erdnussproteinen in das Kochwasser analog Turner et al. (2014) und Mondoulet et al. (2003) eine Rolle gespielt haben. Mittels Aminosäureanalyse wurde gezeigt, dass sich die

gekochten Erdnüsse bezüglich ihrer Gehalte an Cystein, Histidin, Lysin und Arginin nicht signifikant von denjenigen nativer Erdnüsse unterschieden, wohingegen bei den gerösteten Erdnüssen die Aminosäureabnahmen von Cystein, Histidin und Lysin jeweils 17 %, 14 % und 21 % betragen. Anhand einer simulierten gastrointestinalen Verdauung kann die Reihenfolge der Verdaubarkeit der Erdnussproben wie folgt angegeben werden: native Erdnüsse > gekochte Erdnüsse > geröstete Erdnüsse. Hierbei lagen bei den gerösteten Erdnüssen Proteinaggregate in den Probeauftragetaschen vor, die im Zuge des proteolytischen Verdaus nicht freigesetzt werden konnten.

Werden diese Beobachtungen auf den **Verzehr gerösteter Erdnüsse** übertragen, so könnten nach gastrointestinaler Verdauung ebenfalls Peptide mit intakten Epitopen resultieren. Diese stellen die Grundvoraussetzung zur gastrointestinalen Sensibilisierung gegenüber den Erdnussallergenen dar. Als Folge des Erdnussröstens kommt es zu Lipierungs- und Maillard-Reaktionen (Kap. 4.1.2 und Kap. 4.5). Diese beiden Reaktionen können zur Proteinquervernetzung und somit zur Ausbildung höhermolekularer Proteinaggregate beitragen (Kap. 4.3 und Wellner (2012a)). Generell wirken sich Proteinquervernetzungen negativ auf die gastrointestinale Verdaubarkeit aus (Bogh et al., 2012; van Boxtel et al., 2006; Breiteneder & Mills, 2005; Bannon, 2004; Maleki et al., 2000b). Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachteten verringerten Verdaubarkeit dieser Proteinaggregate besteht somit die Wahrscheinlichkeit zur Resorption von Peptiden mit intakten Epitopen. Zur Einleitung einer allergischen Reaktion muss eine Quervernetzung von FcεR1 auf der Mastzelloberfläche erfolgen. Somit muss das resorbierte Antigen mindestens zwei intakte Epitope aufweisen, woraus sich eine Mindestantigengröße von 30 Aminosäuren oder etwa 3 kDa ableiten lässt (Huby et al., 2000). Die Resorption von Peptiden mit mindestens zwei intakten Epitopen stellt somit eine Grundvoraussetzung zur Sensibilisierung und späteren allergischen Reaktion dar. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des 4-HNE gezeigt, dass die Lipierung zur Ausbildung höhermolekularer Proteinaggregate führte. Diese waren unter anderem aus Ara h 1-Proteinen aufgebaut. In Folge des simulierten gastrointestinalen Verdaus konnten aus diesen Aggregaten Ara h 1-Peptide mit intakten Epitopen freigesetzt werden. Diese lagen auch nach einem 16-minütigen Corolaseverdau vor, wonach die M-Zellen der Peyer-Plaques erreicht werden und es somit zur Resorption dieser Peptide kommen könnte (Eiwegger et al., 2006). Da auch die Antikörper des Erdnussallergikerserums diese Peptide binden konnten, wäre eine Erkennung im menschlichen Organismus denkbar. Des Weiteren könnte sich, auf Grund des langsamen Abbaus der Proteinaggregate lipierter oder gerösteter Erdnüsse im Vergleich zu den nativen Proteinen oder Erdnüssen, die Verweilzeit der Peptide im Gastrointestinaltrakt erhöhen. Da eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung Voraussetzung für die Allergieentstehung ist, kann geschlussfolgert werden, dass eine geringe Anzahl oder eine nur

kurzzeitige Präsentation an Antigenfragmenten auf den APC eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung begünstigen könnte (Huby et al., 2000). Hierzu könnte eine langsame, dafür allerdings kontinuierlichere Freisetzung an Peptiden mit intakten Epitopen beitragen, wodurch sich erneut die Wahrscheinlichkeit der Sensibilisierung gegenüber diesen Peptiden erhöhen könnte. Auch Kopper et al. (2005) diskutierten, dass die durch eine Erdnussröstung unlöslich gewordenen und daher die gastrointestinale Verdauung überstehenden Proteine zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzt und dadurch zur Sensibilisierung oder allergischen Reaktion führen könnten.

Wird die **unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens der Erdnussallergie** in den USA und China betrachtet, könnte eine mögliche Ursache eine unterschiedliche Wahrscheinlichkeit zur Sensibilisierung gegenüber den Erdnussproteinen darstellen. Hierauf können neben den in Kap. 2.2.4 diskutierten Ursachen Unterschiede in der Verdaubarkeit der Erdnüsse einen direkten Einfluss haben. Da es als Folge des Kochens der Erdnüsse im Vergleich zum Rösten nur geringfügig zur Ausbildung von Proteinaggregaten kam und diese im Modellansatz besser verdaut werden konnten, wurden Hinweise dahingehend erhalten, dass gekochte Erdnüsse nach ihrem Verzehr ebenfalls besser verdaut werden können. Dies könnte somit zu der unterschiedlichen Häufigkeit des Auftretens der Erdnussallergie in den USA und China beitragen.

Somit sollte bei der **Beurteilung des allergenen Potentials** von Erdnüssen und Lebensmittelproteinen im Allgemeinen nicht nur das IgE-Bindungsvermögen betrachtet werden, sondern auch die Verdaubarkeit der prozessierten Proteine. Die in der Literatur (Blanc et al., 2011; Mondoulet et al., 2003; Maleki et al., 2000a; Koppelman et al., 1999) publizierten widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen auf die IgE-Bindungseigenschaften gekochter und gerösteter Erdnüsse im Vergleich zu den nativen Erdnüssen könnten auf uneinheitliche Proteinextraktionsmethoden zurückzuführen sein. Vor allem als Folge der Erdnussröstung tritt eine Reduktion der Proteinlöslichkeit im Bereich von 75 bis 80 % im Vergleich zu den ungerösteten Erdnüssen auf (Turner et al., 2014; Poms et al., 2004). Damit können in Abhängigkeit der Röstbedingungen unterschiedliche Anteile an Erdnussallergenen extrahiert werden, weshalb standardisierte Detektionsbedingungen zur Erdnussallergenanalytik gefordert werden (Poms et al., 2004).

Als Schlussfolgerung sind nachfolgend einige Faktoren zusammengefasst, die einen Einfluss auf die Sensibilisierung gegenüber Erdnussallergenen im Speziellen und Lebensmittelallergenen im Allgemeinen haben können. Hierzu wurde sich an Petersen et al. (2013), Lepski & Brockmeyer (2013), Becker et al. (2011), Sicherer & Sampson (2007) und Huby et al. (2000) orientiert sowie die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit einbezogen:

1. **Genetische, immunogene, umweltbedingte Faktoren:** geographischer Aufenthaltsort; genetische Prädisposition; Verzehr des Allergens während der Schwangerschaft; Verzehr

des Allergens während der Stillzeit; Hygienebedingungen (Helm & Burks, 2000); Häufigkeit und Zeitpunkt des Verzehrs; Verzehrsmenge; Kreuzreaktionen; Exposition (beispielsweise auch durch Verwendung allergenenthaltender Salben).

2. **Eigenschaften des potentiellen Allergens:** molare Masse; Anzahl der Epitope; Art der Epitope (lineare Epitope oder Konformationsepitope); Stabilität der Proteinstruktur und damit einhergehende Verdauungsstabilität; Proteaseaktivität des Allergens; Möglichkeit zur Beeinflussung des Komplementsystems; Zubereitung des Lebensmittels und damit einhergehende Veränderungen der Proteinstruktur.
3. **Allergenmatrix:** Anwesenheit von Emulgatoren, wodurch ein inkomplettes Freund-Adjuvans erzeugt werden kann; Einnahme von Antazida; posttranslationale Aminosäuremodifizierungen des Proteins durch Lipierungs- oder Maillard-Reaktionen in Folge der Reaktion mit Sekundärprodukten der Lipidperoxidation oder reduzierenden Zuckerkomponenten in Abhängigkeit der Zubereitungsart; hohe Linolsäuregehalte oder ein niedriges Verhältnis von Linolen- zu Linolsäure (Gu et al., 1998; Kuwamori et al., 1997).

## 5 Ausblick und orientierende weiterführende Untersuchungen

### 5.1 Lebensmittel

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Aminosäureanalyse gezeigt, dass sich die Aminosäurezusammensetzungen der nativen und gekochten Erdnüsse nicht signifikant unterschieden, wohingegen im Falle der gerösteten Erdnüsse deutliche Unterschiede feststellbar waren. Ausblickend könnten aus diesem Grund Lipierungs- und Maillard-Reaktionsprodukte in den gekochten Erdnüssen bestimmt werden, um ein noch vollständigeres Bild darüber zu erhalten, inwiefern entsprechende Reaktionen als Folge des Kochens weniger stark ablaufen. Zur weiteren Absicherung der identifizierten Lipierungsprodukte, welche aus dem Inkubationsmodell von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit ausgewählten Sekundärprodukten resultierten, sollten bisher nicht dargestellte Verbindungen ebenfalls dargestellt und chemisch charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass auch der nach der Abspaltung eines flüchtigen Sekundärprodukts zurückbleibende Fettsäurerest in der Lage ist, Lipierungsreaktionen einzugehen. Da unter Berücksichtigung der quantifizierten Lipierungs- und Maillard-Reaktionsprodukte in den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüssen jeweils 83 % und 89 % des Lysinverlusts nicht erklärt werden können, sollten, um die Relevanz entsprechender Reaktionen als Folge der Erdnussröstung zu untersuchen, entsprechende Lipierungsprodukte dargestellt und massenspektrometrische Quantifizierungsmethoden etabliert werden. Auf Grund ihrer Stabilität könnte sich hierbei die Darstellung der aus der ε-Aminogruppe des Lysins und 9-Oxononansäure hervorgehenden 2-Acetamido-6-[(9-methoxy-9-oxo-nonyl)amino]-hexansäure als vielversprechend erweisen. Eine Freisetzung aus dem Protein-Lipid-Verband könnte nach Reduktion mittels salzsaurer Hydrolyse realisiert werden.

Sowohl als Folge einer gezielten Lipierung extrahierter Erdnussproteine als auch des Erdnussröstens wurde die Bildung von Proteinaggregaten beobachtet, die kovalent quervernetzt waren. Anhand einer simulierten gastrointestinalen Verdauung wurden Hinweise dahingehend erhalten, dass diese Proteinaggregate weniger schnell abgebaut werden können als die nativen Proteine. Die gekochten Erdnüsse konnten bezüglich der Verdaubarkeit ihrer Proteine zwischen den nativen und gerösteten Erdnüssen eingestuft werden. Dieses Modell könnte beispielsweise durch Nachahmen der Darmperistaltik noch näher an die menschliche Verdauung angelehnt werden.

Unterschiede in der Verdaubarkeit der gekochten und gerösteten Erdnüsse könnten dazu führen, dass aus den Proteinaggregaten der gerösteten Erdnüsse über einen längeren Zeitraum Peptide

proteolytisch freigesetzt werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Sensibilisierung erhöht wäre. Um diese Vermutung experimentell zu überprüfen, könnten die Stoffmengen an Ara h 1-Peptiden im Blut von Probanden quantifiziert werden. Würden Unterschiede in der Verdaubarkeit der gekochten und gerösteten Erdnüsse existieren, wären diese Peptide im Falle der gerösteten Erdnüsse über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Eine Detektion könnte hierbei massenspektrometrisch oder mittels ELISA erfolgen.

## 5.2 Physiologische Systeme

### 5.2.1 Lipierungsreaktionen am Low Density Lipoprotein (LDL)

Der Transport von Lipiden im Blut erfolgt in Form von Lipoproteinen, die Komplexe aus Proteinen und Lipiden darstellen. Diese Lipoproteine unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihres Lipidgehalts als auch in ihrem Lipid-Protein-Verhältnis und können mittels Ultrazentrifugation in vier Hauptklassen aufgetrennt werden. In aufsteigender Reihenfolge ihrer Dichten sind dies Chylomikronen, very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) und high density lipoproteins (HDL) (Heinrich et al., 2014).

Von besonderem Interesse ist hierbei das LDL, da der LDL-Cholesterinspiegel einen Risikofaktor für atherosklerotische Gefäßveränderungen darstellt (Morawietz, 2010). Dieses weist in Abhängigkeit seiner Lipidzusammensetzung eine molare Masse im Bereich von 2000 bis 3500 kDa, eine Dichte von 1,019 bis 1,063 g/ml und einen Durchmesser von 18 bis 25 nm auf (Heinrich et al., 2014; Goldstein & Brown, 1977). Es ist aus 6 % Triacylglyceriden, 50 % Cholesterol und Cholesterolestern, 22 % Phospholipiden und 22 % Apolipoproteinen zusammengesetzt, wovon das Apolipoprotein B<sub>100</sub> (Apo B<sub>100</sub>) 95 % ausmacht (Heinrich et al., 2014). Nach Esterbauer et al. (1990b) bilden die Cholesterolester und Triacylglyceride einen hydrophoben Kern, der von Phospholipiden und freiem Cholesterol umgeben ist. In diese Schicht ist das Apo B<sub>100</sub> eingebettet (Esterbauer et al., 1990b), welches aus 4536 Aminosäuren aufgebaut ist und eine molare Masse von 513 kDa aufweist (Yang et al., 1986). Lysin stellt mit einem berechneten Molmassenanteil von 8,9 % die dritthäufigste Aminosäure nach Leucin und Serin dar (UniProt\_Apo B-100). Von den 2700 Fettsäuremolekülen innerhalb des LDL-Partikels sind 1300 Fettsäuren ungesättigt (Esterbauer et al., 1990b). Wird die Fettsäurezusammensetzung betrachtet, so zeigt sich, dass die Linolsäure dominiert, deren Vorkommen innerhalb des LDL-Partikels mit 1100 Molekülen angegeben wird (Esterbauer et al., 1990b).

Da Linolsäure unter anderem ein Precursor für die Bildung von Acrolein und 4-HNE darstellt (Ewert et al., 2014; Esterbauer et al., 1991), ist als Folge einer ablaufenden Lipidperoxidation die Bildung von 4-HNE und Acrolein innerhalb des LDL-Moleküls möglich. Das Vorkommen von freiem 4-HNE und Acrolein in nLDL und oxLDL ist bekannt (Uchida et al., 1998; Esterbauer et al., 1990b; Esterbauer et al., 1987). Hierdurch besteht die Möglichkeit zur Bildung entsprechender Lipierungsprodukte.

Unter anderem werden oxidative Veränderungen im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose diskutiert. Als Folge von Gefäßverletzungen (Läsionen) der Arterien kann es zur Akkumulation von Lipoproteinen innerhalb des Blutgefäßes und zur Anreicherung von Monozyten, die ebenfalls in das Blutgefäß transmigrieren, kommen. Dort tritt eine Proliferation und Differenzierung zu Makrophagen ein, welche schließlich die Lipoproteine aufnehmen und es zur Bildung von Schaumzellen kommt. Hierbei wird bevorzugt oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL) aufgenommen, welches über die Zwischenstufe des minimal modifizierten LDL vor allem als Folge der Lipidperoxidation gebildet wird. Die Aufnahme erfolgt über Scavenger-Rezeptoren LOX-1, SR-A, CLA-1/SR-BI, SR-PSOX sowie CD36 und CD68. Absterbende Schaumzellen geben ihren Lipidinhalt innerhalb der Läsionen ab. Diese sogenannten fatty streaks führen zur Akkumulation glatter Muskelzellen und es kann zur Bildung fibröser Plaques kommen, welche weiter wachsen und schließlich die Gefäßwandung durchbrechen und in das Lumen eindringen können. Ein weiteres Wachstum führt zu Gefäßverengungen. Kommt es zu einer Ruptur der Plaques, ist die Entstehung eines Gefäßverschlusses möglich, wodurch ein Herzinfarkt oder ein Schlaganfall die Folge sein können (Morawietz, 2010; Lusis, 2000).

Erkenntnisse darüber, wodurch sich oxLDL und natives LDL (nLDL) unterscheiden, sind in der Literatur bisher nur wenige bekannt. So ist veröffentlicht, dass unter anderem oxidierte Fettsäuren und deren Sekundärprodukte, oxidierte und quervernetzte Aminosäuren sowie Lipierungsprodukte (siehe hierzu Kap. 2.4.5) Bestandteile des oxLDL sein können. Eine einheitliche Definition, die auch unterschiedliche Oxidationsstadien des LDL-Partikels berücksichtigt, existiert nicht (Parthasarathy et al., 2010).

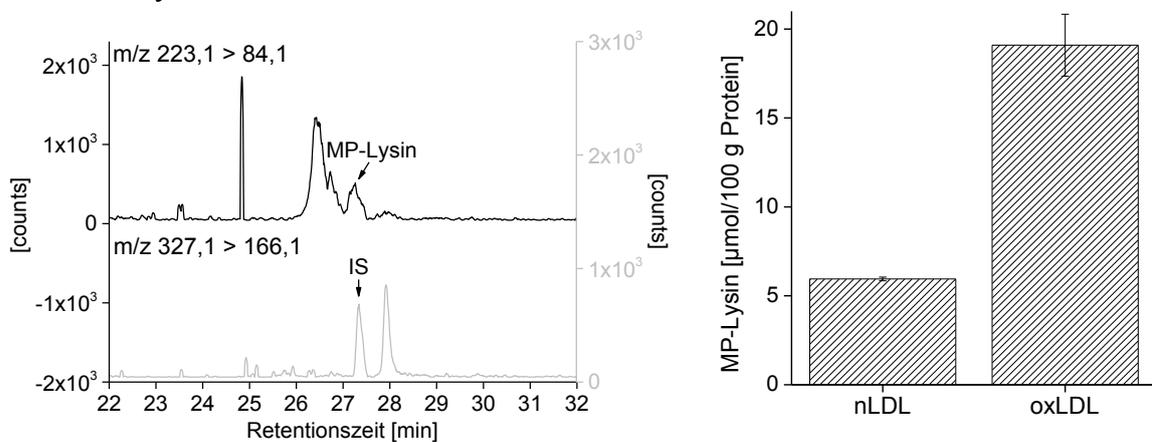
Bekannt ist allerdings, dass gezielte chemische Modifizierungen, welche zu einer Negativierung der Nettoladung der Oberfläche des LDL-Partikels führen, Voraussetzung für die Erkennung durch Scavenger-Rezeptoren und somit für die Aufnahme durch Makrophagen sind (Esterbauer et al., 1990b). Weiterhin wurde gezeigt, dass Endothelzellen in der Lage sind, LDL-Partikel insoweit zu modifizieren, dass diese verstärkt durch Makrophagen aufgenommen werden können (Henriksen et al., 1981). Kumano-Kuramochi et al. (2012) stellten anhand einer gezielten Lipierung durch 4-HNE die Vermutung auf, dass Aldehyd-Protein-Addukte diejenige Struktureinheit darstellen, welche durch den Scavenger-Rezeptor LOX-1 erkannt werden.

Um weitere Erkenntnisse über die Unterscheidung von nativem und oxidiertem LDL zu erhalten, wurden orientierende Studien zur Quantifizierung der Lipierungsprodukte MP-Lysin und 2-PPL in nLDL und oxLDL durchgeführt.

### Quantifizierung von MP-Lysin 10' und 2-PPL 21' in nLDL und oxLDL

Die Isolierung des humanen nLDL erfolgte mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aus gepoolten Plasmaproben. Im Anschluss erfolgte die *in vitro* Oxidation des nLDL in Anwesenheit von  $\text{CuSO}_4$  für 24 h bei 37 °C. Abb. 90 zeigt beispielhafte LC-ESI-MS/MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von MP-Lysin 10' und 2-PPL 21' in nativem LDL sowie die jeweiligen mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierten Gehalte in den nLDL- und oxLDL-Proben.

#### A MP-Lysin



#### B 2-PPL

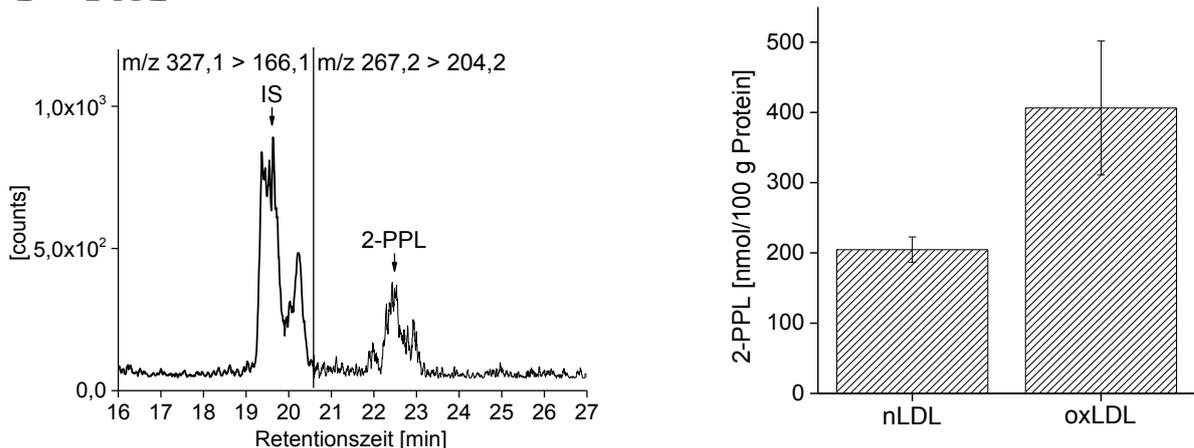


Abb. 90 LC-ESI-MS-MS-(MRM)-Chromatogramme der Quantifizierung von (A) MP-Lysin und (B) 2-PPL in nativem LDL (nLDL) und mittels LC-ESI-MS/MS quantifizierte Gehalte an (A) MP-Lysin ( $n = 3$ ) und (B) 2-PPL ( $n = 2$ ) in nLDL und oxidiertem LDL (oxLDL); IS - interner Standard N-Benzoyl-glycyl-L-phenylalanin

Die Gehalte an **MP-Lysin 10'** (Abb. 90A) betragen in den nLDL- und oxLDL-Proben jeweils 6,0 und 19,1  $\mu\text{mol}/100 \text{ g Protein}$  und lagen somit jeweils um die Faktoren 30 und 50 höher als

die Gehalte an 2-PPL (Abb. 90B). Da in den nLDL-Proben MP-Lysin nachweisbar war, konnte rückgeschlossen werden, dass es bereits *in vivo* zu Lipierungsreaktionen mit Acrolein gekommen sein musste. Als Folge der *in vitro* Oxidation war eine Zunahme des MP-Lysin-Gehalts zu verzeichnen. Der dabei aufgetretene Lysinverlust von 13,3 mmol/100 g Protein konnte zu 0,1 % durch die Bildung des MP-Lysins erklärt werden. Die Lysinblockierungen durch MP-Lysin betragen für nLDL und oxLDL jeweils 0,1 und 0,6 mmol/mol Lysin. Uchida et al. (1998) wiesen mittels Aminosäureanalyse das ebenfalls aus Acrolein und Lysin hervorgehende Lipierungsprodukt FDP-Lysin **7** anhand eines *in vitro* Experiments in  $\text{Cu}^{2+}$ -oxidiertem LDL nach. Nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C und pH 7,4 konnten 3,4 % des beobachteten Lysinverlusts durch die Bildung von FDP-Lysin **7** erklärt werden (Uchida et al., 1998). Mittels LC-ESI-MS/MS konnten Maeshima et al. (2012) über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse MP-Lysin **10'** in oxidiertem LDL, welches einer *in vitro* Oxidation für 48 h an  $\text{Cu}^{2+}$  bei 37 °C ausgesetzt war, quantifizieren. Hierbei konnte 1 % des Lysinverlusts durch die Bildung des MP-Lysins erklärt werden. Generell unterscheiden sich LDL-Proben in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzungen, Lagerdauer, Isolierung und tatsächlichen Oxidationsbedingungen, wodurch somit jede Probe ihre eigene Charakteristik aufweist (Esterbauer et al., 1990b). Zusätzlich zu einer längeren Inkubationszeit konnte dieser Umstand dazu beigetragen haben, dass Maeshima et al. (2012) nach Inkubation für 48 h 1 % des Lysinverlusts und in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation für 24 h nur 0,1 % des Lysinverlusts durch die MP-Lysinbildung erklärt werden konnten. FDP-Lysin **7** konnten Maeshima et al. (2012) im Gegensatz zu Uchida et al. (1998) nicht nachweisen.

Die Gehalte an **2-PPL 21'** (Abb. 90B) betragen in den nLDL- und oxLDL-Proben jeweils 204,6 und 406,3 nmol/100 g Protein. Analog des MP-Lysins konnte auch im Falle des 2-PPL rückgeschlossen werden, dass es bereits *in vivo* zu Lipierungsreaktionen mit 4-HNE gekommen sein musste. Weiterhin kam es ebenfalls als Folge der *in vitro* Oxidation des nLDL zu einer Zunahme der 2-PPL-Gehalte, wodurch 0,002 % des dabei aufgetretenen Lysinverlusts erklärt werden konnten. Die Lysinblockierungen durch 2-PPL betragen für das nLDL und oxLDL jeweils 0,004 und 0,012 mmol/mol Lysin. Salomon et al. (2000) und Ylä-Herttuala et al. (1989) identifizierten 2-PPL immunochemisch jeweils an Apo B<sub>100</sub>-Proteinen und an Kollagenfasern einer arteriosklerotischen Ablagerung sowie in LDL aus arteriosklerotischen Läsionen. LDL von gesunden Probanden zeigte hingegen keine positive Reaktion. Eine direkte massenspektrometrische Identifizierung oder Quantifizierung des 2-PPL in LDL-Proben erfolgte in der Literatur bisher nicht.

Requena et al. (1997) quantifizierten in LDL-Proben gesunder Probanden MDA-Lipierungsprodukte mittels GC-MS nach Reduktion und salzsaurer Hydrolyse über eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse. So konnten sie die Schiff'sche Base **12** in Form des 3-(N<sup>ε</sup>-Lysino)propan-

1-ols (LM) sowie das Enamin **13'** in Form des 1,3-Di-(N<sup>ε</sup>-lysino)propans (LML) nachweisen. Die Gehalte für LM und LML betragen jeweils 0,12 und 0,002 mmol/mol Lysin und lagen somit von ihrer Größenordnung im Bereich der in vorliegender Arbeit quantifizierten Gehalte an 2-PPL und MP-Lysin. Immunochemisch konnten Yamada et al. (2001) das fluoreszierende Dihydropyridin-Addukt **14** in *in vitro* oxidiertem LDL nachweisen. Weiterhin konnten sie auf analoge Weise **14** in atherosklerotischen Plaques aus humanen Aorten identifizieren. Somit kann festgehalten werden, dass Lipierungsprodukte am LDL und atherosklerotischen Plaques in der Literatur bekannt sind, allerdings bisher überwiegend immunochemisch detektiert wurden.

Ausblickend konnte somit gezeigt werden, dass es als Folge einer Oxidation von nLDL zu Lipierungsreaktionen des LDL kam. Quantifiziert wurden hierbei MP-Lysin **10'** und 2-PPL **21'** in nLDL und oxLDL. In der Literatur sind Lipierungsreaktionen am LDL bekannt (Maeshima et al., 2012; Yamada et al., 2001; Salomon et al., 2000; Uchida et al., 1998; Requena et al., 1997; Ylä-Herttuala et al., 1989). Konkrete, mittels Massenspektrometrie erhaltene quantitative Daten bezüglich der Gehalte an MP-Lysin und 2-PPL in nLDL sind bisher allerdings nicht publiziert. Des Weiteren wurde 2-PPL bisher nicht direkt massenspektrometrisch in oxLDL nachgewiesen oder quantifiziert.

Es konnte rückgeschlossen werden, dass Lipierungsreaktionen am LDL bereits *in vivo* abgelaufen sein mussten, da in den nLDL-Proben 2-PPL und MP-Lysin identifiziert und quantifiziert werden konnten (Abb. 90). Eine weitere Zunahme der Gehalte an Lipierungsprodukten im Zuge oxidativer Modifizierungen des LDL *in vivo* ist, entsprechend den Erkenntnissen aus dem Oxidationsmodell, denkbar. Die erklärbaren Anteile der Bildung von MP-Lysin und 2-PPL am Lysinverlust betragen jeweils 0,1 % und 0,002 %. Somit mussten noch weitere Reaktionen abgelaufen sein, die zu einer Lysinabnahme beitragen. Denkbar ist hierbei die Bildung weiterer Lipierungsprodukte, heterogener Lipierungsprodukte, Reaktionen der am Glycerol verbliebenen Sekundärprodukte oder direkte radikalische Aminosäureseitenkettenmodifizierungen (siehe hierzu auch Kap. 4.5.2.4).

Da MP-Lysin in höheren Gehalten nachgewiesen worden ist als 2-PPL und zudem ein stabiles Endprodukt darstellt, könnte MP-Lysin eine mögliche Markerverbindung zur Beurteilung des Oxidationsstatus des LDL im Zuge der medizinischen Diagnostik darstellen. Die Klärung der Frage, ob Lipierungsprodukte einen Einfluss auf die Makrophagenaufnahme haben, bleibt nachfolgenden Untersuchungen vorbehalten. Eine Negativierung der LDL-Oberfläche durch Reaktion der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins zu den in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Lipierungsprodukten wäre prinzipiell denkbar. Watanabe et al. (2013) konnten zeigen, dass durch Acrolein modifiziertes LDL durch den Scavenger-Rezeptor SR-A1 in Makrophagen

aufgenommen wurde und diese sich als Folge in Schaumzellen umwandelten. Somit besteht nach Watanabe et al. (2013) ein Zusammenhang zwischen Lipierungsreaktionen und der Entstehung von Atherosklerose.

Da unter anderem Acrolein Bestandteil von Zigarettenrauch ist (Fujioka & Shibamoto, 2006), wäre weiterhin interessant zu untersuchen, ob sich die Gehalte an Lipierungsprodukten, wie beispielsweise MP-Lysin, in Geweben der Lunge oder im Blut von Rauchern und Nichtrauchern unterscheiden, um hierüber einerseits Aussagen über die Reaktionsorte als auch quantitative Daten über die Reaktionsprodukte zu erhalten.

## 6 Zusammenfassung

Als Folge der Röstung von Erdnüssen wurden Lysinabnahmen von bis zu 42 % festgestellt, wovon allerdings nur 10 % durch bekannte Maillard-Reaktionsprodukte erklärbar waren (Wellner et al., 2012b). Als mögliche Ursache für den hohen Anteil an nicht erklärbarer Lysin-derivatisierung wurden Reaktionen mit Carbonylverbindungen aus der Lipidperoxidation (Lipierung) angenommen. Erkenntnisse über Lipierungsreaktionen stammten bisher vor allem aus physiologischen Modelluntersuchungen. Über entsprechende Reaktionen in Lebensmitteln war zu Beginn der Untersuchungen nur sehr wenig bekannt. Weiterhin waren bisher keine Daten bezüglich eines Zusammenhangs entsprechender Reaktionen und dem allergenen Potential von Erdnüssen verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zunächst freie Sekundärprodukte der Lipidperoxidation in Erdnüssen zu quantifizieren. Hierzu wurden Erdnussröstexperimente bei 170 °C für 20 und 40 min durchgeführt. In Modelluntersuchungen sollten anschließend potentielle Lipierungsprodukte, die sich während der Erdnussröstung bilden könnten, identifiziert, als Referenzsubstanzen dargestellt und schließlich in Erdnussproben quantifiziert werden, um hierüber konkrete Erkenntnisse über Lipierungsreaktionen in Lebensmitteln zu erhalten. Weiterhin wurden physiologische Konsequenzen der Lipierung vor dem Hintergrund eines Einflusses auf das allergene Potential untersucht.

### **Aminosäurezusammensetzung und Ausmaß der Maillard-Reaktion der Erdnussproben**

(1) Die Reaktivitätsreihenfolge der potentiell reaktiven Aminosäuren innerhalb des Erdnussproteinverbands während der Erdnussröstung lautete wie folgt: Lysin > Cystein > Arginin >> Histidin und die aufgetretene Lysinmodifizierung betrug bis zu 62 %. Durch die quantifizierten Maillard-Reaktionsprodukte N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin, Pyrralin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin konnten in den für 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse jeweils 14 % und 9 % des Lysinverlusts erklärt werden, wodurch die Ergebnisse von Wellner et al. (2012b) bestätigt wurden.

(2) Auf Grund des hohen Fettgehalts der Erdnüsse und des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren waren Reaktionen mit Sekundärprodukten aus der Lipidperoxidation als mögliche Ursache der nicht erklärbaren Lysinderivatisierung naheliegend. Für diese Reaktionen wurde in der vorliegenden Arbeit der Begriff „Lipierungsreaktion“ oder „Lipierung“ (engl. „lipation“) in Analogie zur Maillard-Reaktion (Glykierung, engl. glycation) eingeführt. Fortgeschrittene Reaktionsprodukte können als „advanced lipation endproducts (ALE)“ bezeichnet werden.

### **Lipidperoxidationsprodukte in Erdnussöl- und Erdnussproben**

(3) Nach der Erhitzung von Erdnussöl unter Erdnussröstbedingungen (170 °C, 20 min) wurden Hexanal, Nonanal und 2-Heptenal mittels GC-MS (EI) als relevante flüchtige Sekundärprodukte identifiziert. Für Acrolein, Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynon-2-enal (4-HNE) wurden Quantifizierungsmethoden mittels GC-MS (EI) für die Probenmatrices Erdnussöl und Erdnüsse etabliert. Zur Quantifizierung des 4-HNE wurde ein Darstellungsweg für das stabilisotopenmarkierte 4-HNE-DMA-d<sub>2</sub> in Anlehnung an Chandra & Srivastava (1997) entwickelt. Die Gehalte an Acrolein, MDA und 4-HNE stiegen in Folge der 40-minütigen Erhitzung des nativen Erdnussöls jeweils von 0,3 auf 19,1, 0,7 auf 8,0 und 0,1 auf 0,6 µmol/100 g Öl an. In den Erdnussproben wurde im Falle des Acroleins eine Zunahme in Abhängigkeit der Röstzeit von nicht nachweisbar auf 15,6 µmol/100 g Protein festgestellt. MDA und 4-HNE waren hingegen bereits in den ungerösteten Erdnüssen nachweisbar, die Gehalte nahmen allerdings als Folge der Röstung von jeweils 582,1 auf 13,1 µmol/100 g Protein und 12,4 auf 2,2 µmol/100 g Protein ab. Eine Weiterreaktion mit Aminosäureseitenketten innerhalb des Erdnussproteinverbands war somit als Folge der Erdnussröstung naheliegend.

### **Identifizierung reaktiver Aminosäurereste der Erdnussproteine gegenüber ausgewählten Sekundärprodukten**

(4) Zur Identifizierung der reaktiven Aminosäureseitenketten wurden isolierte native Erdnussproteine mit Hexanal, 2-Heptenal, Acrolein, MDA und 4-HNE in Verhältnissen von 0,1:1 bis 10:1 bezogen auf die Stoffmengen der potentiell reaktiven Aminosäuren Cystein, Histidin, Lysin und Arginin bei 37 °C für 24 h (pH 7,4) inkubiert und die Abnahmen der Aminosäuren nach enzymatischer Hydrolyse mittels Aminosäureanalyse verfolgt. Alle Sekundärprodukte führten zu einer Aminosäureabnahme. Hierbei stellte Lysin diejenige Aminosäure dar, die bevorzugt modifiziert wurde. Die maximalen Lysinabnahmen betragen im Falle von Hexanal, 2-Heptenal, Acrolein, MDA und 4-HNE jeweils 31 %, 36 %, 79 %, 35 % und 25 %. Acrolein stellte damit dasjenige Sekundärprodukt dar, welches zur höchsten und unselektivsten Aminosäuremodifizierung sowie zur stärksten Proteinquervernetzung (SDS-PAGE) führte. Die Reaktivitätsreihenfolge der Sekundärprodukte lautete unter Berücksichtigung der Abnahmen aller Aminosäuren und der Eigenschaften zur Proteinquervernetzung wie folgt: Acrolein > 2-Heptenal = 4-HNE > MDA > Hexanal.

(5) Als Folge der gezielten Lipierung zeigte sich mittels SDS-PAGE, dass es vor allem zur Quervernetzung des Erdnusshauptallergens Ara h 1 kam, wohingegen die weiteren Erdnussallergene nur geringfügig quervernetzt wurden. Dies war vor dem Hintergrund einer möglichen Beeinflussung des allergenen Potentials durch die Lipierung von Interesse.

### **Identifizierung von Lipierungsprodukten in Modellansätzen**

(6) Nach Umsetzung von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin mit den ausgewählten Sekundärprodukten Hexanal, 2-Heptenal, Acrolein, MDA und 4-HNE konnten mittels LC-ESI-MS/MS anhand von CID-Experimenten 14 Lipierungsprodukte identifiziert werden, davon 6 Verbindungen erstmalig. Weiterhin wurden 7 ausgewählte Verbindungen (N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1, LHP 2, (Z)-BPP, (E)-BPP, MP-Lysin, 2-PPL) als Referenzsubstanzen dargestellt und chemisch charakterisiert, wovon LHP 2 sowie (Z)- und (E)-BPP erstmalig dargestellt werden konnten. Zusätzlich wurden die stabilisotopenmarkierten Verbindungen N<sup>ε</sup>-Hexyllysin-d<sub>12</sub> und LHP 1-d<sub>29</sub> erstmalig dargestellt.

### **Quantifizierung von Lipierungsprodukten in modifizierten Erdnussproteinen und in Erdnüssen**

(7) Die Lipierungsprodukte N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1, LHP 2, (Z)-BPP, (E)-BPP, MP-Lysin und 2-PPL konnten mittels LC-ESI-MS/MS durch Vergleich mit entsprechenden Referenzsubstanzen erstmalig massenspektrometrisch in modifizierten Erdnussproteinextrakten quantifiziert werden. In den 0,1:1-Inkubationsansätzen konnten für die mit Hexanal inkubierten Erdnussproteine durch die Bildung von N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1 und LHP 2 0,5 % der gemessenen Lysinabnahme erklärt werden. In entsprechenden Experimenten wurde durch die Bildung der 2-Heptenal-, Acrolein- und 4-HNE-Lipierungsprodukte (Z)- und (E)-BPP, MP-Lysin und 2-PPL jeweils 80 %, 96 % und 79 % der Lysinmodifizierung verursacht. Bei geringen und somit lebensmittelrelevanten Gehalten an Sekundärprodukten dürfte somit die Lysinderivatisierung vor allem auf die Bildung der in der vorliegenden Arbeit quantifizierten Lipierungsprodukte (Z)- und (E)-BPP, MP-Lysin und 2-PPL zurückführbar sein.

(8) In den Erdnussproben konnten mittels LC-ESI-MS/MS und Vergleich mit entsprechenden Referenzsubstanzen erstmalig die Lipierungsprodukte N<sup>ε</sup>-Hexyllysin, LHP 1, MP-Lysin und 2-PPL quantifiziert werden. Im Falle des N<sup>ε</sup>-Hexyllysin wurde eine Abnahme in Abhängigkeit der Röstung für 20 und 40 min von 34,2 auf 20,5 μmol/100 g Protein festgestellt. Die Lysinblockierungen betragen jeweils 1,1 bis 0,6 mmol/mol Lysin. Die Gehalte an LHP 1 zeigten keine signifikanten Veränderungen als Folge der Röstung und lagen im Bereich von 17,3 bis 19,0 nmol/100 g Protein. Die Lysinblockierungen durch LHP 1 beliefen sich jeweils auf 0,6 μmol/mol Lysin. Die Stoffmengen an MP-Lysin nahmen als Folge der Erdnussröstung von 0,1 auf 19,7 μmol/100 g Protein zu. Dies entsprach Lysinblockierungen von jeweils 0,002 und 0,6 mmol/mol Lysin. Die Stoffmengen des 2-PPL nahmen ebenfalls als Folge der Röstung von 112,1 auf 175,1 nmol/100 g Protein zu, entsprechend Lysinblockierungen von jeweils 3,5 und 5,5 μmol/mol Lysin. MP-Lysin stellt somit eine mögliche Markerverbindung zur Beurteilung des Oxidationsstatus eines Lebensmittels dar.

(9) Im Vergleich zu den Maillard-Reaktionsprodukten N<sup>ε</sup>-Fruktosyllysin, Pyrralin und N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin waren die Gehalte der quantifizierten Lipierungsprodukte deutlich geringer. Der erklärbare Lysinverlust unter Berücksichtigung der Lipierungs- und Maillard-Reaktionsprodukte konnte für die 20 und 40 min gerösteten Erdnüsse jeweils zu 17 % und 11 % bestimmt werden. Somit blieben jeweils 83 % und 89 % des Lysinverlusts ungeklärt.

(10) In Modelluntersuchungen unter Verwendung von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin, Hexanal und Nonanal konnte gezeigt werden, dass es zur Bildung heterogener Lipierungsprodukte kommen kann, wodurch die Vielzahl an Lipierungsprodukten, die sich aus den Sekundärprodukten bilden können, nochmals deutlich erweitert wird. Heterogene Lipierungsprodukte zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu homogenen Lipierungsprodukten neben dem ursprünglichen Nucleophil aus mehreren unterschiedlichen Carbonylverbindungen aufgebaut sind. Weiterhin wurde anhand eines Inkubationsmodells von N<sup>α</sup>-Acetyl-L-lysin und Linolsäuremethylester unter oxidativen Bedingungen gezeigt, dass auch der nach der oxidativen Abspaltung eines flüchtigen Sekundärprodukts zurückbleibende Fettsäurerest in der Lage ist, Lipierungsreaktionen einzugehen. Als entsprechendes Lipierungsprodukt wurden das Monoalkylierungsprodukt und das Pyrrol-Derivat identifiziert. Somit ist davon auszugehen, dass als Folge der Erdnussröstung eine Vielzahl an Lipierungsprodukten entstehen kann, deren Einzelbeiträge zum Gesamtlysinverlust vermutlich relativ gering sind, in der Summe allerdings einen erheblicheren Beitrag leisten könnten.

### **Lipierungsreaktionen im physiologischen Kontext**

(11) Mittels ELISA und Western Blots wurde gezeigt, dass eine gezielte Lipierung der Erdnussproteine mit 4-HNE das Antikörperbindungsvermögen nicht beeinflusste. In Abhängigkeit des Modifizierungsgrades wurde mittels SDS-PAGE die Ausbildung kovalent quervernetzter Proteinaggregate beobachtet, welche im Vergleich zu den nicht modifizierten Proteinen resistenter gegenüber einer simulierten gastrointestinalen Verdauung waren. Diese Proteinaggregate waren unter anderem aus Ara h 1-Monomeren aufgebaut. Die bei der simulierten gastrointestinalen Verdauung entstandenen Peptide wurden durch die Antikörper eines Erdnussallergikerserums erkannt, wiesen also intakte Epitope auf. Übertragen auf Lebensmittel könnten Lipierungsreaktionen damit zu einer verlangsamten gastrointestinalen Verdauung lipierter Proteine führen. Hierdurch würden im Vergleich zu nicht modifizierten Proteinen über einen längeren Zeitraum Peptide mit intakten Epitopen im Gastrointestinaltrakt verbleiben, wodurch das allergene Potential des Lebensmittels erhöht wäre.

(12) Ein elektrophoretischer Vergleich nativer, gekochter und gerösteter Erdnüsse zeigte, dass die nativen und gekochten Erdnüsse ähnliche Bandenintensitäten aufwiesen, wohingegen bei den gerösteten Erdnüssen verschmierte Bereiche und in den Probenauftragetaschen verbliebene

hochmolekulare Proteinaggregate erkennbar waren. Mittels Western Blot unter Verwendung eines Erdnussallergikerserums zeigte sich, dass die Proteinaggregate innerhalb der verschmierten Bereiche und in den Probeauftragetaschen durch Antikörper gebunden wurden. Somit wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten wie nach der gezielten Lipierung des Erdnussproteinextrakts. Des Weiteren unterschieden sich die nativen und gekochten Erdnüsse bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht signifikant, wohingegen die gerösteten Erdnüsse Aminosäureabnahmen von Cystein, Histidin und Lysin von jeweils 17 %, 14 % und 21 % aufwiesen. Anhand eines simulierten gastrointestinalen Verdaus wurde die Verdaubarkeit der unterschiedlich zubereiteten Erdnüsse wie folgt festgestellt: native Erdnüsse > gekochte Erdnüsse > geröstete Erdnüsse. Die langsamere Verdaubarkeit der gerösteten Erdnüsse im Vergleich zu den gekochten Erdnüssen könnte eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens der Erdnussallergie in China und den USA darstellen.

(13) In abschließenden orientierenden Untersuchungen konnten MP-Lysin und 2-PPL massenspektrometrisch auch in nativen, aus humanen Plasmaproben isolierten LDL-Proben (nLDL) quantifiziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es auch *in vivo* zu Lipierungsreaktionen kommt. Das Lipierungsprodukt 2-PPL wurde erstmalig in LDL-Proben massenspektrometrisch quantifiziert. Als Folge einer *in vitro* Oxidation des nLDL zum „oxLDL“ stiegen die Gehalte an MP-Lysin und 2-PPL von jeweils 6,0 auf 19,1  $\mu\text{mol}/100\text{ g Protein}$  und von 204,6 auf 406,3  $\text{nmol}/100\text{ g Protein}$  an. Übertragen auf die Situation *in vivo* sind somit analoge oxidative Veränderungen des LDL denkbar, wodurch die Makrophagenaufnahme beeinflusst werden und ein Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose bestehen könnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass Lipierungsreaktionen vor allem bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln ablaufen und im Falle der Erdnüsse einen Einfluss auf das allergene Potential haben könnten. Vor dem Hintergrund einer in China im Vergleich zu den USA geringeren Prävalenz der Erdnussallergie wurden Hinweise erhalten, dass die unterschiedlichen Zubereitungsarten (China: Kochen, USA: Rösten) vor allem die Verdaubarkeit der Proteine beeinflussen und hierüber einen direkten Einfluss auf die Sensibilisierung haben könnten. Zur Beurteilung des allergenen Potentials unterschiedlich verarbeiteter Erdnüsse müssen in weiterführenden Untersuchungen neben Tests zur Beurteilung des IgE-Bindungsvermögens auch Verdauungstests durchgeführt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abraham, K.; Andres, A.; Palavinskas, R.; Berg, K.; Appel, K. E.; Lampen, A. Toxicology and risk assessment of acrolein in food. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1277-1290.
- Alaiz, M.; Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Antioxidative activity of pyrrole, imidazole, dihydropyridine, and pyridinium salt derivatives produced in oxidized lipid/amino acid browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 686-691.
- Alaiz, M.; Barragán, S. Reaction of a lysyl residue analogue with E-2-octenal. *Chem. Phys. Lipids* **1995a**, *75*, 43-49.
- Alaiz, M.; Barragán, S. Changes induced in bovine serum albumin following interactions with the lipid peroxidation product E-2-octenal. *Chem. Phys. Lipids* **1995b**, *77*, 217-223.
- Alaiz, M.; Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Natural antioxidants produced in oxidized lipid/amino acid browning reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995c**, *72*, 1571-1575.
- Al-Muhsen, S.; Clarke, A. E.; Kagan, R. S. Peanut allergy: an overview. *CMAJ* **2003**, *168*, 1279-1285.
- Amarnath, V.; Valentine, W. M.; Montine, T. J.; Patterson, W. H.; Amarnath, K.; Bassett, C. N.; Graham, D. G. Reactions of 4-hydroxy-2(E)-nonenal and related aldehydes with proteins studied by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 317-328.
- Ariffin, M. M.; Anderson, R. A. LC/MS/MS analysis of quaternary ammonium drugs and herbicides in whole blood. *J. Chromatogr. B* **2006**, *842*, 91-97.
- Awada, M.; Soulage, C. O.; Meynier, A.; Debard, C.; Plaisancié, P.; Benoit, B.; Picard, G.; Loizon, E.; Chauvin, M.-A.; Estienne, M.; Peretti, N.; Guichardant, M.; Lagarde, M.; Genot, C.; Michalski, M.-C. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: Role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 2069-2080.
- Awasthi, Y. C.; Sharma, R.; Cheng, J. Z.; Yang, Y.; Sharma, A.; Singhal, S. S.; Awasthi, S. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 219-230.
- Ayala, A.; Munoz, M. F.; Arguelles, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, Article ID: 360438, 1-31.
- Baba, S.; Osakabe, N.; Kato, Y.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Kido, T.; Fukuda, K.; Muto, Y.; Kondo, K. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 709-717.
- Baker, A.; Zidek, L.; Wiesler, D.; Chmelik, J.; Pagel, M.; Novotny, M. V. Reaction of N-acetylglycyllysine methyl ester with 2-alkenals: An alternative model for covalent modification of proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 730-740.
- Bannon, G. A. What makes a food protein an allergen? *Curr. Allergy Asthm. R.* **2004**, *4*, 43-46.
- Barrera, G.; Pizzimenti, S.; Dianzani, M. U. 4-Hydroxynonenal and regulation of cell cycle: Effects on the pRb/E2F pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 597-606.
- Becker, W. M.; Petersen, A.; Jappe, U. Die Allergene der Erdnuss: Eine Aktualisierung zu Struktur, Charakteristika und dem Allergom. *Allergologie* **2011**, *34*, 398-411.

- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg* **2008**, 6. Auflage.
- Benzie, I. F. F. Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1996**, *47*, 233-261.
- Berger, A. Science commentary: Why do some children grow out of peanut allergy? *Br. Med. J.* **1998**, *316*, 1275-1275.
- Bewley, J. D.; Black, M. Seeds - Physiology of development and germination. *Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Dordrecht, London* **1994**, 3. Auflage.
- Beyer, K.; Morrow, E.; Li, X.-M.; Bardina, L.; Bannon, G. A.; Burks, A. W.; Sampson, H. A. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *107*, 1077-1081.
- BfR Schwellenwerte zur Allergenkennzeichnung von Lebensmitteln, Expertengespräch im Rahmen der BMELV-Konferenz 2008 "Allergien: Bessere Information, höhere Lebensqualität" am 15. Oktober 2008 in Berlin, *Tagungsband* **2009a**.
- BfR Bessere Allergenkennzeichnung von Lebensmitteln für Verbraucher: Schwellenwerte können derzeit noch nicht zuverlässig festgelegt werden. *BfR, Stellungnahme Nr. 002/2010 vom 29. Juli 2009* **2009b**.
- Bickel-Sandkötter, S. Nutzpflanzen und ihre Inhaltsstoffe. *Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co., Wiebelsheim* **2001**.
- Blanc, F.; Vissers, Y. M.; Adel-Patient, K.; Rigby, N. M.; Mackie, A. R.; Gunning, A. P.; Wellner, N. K.; Skov, P. S.; Przybylski-Nicaise, L.; Ballmer-Weber, B.; Zuidmeer-Jongejan, L.; Szépfalusi, Z.; Ruinemans-Koerts, J.; Jansen, A. P. H.; Bernard, H.; Wal, J.-M.; Savelkoul, H. F. J.; Wichers, H. J.; Mills, E. N. C. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1887-1894.
- Blaser, M. Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature* **2011**, *476*, 393-394.
- Bock, S. A.; Lee, W.-Y.; Remigio, L. K.; May, C. D. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1978**, *62*, 327-334.
- Bock, S. A.; Munoz-Furlong, A.; Sampson, H. A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *107*, 191-193.
- Bock, S. A.; Munoz-Furlong, A.; Sampson, H. A. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *119*, 1016-1018.
- Bogh, K. L.; Nielsen, H.; Madsen, C. B.; Mills, E. N. C.; Rigby, N.; Eiwegger, T.; Szépfalusi, Z.; Roggen, E. L. IgE epitopes of intact and digested Ara h 1: A comparative study in humans and rats. *Mol. Immunol.* **2012**, *51*, 337-346.
- Boldt, A.; Fortunato, D.; Conti, A.; Petersen, A.; Ballmer-Weber, B.; Lepp, U.; Reese, G.; Becker, W.-M. Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. *Proteomics* **2005**, *5*, 675-686.
- Bolland, J. L. Kinetics of olefin oxidation. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1949**, *3*, 1-21.
- Bömer, A.; Juckenack, A.; Tillmans, J. Handbuch der Lebensmittelchemie, Viertes Band: Fette und Öle, Lipide, Wachse, Harze, Ätherische Öle. *Verlag von Julius Springer, Berlin* **1939**.
- Branum, A. M.; Lukacs, S. L. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* **2009**, *124*, 1549-1555.

- Brash, A. R. Autoxidation of methyl linoleate: Identification of the bis-allylic 11-hydroperoxide. *Lipids* **2000**, *35*, 947-952.
- Brededorst, R.; David, K. What establishes a protein as an allergen? *J. Chromatogr. B* **2001**, *756*, 33-40.
- Breiteneder, H.; Mills, E. N. C. Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *115*, 14-23.
- Brown, D. F.; Senn, V. J.; Stanley, J. B.; Dollear, F. G. Comparison of carbonyl compounds in raw and roasted runner peanuts. I. Major qualitative and some quantitative differences. *J. Agr. Food Chem.* **1972**, *20*, 700-706.
- Burks, A. W.; Williams, L. W.; Helm, R. M.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; O'Brien, T. Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1991**, *88*, 172-179.
- Burks, A. W.; Williams, L. W.; Thresher, W.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; Helm, R. M. Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1992a**, *90*, 889-897.
- Burks, A. W.; Williams, L. W.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; O'Brien, T. J.; Helm, R. M. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h 2, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1992b**, *90*, 962-969.
- Burks, A. W.; Cockrell, G.; Stanley, J. S.; Helm, R. M.; Bannon, G. A. Recombinant peanut allergen Ara h 1 expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 1715-1721.
- Burks, A. W.; Shin, D.; Cockrell, G.; Stanley, J. S.; Helm, R. M.; Bannon, G. A. Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 334-339.
- Burks, A. W. Peanut allergy. *Lancet* **2008**, *371*, 1538-1546.
- Burow, G. B.; Gardner, H. W.; Keller, N. P. A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization. *Plant Mol. Biol.* **2000**, *42*, 689-701.
- Buschmann, L.; Petersen, A.; Schlaak, M.; Becker, W.-M. Reinvestigation of the major peanut allergen Ara h 1 on molecular level. *Highlights in Food Allergy. Monogr. Allergy* **1996**, *32*, 92-98.
- BVL L 06.00-7:2014-08 - Bestimmung des Rohproteingehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen. *Ämtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges Tabakgesetz, § 28 b GenTG* **2014**.
- Cabanillas, B.; Cuadrado, C.; Rodriguez, J.; Hart, J.; Burbano, C.; Crespo, J. F.; Novak, N. Potential changes in the allergenicity of three forms of peanut after thermal processing. *Food Chem.* **2015**, *183*, 18-25.
- Cambridge Isotope Laboratories, Inc., NMR Solvent Data Chart. *Internetseite: [http://www2.chem.umd.edu/nmr/reference/isotope\\_solvent.pdf](http://www2.chem.umd.edu/nmr/reference/isotope_solvent.pdf)*, Zugriff am 27.10.2015.
- Calingasan, N. Y.; Uchida, K.; Gibson, G. E. Protein-bound acrolein: A novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 751-756.
- Can, M.; Özaskan, H.; Isildak, Ö.; Pekmez, N. Ö.; Yildiz, A. Investigation of catalytic effects of the proton and Lewis acids on oligomerization and chemical polymerization of pyrrole. *Polymer* **2004**, *45*, 7011-7016.

- Carini, M.; Aldini, G.; Facino, R. M. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 281-305.
- Casella, I. G.; Contursi, M. Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5816-5821.
- Chan, H. W.-S.; Matthew, J. A.; Coxon, D. T. Hydroperoxy-epidioxide from the autoxidation of a hydroperoxide of methyl linolenate. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1980**, *5*, 235-236.
- Chandra, A.; Srivastava, S. K. A synthesis of 4-hydroxy-2-trans-nonenal and 4-(H-3) 4-hydroxy-2-trans-nonenal. *Lipids* **1997**, *32*, 779-782.
- Chatel, J.-M.; Bernard, H.; Orson, F. M. Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2003**, *131*, 14-18.
- Chetschik, I.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Comparison of the key aroma compounds in organically grown, raw west-african peanuts (*Arachis hypogaea*) and in ground, pan-roasted meal produced thereof. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10237-10243.
- Chio, K. S.; Tappel, A. L. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2821-2827.
- Chiou, R. Y.-Y.; Cheng, S.-L.; Tseng, C.-Y.; Lin, T.-C. Flavor fortification and characterization of raw peanut oils subjected to roasting with partially defatted peanut meal under various atmospheric conditions. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1110-1113.
- Chung, S.-Y.; Champagne, E. T. Allergenicity of Maillard reaction products from peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5227-5231.
- Chung, S.-Y.; Champagne, E. T. Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3911-3916.
- Chung, S.-Y.; Maleki, S.; Champagne, E. T.; Buhr, K. L.; Gorbet, D. W. High-oleic peanuts are not different from normal peanuts in allergenic properties. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 878-882.
- Chung, T. Y.; Eiserich, J. P.; Shibamoto, T. Volatile compounds identified in headspace samples of peanut oil heated under temperatures ranging from 50 to 200 °C. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1467-1470.
- Collin, S.; Osman, M.; Delcambre, S.; El-Zayat, A. I.; Dufour, J.-P. Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened Domiati cheeses. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1659-1663.
- Colzani, M.; Aldini, G.; Carini, M. Mass spectrometric approaches for the identification and quantification of reactive carbonyl species protein adducts. *J. Proteomics* **2013**, *92*, 28-50.
- Cong, Y.-J.; Lou, F.; Li, L.-F.; Xue, W.-T.; Wang, J.; Zhang, H.; Fan, J.-F. Identification and quantification of major peanut allergens (in China) with IgE-binding property. *J. Food Biochem.* **2008**, *32*, 353-367.
- Cordis, G. A.; Maulik, N.; Bagchi, D.; Engelman, R. M.; Das, D. K. Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1993**, *632*, 97-103.
- Corey, E. J.; Suggs, J. W. Pyridinium chlorochromate, an efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *31*, 2647-2650.

- Delatour, T.; Hegele, J.; Parisod, V.; Richoz, J.; Maurer, S.; Steven, M.; Buetler, T. Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. The particular case of carboxymethyllysine. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2371-2381.
- Deuber, M. Malondialdehyd- und Acrolein-Lipierungsprodukte in Erdnüssen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2015**.
- Doorn, J. A.; Petersen, D. R. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1445-1450.
- EFSA University of Portsmouth: Literature searches and reviews related to the prevalence of food allergy in Europe. *EFSA supporting publication* **2013**, *EN-509*, 1-343.
- Eiwegger, T.; Rigby, N.; Mondoulet, L.; Bernard, H.; Krauth, M.-T.; Boehm, A.; Dehlink, E.; Valent, P.; Wal, J. M.; Mills, E. N. C.; Szépfalusi, Z. Gastro-duodenal digestion products of the major peanut allergen Ara h 1 retain an allergenic potential. *Clin. Exp. Allergy* **2006**, *36*, 1281-1288.
- EPA Toxicological review of acrolein. *United States Environmental Protection Agency, EPA/635/R-03/003* **2003**, Washington, D.C., USA.
- Esterbauer, H.; Jürgens, G.; Quehenberger, O.; Koller, E. Autoxidation of human low-density-lipoprotein: Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 495-509.
- Esterbauer, H.; Zollner, H.; Schaur, R. J. Aldehydes formed by lipid peroxidation: Mechanisms of formation, occurrence, and determination. *Membrane lipid oxidation, Vol 1, CRC Press, Boca Raton, USA* **1990a**, 239-283.
- Esterbauer, H.; Dieber-Rotheneder, M.; Waeg, G.; Striegl, G.; Jurgens, G. Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* **1990b**, *3*, 77-92.
- Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11*, 81-128.
- Ewert, A.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Development of two stable isotope dilution assays for the quantitation of acrolein in heat-processed fats. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3582-3589.
- Ewert, A.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Isotope-labeling studies on the formation pathway of acrolein during heat processing of oils. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8524-8529.
- Fenaille, F.; Mottier, P.; Turesky, R. J.; Ali, S.; Guy, P. A. Comparison of analytical techniques to quantify malondialdehyde in milk powders. *J. Chromatogr. A* **2001**, *921*, 237-245.
- Fenaille, F.; Guy, P. A.; Tabet, J.-C. Study of protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal and other short chain aldehydes analyzed by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 215-226.
- Fenaille, F.; Tabet, J.-C.; Guy, P. A. Study of peptides containing modified lysine residues by tandem mass spectrometry: Precursor ion scanning of hexanal-modified peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 67-76.
- Feron, V. J.; Til, H. P.; de Vrijer, F.; Woutersen, R. A.; Cassee, F. R.; van Bladeren, P. J. Aldehydes: Occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res.* **1991**, *259*, 363-385.
- Förster, A.; Kühne, Y.; Henle, T. Studies on absorption and elimination of dietary Maillard reaction products. *Maillard Reaction: Chemistry at the interface of nutrition, aging, and disease, Vol. 1043, New York Acad. Sciences, New York* **2005**, 474-481.

- Frank, L.; Marian, A.; Visser, M.; Weinberg, E.; Potter, P. C. Exposure to peanuts in utero and in infancy and the development of sensitization to peanut allergens in young children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **1999**, *10*, 27-32.
- Franke, G.; Hammer, K.; Hanelt, P.; Ketz, H.-A.; Natho, G.; Reinbothe, H. Früchte der Erde. *Urania-Verlag, Leipzig, Jena, Berlin* **1988**, 3. Auflage.
- Franke, W. Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York* **1992**, 5., unveränderte Auflage.
- Frankel, E. N.; Neff, W. E. Formation of malondialdehyde from lipid oxidation products. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *754*, 264-270.
- Frankel, E. N. Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1908-1917.
- Fujioka, K.; Shibamoto, T. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 47-54.
- Funk, W.; Dammann, V.; Donnevert, G. Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* **2005**, 2. Auflage.
- Furuhata, A.; Nakamura, M.; Osawa, T.; Uchida, K. Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde - An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27919-27926.
- Furuhata, A.; Ishii, T.; Kumazawa, S.; Yamada, T.; Nakayama, T.; Uchida, K. N-epsilon-(3-methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48658-48665.
- Gabbanini, S.; Matera, R.; Valvassori, A.; Valgimigli, L. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 4-hydroxynonenal for the assessment of oxidative degradation and safety of vegetable oils. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *869*, 50-58.
- Gardner, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free. Radical Bio. Med.* **1989**, *7*, 65-86.
- Gardner, H. W. Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: A review. *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27*, 220-229.
- Garrison, W. M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 381-398.
- Girón, J.; Alaiz, M.; Vioque, E. High-performance liquid-chromatographic determination of N-ε-(2-propenal)lysine in biological samples after derivatization with diethylethoxymethylmalonate. *Anal. Biochem.* **1992**, *206*, 155-160.
- Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Vioque, E. Bound malondialdehyde in foods: Bioavailability of the N-2-propenals of lysine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6194-6198.
- Globisch, M. Einfluss der Glykierung auf die Erdnuss Hauptallergene Ara h 1 und Ara h 2. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2010**.
- Globisch, M.; Schindler, M.; Kressler, J.; Henle, T. Studies on the reaction of trans-2-heptenal with peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8500-8507.
- Globisch, M.; Kaden, D.; Henle, T. 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and its ligation product 2-pentylpyrrole lysine (2-PPL) in peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5273-5281.
- Goldstein, J. L.; Brown, M. S. Low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 897-930.

- Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- Grevers, G.; Röcken, M. Taschenatlas Allergologie - Grundlagen, Diagnostik, Klinik. *Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart* **2008**, 2. Auflage.
- Grimm, D. T.; Sanders, T. H.; Pattee, H. E.; Williams, D. E.; Sanchez-Dominguez, S. Chemical composition of *Arachis hypogaea* L. subsp. *hypogaea* var. *hirsuta* peanuts. *Peanut Science* **1996**, *23*, 111-116.
- Grundy, J.; Matthews, S.; Bateman, B.; Dean, T.; Arshad, S. H. Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *110*, 784-789.
- Gu, X.; Salomon, R. G. Fragmentation of a linoleate-derived  $\gamma$ -hydroperoxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated epoxide to  $\gamma$ -hydroxy- and  $\gamma$ -oxo-alkenals involves a unique pseudo-symmetrical diepoxycarbonyl radical. *Free. Radical Bio. Med.* **2012**, *52*, 601-606.
- Gu, J. Y.; Wakizono, Y.; Dohi, A.; Nonaka, M.; Sugano, M.; Yamada, K. Effect of dietary fats and sesamin on the lipid metabolism and immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1917-1924.
- Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 715-725.
- Han, I. H.; Csallany, A. S. Temperature dependence of HNE formation in vegetable oils and butter oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 777-782.
- Han, I. H.; Csallany, A. S. Formation of toxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated 4-hydroxy-aldehydes in thermally oxidized fatty acid methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 253-260.
- Hegele, J.; Buetler, T.; Delatour, T. Comparative LC-MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *617*, 85-96.
- Heinrich, P. C.; Müller, M.; Graeve, L. Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie: *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg* **2014**, 9. Auflage.
- Helm, R. M.; Burks, A. W. Mechanisms of food allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 647-653.
- Henle, T.; Walter, H.; Klostermeyer, H. Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk-products by direct measurement of the Amadori-product lactuloselysine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991a**, *193*, 119-122.
- Henle, T.; Walter, H.; Krause, I.; Klostermeyer, H. Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* **1991b**, *1*, 125-135.
- Henle, T.; Walter, A. W.; Haefßner, R.; Klostermeyer, H. Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1994**, *199*, 55-58.
- Henle, T.; Bachmann, A. Synthesis of pyrrolidine reference material. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *202*, 72-42.
- Henriksen, T.; Mahoney, E. M.; Steinberg, D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6499-6503.

- Hernández-Ledesma, B.; Amigo, L.; Ramos, M.; Recio, I. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 889-898.
- Hidalgo, F. J.; Zamora, R. The role of lipids in nonenzymatic browning. *Grasas y Aceites* **2000**, *51*, 35-49.
- Hill, D. J.; Hosking, C. S.; Zhie, C. Y.; Leung, R.; Baratwidjaja, K.; Iikura, Y.; Iyngkaran, N.; Gonzalez-Andaya, A.; Wah, L. B.; Hsieh, K. H. The frequency of food allergy in Australia and Asia. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1997**, *4*, 101-110.
- Hilmenyuk, T.; Bellinghausen, I.; Heydenreich, B.; Ilchmann, A.; Toda, M.; Grabbe, S.; Saloga, J. Effects of glycation of the model food allergen ovalbumin on antigen uptake and presentation by human dendritic cells. *Immunology* **2009**, *129*, 437-445.
- Horn, F.; Moc, I.; Schneider, N.; Grillhösl, C.; Berghold, S.; Lindenmeier, G. Biochemie des Menschen. *Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart* **2005**, 3. Auflage.
- Hourihane, J. O.; Kilburn, S. A.; Dean, P.; Warner, J. O. Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy* **1997a**, *27*, 634-639.
- Hourihane, J. O.; Kilburn, S. A.; Nordlee, J. A.; Hefle, S. L.; Taylor, S. L.; Warner, J. O. An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: A randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1997b**, *100*, 596-600.
- Hourihane, J. O.; Knulst, A. C. Thresholds of allergenic proteins in foods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 152-156.
- Hu, W.; Feng, Z.; Eveleigh, J.; Iyer, G.; Pan, J.; Amin, S.; Chung, F.-L.; Tang, M.-S. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1781-1789.
- Huby, R. D. J.; Dearman, R. J.; Kimber, I. Why are some proteins allergens? *Toxicol. Sci.* **2000**, *55*, 235-246.
- Hwang, J.-Y.; Shue, Y.-S.; Chang, H.-M. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels. *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 639-647.
- Ichihashi, K.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Uchida, K. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes - Implications for oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23903-23913.
- Ilchmann, A.; Burgdorf, S.; Scheurer, S.; Waibler, Z.; Nagai, R.; Wellner, A.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, H.; Henle, T.; Kurts, C.; Kalinke, U.; Vieths, S.; Toda, M. Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: Role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, 175-183.
- Ishii, T.; Yamada, T.; Mori, T.; Kumazawa, S.; Uchida, K.; Nakayama, T. Characterization of acrolein-induced protein cross-links. *Free Radic. Res.* **2007**, *41*, 1253-1260.
- Ishino, K.; Shibata, T.; Ishii, T.; Liu, Y.-T.; Toyokuni, S.; Zhu, X.; Sayre, L. M.; Uchida, K. Protein N-acylation: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated covalent modification of protein by lipid peroxidation-derived saturated aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1261-1270.
- Ishino, K.; Wakita, C.; Shibata, T.; Toyokuni, S.; Machida, S.; Matsuda, S.; Matsuda, T.; Uchida, K. Lipid peroxidation generates body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 15302-15313.

- Itakura, K.; Uchida, K.; Osawa, T. A novel fluorescent malondialdehyde-lysine adduct. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *84*, 75-79.
- Itakura, K.; Osawa, T.; Uchida, K. Structure of a fluorescent compound formed from 4-hydroxy-2-nonenal and N<sup>ε</sup>-hippuryllysine: A model for fluorophores derived from protein modifications by lipid peroxidation. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 185-187.
- Itakura, K.; Uchida, K. Evidence that malondialdehyde-derived aminoenimine is not a fluorescent age pigment. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 473-475.
- IUIS Allergen Nomenclature IUSI, Allergen Nomenclature Sub-Committee. *Internetseite: <http://www.allergen.org/search.php?allergenname=&allergensource=peanut&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioname=>*, Zugriff am 14.01.2016.
- Jäger, L.; Wüthrich, B.; Ballmer-Weber, B.; Vieths, S. Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen - Immunologie, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe. *Elsevier GmbH, München*, **2008**, 3. Auflage.
- Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin*, **2002**, 5. Auflage.
- Jones, D. B. Proteins of the castor bean - their preparation, properties, and utilization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1947**, 247-251.
- Kaden, D. Einfluss der Lipierung auf das allergene Potential von Erdnussproteinen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2015**.
- Kaltofen, R.; Opitz, R.; Schumann, K.; Ziemann, J. Tabellenbuch Chemie. *VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig*, **1969**, 8. Auflage.
- Karademir, Y.; Göncüoğlu, N.; Gökmen, V. Investigation of heat induced reactions between lipid oxidation products and amino acids in lipid rich model systems and hazelnuts. *Food Funct.* **2013**, *4*, 1061-1066.
- Kato, H.; Kaneko, S.; Okitani, A.; Ito, M.; Hayase, F. Modification of lysine residues to alkyl-substituted pyridiniums on exposure of proteins to vaporized hexanal. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 1223-1228.
- Kato, Y.; Mori, Y.; Morimitsu, Y.; Hiroi, S.; Ishikawa, T.; Osawa, T. Formation of N<sup>ε</sup>-(Hexanonyl)lysine in protein exposed to lipid hydroperoxide - A plausible marker for lipid hydroperoxide-derived protein modification. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20406-20414.
- Kato, Y.; Yoshida, A.; Naito, M.; Kawai, Y.; Tsuji, K.; Kitamura, M.; Kitamoto, N.; Osawa, T. Identification and quantification of N<sup>ε</sup>-(hexanoyl)lysine in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 1864-1874.
- Kato, Y.; Osawa, T. Detection of lipid-lysine amide-type adduct as a marker of PUFA oxidation and its applications. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *501*, 182-187.
- Kaur, K.; Salomon, R. G.; O'Neil, J.; Hoff, H. F. (Carboxyalkyl)pyrroles in human plasma and oxidized low-density lipoproteins. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1387-1396.
- Kawai, Y.; Kato, Y.; Fujii, H.; Makino, Y.; Mori, Y.; Naito, M.; Osawa, T. Immunochemical detection of a novel lysine adduct using an antibody to linoleic acid hydroperoxide-modified protein. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 1124-1131.
- Kawai, Y.; Takeda, S.; Terao, J. Lipidomic analysis for lipid peroxidation-derived aldehydes using gas chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 99-107.

- Keller, J.; Baradat, M.; Jouanin, I.; Debrauwer, L.; Guéraud, F. "Twin peaks": Searching for 4-hydroxynonenal urinary metabolites after oral administration in rats. *Redox Biol.* **2015**, *4*, 136-148.
- King, T. P. Selective chemical modification of arginyl residues. *Biochemistry* **1966**, *5*, 3454-3459.
- Kleber-Janke, T.; Cramer, R.; Appenzeller, U.; Schlaak, M.; Becker, W. M. Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **1999**, *119*, 265-274.
- Kolarich, D.; Altmann, F. N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: Application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e 1. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 64-75.
- Koppelman, S. J.; Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M.; Hessing, M.; de Jong, H. H. J. Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4770-4777.
- Koppelman, S. J.; Knol, E. F.; Vlooswijk, R. A. A.; Wensing, M.; Knulst, A. C.; Hefle, S. L.; Gruppen, H.; Piersma, S. Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* **2003**, *58*, 1144-1151.
- Koppelman, S. J.; Wensing, M.; Ertmann, M.; Knulst, A. C.; Knol, E. F. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34*, 583-590.
- Kopper, R. A.; Odum, N. J.; Sen, M.; Helm, R. M.; Stanley, J. S.; Burks, A. W. Peanut protein allergens: The effect of roasting on solubility and allergenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2005**, *136*, 16-22.
- Krause, R.; Knoll, K.; Henle, T. Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216*, 277-283.
- Krause, S.; Reese, G.; Randow, S.; Zennaro, D.; Quarantino, D.; Palazzo, P.; Ciardiello, M. A.; Petersen, A.; Becker, W.-M.; Mari, A. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124*, 771-778.
- Kreßler, J. Lysin-Hexanal-Addukte in gerösteten Erdnüssen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden*, **2014**.
- Krist, S. Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle. *Springer Verlag, Wien* **2013**, 2. Auflage.
- Kromidas, S. Handbuch Validierung in der Analytik. *Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim* **2000**.
- Kumano-Kuramochi, M.; Shimozu, Y.; Wakita, C.; Ohnishi-Kameyama, M.; Shibata, T.; Matsunaga, S.; Takano-Ishikawa, Y.; Watanabe, J.; Goto, M.; Xie, Q.; Komba, S.; Uchida, K.; Machida, S. Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Biochem. J.* **2012**, *442*, 171-180.
- Kuwamori, M.; Wada, M.; Takita, T.; Tadokoro, T.; Maekawa, A.; Innami, S. Effect of dietary n-3/n-6 fatty acid ratio on the total count, fatty acid composition, and histamine and leukotriene concentrations of mast cells in tunica mucosa bronchiorum of type I allergic Guinea pig. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 763-767.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.

- Lepski, S.; Brockmeyer, J. Impact of dietary factors and food processing on food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 145-152.
- Leung, T.; Lam, C. W. K.; Chan, I. H. S. Li, A. M., Tang, N. L. S. Sensitization to common food allergens is a risk factor for asthma in young Chinese children in Hong Kong. *J. Asthma* **2002**, *39*, 523-529.
- Li, J.; Shefcheck, K.; Callahan, J.; Fenselau, C. Primary sequence and site-selective hydroxylation of prolines in isoforms of a major peanut allergen protein Ara h 2. *Protein Sci.* **2010**, *19*, 174-182.
- Lin, D.; Lee, H.-G.; Liu, Q.; Perry, G.; Smith, M. A.; Sayre, L. M. 4-Oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1219-1231.
- Liu, X.; Jin, Q.; Liu, Y.; Huang, J.; Wang, X.; Mao, W.; Wang, S. Changes in volatile compounds of peanut oil during the roasting process for production of aromatic roasted peanut oil. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 404-412.
- Lorenz, A. R.; Reese, G.; Haustein, D.; Vieths, S. Versteckte Allergene in Lebensmitteln - noch immer ein Problem. *Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **2001**, *44*, 666-675.
- Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **2000**, *407*, 233-241.
- Lynch, M. P.; Faustman, C.; Silbart, L. K.; Rood, D.; Furr, H. C. Detection of lipid-derived aldehydes and aldehyde:protein adducts in vitro and in beef. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 1093-1099.
- Maeshima, T.; Honda, K.; Chikazawa, M.; Shibata, T.; Kawai, Y.; Akagawa, M.; Uchida, K. Quantitative analysis of acrolein-specific adducts generated during lipid peroxidation-modification of proteins in vitro: Identification of N<sup>ε</sup>-(3-propanal)histidine as the major adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1384-1392.
- Maguire, L. S.; O'Sullivan, S. M.; Galvin, K.; O'Connor, T. P.; O'Brien, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2004**, *55*, 171-178.
- Maillard, L. C. Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1912**, *154*, 66-68.
- Maleki, S. J.; Chung, S.-Y.; Champagne, E. T.; Raufman, J.-P. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000a**, *106*, 763-768.
- Maleki, S. J.; Kopper, R. A.; Shin, D. S.; Park, C.-W.; Compadre, C. M.; Sampson, H.; Burks, A. W.; Bannon, G. A. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J. Immunol.* **2000b**, *164*, 5844-5849.
- Maleki, S. J.; Viquez, O.; Jacks, T.; Dodo, H.; Champagne, E. T.; Chung, S.-Y.; Landry, S. J. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 190-195.
- Maleki, S. J.; Schmitt, D. A.; Galeano, M.; Hurlburt, B. K. Comparison of the digestibility of the major peanut allergens in thermally processed peanuts and in pure form. *Foods* **2014**, *3*, 290-303.
- Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. Lebensmittelanalytik. *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg* **2010**, 4. Auflage.
- Matsui, T.; Guth, H.; Grosch, W. A comparative study of potent odorants in peanut, hazelnut, and pumpkin seed oils on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA) and gas chromatography-olfactometry of headspace samples (GCOH). *Fett-Lipid* **1998**, *100*, 51-56.

- Matthews, R. F.; Scanlan, R. A.; Libbey, L. M. Autoxidation products of 2,4-decadienal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48*, 745-747.
- McGirr, L. G.; Hadley, M.; Draper, H. H. Identification of N<sup>ε</sup>-acetyl-ε-(2-propenal)lysine as a urinary metabolite of malondialdehyde. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 15427-15431.
- Metz, T. O.; Alderson, N. L.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: A novel therapy for treatment of diabetic complications. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 41-49.
- Miller, B. E.; Danielson, N. D. Derivatization of vinyl aldehydes with anthrone prior to high-performance liquid-chromatography with fluorometric detection. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 622-626.
- Minato, K.; Gono, M.; Yamaguchi, H.; Kato, Y.; Osawa, T. Accumulation of N<sup>ε</sup>-(hexanoyl)lysine, an oxidative stress biomarker, in rice seeds during storage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1806-1810.
- Mittag, D.; Akkerdaas, J.; Ballmer-Weber, B. K.; Vogel, L.; Wenising, M.; Becker, W.-M.; Koppelman, S. J.; Knulst, A. C.; Helbling, A.; Hefle, S. L.; van Ree, R.; Vieths, S. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *114*, 1410-1417.
- Mondoulet, L.; Drumare, M.-F.; Ah-Leung, S.; Paty, E.; Scheinmann, P.; Wal, J.-M.; Bernard, H. Influence of thermal processing on the IgE binding capacity of peanut allergens. *Rev. Fr. Allergol.* **2003**, *43*, 486-491.
- Montine, K. S.; Olson, S. J.; Amarnath, V.; Whetsell, W. O.; Graham, D. G.; Montine, T. J. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 437-443.
- Morawietz, H. Der LOX-1-Rezeptor als neues Zielmolekül bei endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2010**, *135*, 308-312.
- Morohashi, Y.; Bewley, J. D.; Yeung, E. C. Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons: Influence of the axis. *J. Exp. Bot.* **1981**, *32*, 605-613.
- Mueller, G. A.; Maleki, S. J.; Johnson, K.; Hurlburt, B. K.; Cheng, H.; Ruan, S.; Nesbit, J. B.; Pomés, A.; Edwards, L. L.; Schorzman, A.; Deterding, L. J.; Park, H.; Tomer, K. B.; London, R. E.; Williams, J. G. Identification of Maillard reaction products on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products. *Allergy* **2013**, *68*, 1546-1554.
- Mueller, G. A.; Maleki, S. J.; Pedersen, L. C. The molecular basis of peanut allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2014**, *14*, 429-438.
- Munasinghe, D. M. S.; Ichimaru, K.-I.; Ryuno, M.; Ueki, N.; Matsui, T.; Sugamoto, K.; Kawahara, S.; Sakai, T. Lipid peroxidation-derived hepatotoxic aldehydes, 4-hydroxy-2E-hexenal in smoked fish meat products. *Fisheries Sci.* **2003a**, *69*, 189-194.
- Munasinghe, D. M. S.; Ichimaru, K.; Matsui, T.; Sugamoto, K.; Sakai, T. Lipid peroxidation-derived cytotoxic aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal in smoked pork. *Meat Sci.* **2003b**, *63*, 377-380.
- Nadkarni, D. V.; Sayre, L. M. Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 284-291.
- Nair, V.; Vietti, D. E.; Cooper, C. S. Degenerative chemistry of malondialdehyde. Structure, stereochemistry, and kinetics of formation of enaminals from reaction with amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3030-3036.

- Nair, V.; Offerman, R. J.; Turner, G. A.; Pryor, A. N.; Baenziger, N. C. Fluorescent 1,4-dihydropyridines: The malondialdehyde connection. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 2793-2803.
- Napetschnig, S.; Schauenstein, E.; Esterbauer, H. Formation of a pyridinium derivative by reaction of 4-hydroxypentenal with glycine. *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *68*, 165-177.
- Nath, R. G.; Chung, F. L. Detection of exocyclic 1,N<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 7491-7495.
- Nath, R. G.; Ocando, J. E.; Guttenplan, J. B.; Chung, F. L. 1,N<sup>2</sup>-Propanodeoxyguanosine adducts: Potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 581-584.
- NCBI Ara h 12 5J9 Full length peanut pod cDNA library Arachis hypogaea cDNA clone 5J9 5-similar to putative defensin 2.1 precursor, mRNA sequence. *Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/EY396089>*, Zugriff am 14.01.2016.
- NCBI Ara h 13 1N15 Full length peanut pod cDNA library Arachis hypogaea cDNA clone 1N15-5-similar to defensin, mRNA sequence. *Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/EY396019>*, Zugriff am 14.01.2016.
- NCBI National Center for Biotechnology Information. *Internetseite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>*, Zugriff am 14.01.2016.
- Neutra, M. R.; Pringault, E.; Kraehenbuhl, J.-P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, *14*, 275-300.
- Neyens, E.; Baeyens, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J. Hazard. Mater.* **2003**, *98*, 33-50.
- Niemelä, O.; Parkkila, S.; Ylä-Herttuala, S.; Villanueva, J.; Ruebner, B.; Halsted, C. H. Sequential acetaldehyde production, lipid-peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **1995**, *22*, 1208-1214.
- Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2005**, *338*, 668-676.
- NIST NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. *Internetseite: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>*, Zugriff von 2012 bis 2015.
- Norgaard, A.; Bindslev-Jensen, C. Egg and milk allergy in adults - diagnosis and characterization. *Allergy* **1992**, *47*, 503-509.
- Okolie, N. P.; Okugbo, O. T. A comparative study of malondialdehyde contents of some meat and fish samples processed by different methods. *JPSI* **2013**, *2*, 26-29.
- Onorato, J. M.; Jenkins, A. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions - Mechanism of action of pyridoxamine. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21177-21184.
- Ortolani, C.; Ballmer-Weber, B. K.; Hansen, K. S.; Ispano, M.; Wüthrich, B.; Bindslev-Jensen, C.; Ansaloni, R.; Vannucci, L.; Pravettoni, V.; Scibilia, J.; Poulsen, L. K.; Pastorello, E. A. Hazelnut allergy: A double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *105*, 577-581.
- Östblom, E.; Lilja, G.; Pershagen, G.; van Hage, M.; Wickman, M. Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clin. Exp. Allergy* **2008**, *38*, 1325-1332.

- Owusu-Apenten, R. K. Food protein analysis: Quantitative Effects on processing. *Marcel Dekker, Inc., New York* **2002**.
- Özben, T. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants - pathological and physiological significance. *Springer Verlag, New York* **1998**.
- Pang, X.; Lewis, A. C.; Hamilton, J. F. Determination of airborne carbonyls via pentafluorophenylhydrazine derivatisation by GC-MS and its comparison with HPLC method. *Talanta* **2011**, *85*, 406-414.
- Panosyan, A. G.; Mamikonyan, G. V.; Torosyan, M.; Gabrielyan, E. S.; Mkhitarian, S. A.; Tirakyan, M. R.; Ovanesyan, A. Determination of the composition of volatiles in cognac (brandy) by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* **2001**, *56*, 945-952.
- Papastergiadis, A.; Mubiru, E.; Van Langenhove, H.; De Meulenaer, B. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9589-9594.
- Papastergiadis, A.; Mubiru, E.; Van Langenhove, H.; De Meulenaer, B. Development of a sensitive and accurate stable isotope dilution assay for the simultaneous determination of free 4-hydroxy-2-(E)-nonenal and 4-hydroxy-2-(E)-hexenal in various food matrices by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 836-843.
- Parthasarathy, S.; Raghavamenon, A.; Garelnabi, M. O.; Santanam, N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *610*, 403-417.
- Patke, S. Nachweis und Quantifizierung von 2-Pentylpyrrollysin (2-PPL) in gerösteten Erdnüssen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2014**.
- Pawankar, R.; Holgate, S. T.; Rosenwasser, L. J. Allergy Frontiers: Classification and pathomechanisms. *Springer Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York* **2009**, 2. Auflage.
- Petersen, A.; Becker, W.-M.; Jappe, U. What makes peanuts so allergenic? *J. Serb. Chem. Soc.* **2013**, *78*, 321-331.
- Petersen, A.; Kull, S.; Rennert, S.; Becker, W.-M.; Krause, S.; Ernst, M.; Gutschmann, T.; Bauer, J.; Lindner, B.; Jappe, U. Peanut defensins: Novel allergens isolated from lipophilic peanut extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *136*, 1295-1301.
- Piche, L. A.; Cole, P. D.; Hadley, M.; van den Bergh, R.; Draper, H. H. Identification of N-ε-(2-propenal)lysine as the main form of malondialdehyde in food digesta. *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 473-477.
- Poli, G.; Schaur, R. J. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* **2000**, *50*, 315-321.
- Poms, R. E.; Capelletti, C.; Anklam, E. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 459-464.
- Porter, N. A.; Lehman, L. S.; Weber, B. A.; Smith, K. J. Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction, β-scission, and cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6447-6455.
- Porter, N. A.; Caldwell, S. E.; Mills, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **1995**, *30*, 277-290.
- Poulsen, M. E.; Christensen, H. B.; Sorensen, M. T.; Leffers, H.; Andersen, J. H. Determination of chlormequat in pig serum and sow milk by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1799-1804.

- Pumphrey, R. S. H.; Gowland, M. H. Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *119*, 1018-1019.
- Radola, B. J. Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100  $\mu\text{m}$  polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis* **1980**, *1*, 43-56.
- Rauscher, K.; Engst, R.; Freimuth, U. Untersuchung von Lebensmitteln: Einführung und Anleitung zur Untersuchung der Lebensmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft einschließlich Fremdstoffe und Trinkwasser. *VEB Fachbuchverlag Leipzig* **1986**, 2. Auflage.
- Rawls, H. R.; van Santen, P. J. Singlet oxygen: A possible source of original hydroperoxides in fatty acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1970**, *171*, 135-137.
- Refsgaard, H. H. F.; Tsai, L.; Stadtman, E. R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 611-616.
- Requena, J. R.; Fu, M.-X.; Ahmed, M. U.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Thorpe, S. R. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1996**, *11*, 48-53.
- Requena, J. R.; Fu, M. X.; Ahmed, M. U.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein. *Biochem. J.* **1997**, *322*, 317-325.
- Resmini, P.; Pellegrino, L.; Battelli, G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci.* **1990**, *2*, 173-184.
- Roubal, W. T.; Tappel, A. L. Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *113*, 5-8.
- Royer, P.-J.; Emara, M.; Yang, C.; Al-Ghouleh, A.; Tighe, P.; Jones, N.; Sewell, H. F.; Shakib, F.; Martinez-Pomares, L.; Ghaemmaghami, A. M. The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 1522-1531.
- Sakai, T.; Kuwazuru, S.; Yamauchi, K.; Uchida, K. A lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal and  $\omega 6$  fatty-acids contents in meats. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 1379-1380.
- Salomon, R. G.; Kaur, K.; Podrez, E.; Hoff, H. F.; Krushinsky, A. V.; Sayre, L. M. HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 557-564.
- Sampson, H. A.; McCaskill, C. C. Food hypersensitivity and atopic-dermatitis - evaluation of 113 patients. *J. Pediatr.* **1985**, *107*, 669-675.
- Sampson, H. A. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113*, 805-819.
- Sayre, L. M.; Arora, P. K.; Iyer, R. S.; Salomon, R. G. Pyrrole formation from 4-hydroxynonenal and primary amines. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 19-22.
- Sayre, L. M.; Sha, W.; Xu, G.; Kaur, K.; Nadkarni, D.; Subbanagounder, G.; Salomon, R. G. Immunochemical evidence supporting 2-pentylpyrrole formation on proteins exposed to 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1194-1201.
- Sayre, L. M.; Zelasko, D. A.; Harris, P. L. R.; Perry, G.; Salomon, R. G.; Smith, M. A. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 2092-2097.

- Sayre, L. M.; Lin, D.; Yuan, Q.; Zhu, X.; Tang, X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: Focus on HNE and ONE. *Drug Metab. Rev.* **2006**, *38*, 651-675.
- Schägger, H.; von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **1987**, *166*, 368-379.
- Schaller, K., Einfluss der Lipierung auf das Low Density Lipoprotein. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2015**.
- Scheijen, J. L. J. M.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P. C.; Brouns, F.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database. *Food Chem.* **2016**, *190*, 1145-1150.
- Schieberle, P.; Trebert, Y.; Firl, J.; Grosch, W. Photolysis of unsaturated fatty acid hydroperoxides. 2. Products from the anaerobic decomposition of methyl 13(S)-hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadienoate dissolved in methanol. *Chem. Phys. Lipids* **1985**, *37*, 99-114.
- Schindler, M. Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten erhitzten Erdnussöls und Identifizierung ausgewählter Lipierungsprodukte. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2013**.
- Schlörmann, W.; Birringer, M.; Böhm, V.; Löber, K.; Jahreis, G.; Lorkowski, S.; Müller, A. K.; Schöne, F.; Gleis, M. Influence of roasting conditions on health-related compounds in different nuts. *Food Chem.* **2015**, *180*, 77-85.
- Schmarr, H.-G.; Potouridis, T.; Ganß, S.; Sang, W.; Koepf, B.; Bokuz, U.; Fischer, U. Analysis of carbonyl compounds via headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatographic-ion trap tandem mass spectrometric determination of their o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime derivatives. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *617*, 119-131.
- Schneider, A. Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von N<sup>ε</sup>-(γ-L-Glutamyl)-L-lysin in Milchprotein nach enzymatischer Hydrolyse. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden* **2002**.
- Schneider, C.; Tallman, K. A.; Porter, N. A.; Brash, A. R. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20831-20838.
- Schwetlick, K. Organikum. *Wiley-VCH, Weinheim* **2004**, 22. Auflage.
- Selley, M. L.; Bartlett, M. R.; McGuinness, J. A.; Hapel, A. J.; Ardlie, N. G.; Lacey, M. J. Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1989**, *488*, 329-340.
- Sen, M.; Kopper, R.; Pons, L.; Abraham, E. C.; Burks, A. W.; Bannon, G. A. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 882-887.
- Seppanen, C. M.; Csallany, A. S. The effect of intermittent and continuous heating of soybean oil at frying temperature on the formation of 4-hydroxy-2-trans-nonenal and other α-, β-unsaturated hydroxyaldehydes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 121-127.
- Shek, P. Y. I.; Zhao, J.; Ke, Y.; Siu, K. W. M.; Hopkinson, A. C. Fragmentations of protonated arginine, lysine and their methylated derivatives: Concomitant losses of carbon monoxide or carbon dioxide and an amine. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 8282-8296.

- Shimozu, Y.; Hirano, K.; Shibata, T.; Shibata, N.; Uchida, K. 4-Hydroperoxy-2-nonenal is not just an intermediate but a reactive molecule that covalently modifies proteins to generate unique intramolecular oxidation products. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 29313-29324.
- Shin, D. S.; Compadre, C. M.; Maleki, S. J.; Kopper, R. A.; Sampson, H.; Huang, S. K.; Burks, A. W.; Bannon, G. A. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13753-13759.
- Shreffler, W. G.; Beyer, K.; Chu, T.-H. T.; Burks, A. W.; Sampson, H. A. Microarray immunoassay: Association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2004**, *113*, 776-782.
- Sicherer, S. H.; Munoz-Furlong, A.; Burks, A. W.; Sampson, H. A. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *101*, 559-562.
- Sicherer, S. H.; Munoz-Furlong, A.; Sampson, H. A. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: A 5-year follow-up study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 1203-1207.
- Sicherer, S. H.; Sampson, H. A. Peanut allergy: Emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *120*, 491-503.
- Sicherer, S. H.; Munoz-Furlong, A.; Godbold, J. H.; Sampson, H. A. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, 1322-1326.
- Siems, W.; Crifo, C.; Capuozzo, E.; Uchida, K.; Grune, T.; Salerno, C. Metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal in human polymorphonuclear leukocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *503*, 248-252.
- Sigma-Aldrich Sicherheitsdatenblätter p-Xylol, 1,3-Diethylbenzol und Hexanal. *Internetseite: <http://www.sigmaaldrich.com>*, Zugriff am 23.11.2012.
- Skolnick, H. S.; Conover-Walker, M. K.; Koerner, C. B.; Sampson, H. A.; Burks, W.; Wood, R. A. The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *107*, 367-374.
- Slatter, D. A.; Murray, M.; Bailey, A. J. Formation of a dihydropyridine derivative as a potential cross-link derived from malondialdehyde in physiological systems. *FEBS Lett.* **1998**, *421*, 180-184.
- Slatter, D. A.; Avery, N. C.; Bailey, A. J. Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 61-69.
- Souci, S. W.; Fachmann, W.; Kraut, H. Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* **2008**, 3. Auflage.
- Soulère, L.; Queneau, Y.; Doutheau, A. An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *150*, 239-243.
- Spickett, C. M. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 145-152.
- Spies-Martin, D.; Sommerburg, O.; Langhans, C.-D.; Leichsenring, M. Measurement of 4-hydroxy-nonenal in small volume blood plasma samples: Modification of a gas chromatographic-mass spectrometric method for clinical settings. *J. Chromatogr. B* **2002**, *774*, 231-239.
- Spiteller, G. Linoleic acid peroxidation - the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein - and its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *95*, 105-162.

- Spiteller, G.; Kern, W.; Spiteller, P. Investigation of aldehydic lipid peroxidation products by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *843*, 29-98.
- Stadtman, E. R.; Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 207-218.
- Stanley, J. S.; King, N.; Burks, A. W.; Huang, S. K.; Sampson, H.; Cockrell, G.; Helm, R. M.; West, C. M.; Bannon, G. A. Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *342*, 244-253.
- Stefka, A. T.; Feehley, T.; Tripathi, P.; Qiu, J.; McCoy, K.; Mazmanian, S. K.; Tjota, M. Y.; Seo, G.-Y.; Cao, S.; Theriault, B. R.; Antonopoulos, D. A.; Zhou, L.; Chang, E. B.; Fu, Y.-X.; Nagler, C. R. Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 13145-13150.
- Stevens, J. F.; Maier, C. S. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 7-25.
- Surh, J.; Kwon, H. Estimation of daily exposure to 4-hydroxy-2-alkenals in Korean foods containing n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 701-708.
- Suyama, K.; Adachi, S. Reaction of alkanals and amino acids or primary amines. Synthesis of 1,2,3,5- and 1,3,4,5-substituted quaternary pyridinium salts. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1417-1420.
- Suyama, K.; Adachi, S. Origin of alkyl-substituted pyridines in food flavor: Formation of the pyridines from the reaction of alkanals with amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 546-549.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Perrino, C. T. Synthesis and occurrence of oxoaldehydes in used frying oils. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 22-26.
- Tanaka, R.; Sugiura, Y.; Matsushita, T. Simultaneous identification of 4-hydroxy-2-hexenal and 4-hydroxy-2-nonenal in foods by pre-column fluorogenic labeling with 1,3-cyclohexanedione and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2013**, *36*, 881-896.
- Tashiro, Y.; Okitani, A.; Utsunomiya, N.; Kaneko, S.; Kato, H. Changes in lysozyme due to interaction with vaporized hexanal. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 1739-1747.
- Toda, M.; Heilmann, M.; Ilchmann, A.; Vieths, S. The Maillard reaction and food allergies: Is there a link? *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, *52*, 61-67.
- Turner, P. J.; Mehr, S.; Sayers, R.; Wong, M.; Shamji, M. H.; Campbell, D. E.; Mills, E. N. C. Loss of allergenic proteins during boiling explains tolerance to boiled peanut in peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 751-753.
- Uchida, K.; Stadtman, E. R. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6388-6393.
- Uchida, K.; Toyokuni, S.; Nishikawa, K.; Kawakishi, S.; Oda, H.; Hiai, H.; Stadtman, E. R. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: Markers for atherosclerosis. *Biochemistry* **1994**, *33*, 12487-12494.
- Uchida, K.; Sakai, K.; Itakura, K.; Osawa, T.; Toyokuni, S. Protein modification by lipid peroxidation products: Formation of malondialdehyde-derived N<sup>ε</sup>-(2-propenal)lysine in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *346*, 45-52.

- Uchida, K.; Kanematsu, M.; Morimitsu, Y.; Osawa, T.; Noguchi, N.; Niki, E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction - Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16058-16066.
- Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* **2003a**, *42*, 318-343.
- Uchida, K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* **2003b**, *25*, 249-257.
- Umamo, K.; Shibamoto, T. Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat. *J. Agr. Food Chem.* **1987**, *35*, 909-912.
- UniProt\_Apo B-100 Universal Protein Resource (UniProt), Apolipoprotein B-100 (human).  
*Internetseite: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04114>, Zugriff am 14.01.2016.*
- UniProt\_Ara h 2 Q6PSU2 - CONG7\_ARAHY. *Internetseite: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6PSU2>, Zugriff am 14.01.2016.*
- UniProt Universal Protein Resource. *Internetseite: <http://www.uniprot.org/>, Zugriff am 14.01.2016.*
- Untersmayr, E.; Schöll, I.; Swoboda, I.; Beil, W. J.; Förster-Waldl, E.; Walter, F.; Riemer, A.; Kraml, G.; Kinaciyan, T.; Spitzauer, S.; Boltz-Nitulescu, G.; Scheiner, O.; Jensen-Jarolim, E. Antacid medication inhibits digestion of dietary proteins and causes food allergy: A fish allergy model in Balb/c mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 616-623.
- USDA United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Oilseeds: World Markets and Trade. June 2015. *Internetseite: <http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>, Zugriff am 29.06.2015.*
- van Boxel, E. L.; Van Beers, M. M. C.; Koppelman, S. J.; Van Den Broek, L. A. M.; Gruppen, H. Allergen Ara h 1 occurs in peanuts as a large oligomer rather than as a trimer. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7180-7186.
- van Kuijk, F. J. G. M.; Siakotos, A. N.; Fong, L. G.; Stephens, R. J.; Thomas, D. W. Quantitative measurement of 4-hydroxyalkenals in oxidized low-density-lipoprotein by gas-chromatography-mass-spectrometry. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 420-424.
- Vander Leek, T. K.; Liu, A. H.; Stefanski, K.; Blacker, B.; Bock, S. A. The natural history of peanut allergy in young children and its association with serum peanut-specific IgE. *J. Pediatr.* **2000**, *137*, 749-755.
- Vercellotti, J. R.; Sanders, T. H.; Chung, S.-Y.; Bett, K. L.; Vinyard, B. T. Carbohydrate metabolism in peanuts during postharvest curing and maturation. *Dev. Food Sci.* **1995**, *37*, 1547-1578.
- Vieths, S.; Holzhauser, T.; Erdmann, S.; Fuchs, T.; Henzgen, M.; Kleine-Tebbe, J.; Lepp, U.; Niggemann, B.; Raithel, M.; Reese, I.; Saloga, J.; Vieluf, I.; Zuberbier, T.; Werfel, T. Neue Deklarationspflicht für Nahrungsmittelallergene in Lebensmitteln. *Allergo J.* **2006**, *15*, 114-122.
- Vissers, Y. M.; Iwan, M.; Adel-Patient, K.; Skov, P. S.; Rigby, N. M.; Johnson, P. E.; Müller, P. M.; Przybylski-Nicaise, L.; Schaap, M.; Ruinemans-Koerts, J.; Jansen, A. P. H.; Mills, E. N. C.; Savelkoul, H. F. J.; Wichers, H. J. Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: The necessity of degranulation assays. *Clin. Exp. Allergy* **2011**, *41*, 1631-1642.

- VO (EU) Nr. 1169/2011 Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission. *ABl EU L* **2011**, 304, 18-63.
- Vogt, W. Oxidation of methionyl residues in proteins - tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18, 93-105.
- Walker, W. A. Absorption of protein and protein fragments in the developing intestine: Role in immunological allergic reactions. *Pediatrics* **1985**, 75, 167-171.
- Wang, J.; Visness, C. M.; Sampson, H. A. Food allergen sensitization in inner-city children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, 115, 1076-1080.
- Watanabe, K.; Nakazato, Y.; Saiki, R.; Igarashi, K.; Kitada, M.; Ishii, I. Acrolein-conjugated low-density lipoprotein induces macrophage foam cell formation. *Atherosclerosis* **2013**, 227, 51-57.
- Wellner, A., Zusammenhang zwischen der Glykierung und dem allergenen Potential von Karotte (*Daucus carota* L.) und Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.). *Dissertation, Technische Universität Dresden* **2012a**.
- Wellner, A.; Nußpickel, L.; Henle, T. Glycation compounds in peanuts. *Eur. Food Res. Technol.* **2012b**, 234, 423-429.
- Westermeier, R. Electrophoresis in practice. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* **2005**, 4. Ausgabe.
- Woodroof, J. G. Peanuts - Production, Processing, Products. *The AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut* **1983**, 3. Auflage.
- Xu, D.; Thiele, G. M.; Kearley, M. L.; Haugen, M. D.; Klassen, L. W.; Sorrell, M. F.; Tuma, D. J. Epitope characterization of malondialdehyde-acetaldehyde adducts using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 978-986.
- Xu, G.; Sayre, L. M. Structural characterization of a 4-hydroxy-2-alkenal-derived fluorophore that contributes to lipoperoxidation-dependent protein cross-linking in aging and degenerative disease. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 247-251.
- Xu, G.; Liu, Y.; Sayre, L. M. Independent synthesis, solution behavior, and studies on the mechanism of formation of a primary amine-derived fluorophore representing cross-linking of proteins by (E)-4-hydroxy-2-nonenal. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5732-5745.
- Yalcin, T.; Harrison, A. G. Ion chemistry of protonated lysine derivatives. *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 1237-1243.
- Yamada, S.; Kumazawa, S.; Ishii, T.; Nakayama, T.; Itakura, K.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Sakai, K.; Osawa, T.; Uchida, K. Immunochemical detection of a lipofuscin-like fluorophore derived from malondialdehyde and lysine. *J. Lipid Res.* **2001**, 42, 1187-1196.
- Yang, C.-Y.; Chen, S.-H.; Gianturco, S. H.; Bradley, W. A.; Sparrow, J. T.; Tanimura, M.; Li, W.-H.; Sparrow, D. A.; DeLoof, H.; Rosseneu, M.; Lee, F.-S.; Gu, Z.-W.; Gotto, A. M.; Chan, L. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* **1986**, 323, 738-742.

- Yin, D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radical Bio. Med.* **1996**, *21*, 871-888.
- Yin, H.; Porter, N. A. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxid. Redox. Sign.* **2005**, *7*, 170-184.
- Ylä-Herttuala, S.; Palinski, W.; Rosenfeld, M. E.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Butler, S.; Witztum, J. L.; Steinberg, D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 1086-1095.
- Yolanda, P. Food toxicants analysis - Techniques, strategies and developments. *Elsevier, Amsterdam, Oxford* **2007**.
- Yoritaka, A.; Hattori, N.; Uchida, K.; Tanaka, M.; Stadtman, E. R.; Mizuno, Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 2696-2701.
- Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Modification of lysine amino groups by the lipid-peroxidation product 4,5(E)-epoxy-2(E)-heptenal. *Lipids* **1994**, *29*, 243-249.
- Zamora, R.; Alaiz, M.; Hidalgo, F. J. Determination of  $\epsilon$ -N-pyrrolylnorleucine in fresh food products. *J. Agric. Food Chem.* **1999a**, *47*, 1942-1947.
- Zamora, R.; Alaiz, M.; Hidalgo, J. Modification of histidine residues by 4,5-epoxy-2-alkenals. *Chem. Res. Toxicol.* **1999b**, *12*, 654-660.
- Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Lipids: Their role in the formation of endogenous antioxidants during food processing. *Czech J. Food. Sci.* **2009**, *27*, S1-S3.
- Zhou, Y.; Wang, J.; Yang, X.; Lin, D.; Gao, Y.; Su, Y.; Yang, S.; Zhang, Y.; Zheng, J. Peanut allergy, allergen composition, and methods of reducing allergenicity: A review. *Int. J. Food. Sci.* **2013**, 1-8.
- Zielinski, T. L.; Smith, S. A.; Pestka, J. J.; Gray, J. I.; Smith, D. M. ELISA to quantify hexanal-protein adducts in a meat model system. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3017-3023.
- Zuberbier, T.; Edenharter, G.; Worm, M.; Ehlers, I.; Reimann, S.; Hantke, T.; Roehr, C. C.; Bergmann, K. E.; Niggemann, B. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy* **2004**, *59*, 338-345.

## Verzeichnis wissenschaftlicher Publikationen, Poster und Vorträge

### Originalpublikationen

Globisch, M.; Schindler, M.; Kreßler, J., Henle, T. Studies on the reaction of trans-2-heptenal with peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 8500-8507.

Globisch, M.; Kaden, D.; Henle, T. 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and its lipation product 2-pentylpyrrole lysine (2-PPL) in peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 5273-5281.

Globisch, M.; Deuber, M.; Henle, T. Quantitation of acrolein and its lipation product 2-amino-6-(3-methylpyridin-1-ium-1-yl)hexanoic acid (MP-lysine) in peanuts. **2016**, in Vorbereitung.

### Sonstige Publikationen

Globisch, M.; Wellner, A.; Henle, T. Modifikation von Lebensmittelproteinen durch Lipidperoxidationsprodukte. *Lebensmittelchemie* **2013**, 67, 38, ISSN 0937-1478.

Globisch, M.; Kreßler, J.; Henle, T. Lysin-Hexanal-Addukte in gerösteten Erdnüssen. *Lebensmittelchemie* **2014**, 68, 101, ISSN 0937-1478.

Globisch, M.; Pattke, S.; Henle, T. Nachweis und Quantifizierung des Lipierungsproduktes 2-Pentylpyrrol-Lysin (2-PPL) in gerösteten Erdnüssen. *Lebensmittelchemie* **2015**, 69, 35, ISSN 0937-1478.

### Vorträge und Poster

Globisch, M.; Schindler, M.; Henle, T. Modifikation von Erdnussproteinen durch das Lipidperoxidationsprodukt *trans*-2-Heptenal. 23. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 14.-15.03.2013, Dresden. (Vortrag)

Globisch, M.; Wellner, A.; Henle, T. Modifikation von Lebensmittelproteinen durch Lipidperoxidationsprodukte. 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 10.-12.09.2012, Münster. (Poster)

Globisch, M.; Wellner, A.; Henle, T. Modification of food proteins by products of lipid peroxidation: Reaction of lysine with 2-heptenal. 11<sup>th</sup> International Symposium on the Maillard Reaction, 16.-20.09.2012, Nancy, Frankreich. (Poster)

Globisch, M.; Wellner, A.; Henle, T. Folgeprodukte der Lipidperoxidation modifizieren Lebensmittelproteine. Kongress Lebensmitteltechnologie der Gesellschaft Deutscher Lebensmitteltechnologe e.V., 27.-29.09.2012, Dresden. (Poster)

Globisch, M.; Wellner, A.; Henle, T. Modification of the  $\epsilon$ -amino group of lysine by trans-2-heptenal, a product of lipid peroxidation of heated peanut oil. Chemical Reactions in Foods VII, 14.-16.11.2012, Prag, Tschechische Republik. (Poster)  
Auszeichnung: Best Poster Award

Globisch, M.; Kreßler, J.; Henle, T. Lysin-Hexanal-Addukte in gerösteten Erdnüssen. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 16.-18.09.2013, Braunschweig. (Poster)

Globisch, M.; Pattke, S.; Henle, T. Nachweis und Quantifizierung des Lipierungsproduktes 2-Pentylpyrrol-Lysin (2-PPL) in gerösteten Erdnüssen. 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 22.-24.09.2014, Gießen. (Poster)

Witte, S.; Globisch, M.; Henle, T. Bildung von Maillard-Reaktionsprodukten während der Haselnussröstung. 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2015, Karlsruhe. (Poster)

Witte, S.; Globisch, M.; Henle, T. Formation of Maillard reaction products during roasting of hazelnuts. Euro Food Chem XVIII, 13.-16.10.2015, Madrid, Spanien. (Poster)

## Betreute wissenschaftliche Abschlussarbeiten

Schindler, M. Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten erhitzten Erdnussöls und Identifizierung ausgewählter Lipierungsprodukte. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2013.*

Kreßler, J. Lysin-Hexanal-Addukte in gerösteten Erdnüssen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2014.*

Pattke, S. Nachweis und Quantifizierung von 2-Pentylpyrrollysin (2-PPL) in gerösteten Erdnüssen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2014.*

Yipeng, T. Proteinfunktionalisierung durch Lipierung. *Masterarbeit, Technische Universität Dresden 2015.*

Kaden, D. Einfluss der Lipierung auf das allergene Potential von Erdnussproteinen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2015.*

Deuber, M. Malondialdehyd- und Acrolein-Lipierungsprodukte in Erdnüssen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2015.*

Schaller, K. Einfluss der Lipierung auf das Low Density Lipoprotein. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2015.*

Störmer, L. Neo-Lipoproteine durch Lipierung. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Technische Universität Dresden 2016.*

## Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die fachlichen Diskussionen, das stets entgegengebrachte Vertrauen, den wissenschaftlichen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas sowie das immer freundschaftliche Verhältnis.

Herrn Prof. Dr. Harshadrai Rawel der Universität Potsdam, Institut für Ernährungswissenschaft, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Masako Toda sowie Frau Maren Krause vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen danke ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen sowie die Möglichkeiten zur Durchführung von Allergenitätstests im Rahmen der immunologischen Untersuchungen. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Henning Morawitz, Frau Dr. Anja Hofmann und Frau Annika Frenzel vom Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen sowie die Möglichkeit zur Isolierung der LDL-Proben im Rahmen der Untersuchungen zu physiologischen Konsequenzen der LDL-Oxidation.

Herrn Marco Schindler, Frau Jana Kreßler, Frau Stefanie Pattke, Frau Yipeng Tan (Chemie Master), Frau Diana Kaden, Frau Meike Deuber, Herrn Karl Schaller sowie Herrn Lars Störmer danke ich für ihre sehr engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten und darüber hinaus Herrn Marco Schindler, Herrn Christoph Hohmann sowie Herrn Karl Schaller für ihre Tätigkeiten als studentische Hilfskräfte.

Frau Karla Schlosser, Professur für Lebensmittelchemie, danke ich für die Messungen am Aminosäureanalysator. Frau Anke Peritz, Professur für organische Chemie, und Herrn Stephen Schulz, Professur für anorganische Chemie, danke ich für die Durchführungen der Elementanalysen. Frau Dr. Margit Gruner, Professur für organische Chemie, Herrn Silvathmeehan Yogendra und Herrn Kai Schwedtmann, jeweils aus der Professur für anorganische Chemie, danke ich für die Durchführungen der Messungen mittels NMR-Spektrometer.

Weiterhin möchte ich allen Doktoranden, Diplomanden und Mitarbeitern der Professur für Lebensmittelchemie für das freundschaftliche Umfeld und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Bei meiner Freundin bedanke ich mich für alles.

## Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Technischen Universität Dresden an der Professur für Lebensmittelchemie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften vom 23.02.2011, zuletzt geändert durch Beschlüsse des Fakultätsrates vom 15.06.2011 und 18.06.2014, in allen Teilen an. Weiterhin versichere ich, dass bisher kein früheres erfolgloses Promotionsverfahren stattgefunden hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift