



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zum
Nachweis von Mohn-DNA in Lebensmitteln

verfasst von / submitted by

Mag. Maria Pesendorfer

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears
on the student record sheet:

UA 190 445 423

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Lehramtsstudium Unterrichtsfach Biologie und Umweltkunde
Unterrichtsfach Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl für die sehr kompetente und wohlwollende Unterstützung, insbesondere auch für die Bereitschaft, meine Diplomarbeit einige Jahre nach der Arbeit am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien noch weiterhin zu betreuen und sich die Zeit zu nehmen, mir zahlreiche sehr hilfreiche fachliche Tipps zu geben.

Weiters möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir immer wieder mit aufmunternden Worten zur Seite standen und mich auf diese Weise unterstützten.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	LEBENSMITTELALLERGIEN.....	1
1.1.1	Epidemiologie von Lebensmittelallergien	1
1.1.2	Einteilung von Nahrungsmittelunverträglichkeiten	4
1.1.3	Definition von Allergien	6
1.1.4	Antigene, Allergene und Antikörper	6
1.1.4.1	Einteilung und Eigenschaften von Lebensmittelallergenen	8
1.1.5	Der Magen-Darm-Trakt und die Entstehung von Lebensmittelallergien	9
1.1.5.1	Das mukosale Immunsystem.....	10
1.1.5.2	Chemische und biologische Schutzmechanismen des Magen-Darm-Trakts	11
1.1.5.3	Transport von Antigenen durch die Darm-Epithelzellschicht.....	11
1.1.5.4	Die Rolle von dendritischen Zellen und T-Helfer-Zellen	12
1.1.6	Entstehung einer Allergie.....	13
1.1.6.1	Sensibilisierung.....	13
1.1.6.2	Die allergische Reaktion	13
1.1.7	Symptome von Lebensmittelallergien	14
1.1.7.1	Allergische Sofortreaktion und länger andauernde Entzündungsreaktion	17
1.1.7.2	Die anaphylaktische Reaktion (Anaphylaxis, Anaphylaxie)	18
1.1.7.3	Symptome von Pollen-assoziierten Lebensmittelallergien (Orales Allergiesyndrom)	19
1.1.8	Faktoren mit Einfluss auf die Entstehung einer Lebensmittelallergie	19
1.1.8.1	Genetische Faktoren	19
1.1.8.2	Umweltfaktoren	20
1.1.9	Diagnose von Lebensmittelallergien	21
1.1.9.1	Anamnese.....	22
1.1.9.2	Skin-Prick-Test	22
1.1.9.3	IgE-Serum-Test	23
1.1.9.4	Provokationstest (Oral Food Challenge).....	23
1.1.9.5	Diagnose anaphylaktischer Reaktionen.....	24
1.1.10	Prävention von Lebensmittelallergien	25
1.1.11	Therapie von Lebensmittelallergien.....	25
1.1.11.1	Die Vermeidung des Allergens	25
1.1.11.2	Therapie im Fall einer anaphylaktischen Reaktion.....	26
1.1.11.3	Neuere Therapie-Ansätze.....	27
1.1.12	Gesetzliche Kennzeichnungspflichten für Lebensmittelallergene	28
1.1.12.1	Die Problematik „versteckter Allergene“ in Lebensmitteln.....	31
1.2	MOHN und MOHNALLERGIE	32
1.2.1	Schlafmohn (Papaver somniferum)	32
1.2.1.1	Die Inhaltsstoffe von Schlafmohn und deren Verwendung.....	33
1.2.1.2	Medizinische Anwendungen von Schlafmohn.....	34
1.2.2	Epidemiologie der Mohnallergie.....	35
1.2.3	Allergene in Schlafmohnsamen	36
1.2.3.1	Schlafmohnsamen: <i>in vitro</i> -Kreuzreaktionen und klinische Kreuzreaktionen.....	36
1.2.3.2	Der Einfluss der Verarbeitung von Mohnsamen auf die Mohn-Allergie	38
1.2.4	Symptome der Mohn-Allergie.....	39
1.2.4.1	Die Mohn-Allergie bei Personen ohne weitere allergische Erkrankungen.....	40
1.2.4.2	Anaphylaktische Reaktionen nach dem Verzehr von Mohnsamen	40
1.2.4.3	Mohn-abhängige, Sport-induzierte anaphylaktische Reaktionen	41
1.2.5	Diagnose der Mohn-Allergie	42
1.2.6	Therapie der Mohn-Allergie.....	43

1.3 Bisherige Methoden zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln.....	43
1.3.1 Grundlage dieser Diplomarbeit: Dissertation von Fatima Tazeen Husain ⁸³	43
1.3.2 Weitere Methoden zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln	45
2 ZIELSETZUNG	47
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	48
3.1 Molekularbiologische Methoden	48
3.1.1 Vorteile und Nachteile molekularbiologischer Methoden.....	48
3.1.2 Isolierung von DNA aus Lebensmitteln	49
3.1.2.1 Die CTAB-Extraktionsmethode	50
3.1.2.2 QIAamp DNA Mini Kit	51
3.1.2.3 Vergleich der CTAB-Methode mit Silica-Methoden	52
3.1.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA	52
3.1.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	53
3.1.4.1 Struktur und Eigenschaften von DNA.....	54
3.1.4.2 Die Beschaffenheit der DNA-Probe	55
3.1.4.3 Eigenschaften der Primer	56
3.1.4.4 Eigenschaften von DNA-Polymerasen	57
3.1.4.5 Die Pufferlösung	58
3.1.4.6 Die 1. Phase der PCR: Denaturierung der DNA-Doppelstränge.....	59
3.1.4.7 Die 2. Phase der PCR: Anlagerung der Primer (Annealing).....	59
3.1.4.8 Die 3. Phase der PCR: Elongation	59
3.1.4.9 Die Amplifikations-Rate der PCR	60
3.1.4.10 Detektion der PCR-Produkte	60
3.1.4.11 Die Real-Time PCR (Echtzeit-PCR).....	61
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	65
4.1 Ergebnisse der Untersuchungen von Blaumohn, Graumohn- und Weißmohn-Extrakten	65
4.1.1 Konzentration und Reinheit der Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakte	66
4.1.2 Optimierung der Primer-Paar- und Sonden-Konzentration	68
4.1.3 Selektivität des optimierten Assays für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn	70
4.1.4 Bestimmung der Effizienz und Nachweisgrenze des Real-Time PCR-Assays	71
4.1.4.1 Effizienz	71
4.1.4.2 Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD).....	73
4.2 Kreuzreaktivitäts-Tests	76
4.2.1 Ergebnisse der photometrischen Messungen der DNA-Extrakte	77
4.2.1.1 Konzentration und Reinheit der Extrakte der 1. Extraktion (CTAB-Methode)	77
4.2.1.2 Konzentration und Reinheit der Extrakte der 2. Extraktion (CTAB-Methode)	79
4.2.1.3 Konzentration und Reinheit der Extrakte der 3. Extraktion (CTAB, QIAamp DNA Mini Kit).....	81
4.2.1.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der drei Extraktionen	83
4.2.2 Untersuchung der Kreuzreaktivität des Real-Time PCR-Assays	91
4.3 Bestimmung der Nachweisgrenze und Effizienz in einem Modell-Lebensmittel	92
4.3.1 Konzentration und Reinheit der Extrakte aus den rohen und gebackenen Teigen	93
4.3.2 C _T -Werte der Extrakte aus den rohen und gebackenen Teigen	94
4.3.3 Nachweisgrenze und Effizienz des Real-Time PCR-Assays im Modell-Lebensmittel.....	97
4.4 Nachweis von Mohn-DNA in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln.....	98
4.4.1 Konzentration und Reinheit der Extrakte aus Produkten mit und ohne Mohn	100
4.4.2 Untersuchung der Eignung des Real-Time PCR-Assays für kommerzielle Lebensmittel	102

5	SCHLUSSBETRACHTUNG	107
6	EXPERIMENTELLES	109
6.1	DNA-Extraktion	109
6.1.1	CTAB-Methode.....	109
6.1.1.1	Reagenzien der CTAB-Extraktions-Methode	109
6.1.1.2	Herstellung der Lösungen für die CTAB-Extraktion	109
6.1.1.3	Durchführung der CTAB-Extraktion	110
6.1.2	QIAamp DNA Mini Kit (Firma QIAGEN)	111
6.1.2.1	Durchführung der Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit.....	111
6.1.3	DNA-Extrakte aus Lebensmitteln mit/ohne Mohn in der Zutatenliste	112
6.1.3.1	Herstellung und Verwendung der Extrakte aus Blau-, Grau- und Weißmohn	112
6.1.3.2	Herstellung der Extrakte für die Kreuzreaktivitäts-Tests.....	113
6.1.3.3	Herstellung der Extrakte aus dem Modell-Lebensmittel.....	115
6.1.3.4	Herstellung der Extrakte aus kommerziell erhältlichen Produkten mit und ohne Mohn	116
6.2	Real-Time PCR.....	117
6.2.1	Materialien, Durchführung und Auswertung der PCR	117
6.2.1.1	Eigenschaften von Primer Forward, Primer Reverse und Sonde.....	117
6.2.1.2	Arbeitsplatz.....	117
6.2.1.3	Zusammensetzung des Reaktionsansatzes pro Well	118
6.2.1.4	Mastermix.....	118
6.2.1.5	Pipettierschema für die DNA-Extrakte und für die Positiv- und Negativ-Kontrollen	118
6.2.1.6	Pipettier-Schemata für die Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration	119
6.2.1.7	Temperaturprogramm.....	120
6.2.1.8	Auswertung der PCR: Threshold-Line, Nachweisgrenze und Effizienz	120
7	ANHANG	121
	ABSTRACT	121
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	122
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	124
	TABELLENVERZEICHNIS.....	125
	LITERATURVERZEICHNIS	127

1 EINLEITUNG

1.1 LEBENSMITTELALLERGIEN

1.1.1 Epidemiologie von Lebensmittelallergien

Lebensmittelallergien betreffen, wie aufgrund umfangreicher Daten angenommen wird, bis zu 10 % der Bevölkerung in westlichen Ländern. Die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien haben in den letzten 20 bis 30 Jahren zugenommen und sind nicht gleichmäßig über alle Altersgruppen verteilt, da prozentuell mehr Kinder an Lebensmittelallergien leiden als Erwachsene.¹ Allgemein lässt sich feststellen, dass sich Lebensmittelallergien neben Asthma und Pollenallergien zu einem erheblichen gesundheitlichen Problem entwickelt haben,² da sie weltweit Millionen von Menschen betreffen und dabei die unterschiedlichsten Lebensbereiche beeinträchtigen.³

Es gibt zahlreiche allergieauslösende Lebensmittel, jedoch verursachen nur wenige davon schwerwiegende Reaktionen, darunter **Erdnüsse** und **Baumnüsse**, **Fische**, **Schalentiere (Meeresfrüchte)**, **Eier**, **Milch**, **Weizen**, **Soja** und **Samen**.¹

Obwohl theoretisch jedes Lebensmittel eine allergische Reaktion bewirken kann, sind die bei Erwachsenen weltweit am häufigsten zu Reaktionen führenden Lebensmittel **Fische**, **Schalentiere**, **Erdnüsse** und **Baumnüsse**. Schätzungen zufolge sind etwa 2 % der Erwachsenen in den USA von einer der genannten Allergien betroffen⁴ und 1 % der Bevölkerung, auf alle Altersgruppen bezogen, leidet an einer Erdnuss-Allergie.³

Abgesehen davon gibt es pollenassoziierte Lebensmittelallergien, wobei es sich um Kreuzallergien von Pollen mit bestimmten Lebensmitteln handelt. Da die Reaktionen auf Pollen generell zunehmen, lässt sich daher auch ein Anstieg bei den pollenassoziierten Lebensmittelallergien beobachten,⁵ wobei diese bei Erwachsenen häufiger auftreten als bei Kindern⁶ und allgemein den Hauptgrund für Lebensmittelallergien bei Erwachsenen darstellen.⁵

Weitere Lebensmittelallergien ergeben sich durch die in verschiedenen Regionen vorherrschenden kulturell bedingten Ernährungsweisen.⁴ In diesem Zusammenhang fällt auf, dass bestimmte Lebensmittelallergien heutzutage häufiger zu beobachten sind als zu früheren Zeiten, da die Verfügbarkeit exotischer Obst- und Gemüsesorten und dadurch der Kontakt zu neuen Lebensmittelallergenen weltweit zugenommen hat.⁵ Beispiele dafür sind die Allergien gegen Kiwis,⁵ tropische Früchte, Sesam-Samen und bestimmte Gewürze,⁷ aber auch Allergien gegen früher nur selten konsumierte Getreidesorten und gegen Hülsenfrüchte.⁵

Frauen sind aus unbekannten Gründen einem doppelt so hohen Risiko wie Männer ausgesetzt, eine Lebensmittelallergie gegen Gewürze zu entwickeln,⁸ und allgemein gehören Anis, Pfeffer, Paprika, Senf, Thymian, Majoran und Zimt zu den häufigsten allergieauslösenden Gewürzen in Deutschland.⁹

Betrachtet man die einzelnen Lebensalter genauer, so sind bis zu 5 % der Erwachsenen und bis zu 8 % der Kinder von Lebensmittelallergien betroffen.¹⁰ Letzteres geht aus einer von Gupta et al.¹¹ 2009 bis 2010 in den USA unter den Eltern von 38480 Kindern durchgeführten Umfrage hervor, wobei 30,4 % der von Lebensmittelallergien betroffenen Kinder an mehreren Lebensmittelallergien litten und bei 38,7 % durch ein bestimmtes Allergen sogar schwerwiegende Reaktionen ausgelöst wurden.¹¹ Allerdings liegen aus Umfragen ermittelte Häufigkeiten von Lebensmittelallergien im Allgemeinen höher als von medizinischer Seite bestätigte Häufigkeiten.¹

Die meisten Lebensmittelallergien bei Kindern werden durch **Eier, Kuhmilch, Weizen, Soja, Erdnüsse** und **Baumnüsse** verursacht,⁴ wobei es sich bei den zwei häufigsten Lebensmittelallergien im Kindesalter um die Hühnerei- und die Kuhmilch-Allergie handelt.¹² Lebensmittelallergien entwickeln sich oftmals in den ersten drei Lebensjahren und gehen bei 85 % der Kinder im Alter von fünf bis zehn Jahren wieder verloren,¹² wobei es Unterschiede zwischen einzelnen Lebensmittelallergien gibt: So bleibt die Erdnuss-Allergie im späteren Leben in vielen Fällen erhalten, während die Milch-Allergie¹³ und die Hühnerei-Allergie häufig wieder verschwinden.²

Laut der EuroPrevall Birth Cohort Study,^{14, 15} einer Studie an insgesamt 12049 Neugeborenen in neun europäischen Ländern, wovon bei 9336 Kindern (77,5 %) das Auftreten der Kuhmilch-Allergie und der Hühnerei-Allergie von der Geburt bis zum vollendeten zweiten Lebensjahr untersucht wurde, ging die Kuhmilch-Allergie bei 69 % und die Hühnerei-Allergie bei 50 % der Kinder innerhalb eines Jahres nach der Diagnose-Stellung wieder verloren,^{14, 15} während laut der australischen HealthNuts Study^{16, 17} nur bei 22 % aller Kinder, die im Alter von einem Jahr an einer Erdnuss-Allergie litten, diese im Alter von vier Jahren nicht mehr vorhanden war.¹⁶

Die letztgenannte Studie, an der 5276 australische Kinder teilnahmen, ergab allgemein, dass 11 % aller einjährigen Kinder in Australien an Allergien gegen rohe Eier, Erdnüsse oder Sesam litten,^{17, 18} und dass die insgesamt Häufigkeit der drei genannten Allergien im Alter von vier Jahren nur noch 3,8 % betrug.¹⁷ Allgemein erreichen die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien bei Kindern im Alter von einem Jahr mit 6-8 % ihren höchsten Wert.¹³

Eine in 89 Ländern von Experten durchgeführte Umfrage der World Allergy Organization (WAO)¹⁹ ergab, dass Lebensmittelallergien in einem Alter von unter fünf Jahren in Australien, gefolgt von Finnland und Kanada, am höchsten sowie in Thailand und Island am niedrigsten waren, wobei sich jedoch die Untersuchungsmethoden in den verschiedenen Ländern teilweise beträchtlich voneinander unterschieden.^{1, 19}

Was lebensbedrohliche Reaktionen auf Lebensmittel betrifft, so werden statistisch gesehen etwa ein Drittel bis die Hälfte aller **anaphylaktischen Reaktionen**, welche in Notaufnahmen in Nordamerika, Europa, Asien und Australien dokumentiert sind, durch Lebensmittelallergene verursacht.⁷ Erdnüsse führen unter allen Lebensmitteln am häufigsten zu einer tödlichen oder

beinahe tödlichen Anaphylaxie, wobei ein früher Kontakt zu Erdnüssen, konkret innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate, das Risiko für die Entstehung einer Erdnuss-Allergie deutlich reduziert.³ Bei Kindern werden 50-75 % aller anaphylaktischen Reaktionen durch den Verzehr von Lebensmitteln bewirkt, wobei die häufigsten Auslöser Eier, Milch, Nüsse, Sesam, Fische und Schalentiere (Meeresfrüchte) sind, es können aber auch in seltenen Fällen Mohnsamen für eine anaphylaktische Reaktion verantwortlich sein.²⁰ Die meisten tödlichen anaphylaktischen Reaktionen treten bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf.²¹

Vergleicht man die Häufigkeiten von **Lebensmittelallergien weltweit**, so ging man bis vor wenigen Jahren davon aus, dass überproportional viele Menschen in westlichen Ländern an Lebensmittelallergien leiden.¹ Allgemein sind von zahlreichen Ländern bisher noch keine epidemiologischen Daten in Bezug auf Lebensmittelallergien verfügbar,² mittlerweile gibt es jedoch Hinweise darauf, dass die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien auch in Entwicklungs- oder Schwellenländern im Steigen begriffen sind.²²

Einer der Gründe dafür, dass es über einige Länder erst seit kurzem Informationen gibt, ist, dass die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien bis vor einigen Jahren generell nicht dokumentiert oder gemeldet wurden.²² Außerdem wird vermutet, dass Lebensmittelallergien parallel zu ökonomischem Wachstum zunehmen, weswegen Lebensmittelallergien in Schwellenländern aufgrund der zunehmenden wirtschaftlichen Entwicklung erst seit kurzem im Steigen begriffen sein könnten.²²

Ökonomisches Wachstum ist mit einem zunehmend urbanen Lebensstil verbunden, welcher mit einer Reihe an veränderten Lebensbedingungen einhergeht, beispielsweise mit einem geringeren Kontakt zu Mikroorganismen, der Einnahme von Antibiotika, einer Ernährungsumstellung und einer geringeren Exposition gegenüber UV-Licht und einem daraus resultierenden Vitamin D-Mangel.²² Man nimmt daher aufgrund neuerer Studien^{23, 24} an, dass Lebensmittelallergien in sich stark entwickelnden Gebieten in China oder in städtischen Gegenden von Südafrika häufiger werden.^{19, 23, 24}

Aufgrund der in Australien durchgeführten HealthNuts Study^{25, 26} gibt es außerdem Hinweise darauf, dass die ethnische Herkunft einen Einfluss auf die Entstehung von Lebensmittelallergien haben kann,^{25, 26} so scheint etwa eine asiatische Herkunft das Risiko für die Entstehung einer Erdnuss-Allergie zu bergen, jedoch nur unter der Voraussetzung, dass Kinder asiatischer Eltern in einem frühen Lebensalter einem westlichen Lebensstil ausgesetzt sind.^{22, 25, 26} Es wird daher angenommen, dass es eine genetische Veranlagung für bestimmte Lebensmittelallergien gibt, welche durch schützende Umweltfaktoren verdeckt wird, jedoch durch eine westliche Lebensweise zum Vorschein kommen kann.²²

Trotz umfangreicher Daten lassen sich aus verschiedenen Gründen oftmals keine Aussagen über die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien treffen. So gibt es etwa verschiedene Schweregrade von Lebensmittelallergien, der Begriff Allergie wird in verschiedenen Studien

oft nicht gleich definiert, es werden nicht in jeder Studie dieselben Methoden angewandt und häufig werden jeweils nur bestimmte Lebensmittel in die Untersuchungen einbezogen. Dadurch ist die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Studien in vielen Fällen nicht gegeben.¹ Zusätzlich erschweren geographische Unterschiede, Ernährungsfaktoren sowie Unterschiede, die das Alter und die ethnische Zugehörigkeit betreffen, die Gewinnung zuverlässiger Daten,¹ und die zur Durchführung standardisierter Untersuchungen notwendigen spezialisierten medizinischen Zentren stehen nicht in allen Gebieten zur Verfügung. Informationen über die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien beruhen abgesehen davon häufig auf Ersatz-Messungen, beispielsweise auf der Dokumentation von anaphylaktischen Reaktionen in Notaufnahmen oder auf Befragungen von Eltern, Lehrern oder medizinischem Personal.²

1.1.2 Einteilung von Nahrungsmittelunverträglichkeiten

Viele Menschen leiden an Nahrungsmittelunverträglichkeiten, wobei es sich nur zu einem geringen Prozentsatz um echte Lebensmittelallergien handelt.²⁷ Um verschiedene Nahrungsmittelunverträglichkeiten voneinander abzugrenzen, wurden diese von der EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology) im Jahr 1995 zunächst in toxische und nicht-toxische Reaktionen unterteilt.⁵

Toxische Reaktionen auf Lebensmittel werden durch Substanzen, welche eine toxische oder pharmakologische Wirkung besitzen, hervorgerufen, beispielsweise durch das Alkaloid Solanin, durch das biogene Amin Histamin, durch toxische Proteine (z.B. Lektine), Umweltverunreinigungen, Gifte biologischen Ursprungs und bestimmte Zusatzstoffe in Lebensmitteln (z.B. Glutamat).⁵ Toxische Reaktionen auf Lebensmittel werden gelegentlich mit Lebensmittelallergien verwechselt, da teilweise ähnliche Symptome auftreten. Ein wichtiger Unterschied zu Lebensmittelallergien besteht jedoch darin, dass bei toxischen Reaktionen keine Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, und dass die schädliche Wirkung toxischer Substanzen von der Dosis abhängig ist.⁵ Letzteres trifft auf allergieauslösende Lebensmittel nicht zu, da bereits geringste Spuren von Lebensmittelallergenen bei betroffenen Personen sehr starke Reaktionen bis hin zu einem anaphylaktischen Schock verursachen können.²⁸

Nicht-toxische Reaktionen werden laut der EAACI in immunologische Reaktionen (Allergien) und nicht-immunologische Reaktionen (Lebensmittelintoleranzen) unterteilt.⁵ Mittlerweile verwendet man, wie 2001 von der WAO, der World Allergy Organization, vorgeschlagen, anstelle des von der EAACI geprägten Begriffs der nicht-toxischen Reaktionen die Bezeichnung Hypersensibilität (Hypersensitivity) oder Überempfindlichkeit.²⁹ Die Definition der Hypersensibilität nach der WAO lautet, dass eine Substanz, welche vom Großteil der Menschen in einer bestimmten Dosis toleriert wird, bei hypersensiblen Personen in derselben

Dosis objektiv beobachtbare und reproduzierbare Symptome hervorruft.²⁹ Dabei ist wichtig, dass ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Stoff (oder Umweltfaktor) und den auftretenden Symptomen hergestellt werden kann.³⁰

Bei den **nicht-immunologischen Hypersensibilitäts-Reaktionen** werden enzymatische, pharmakologische und unbekannte Ursachen unterschieden.⁵ Dazu zählen beispielsweise die Intoleranz gegenüber dem in Aspirin enthaltenen Wirkstoff,²⁹ die Laktose-, Fruktose- und Galaktose-Intoleranz, die Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie (PKU), die Ahornsirup-Krankheit und die Reaktionen auf chemische Zusatzstoffe (z.B. Farbstoffe, Aromastoffe und Konservierungsmittel).⁵ Bei den nicht-immunologischen Hypersensibilitäts-Reaktionen handelt es sich um reproduzierbare Reaktionen auf Substanzen, zwei wichtige Unterschiede zu Allergien bestehen jedoch darin, dass die Reaktionen nicht durch das Immunsystem vermittelt werden²⁹ und daher kein Immunglobulin E (IgE) im Blut nachgewiesen werden kann,²⁷ und dass bereits beim ersten Kontakt mit der betreffenden Substanz Symptome auftreten können, also keine Sensibilisierung notwendig ist.⁵

Innerhalb der **immunologischen Hypersensibilitäts-Reaktionen (Allergien)** unterscheiden sowohl die EAACI als auch die WAO zwischen nicht-IgE-vermittelten und IgE-vermittelten Reaktionen.^{5, 29} Unter **nicht-IgE-vermittelten Allergien** versteht man Reaktionen, die ohne Beteiligung von IgE ablaufen, an welchen jedoch trotzdem das Immunsystem beteiligt ist – ein Beispiel dafür ist die Zöliakie.²⁹ **IgE-vermittelte Allergien** werden laut WAO in Allergien unterteilt, bei welchen bereits eine *geringe Dosis* des Allergens zu einer Sensibilisierung führt, beispielsweise Lebensmittelallergien und Allergien gegen inhalierte Substanzen, und in Allergien, die erst in einer *höheren Dosis* eine Sensibilisierung zur Folge haben, etwa Arzneimittelallergien²⁹ und Allergien gegen Insektenstiche aus der Gruppe der Hautflügler.³⁰ Bei der letztgenannten Gruppe von Allergien sind besonders jene gegen Bienen- und Wespengifte von Bedeutung, da es sich dabei um einen der Hauptgründe für das Auftreten anaphylaktischer Reaktionen bei Erwachsenen handelt.³¹

Abgesehen von der für eine allergische Reaktion notwendigen Dosis kann man IgE-vermittelte Allergien nach ihrer *Entstehung* sowie nach dem *Ort ihres Auftretens* in Sofortreaktionen sowie in das orale Allergiesyndrom (OAS) unterteilen.⁷ Sofortreaktionen können die Haut, den Atemtrakt und den Gastrointestinaltrakt betreffen, aber auch systemische Reaktionen bis hin zu einer Anaphylaxie bewirken, und sie zeigen beim Großteil der Patienten IgE-Antikörper im Blutserum sowie einen positiven Hauttest, während beim oralen Allergiesyndrom (OAS), der pollenassozierten Lebensmittelallergie, vor allem Symptome an der Schleimhautoberfläche des Verdauungstrakts und nur selten Symptome in anderen Organsystemen auftreten.⁷

1.1.3 Definition von Allergien

Im Lauf der Zeit gab es unterschiedliche Definitionen des Begriffes Allergie, wobei das Wort „Allergie“ ursprünglich von den zwei aus dem Altgriechischen stammenden Wörtern „*allos*“ (anders) und „*ergos*“ (Reaktion) abgeleitet werden kann. Auf dieser Wortherkunft basiert die 1906 von Clemens von Pirquet für die Beschreibung von Allergien gefundene Definition²⁹ einer „*erworbenen Änderung der Reaktionsfähigkeit eines Organismus in zeitlicher, qualitativer und quantitativer Beziehung*“,⁵ wobei die veränderte Reaktionsfähigkeit durch den wiederholten Kontakt mit einem Allergen erworben wird.⁵

Seit Pirquet gab es immer wieder neue Definitionen des Begriffs Allergie, nicht nur zu verschiedenen Zeiten, sondern teilweise sogar zeitgleich in unterschiedlichen Gebieten der Erde, was die Kommunikation zwischen Forscherinnen und Forschern sowie Ärztinnen und Ärzten aus verschiedenen Ländern erschwerte. Daher versuchte man schließlich, die Nomenklatur des Begriffs „Allergie“ zu vereinheitlichen.²⁹

Die Definition des Begriffs **Allergie** nach der WAO lautet, dass es sich dabei um eine durch das Immunsystem vermittelte, spezifische Hypersensibilität gegenüber bestimmten körperfremden Substanzen, die als Allergene bezeichnet werden, handelt, welche durch Antikörper oder durch Zellen des Immunsystems vermittelt wird.^{29, 32} Ein typisches Merkmal von Allergien ist, dass das Gleichgewicht zwischen den Zellen des erworbenen Immunsystems (B- und T-Lymphozyten), den restlichen Körperzellen und bestimmten Umwelteinflüssen beeinträchtigt ist, was im schlimmsten Fall zu lebensbedrohlichen Symptomen führen kann.³³

Unter einer **Lebensmittelallergie** versteht man eine durch Antikörper aus der Klasse IgE vermittelte Typ-I-Reaktion des Immunsystems (Hypersensibilisierung vom Soforttyp), welche sich gegen bestimmte Nahrungsmittelbestandteile, die sogenannten Lebensmittelallergene, richtet.⁵ Bei einer Lebensmittelallergie findet man daher spezifisch gegen das jeweilige Lebensmittelallergen gerichtete IgE-Antikörper im Blut.²⁷ Die Typ-I-Reaktion ist nicht nur charakteristisch für Lebensmittelallergien, sondern tritt unter anderem auch bei Pollenallergien auf,⁵ und ein wesentlicher Bestandteil der allergischen Typ-I-Reaktion besteht allgemein in einer Aktivierung von Mastzellen.³⁴ Es gibt noch weitere Typen von allergischen Reaktionen,³⁴ die Typ-I-Reaktionen und die dazugehörigen Lebensmittelallergien gelten jedoch als die eigentlichen allergischen Reaktionen.⁵

1.1.4 Antigene, Allergene und Antikörper

Der Begriff **Antigen** ist eine Bezeichnung für körperfremde Substanzen, welche nach Einbringung in den Körper von Wirbeltieren, so auch in den menschlichen Körper, eine Immunreaktion auslösen können.³⁵ Beispiele für Antigene sind Bestandteile von Krankheitserregern, Toxine,³⁴ aber auch Allergene,³³ etwa Nahrungsmittelbestandteile.³⁶

Antigene sind üblicherweise große Moleküle, beispielsweise Proteine oder Polysaccharide,³³ es gibt jedoch auch kleine Moleküle, welche die Fähigkeit besitzen, eine Immunreaktion zu verursachen.³⁵ Antigene besitzen an ihrer Oberfläche einen Bereich, an welchen ein spezifischer Antikörper des Immunsystems binden kann und welcher als **Epitop** oder **Antigen-Determinante** bezeichnet wird. Große Antigene können auch mehr als ein Epitop und somit mehr als eine Bindungsstelle für Antikörper aufweisen.³⁴

Allergene sind von ihrem Aufbau her Proteine oder Glycoproteine⁵ mit einem Molekulargewicht von 5000 bis 70000 Dalton (Da).⁷ Die Benennung von Allergenen beruht auf dem lateinischen Namen der allergieauslösenden biologischen Art,⁵ beispielsweise bezeichnet die Abkürzung **Pap s 1** ein Allergen in den Samen des Schlafmohns (**Papaver somniferum**).³⁷ Ein wesentlicher Bestandteil der von körperfremden Antigenen verursachten Immunreaktion ist die Bildung von **Antigen-Antikörper-Komplexen** in Körperflüssigkeiten und im Gewebe,³⁵ wobei die Antigene von bestimmten Zellen des Immunsystems, den B- und T-Lymphozyten, erkannt werden.³³ Der Antigen-Antikörper-Komplex kommt durch eine hochspezifische, nicht-kovalente und reversible Bindung zwischen dem Epitop des jeweiligen Antigens und spezifischen, gegen das Antigen gerichteten Abwehrstoffen, den sogenannten Antikörpern, zustande.^{5, 35}

Antikörper (Immunglobuline) sind Proteine⁵ und liegen entweder gebunden in Form von Antigen-spezifischen Rezeptoren an den Oberflächen von B- und T-Lymphozyten vor oder werden von spezialisierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, als freie Antikörper abgegeben. Allgemein richtet sich jeder B- und T-Lymphozyt mit Hilfe von Rezeptoren bzw. Antikörpern spezifisch gegen ein ganz bestimmtes Antigen.³³ Es gibt **5 Haupttypen** von Antikörpern (Immunglobulinen), die als IgA, IgD, IgE, IgG und IgM bezeichnet werden und verschiedene Aufgaben im Immunsystem erfüllen.³⁴ Diese auch als Iso-Typen bezeichneten Antikörper-Klassen sind je nach ihrer Funktion in bestimmten Geweben zu finden.³⁸

Die **IgE-Antikörper** sind Monomere und kommen im Blut nur selten vor, da sie stets an bestimmte Rezeptoren von basophilen Zellen und Mastzellen gebunden sind. IgE-Antikörper spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Parasiten, etwa von Würmern, jedoch ist diese Aufgabe von IgE in modernen Gesellschaften mittlerweile in den Hintergrund getreten, und IgE besitzt hier hauptsächlich eine Bedeutung im Rahmen von allergischen Erkrankungen.³⁸

Die Antikörper-Monomere besitzen die gleiche Grundstruktur, unterscheiden sich jedoch in kleinen Bereichen, so fehlt etwa dem Immunglobulin E die zentrale Gelenk-Region.³⁴ Jeder Antikörper setzt sich aus jeweils zwei gleichen schweren und zwei gleichen leichten Ketten zusammen, welche gemeinsam eine Ypsilon-Form bilden.³⁸ Der wichtigste Unterschied zwischen den einzelnen Antikörpern besteht in unterschiedlichen Aminosäure-Abfolgen in jenem Bereich, mit welchem die Antikörper bzw. Rezeptoren an das Epitop eines bestimmten

Antigens binden.³⁸ Jeder erwachsene menschliche Körper besitzt bis zu 100 Millionen verschiedene Rezeptoren bzw. Antikörper, welche durch unterschiedliche Kombinationen von circa 30000 Gensegmenten, auf deren Information die Bildung der verschiedenen Antikörper- bzw. Rezeptor-Proteine basiert, entstehen.³⁸

Indem Immunglobuline an Antigene von Toxinen oder Krankheitserregern binden, fördern sie verschiedene Prozesse des Immunsystems, etwa die Aktivierung von Zellen, welche zu einer Zerstörung der Krankheitserreger beitragen, oder die Freisetzung von Entzündungsmediatoren.³⁴ Manchmal ist dieser Vorgang jedoch fehlgeleitet, was man anhand von Lebensmittelallergien, bei welchen es zu einer Reaktion gegen an sich unschädliche Nahrungsmittelbestandteile kommt,³⁶ oder auch anhand von allergischen Reaktionen gegen Pollen, Gräser, Kräuter oder Hausstaub erkennen kann.³⁴ Die IgE-Antikörper erkennen dabei ein bestimmtes Antigen als körperfremd und lösen bei Kontakt mit diesem eine allergische Reaktion aus.³⁵

1.1.4.1 Einteilung und Eigenschaften von Lebensmittelallergenen

Allergene gehören unterschiedlichen **Proteinklassen** an, beispielsweise den Enzymen, Enzyminhibitoren, Transportproteinen, Speicherproteinen, regulatorischen Proteinen, Abwehrproteinen und Stressproteinen, wobei 65 % aller Lebensmittelallergene in nur vier verschiedene **Proteinfamilien** eingeordnet werden können – in die Prolamin-Superfamilie, die Bet v 1-Familie, die Cupin-Familie und die Profilin-Familie.⁵

Die Tatsache, dass viele Lebensmittelallergene denselben Proteinfamilien angehören, ist ein Hinweis darauf, dass bestimmte Teile von Proteinen besonders häufig eine Allergie auslösen, allerdings wurde bisher noch kein allen allergenen Lebensmittelproteinen gemeinsames Strukturelement entdeckt.⁵ Es lässt sich daher annehmen, dass grundsätzlich jedes Protein bei dazu veranlagten Personen eine allergische Erkrankung auslösen kann.³⁴

Allgemein geht man davon aus, dass Lebensmittelallergene ein Erhitzen, einen Protein-Abbau sowie Verarbeitungsprozesse stabil überstehen, allerdings gibt es bei jedem der genannten Vorgänge auch Ausnahmen.⁵ Generell verändert sich die allergieauslösende Wirkung von Nahrungsmittelbestandteilen je nach der Zubereitungsart, so besitzen etwa Getreidesorten, wie sie im Müsli verwendet werden, im rohen Zustand ein höheres allergenes Potenzial als im erhitzten Zustand.⁵

Lebensmittelallergene können abgesehen von der Einordnung in verschiedene Proteinfamilien auch in zwei Gruppen unterteilt werden, je nachdem, auf welche Art die Sensibilisierung erfolgt: die klassischen und die pollenassoziierten Lebensmittelallergene.⁵

Klassische Lebensmittelallergene können nach oraler Aufnahme sowohl eine Sensibilisierung, also die Einleitung einer IgE-vermittelten Immunreaktion, als auch Symptome auslösen.⁵ Ein typisches Merkmal von klassischen Lebensmittelallergenen ist, dass das

allergieauslösende Potenzial in den meisten Fällen auch nach der Verarbeitung und Zubereitung des Nahrungsmittels erhalten bleibt.⁵

Bei den **pollenassoziierten Lebensmittelallergenen** erfolgt die primäre Sensibilisierung nicht gegen Nahrungsmittelbestandteile, sondern gegen Allergene in Pollen. Diese lösen zunächst eine Inhalationsallergie aus, welche aufgrund einer Kreuzallergie anschließend auch zu Reaktionen gegen Lebensmittelallergene führt, welche eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem jeweiligen Pollenprotein aufweisen.⁵ Ein wichtiger Unterschied zwischen klassischen und pollenassoziierten Lebensmittelallergenen ist, dass letztere abgesehen vom geringeren Sensibilisierungspotenzial häufig nicht stabil gegen das Erhitzen sind.⁵

Unter den pollenassoziierten Lebensmittelallergenen sind häufig Gemüsesorten zu finden, welche der Pflanzenfamilie der *Apiaceae* angehören, besonders in europäischen Ländern, ein Beispiel dafür ist Sellerie.³⁹ Es gibt auch einige dokumentierte Fälle von *in vitro*-Kreuzreaktionen und von Kreuzallergien zwischen Schlafmohn-Samen und Pollen sowie zwischen Schlafmohn-Samen und weiteren Lebensmitteln.⁴⁰⁻⁴⁵

1.1.5 Der Magen-Darm-Trakt und die Entstehung von Lebensmittelallergien

Die **Mukosa** (Schleimhaut) des Magen-Darm-Trakts ist diejenige Stelle im Körper, an welcher der erste Kontakt zwischen den Bestandteilen der Nahrung und dem Immunsystem erfolgt.³⁶ In der Darmwand befinden sich 70-80 % aller Antikörper-produzierenden Zellen des gesamten menschlichen Körpers, weshalb der Darm auch als Zentrum der Immunabwehr gilt.⁴⁶

Die große Bedeutung des Darms für die Abwehr von schädlichen Organismen und Substanzen ergibt sich unter anderem durch seine enorme innere Oberfläche, welche durch die Ausbildung von Falten, Zotten und Mikrovilli in der Schleimhaut des Dünndarms, aber auch durch tiefe Einstülpungen in der Schleimhaut des Dickdarms zustande kommt. Die Dünndarm-Schleimhaut trägt jedoch zum überwiegenden Teil zur Oberflächenvergrößerung des gesamten Darms bei.⁴⁶

Die Mukosa des Darmepithels besteht aus **3 Schichten**, einer dem Darminneren zugewandten Epithelzellschicht, einer darunter liegenden Bindegewebsschicht sowie einer Muskelschicht. Die für die Immunabwehr wichtigen Zellschichten sind die Epithelzell- und die Bindegewebsschicht, wobei letztere freie Zellen enthält, beispielsweise Lymphozyten zur Immunabwehr, Plasmazellen zur Antikörper-Produktion, Mastzellen zur Freisetzung von Histamin und Heparin sowie eosinophile Granulocyten.⁴⁷ Die innerste Schicht der Mukosa besteht nur aus einer einzigen dünnen Schicht an Säulenepithelzellen, jedoch ergibt sich durch die starke Oberflächenvergrößerung eine Gesamtoberfläche von etwa 100-200 m².^{36, 46, 48}

Aufgrund der nur sehr dünnen Barriere zwischen dem Darm und den restlichen Körpergeweben besteht permanent die Gefahr einer systemischen Infektion. Die Mukosa hat die schwierige Aufgabe, diese Grenze zu schützen und somit zu verhindern, dass Toxine,

pathogene Bakterien, Viren oder Parasiten aus dem Darm in den Körper gelangen, wobei sowohl unspezifische als auch zielgerichtete Prozesse ablaufen.³⁶

Der menschliche Darm beherbergt etwa 10^{12} Bakterien, die etwa 500 verschiedenen Arten angehören,³⁶ abgesehen davon befinden sich im Darm unzählige weitere Mikroorganismen wie Pilze, Parasiten und Viren, welche gemeinsam mit den Bakterien als **gastrointestinale Mikrobiota** bezeichnet werden und bei einem erwachsenen Menschen in Summe ungefähr 1,5 kg wiegen.⁴⁹ Der Hauptanteil entfällt dabei auf die Bakterien, wobei der Darm ungefähr zehn- bis hundertmal so viele Bakterienzellen enthält, wie der gesamte menschliche Körper an Zellen besitzt.⁴⁹ Somit stellt der Darm des Menschen eines der am dichtesten mit Mikroorganismen besiedelten Gebiete der Erde dar.³⁶

Beim Großteil der Bakterien im Darm handelt es sich um nicht-pathogene, kommensale Bakterien, jedoch können selbst diese unter ungünstigen Bedingungen eine schädliche Wirkung besitzen.³⁶ Daher müssen die Epithelzellen des Darms und das mukosale Immunsystem vor den Darmbakterien geschützt werden, was durch eine Schleimschicht sowie durch darin enthaltene antimikrobielle Peptide erreicht wird – welcher der beiden Faktoren an der Entstehung von Lebensmittelallergien beteiligt ist, ist jedoch bisher noch unklar.³⁶

Die gastrointestinale Mikrobiota ist von großer Bedeutung für die Verdauung von Nährstoffen, aber auch für die Funktion des Immunsystems sowie für die Weitergabe von Signalen aus dem Verdauungstrakt an andere Organe, zum Beispiel an die Leber, die Muskulatur und das Zentralnervensystem.⁴⁹ Wie viele verschiedene Arten von Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt eines Menschen zu finden sind und in welcher Anzahl die Vertreter der einzelnen Arten vorkommen, wird durch die Lebensweise eines Menschen maßgeblich beeinflusst.⁴⁹ Die Mikroorganismen im Magen-Darm-Trakt spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lebensmittelallergien, indem sie das mukosale Immunsystem verändern.⁷

1.1.5.1 Das mukosale Immunsystem

Das mukosale Immunsystem besitzt die wichtige Aufgabe, zwischen unschädlichen und schädlichen Nahrungsbestandteilen zu unterscheiden und mit Hilfe einer schützenden Immunantwort gegen Pathogene vorzugehen, wobei es sowohl die lokale als auch die systemische Reaktion steuert.³⁶ Es bewegt sich dabei zwischen zwei Extremen, der oralen Toleranz gegenüber Antigenen aus der Nahrung einerseits sowie dem Fehlen der oralen Toleranz bei einer Lebensmittelallergie andererseits.³⁶

Als **orale Toleranz** wird dabei jener immunologische Zustand bezeichnet, welcher durch eine nicht stattfindende Reaktion oder durch die regulierte Unterdrückung einer Immunreaktion auf ein bestimmtes Antigen aus der Nahrung gekennzeichnet ist.⁷ Orale Toleranz entspricht dem üblichen Zustand des Immunsystems, da der Kontakt zu harmlosen Antigenen in Lebensmitteln normalerweise zu keiner allergischen Reaktion führen sollte.⁷

Orale Toleranz ist eine erworbene, Antigen-spezifische Eigenschaft, die durch einen lebenslangen, bereits pränatal in der Gebärmutter beginnenden Prozess entsteht, vom Kontakt zu Antigenen abhängt und durch ein Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems gekennzeichnet ist.² Manchmal ist die Toleranz des Immunsystems gegenüber Antigenen aus der Nahrung jedoch fehlgeleitet, was man anhand von Lebensmittelallergien erkennen kann.³⁶

1.1.5.2 Chemische und biologische Schutzmechanismen des Magen-Darm-Trakts

Die erste Abwehrstrategie des menschlichen Körpers gegen eine allergische Sensibilisierung besteht in einer **Denaturierung** von Nahrungsmittelproteinen, welche durch die Salzsäure im Magen bewirkt wird, sowie im **enzymatischen Abbau** der Proteine.³⁶ Die meisten mit der Nahrung zugeführten Proteine sind nicht in der Lage, allergische Reaktionen auszulösen, da sie nicht stabil sind und daher bereits im Magen ihre Struktur verlieren bzw. im Verdauungstrakt abgebaut werden. Umgekehrt kann man Lebensmittelallergene daran erkennen, dass sie häufig widerstandsfähig gegen eine Denaturierung oder Verdauung sind, wodurch sie die Immunzellen im Darm unbeschadet erreichen und somit eine Sensibilisierung auslösen können.³⁶ Allerdings gibt es auch zahlreiche Nahrungsmittelproteine, die gegenüber einer Denaturierung oder einem enzymatischen Abbau stabil sind, die jedoch trotzdem nicht als Allergene wirken. Dies weist darauf hin, dass es weitere Faktoren geben muss, die der Entstehung von Allergien entgegenwirken.³⁶

Der wichtigste biologische Schutz vor einer allergischen Sensibilisierung besteht in einer intakten **Barrierefunktion der Darmwand** durch sogenannte *tight junctions*, darunter versteht man eine Abdichtung zwischen den Epithelzellen des Darms, welche durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, beispielsweise durch die Ernährung, durch Medikamente und durch Zytokine.³⁶ Bei Zytokinen handelt es sich um Protein-Mediatoren, die von Zellen ausgeschieden werden und verschiedenste Funktionen erfüllen, indem sie auf andere Zellen einwirken und dadurch eine Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems ermöglichen.³⁸ Bestimmte Zytokine können die Barrierefunktion des Darms stören und somit die Durchlässigkeit des Darmepithels erhöhen, wodurch sie mit Autoimmunerkrankungen und Allergien im Zusammenhang stehen.³⁶

1.1.5.3 Transport von Antigenen durch die Darm-Epithelzellschicht

Ein Lebensmittelallergen, das sowohl die chemischen als auch die biologischen Barrieren der Darmepithelzellen überwunden hat, kann nun auf unterschiedlichen Wegen das mukosale Immunsystem des Darms erreichen, welches sich unterhalb der Darmepithelzellen befindet, wobei der Transport sowohl passiv als auch aktiv erfolgen kann: Das Antigen kann **passiv**

zwischen den Epithelzellen zum mukosalen Immunsystem transportiert werden (parazellulärer Transport), es kann von **dendritischen Zellen**, deren Ausläufer zwischen den Epithelzellen bis ins Darmlumen reichen, aufgenommen werden, es kann von **M-Zellen**³⁶ (microfold cells) – das sind spezialisierte Epithelzellen, die über den Peyer-Plaques liegen² – oder von den **Epithelzellen** selbst aufgenommen und auf die andere Seite transportiert werden.³⁶ Unterhalb der Epithelzellen finden nun Prozesse statt, die darüber entscheiden, ob es zu einer allergischen Sensibilisierungs-Reaktion kommt oder ob sich eine orale Toleranz entwickelt.³⁶

1.1.5.4 Die Rolle von dendritischen Zellen und T-Helfer-Zellen

Ein Lebensmittelallergen, welches durch die Epithelzellschicht gelangt, wird von **dendritischen Zellen**, einer Art von Antigen-präsentierenden Zellen, ins Zellinnere aufgenommen und in kleinere Peptid-Bruchstücke zerlegt.⁷ Die wichtigste Aufgabe der dendritischen Zellen besteht darin, zwischen dem angeborenen Immunsystem und dem adaptiven Immunsystem, welchem unter anderem die T-Lymphocyten angehören, zu vermitteln.³⁸

Die von den dendritischen Zellen erzeugten Bruchstücke des Lebensmittelallergens werden an deren Zelloberfläche an sogenannte MHC-II-Rezeptoren gebunden⁷ und die Zellen wandern schließlich mit den mit Bruchstücken beladenen Rezeptoren zu den T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) in den Peyer-Plaques, in der Bindegewebsschicht und in den ableitenden mesenterischen Lymphknoten.^{36, 46} In den Lymphknoten präsentieren die dendritischen Zellen nun den T-Helfer-Zellen die Antigen-Bestandteile des Lebensmittelallergens.⁷

Die mesenterischen Lymphknoten spielen im Zusammenhang mit Lebensmittelallergenen die größte Rolle, da sie einerseits als Schutzwall fungieren, der die Immunreaktion auf einer lokalen Ebene hält, ohne das systemische Immunsystem einzubeziehen, und weil sie andererseits die zentrale Schaltstelle sind, an der entschieden wird, ob sich das Immunsystem in Richtung einer oralen Toleranz oder einer allergischen Reaktion bewegt.³⁶ Die **T-Helfer-Zellen** in den mesenterischen Lymphknoten können sich nach der Antigen-Präsentation durch die dendritischen Zellen in zwei verschiedene Zelltypen differenzieren, in Th1- oder Th2-Zellen.⁷ Im besten Fall besteht ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Zelltypen, liegen jedoch im Verhältnis deutlich mehr Th1- oder Th2-Zellen vor, so kommt es zu einer sich selbst verstärkenden Reaktion bei gleichzeitiger Abschwächung der jeweils anderen Reaktion.³⁸ Die Entwicklung der oralen Toleranz beruht auf der erhöhten Produktion von Th1-Zellen,¹ eine allergische Reaktion hingegen wird durch die verstärkte Reifung von Th2-Zellen ausgelöst,³⁶ was die humorale Immunreaktion,³⁸ also die Produktion von IgE-Antikörpern, begünstigt.³⁶

1.1.6 Entstehung einer Allergie

Die Entstehung einer Allergie ist durch zwei zeitlich aufeinander folgende Prozesse gekennzeichnet: Beim ersten Kontakt mit einem Allergen kommt es zunächst zu einer Sensibilisierungs-Reaktion, bei wiederholtem Allergenkontakt kommt es schließlich zur eigentlichen allergischen Reaktion, wobei verschiedene Zellen des Immunsystems aktiviert, Entzündungsmediatoren freigesetzt und spezifische IgE-Antikörper produziert werden.⁵

1.1.6.1 Sensibilisierung

Am Anfang der Sensibilisierung steht die Anregung bestimmter **B-Lymphozyten**, sich stärker zu vermehren.⁵ Unter B-Lymphozyten versteht man eine Art von weißen Blutkörperchen, die im Knochenmark entstehen und deren wichtigste Funktion darin besteht, Antikörper zu produzieren.³⁸

Zu Beginn entwickeln sich B-Lymphozyten durch einen Isotyp-Wechsel³⁴ zu spezialisierten **Plasmazellen**.⁵ Diese Differenzierung wird durch die Anwesenheit von Th2-Zellen ausgelöst, die bestimmte Zytokine produzieren und über einen Rezeptor an ihrer Oberfläche mit Rezeptoren der B-Lymphozyten interagieren.⁷ Weitere Wirkungen dieser Zytokine sind die Aktivierung sowie das Wachstum von Mastzellen und eosinophilen Zellen.³⁶

Die Plasmazellen produzieren spezifische IgE-Antikörper, welche ins Blut abgegeben werden und dort zu zirkulieren beginnen. Diese binden nun in verschiedenen Körpergeweben dauerhaft und fest an die **Fcε-Rezeptoren (FcεRI)** von basophilen Zellen und Mastzellen, welche eine sehr hohe Bindungsfähigkeit für IgE-Antikörper aufweisen. Damit ist der Vorgang der Sensibilisierung abgeschlossen.^{5, 34}

1.1.6.2 Die allergische Reaktion

Bei einem erneuten Kontakt mit einem Allergen kommt es nun zur allergischen Reaktion,⁵ wobei die Aktivierung von Mastzellen und basophilen Zellen eine wesentliche Rolle spielt.³⁴

Basophile Granulozyten (basophile Zellen) sind eine Gruppe von weißen Blutkörperchen (Leukocyten), deren reife Vertreter im Blut zirkulieren.³⁸ **Mastzellen**, ebenfalls eine Art von Leukozyten, fungieren als „Wächterzellen“ in mukosalen Geweben und besitzen daher eine große Bedeutung im Zusammenhang mit Allergien.³⁸ Ihre wichtigste Aufgabe besteht darin, das Immunsystem zu lokalen Infektionen zu lenken³⁴ und sie befinden sich unter anderem unterhalb der Darmepithelzellschicht.² Wird das Allergen systemisch im Körper verteilt, so kann es auch an spezialisierte Mastzellen in anderen Geweben sowie an basophile Zellen, welche mit dem Blutstrom zirkulieren, binden, und so eine anaphylaktische Reaktion auslösen.²

Basophile Zellen und Mastzellen enthalten **Granula** mit verschiedenen gespeicherten Mediatoren und Wirkstoffen,³⁸ darunter Enzyme³⁴ wie die Proteasen Tryptase und Chymase² sowie Mediator-Substanzen wie Histamin, Heparin, Serotonin, chemotaktische Faktoren und das Zytokin Interleukin-4 (IL-4).³⁸ Zusätzlich sind Mastzellen in der Lage, nach ihrer Aktivierung bei einer allergischen Reaktion weitere Zytokine und verschiedene Arachidonsäure-Metabolite (Lipidmediatoren) wie Prostaglandine, Leukotriene und den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) neu zu bilden.³⁸

Kommt ein Allergen nun mit einer auf dieses Allergen spezialisierten Mastzelle⁵ oder basophilen Zelle² in Kontakt, so bindet das Allergen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an zwei in der Membran der jeweiligen Zelle verankerte, allergenspezifische IgE-Antikörper.⁵ Dadurch kommt es zu einer Quervernetzung (Überbrückung) dieser zwei Immunglobuline, was in weiterer Folge die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus den Granula der betreffenden Zelle auslöst, ein Vorgang, welcher als **Degranulation** bezeichnet wird.⁵

Je nachdem, welche Entzündungsmediatoren und in welchem Körpergewebe diese freigesetzt werden, kommt es schließlich zu typischen Symptomen.⁵

Allergische Personen weisen hohe IgE-Konzentrationen auf, was zur Folge hat, dass man eine erhöhte Anzahl an Fcε-Rezeptoren an den Oberflächen von Mastzellen findet.³⁴ Dadurch reagieren die Mastzellen bereits auf geringe Mengen des betreffenden Allergens und setzen große Mengen an Entzündungsmediatoren frei.³⁴

Die beschriebene Quervernetzung von IgE-Antikörpern hat den Effekt, dass die Mastzellen und basophilen Zellen Signale aussenden, welche die erneute Produktion von IgE-Antikörpern in den B-Lymphozyten in Gang setzen.³⁴ Eine Folge davon ist, dass es in Körpergeweben, in welchen eine allergische Reaktion stattfindet, etwa in den Bronchien oder in der Mukosa des Gastrointestinal-Trakts, durch die wiederholte Anregung der Bildung von IgE-Antikörpern zu einem zusätzlichen Selbstverstärkungsprozess der Immunreaktion kommt. Daher besteht eines der Ziele in der Therapie von Allergien darin, diesen Prozess zu blockieren, um die Selbsterhaltung der allergischen Reaktion zu unterbrechen.³⁴

1.1.7 Symptome von Lebensmittelallergien

Die Symptome bei einer Lebensmittelallergie treten üblicherweise innerhalb von fünf bis 60 Minuten nach der Aufnahme des betreffenden Lebensmittels auf.³ Lebensmittelallergene können zahlreiche Reaktionen in verschiedenen Bereichen des Körpers verursachen, wobei die *Haut*, der *Magen-Darm-Trakt*, der *Mund-* und *Rachenraum*, die *Atemwege* und die *Augen* am häufigsten betroffen sind.⁵ Dabei werden beispielsweise Lippen- und Rachenschwellungen, Bronchialasthma, Bindehautentzündungen, Magenschmerzen, Durchfall,⁵ Erbrechen, Urtikaria (Nesselsucht), Hautjucken und Bronchospasmen (Keuchanfälle) als mögliche Symptome beschrieben.³⁴ Zusammenhänge zwischen

Lebensmitteln und unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Kopfschmerzen, Migräne oder Verhaltensauffälligkeiten bei Kindern gelten hingegen als nicht gesichert.⁵

Gelegentlich ist bei einer Lebensmittelallergie nur der Verdauungstrakt betroffen, jedoch können auch Symptome in Körpergeweben auftreten, welche weit vom Verdauungstrakt entfernt liegen.³⁴ Derartige systemische Reaktionen kommen zustande, indem das betreffende Allergen durch das Blutkreislaufsystem im gesamten Körper verteilt wird, wobei die Bezeichnung systemische Reaktion auch dann gilt, wenn nur Symptome in *einem* außerhalb des Verdauungstraktes liegenden Organ auftreten.³⁴

Darüber hinaus können hochallergische Personen bei Kontakt mit geringsten Spuren eines Lebensmittelallergens schwerwiegende Reaktionen entwickeln,²⁸ welche im schlimmsten Fall zu einer lebensbedrohlichen Schockreaktion führen, welche als anaphylaktische Reaktion oder Anaphylaxie bezeichnet wird.⁵

Lebensmittelallergien treten, wie aus **Tab. 1** hervorgeht, in verschiedenen Organsystemen mit bestimmten Häufigkeiten auf und rufen dort typische Symptome hervor, wobei **lebensbedrohliche Symptome** und die dazugehörigen **Organsysteme** fett gedruckt dargestellt sind. Wie man anhand der Auflistung erkennen kann, sind die Haut, die Atemwege und der Magen-Darm-Trakt bei Lebensmittelallergien üblicherweise am stärksten betroffen, es sind jedoch auch Symptome im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems möglich, welche schwerwiegende Auswirkungen besitzen können.³²

Tab. 1: Häufigkeit von Symptomen in verschiedenen Organsystemen *nach* Hauber-Schwenk³²

Organ / Organsystem	Häufigkeit	Mögliche Symptome
Haut	43 %	Rote Flecken, Juckreiz, Nesselsucht, Gesichtsschwellung
Atemwege	23 %	Husten, Schnupfen, Verengung der Atemwege, Atemnot (Asthma-Anfall)
Magen-Darm-Trakt	21 %	Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Darmkrämpfe, Durchfall, Verstopfung
Herz-Kreislauf-System	13 %	Erweiterung der Blutgefäße, Blutdruckabfall, Herz-Kreislauf-Versagen

Zwei Gemeinsamkeiten aller IgE-vermittelten allergischen Reaktionen sind die Beteiligung von IgE sowie die Degranulation von Mastzellen, es treten jedoch Unterschiede in den Symptomen auf, abhängig davon, auf welchem Weg und in welcher Dosis das Allergen in den Körper kommt.³⁴ **Tab. 2** gibt einen Überblick über verschiedene Eintrittswege von Lebensmittelallergenen in den menschlichen Körper sowie über mögliche Symptome, wobei alle **lebensbedrohlichen Symptome** sowie die dazugehörigen **Eintrittswege, Arten des Kontakts** und **betroffenen Organe** fett gedruckt dargestellt sind.³⁴

Möglichkeiten für Eintrittspforten von Allergenen in das Blut sind die direkte Injektion, etwa von Medikamenten, Giften oder Blutserum, die Resorption des Allergens aus dem Verdauungstrakt in das Blut, wie es bei Lebensmitteln, Medikamenten und Giften der Fall ist, und die Aufnahme über die Schleimhäute von Augen und Atemwegen in das Blut.³⁴

Tab. 2: Eintrittswege von Lebensmittelallergenen, betroffene Organe und Symptome
nach Baltes; Matissek,⁵ Hauber-Schwenk; Schwenk³² und Murphy; Weaver³⁴

EINTRITTSWEG	Kontakt	Organe	Mögliche Symptome
VERDAUUNGS- -TRAKT	Direkter Kontakt	Mund Magen Darm	Lippenschwellung Rachenschwellung Magen- und/oder Bauchschmerzen Verstärkte Peristaltik Erhöhte Flüssigkeits-Sekretion Erbrechen Darmkrämpfe Durchfall Verstopfung
AUGEN	Direkter Kontakt / systemisch	Augen	Bindehautentzündung
ATEMWEGE	Direkter Kontakt / systemisch	Nase Rachen Bronchien	Husten, Schnupfen, Niesen Erhöhte Schleimproduktion Bronchialasthma Bronchospasmen Verengung der Atemwege Atemnot
HAUT	Direkter Kontakt (z.B. Allergietests) / systemisch	Haut	Hautjucken Hautrötung Urtikaria Gesichtsschwellung Gefäßdurchlässigkeit (lokal erhöht) Ödeme
BLUT Resorption	systemisch	(Atemwege, Blutkreislauf) ↓ ANAPHYLAXIE	Fluss der Lymphe zu Lymphknoten, Zellen und Geweben Ödeme Verengung/Verschluss der Atemwege Gefäßdurchlässigkeit (Erhöhung): → Blutfluss (Zunahme) → Blutdruck (Abnahme) Kreislaufversagen Bewusstlosigkeit Tod

1.1.7.1 Allergische Sofortreaktion und länger andauernde Entzündungsreaktion

Die meisten Symptome allergischer Reaktionen werden durch die Degranulation von Mastzellen verursacht, was zunächst zu einer **Sofortreaktion** führt. Die Degranulation erfolgt innerhalb von Sekunden nach der Bindung der betreffenden Allergene an die Fcε-Rezeptoren an der Oberfläche der Mastzellen.³⁸

Die allergische Sofortreaktion kann schließlich in eine **länger andauernde Entzündungsreaktion** übergehen, wobei durch die IgE-vermittelte Aktivierung der Mastzellen eine Kaskade an Entzündungsreaktionen ausgelöst wird.³⁴ An diesen zahlreichen Reaktionen sind verschiedenste Zellen des Immunsystems beteiligt, beispielsweise eosinophile, basophile und neutrophile Zellen, außerdem Th2-Zellen, Monozyten und Makrophagen.³⁴ Zusätzlich kann es auch zu einer Aktivierung von Thrombozyten (Blutplättchen) kommen.³⁴

Die an der Degranulation beteiligten Substanzen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die **erste Gruppe** umfasst die Enzyme und die Entzündungsmediatoren, welche bereits vor einer möglichen allergischen Reaktion in den Granula gespeichert vorliegen. Zur **zweiten Gruppe** gehören die Zytokine, die Chemokine und die Lipidmediatoren, welche erst während einer allergischen Reaktion bei einer Aktivierung der Mastzellen neu gebildet werden.³⁴

Die **Enzyme** *Tryptase* und *Chymase* bewirken den Abbau von Proteinen in der extrazellulären Matrix, was zu einer Zerstörung der Gewebsstruktur und folglich zu einer lokalen Gewebsschädigung führt.³⁴ Beim **Entzündungsmediator** *Histamin* handelt es sich um ein kurzlebiges, gefäßaktives Amin, welches zu einer Verstärkung des Blutflusses und einer Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit in lokalen Blutgefäßen führt. Dies trägt zur Bildung von Ödemen, zu Entzündungsreaktionen sowie zu einer Verengung der Bronchien bei. Histamin aktiviert außerdem Rezeptoren des Nervensystems und verursacht dadurch Juckreiz und Niesen.^{34, 50}

Zytokine fördern die Bildung, Aktivierung und Reaktion verschiedener Zellen des Immunsystems und bewirken eine weitere Freisetzung von Zytokinen, was eine Verstärkung des Prozesses zur Folge hat.³⁴ **Chemokine** locken bestimmte Immunzellen an den Ort des Geschehens.³⁴ Bei den **Lipidmediatoren** handelt es sich um Derivate der Arachidonsäure,² einer membranassoziierten Fettsäure.³⁴ Beispiele dafür sind die *Leukotriene*, die *Prostaglandine*, der *Plättchen-aktivierende Faktor*² sowie die *Thromboxane*.³⁴

Die Wirkung der Lipidmediatoren ist sowohl rasch als auch langfristig. Sie bewirken eine Kontraktion der glatten Muskulatur, eine erhöhte Durchlässigkeit von Blutgefäßen, eine Freisetzung von Schleim und eine Aktivierung von Thrombozyten (Blutplättchen), außerdem locken sie verschiedene Arten von Leukozyten an und aktivieren diese, was die Entzündungsreaktion verstärkt.³⁴

1.1.7.2 Die anaphylaktische Reaktion (Anaphylaxis, Anaphylaxie)

Bei einer anaphylaktischen Reaktion handelt es sich um die schwerste Form einer allergischen Reaktion, die sich bei Kontakt mit dem betreffenden Allergen sehr schnell entwickelt und ebenso schnell verschlechtert. Dabei werden verschiedene Organsysteme schwer beeinträchtigt, darunter das Atmungs- und Verdauungssystem sowie die Haut.³

Es können lebensbedrohliche Symptome wie Atemnot, Blutdruckabfall,²⁸ Kreislaufkollaps³⁴ und ein hypovolämischer Schock auftreten,² welche im schlimmsten Fall zum Tod führen.³

Es gibt eine **fünfstufige Klassifizierung der Symptome** einer anaphylaktischen Reaktion, je nachdem, welche Organsysteme involviert sind. Dabei sind in der ersten Stufe der Anaphylaxis der Gastrointestinaltrakt und die Haut betroffen, während in der fünften Stufe Symptome im Gastrointestinaltrakt, in der Haut, im Atmungs- und Herz-Kreislauf-System sowie im Nervensystem zu beobachten sind, welche zur Bewusstlosigkeit sowie zu einem Atem- oder Herzstillstand führen können. In der zweiten bis vierten Stufe treten jeweils Symptome zwischen der beschriebenen ersten und fünften Stufe auf.³⁶

Eine anaphylaktische Reaktion ist schwer vorhersehbar, da es Personen gibt, bei denen ein bestimmtes Allergen üblicherweise nur zu einer leichten lokalen Reaktion führt, welche jedoch zu einem anderen Zeitpunkt bei Kontakt mit dem gleichen Allergen eine anaphylaktische Reaktion erleiden. Genauso kann dasselbe Allergen bei einer Person eine leichte Reaktion, jedoch bei einer anderen Person eine schwere anaphylaktische Reaktion auslösen. Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht bekannt.³⁴

Von einer **Lebensmittel-abhängigen, Sport-induzierten Anaphylaxis** spricht man, wenn Personen nur allergisch auf ein bestimmtes Lebensmittel reagieren, wenn sie innerhalb weniger Stunden nach der Nahrungsaufnahme Sport betreiben, jedoch keine anaphylaktische Reaktion zeigen, wenn sie das Lebensmittel ohne anschließende körperliche Betätigung zu sich genommen haben.³⁶ Die Ursachen dafür sind unbekannt, mögliche Gründe könnten jedoch sein, dass sich durch den Sport die Aufnahme des Allergens in den Körper oder dessen Verteilung im Körper verändert, oder dass die Mastzellen leichter degranulieren.³⁶ Berichte über Sport-induzierte anaphylaktische Reaktionen nehmen zu,⁵¹ und Lebensmittel, die damit im Zusammenhang stehen, sind Kuhmilch, Eier, Erdnüsse, Baumnüsse, Fische, Schalentiere, Weizen und Sellerie.³⁶

Zusätzlich gibt es auch vereinzelt Personen, welche eine **Lebensmittel-unabhängige, Sport-induzierte Anaphylaxis** erleiden, wenn sie innerhalb einer bestimmten Zeit nach der Aufnahme eines *beliebigen* Lebensmittels Sport betreiben.³⁶

1.1.7.3 Symptome von Pollen-assoziierten Lebensmittelallergien (Orales Allergiesyndrom)

Typisch für Pollen-assoziierte Lebensmittelallergien ist, dass sich die Symptome häufig nur auf einen Juckreiz im Mund beschränken und nur selten schwere, in Richtung Anaphylaxie gehende Symptome, etwa eine Schwellung der Zunge oder des Rachens, auftreten.³⁶ Die Art und der Schweregrad der Symptome hängen von verschiedenen Faktoren ab, etwa von der Art und Menge des konsumierten Allergens, von der Verdauung und Resorption, von gleichzeitig auftretenden Virus-Infektionen, von körperlicher Betätigung und vom Konsum von Alkohol oder Drogen.³⁶

Da Pollen-assoziierte Lebensmittelallergene häufig nicht stabil sind, können die Lebensmittel oftmals in gekochter Form konsumiert werden, ohne Symptome auszulösen. Sollten die Symptome nur leicht sein und sich auf den Mund beschränken, so können Betroffene, falls erwünscht, das betreffende Lebensmittel ohne Bedenken konsumieren.³⁶

1.1.8 Faktoren mit Einfluss auf die Entstehung einer Lebensmittelallergie

Das Risiko für die Entstehung einer Lebensmittelallergie ist durch **innere Faktoren** und **Umweltfaktoren** bedingt – so können das Lebensalter, das Geschlecht, genetische Faktoren, die Exposition gegenüber Mikroorganismen, die Ernährungsweise, Kreuzreaktionen, die Dosis des betreffenden Allergens sowie dessen Weg in den Körper und Verteilung im Körper einen Einfluss auf die Entwicklung einer Lebensmittelallergie besitzen.^{1, 27, 36}

Allergische Reaktionen auf Lebensmittel werden durch psychische Faktoren, aber auch durch die Einnahme von Medikamenten sowie durch den Konsum von Alkohol oder anderen Drogen begünstigt und können dadurch zu stärkeren Reaktionen führen.^{2, 3, 5}

Weitere Faktoren, welche die Reaktionsschwelle bei Kontakt mit einem Allergen herabsetzen und somit eine anaphylaktische Reaktion wahrscheinlicher machen, sind neben den bereits genannten Faktoren auch Sport, Virus-Infektionen, die Menstruation und eine vorhandene Schwangerschaft.³ Zu den Lebensmitteln, welche das Risiko für eine anaphylaktische Reaktion erhöhen, zählen Erdnüsse, Baumnüsse, Fische und Schalentiere.³

1.1.8.1 Genetische Faktoren

Das Auftreten von Lebensmittelallergien in der Familie zählt zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Lebensmittelallergie, was eine bedeutende genetische Komponente aufzeigt.³⁶ Allgemein wird die Erbllichkeit bestimmter Lebensmittelallergien, abhängig davon, wie man den Begriff Lebensmittelallergie definiert und welche Personengruppe man untersucht, auf 15-80 % geschätzt.³⁶

Die genetische Veranlagung (Prädisposition) für die Entstehung von IgE-vermittelten Hypersensibilitäts-Reaktionen gegenüber Umwelt-Antigenen wird als **Atopie** bezeichnet.³⁴

Eine Person mit einer angeborenen Neigung, gegen einige verschiedene Allergene IgE-Antikörper zu bilden, nennt man atopisch, bei nicht-atopischen allergischen Personen findet hingegen nur eine Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Allergen statt.³⁴

Das Risiko für eine Atopie bei Kindern, von welchen kein Elternteil eine solche Prädisposition aufweist, liegt bei etwa 10 %, erhöht sich jedoch auf 40-60 %, wenn beide Elternteile von einer Veranlagung für eine allergische Erkrankung betroffen sind.³⁴

Häufig steht zu Beginn eine Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelbestandteile, woraufhin sich in der Kindheit ein atopisches Ekzem und manchmal in einem späteren Lebensalter eine allergische Rhinitis und Asthma entwickeln können. Diese schrittweise Entwicklung verschiedener allergischer Erkrankungen im Lauf des Lebens wird auch als **atopischer Marsch** bezeichnet, im Gegensatz dazu kann sich eine Allergie bei einer nicht-atopischen Person in jedem Lebensalter entwickeln.³⁴ Allgemein stellen Lebensmittelallergien in der frühen Kindheit ein Risiko für das spätere Auftreten von Asthma dar, auch wenn die betreffende Lebensmittelallergie in einem späteren Alter bereits wieder verloren gegangen ist.⁶

1.1.8.2 Umweltfaktoren

Da die Häufigkeiten von Lebensmittelallergien in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen haben, deutet dies aufgrund der gleichzeitig zunehmenden Umwelt- und Luftverschmutzung darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Umweltfaktoren und Lebensmittelallergien gibt.² Man geht allgemein davon aus, dass die genetische Veranlagung und Umweltfaktoren etwa in gleichem Maße zur Entstehung einer Atopie beitragen.³⁴

Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die sogenannte **Hygienehypothese**, die beschreibt, dass ein Kontakt mit verschiedenen Mikroorganismen und Krankheitserregern im Säuglingsalter und in der frühen Kindheit das Risiko für eine Atopie verringert, während eine hygienischere Umgebung sowie Antibiotika-Behandlungen in einem frühen Lebensalter die Anfälligkeit für allergische Reaktionen erhöhen.³⁴

in Beispiel für eine weniger hygienische Umgebung ist der ländliche Raum, in dem Kinder häufig mit Mikroorganismen, welche sich beispielsweise im Boden oder auf Tieren befinden, in Kontakt kommen und daher oftmals Infektionen durchleben, was zu einem Zustand des Immunsystems führt, der das Auftreten von Allergien weniger wahrscheinlich macht.³⁴ Zusätzlich hat sich der Konsum nicht pasteurisierter Milch als wichtiger Schutzfaktor des Landlebens in Bezug auf Allergien herausgestellt.³⁶

In städtischen Regionen kommen Kinder seltener mit pathogenen Mikroorganismen in Berührung, daher kann das Immunsystem keine wirksamen regulatorischen Mechanismen entwickeln und ist laut der Hygiene-Hypothese anfälliger für allergische Erkrankungen.³⁴

Eine Besiedlung des Darms mit kommensalen Bakterien wie Laktobazillen oder Bifidobakterien, aber auch Infektionen mit pathogenen Darmbakterien wie Toxoplasma gondii oder Helicobacter pylori in einem jungen Lebensalter verringern das Risiko für das Auftreten von Allergien.³⁴

Da es Hinweise auf den Schutz vor allergischen Erkrankungen gibt, wenn im Kindesalter bestimmte Infektionen durchgemacht werden, sind Kinder, die mindestens drei ältere Geschwister haben oder bis zu einem Alter von sechs Monaten in Tagesbetreuungseinrichtungen mit anderen Kindern in Kontakt kommen, zum Teil vor Asthma³⁴ und allgemein vor Allergien geschützt. Umgekehrt neigen ältere Geschwister und Kinder, die in einem frühen Lebensalter wenig Kontakt zu anderen Kindern haben, eher dazu, eine Allergie zu entwickeln.³⁶

Ernährungsfaktoren, welche im Zusammenhang mit einem reduzierten Risiko für Allergien diskutiert werden, sind eine ausreichende Versorgung mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Omega-3-Fettsäuren, welche in Fischölen vorkommen, sowie mit Vitamin A, Vitamin D, Folsäure³⁶ und Antioxidantien.¹

In Bezug auf Vitamin D gibt es Hinweise, dass ein Mangel die Entstehung von Lebensmittelallergien begünstigt, da beispielsweise Kinder, welche weiter vom Äquator entfernt leben oder die im Herbst oder Winter geboren werden, ein höheres Risiko für Lebensmittelallergien aufweisen als Kinder, welche in der Nähe des Äquators leben oder im Frühling oder Sommer geboren werden.²

Zusätzlich gibt es Risiko- beziehungsweise Schutzfaktoren, die das Zusammenspiel von Genen und Umwelt betreffen, was als epigenetischer Effekt bezeichnet wird.¹ Ein Beispiel dafür ist die Folsäure, ein Methylgruppen-Donator, welcher Gegenstand intensiver Forschungen ist, da er einen Einfluss auf den epigenetischen Vorgang der DNA-Methylierung besitzt und möglicherweise mit Lebensmittelallergien und Asthma im Zusammenhang steht.³⁶

1.1.9 Diagnose von Lebensmittelallergien

Es ist allgemein schwierig, herauszufinden, ob bestimmte Symptome durch eine Lebensmittelallergie hervorgerufen werden, und um welches Lebensmittel es sich handelt, das für die Symptome verantwortlich ist.¹ So spielt etwa das bei allergischen Reaktionen freigesetzte Histamin teilweise auch bei Vergiftungen eine Rolle, wobei eine allergische Reaktion imitiert wird – ein Beispiel ist die Scombroid-Fischvergiftung.^{1, 52}

Abgesehen davon gibt es Erkrankungen, die ähnliche Symptome wie Lebensmittelallergien verursachen, was die Gefahr einer Verwechslung birgt,¹ etwa entzündliche Darmerkrankungen oder das Reizdarmsyndrom.³⁶

Zusätzlich können bestimmte Faktoren zum Auftreten einer allergischen Reaktion beitragen oder diese verstärken, weshalb es von großer Wichtigkeit ist, dass die Diagnose von

Lebensmittelallergien verschiedene Methoden und Aspekte umfasst, um das Leben von Betroffenen zu erleichtern¹ – dazu gehören die Krankengeschichte (Anamnese), ein Haut-Test (Skin-Prick-Test, SPT), ein IgE-Serum-Test und/oder ein Provokationstest (Oral Food Challenge, OFC).³ In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass die Diagnose nicht nur auf einem Skin-Prick-Test oder auf einem IgE-Serum-Test beruht.¹

Nach der Erhebung der Krankengeschichte und der Durchführung eines Skin-Prick-Tests und/oder eines IgE-Serum-Tests muss entschieden werden, ob auch ein Provokationstest notwendig ist, um eine sichere Diagnose zu gewährleisten.¹

1.1.9.1 Anamnese

Der wichtigste Bestandteil der Diagnose von Lebensmittelallergien besteht in der Ermittlung der Krankengeschichte der betroffenen Person, wobei herausgefunden werden soll, um welches allergieauslösende Lebensmittel es sich handelt, welchen zeitlichen Verlauf die allergische Reaktion zeigt, welche Art von Symptomen auftreten, ob diese reproduzierbar sind, und falls bereits eine Behandlung erfolgt ist, wie sich diese auf die Patientin oder den Patienten ausgewirkt hat.^{3, 36} Eine Lebensmittelallergie kann beispielsweise ausgeschlossen werden, wenn die Symptome mit einer sehr starken zeitlichen Verzögerung nach der Aufnahme eines bestimmten Lebensmittels auftreten.³⁶

1.1.9.2 Skin-Prick-Test

Bei einem Skin-Prick-Test wird untersucht, ob sich in der Haut Allergen-spezifische IgE-Antikörper befinden,³ wobei die Aussagekraft in Bezug auf negative Ergebnisse sehr groß, der positive Vorhersagewert jedoch nicht besonders hoch ist.³⁶

Ein positives Ergebnis zeigt zwar die Anwesenheit von IgE-Antikörpern in der Haut an, was eine Sensibilisierung bestätigt, jedoch geht diese nicht immer mit einer allergischen Reaktion einher, da eine Sensibilisierung auch ohne klinische Symptome auftreten kann.³⁶ Daher ist es nicht möglich, eine Lebensmittelallergie nur anhand eines positiven Skin-Prick-Tests zu diagnostizieren, eine Eigenschaft, welche genauso auf IgE-Serum-Tests zutrifft.³⁶ Kombiniert man einen Skin-Prick-Tests jedoch mit einem IgE-Serum-Test, so kann dies dazu führen, dass ein zur sicheren Bestätigung der Krankengeschichte üblicherweise durchgeführter Provokationstest nicht mehr notwendig ist. Ebenso kann auf einen Provokationstest verzichtet werden, wenn die Krankengeschichte eine starke Reaktion nach Verzehr eines isoliert aufgenommenen Lebensmittels ergibt und der Skin-Prick-Test ebenfalls positiv ausfällt.³⁶

Die **Durchführung** eines Skin-Prick-Tests erfolgt mit Hilfe kommerziell erhältlicher oder frisch hergestellter Allergen-Extrakte, welche in einem Lösungsmittel vorliegen und auf die Haut aufgebracht werden.³⁶ Zusätzlich zu den Lösungen der Lebensmittelextrakte wird auch eine

Positivkontrolle (Histamin) und eine Negativkontrolle, bei welcher es sich um eine Salzlösung oder um das Lösungsmittel der Extrakte handelt, aufgetragen.³⁶ Anschließend wird die Haut an den Stellen, an welchen sich die Lösungen befinden, eingeritzt,³⁶ wodurch das potenzielle Allergen mit Mastzellen in Kontakt kommt.²

Das **Ergebnis** des Skin-Prick-Tests kann nach etwa 15 bis 20 Minuten abgelesen werden, wobei als positives Testergebnis gilt, wenn durch die getestete Substanz³⁶ eine rote, juckende Erhebung der Haut entsteht, welche mindestens drei Millimeter größer ist als die Negativkontrolle.² Je größer der Durchmesser dieser Erhebung ist, desto wahrscheinlicher liegt eine klinisch relevante allergische Reaktion vor, und ein Durchmesser von mehr als zehn Millimeter spricht für eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit des tatsächlichen Auftretens von Symptomen.²

Für Lebensmittel, die einen negativen Hauttest in Kombination mit einer gegenteilig lautenden Krankengeschichte ergeben, sollte noch ein Provokationstest durchgeführt werden, um eine sichere Diagnose zu ermöglichen, und bevor das Lebensmittel wieder in den Speiseplan aufgenommen wird.³⁶

1.1.9.3 IgE-Serum-Test

Ein IgE-Serum-Test misst die Menge an zirkulierenden Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern im Blutserum, wobei hauptsächlich Immunoassay-Tests zur Anwendung kommen.³⁶ Dabei korreliert die Menge an Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern im Blutserum mit der Wahrscheinlichkeit, dass das betreffende Lebensmittel das Potenzial besitzt, eine allergische Reaktion auszulösen, die Vorhersagekraft von IgE-Serum-Tests kann aber je nach dem Alter der betroffenen Person unterschiedlich hoch sein.²

Der Fall, dass ein IgE-Serum-Test negativ ausfällt, Betroffene jedoch trotzdem eine allergische Reaktion erleiden, ist sehr selten, und in diesem Fall muss ein Provokationstest durchgeführt werden, um eine Lebensmittelallergie auszuschließen.²

1.1.9.4 Provokationstest (Oral Food Challenge)

Die Oral Food Challenge ist der „Goldstandard“ für die Diagnose einer Lebensmittelallergie, wobei es sich um einen Doppel-Blind-Placebo-kontrollierten Provokationstest handelt, welcher die zuvor erhobene Krankengeschichte bestätigen kann.² Eine Oral Food Challenge sollte nur durchgeführt werden, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die betroffene Person an einer Lebensmittelallergie leidet, gering ist, und wird manchmal nur angewendet, um zu zeigen, dass eine Person mittlerweile nicht mehr allergisch auf ein bestimmtes Lebensmittel reagiert. Dieser Aspekt hat zum Beispiel Relevanz in der Diagnose von Lebensmittelallergien bei Kindern, welche ab einem bestimmten Lebensalter häufig wieder verloren gehen.³

Mit Hilfe eines Provokationstests kann zwar eine sichere Diagnose gestellt werden, sie ist jedoch sehr zeitaufwendig und auch kostspielig. In der Vorbereitung müssen verschiedene Faktoren, welche sich aufgrund der Krankengeschichte ergeben, in die Planung einbezogen werden, etwa die Form, in welcher das Lebensmittel verabreicht werden soll (roh oder gekocht), die Matrix, in welche das Lebensmittel eingebracht wird, die anfängliche und die höchste Dosis, die Zahl an Verabreichungen, das Zeitintervall dazwischen sowie die insgesamt Dauer der Untersuchung.² Diejenigen Lebensmittel, welche im Verdacht stehen, eine allergische Reaktion auszulösen, müssen sieben bis 14 Tage vor Beginn des Provokationstests aus dem Speiseplan gestrichen werden, ebenso sollten Medikamente wie Antihistaminika, welche das Testergebnis verfälschen könnten, abgesetzt werden.²

In der Durchführung wird das betreffende Allergen mit der gewählten Matrix vermischt, wobei zu Beginn aus Sicherheitsgründen eine sehr niedrige Allergendosis eingesetzt wird, welche schließlich schrittweise unter klinischer Beobachtung erhöht wird, und zwar so lange, bis objektiv beobachtbare Symptome auftreten oder bis die Maximal-Dosis erreicht ist.² Ärztinnen und Ärzte, die einen Provokationstest durchführen, müssen sehr erfahren und auch in der Lage sein, anaphylaktische Reaktionen zu erkennen und zu behandeln, um negative Auswirkungen auf die Patientinnen und Patienten zu vermeiden.²

1.1.9.5 Diagnose anaphylaktischer Reaktionen

Bis vor einiger Zeit lautete die Definition einer anaphylaktischen Reaktion, dass ein niedriger Blutdruck und/oder ein Schockzustand die wichtigsten Diagnosekriterien seien. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass bei einer tödlichen Anaphylaxis in den meisten Fällen eher eine Atemnot als ein Kreislauf-Zusammenbruch auftritt.²¹

Die WHO definiert eine Anaphylaxis als „*ernste, lebensbedrohliche, systemische Hypersensitivitätsreaktion*“.³⁶ Das Problem dieser Definition ist jedoch, dass der Begriff „lebensbedrohlich“ von Ärztinnen und Ärzten unterschiedlich definiert werden kann, weshalb bestimmte Kriterien entwickelt wurden, um eine sichere Diagnose der Anaphylaxis zu gewährleisten.³⁶ Danach handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine anaphylaktische Reaktion, wenn eines der folgenden drei Kriterien erfüllt ist und die Symptome innerhalb von Minuten bis Stunden nach Aufnahme des betreffenden Lebensmittels auftreten,³⁶ meistens im Zeitraum von 5-60 Minuten:³ **1) Ein plötzlich auftretendes Krankheitsgefühl** mit Symptomen im Bereich der Haut und des Gastrointestinaltraktes **UND** mindestens ein Symptom, welches entweder die Atem-Funktion oder die Herz-Kreislauf-Funktion betrifft.³⁶ **2) Mindestens zwei der folgenden Symptome:** Haut- oder Schleimhautsymptome, andauernde Symptome im Gastrointestinal-Trakt, Beeinträchtigung der Atem- oder der Herz-Kreislauf-Funktion.³⁶ **3) Ein Blutdruckabfall** um mindestens 30 % im Vergleich zum individuell üblichen systolischen Wert.^{3, 36}

1.1.10 Prävention von Lebensmittelallergien

Da Lebensmittelallergien nicht heilbar sind, konzentriert sich die Forschung zunehmend auf die Prävention,⁵³ wobei eine Möglichkeit darin besteht, Kindern das betreffende Allergen in einem frühen Lebensalter zuzuführen.^{2, 54}

In der Vergangenheit wurde von verschiedenen Ländern und Gesundheitsorganisationen die strikte Vermeidung von Allergenen in der frühen Kindheit empfohlen, so sollten Kinder im Alter von bis zu einem Jahr Milchprodukte, im Alter von bis zu zwei Jahren Hühnereier und im Alter von bis zu drei Jahren Erdnüsse, Baumnüsse und Fische vermeiden.^{2, 54} Schwangeren und stillenden Frauen mit Allergien in der Familie wurde empfohlen, Erdnüsse, Baumnüsse, Eier, Fische und Milch zu vermeiden, um das Allergie-Risiko für die ungeborenen oder gestillten Kinder zu reduzieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass es keine Beweise für einen Nutzen dieser Maßnahmen gab, und dass die Vermeidung von Milch und Eiern zudem negative Auswirkungen auf die Nährstoffversorgung der Frauen besaß.³⁶

Mittlerweile weiß man aufgrund verschiedener Studien über den Konsum von Erdnüssen⁵⁵⁻⁵⁷ und Eiern⁵⁸ in einem frühen Lebensalter, dass ein früher Kontakt zu Allergenen wichtig ist, um das Risiko für Lebensmittelallergien zu reduzieren.^{2, 55-58} Man geht man davon aus, dass es eine kritische Phase, die ersten 1000 Tage des Lebens, gibt, in der bestimmte Umweltfaktoren einen dauerhaften Effekt auf die Entwicklung von Lebensmittelallergien besitzen, wobei diese Phase sowohl die pränatale als auch die postnatale Entwicklung umfasst.²

1.1.11 Therapie von Lebensmittelallergien

Die wichtigste Therapie bei einer Lebensmittelallergie besteht derzeit in der strikten Vermeidung des aufgrund der Krankengeschichte und zusätzlicher Tests identifizierten, auslösenden Allergens sowie – für den Fall einer versehentlichen Aufnahme des Allergens, insbesondere bei Personen, die gefährdet sind, schwere allergische Reaktionen zu erleiden – in der ständigen Verfügbarkeit eines Adrenalin-Autoinjektors und weiterer Medikamente.^{2, 36} Zusätzlich gibt es neuere Therapie-Ansätze, welche sich teilweise noch in der Entwicklung befinden, welche teilweise aber auch bereits eingesetzt, jedoch noch genauer untersucht werden müssen. Dazu gehören die orale, die epikutane und die sublinguale Immuntherapie.²

1.1.11.1 Die Vermeidung des Allergens

Die Vermeidung des allergieauslösenden Lebensmittels setzt eine große Wachsamkeit und ein lebenslanges Lernen voraus. Zu den notwendigen Maßnahmen zählen das Studieren von Produktkennzeichnungen und von Informationen über Kreuzreaktionen,³ beispielsweise sollten Betroffene die Inhaltsstoffe von Produkten, selbst, wenn ihnen diese Produkte bereits bekannt sind, vor jedem Konsum genau lesen, da bei Produkten teilweise das Packungsdesign

unverändert bleibt, während sich jedoch die Inhaltsstoffe immer wieder geringfügig ändern können.³⁶ Allergische Personen sollten sich abgesehen davon stets nach der genauen Zutatenliste von frisch zubereiteten Speisen in Restaurants oder Schulkantinen erkundigen und das Personal über ihre Allergie informieren, wobei sie sehr deutlich betonen sollten, dass sie nicht aufgrund geschmacklicher Vorlieben nachfragen, sondern, weil sie an einer lebensbedrohlichen Allergie leiden.^{3, 36}

1.1.11.2 Therapie im Fall einer anaphylaktischen Reaktion

Die strikte Vermeidung eines Lebensmittelallergens ist aufgrund eines unbeabsichtigten Konsums nicht immer möglich, weshalb die vorsorgliche Erstellung eines individuellen Notfall-Plans für den Fall des Auftretens einer anaphylaktischen Reaktion unerlässlich ist.³

Wie man aus der Statistik weiß, treten die meisten Todesfälle im Zusammenhang mit Lebensmittelallergien bei Personen auf, die wissen, dass sie allergisch auf ein bestimmtes Lebensmittel reagieren, die jedoch ein Produkt, welches mit einem nicht gekennzeichneten Allergen verunreinigt ist, konsumieren, oder die versehentlich ein in einer frisch zubereiteten Speise „versteckt“ vorkommendes Allergen aufnehmen.³⁶

Das erste Mittel der Wahl bei einer anaphylaktischen Reaktion ist **Adrenalin**, welches mit Hilfe eines Autoinjektors von den Betroffenen selbst injiziert werden sollte,² und zwar sofort und bevorzugt in Form einer intramuskulären Selbst-Injektion anstatt einer subkutanen Injektion oder einer Inhalation.²¹

Da die häufigste Todesursache im Fall einer anaphylaktischen Reaktion eine verspätete oder fehlende Verabreichung von Adrenalin darstellt,³ umgekehrt jedoch der Großteil der Betroffenen, die Adrenalin einsetzen, eine anaphylaktische Reaktion überleben,²¹ gilt Adrenalin als das effektivste Mittel, um den Tod zu verhindern,³ was die zentrale Bedeutung dieses Medikaments aufzeigt.²¹ Trotzdem wird Adrenalin immer noch viel zu wenig verschrieben und auch von medizinischem Personal und von den Betroffenen selbst zu selten eingesetzt.³ Prinzipiell ist es sehr wichtig, dass Betroffene lernen, den Adrenalin-Autoinjektor selbst zu bedienen, und dass sie für den Notfall auch schriftliche Anweisungen bei sich tragen.² Dieser Notfall-Plan sollte das auslösende Lebensmittel, mögliche Symptome, zu verabreichende Medikamente sowie Notrufnummern enthalten,²¹ und sollte im Fall von Kindern dem Kind selbst, den Eltern sowie allen Betreuungspersonen zur Verfügung stehen. Abgesehen davon sollten besonders gefährdete Personen ein Notfall-Armband tragen, in welchem die genauen Details zur Allergie eingespeichert sind.²¹

Adrenalin kehrt die Wirkung der aus den Mastzellen bereits freigesetzten Mediator-Substanzen um, verbessert so die Funktion des Herzmuskels und bewirkt eine Bronchienerweiterung. Zusätzlich kann Adrenalin auch die Freisetzung der Mediatoren verringern.² Da Adrenalin eine sehr kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzt, ist des

Öfteren noch eine zweite Dosis notwendig, falls die Symptome länger andauern oder wieder auftreten sollten.³

Grundsätzlich sollten alle von einer anaphylaktischen Reaktion betroffenen Personen umgehend zu einer medizinischen Notfalleinrichtung gebracht werden und dort noch mehrere Stunden unter ständiger Beobachtung stehen, für den Fall, dass es eine zweite Phase der Symptome gibt, welche mit einer Zeitverzögerung von vier bis 24 Stunden nach der ersten Reaktion auftreten kann.³

Zusätzlich zu Adrenalin gibt es weitere Medikamente, welche im Fall einer anaphylaktischen Reaktion eingesetzt werden können, beispielsweise Antihistaminika, Salbutamol und Corticosteroide,² abgesehen davon haben sich die Gabe von Sauerstoff, intravenöse Infusionen sowie für Asthma-Patienten die Verabreichung von inhalierten β -Agonisten häufig als notwendig erwiesen.²¹ Die genannten Medikamente schwächen die Symptome im Fall einer anaphylaktischen Reaktion ab, sind jedoch nur als zusätzliche Maßnahme neben Adrenalin und nicht als primäre Behandlungsmethode gedacht.³

Antihistaminika heben die Wirkung von Histamin auf und verringern dadurch die Bronchienverengung, die Gefäßerweiterung und den damit verbundenen Blutdruckabfall sowie die Gefäßdurchlässigkeit.⁵⁰ **Salbutamol** führt zu einer Bronchienerweiterung, wobei die Wirkung innerhalb von Minuten einsetzt und drei bis fünf Stunden lang anhält.⁵⁰

Corticosteroide verhindern eine späte allergische Reaktion (mehr als acht Stunden nach dem Konsum eines Allergens), wirken jedoch langsam und sind daher als Notfall-Medikament nicht geeignet.²

Im sehr speziellen Fall, dass Personen von einer Lebensmittel-unabhängigen, Sport-induzierten Anaphylaxis betroffen sind, müssen diese mindestens zwei bis vier Stunden nach einer Mahlzeit abwarten, ehe sie Sport betreiben. Allgemein gilt für Personen mit jeder Form von Sport-induzierter Anaphylaxis, dass sie nicht allein trainieren sollten und dass sie beim allerersten Anzeichen einer Reaktion das Training sofort beenden müssen.³⁶

1.1.11.3 Neuere Therapie-Ansätze

Die orale, die sublinguale und die epikutane Immuntherapie streben eine Desensibilisierung oder eine anhaltende Nichtreaktion an.³ Das Ziel einer *Desensibilisierung* besteht im Anheben der Reaktionsschwelle für ein bestimmtes Allergen, was Betroffenen einen gewissen Schutz vor unbeabsichtigt aufgenommenen Allergenen bieten soll. Dazu ist allerdings eine jahrelange Immuntherapie notwendig und die Therapie muss dauerhaft fortgesetzt werden.³ Die *anhaltende Nicht-Reaktion* ist ein Zustand, in welchem selbst nach Absetzen der jahrelangen Therapie keine klinisch beobachtbare Reaktion auf ein Allergen mehr stattfindet.³ Eine *orale Toleranz* kann hingegen üblicherweise nicht durch eine Immuntherapie bewirkt werden.³

Die **orale Immuntherapie** besteht darin, Betroffenen täglich eine bestimmte Dosis Allergen-Pulver, einem Lebensmittel beigemischt, zu verabreichen, wobei die Dosis des Allergen-Pulvers über einen Zeitraum von mehreren Jahren regelmäßig gesteigert wird.³

Die orale Immuntherapie führt zu einem großen Erfolg in Bezug auf die Desensibilisierung und die anhaltende Nicht-Reaktion, es können jedoch Nebenwirkungen wie anaphylaktische Reaktionen oder Symptome, welche den Gastrointestinaltrakt betreffen, auftreten.³

Bei der **sublingualen Immuntherapie** wird das Allergen jahrelang täglich unter die Zunge eingebracht, was bei den meisten Personen nach einem Jahr Therapie zu einer Desensibilisierung führt, wobei nur wenige, lokale Nebenwirkungen beobachtet werden.³

Bei der **epikutanen Immuntherapie** wird das Allergen mit Hilfe eines Pflasters am Rücken oder am Oberarm auf die Haut aufgebracht, wobei das Pflaster im 24-Stunden-Rhythmus gewechselt wird.³ Die Therapie wird ebenfalls jahrelang durchgeführt und führt in manchen Fällen nach einem Jahr Behandlung zu einer Desensibilisierung, besonders bei Kindern im Alter von vier bis elf Jahren, und es treten nur wenige, harmlose Nebenwirkungen aufgrund von Hautreizungen durch das Pflaster auf.³

1.1.12 Gesetzliche Kennzeichnungspflichten für Lebensmittelallergene

Bisher wurden über 170 Lebensmittel als Allergene identifiziert, jedoch sind nur wenige davon für den Großteil aller Lebensmittelallergien verantwortlich.⁵⁹

Die Unterschiede in der toxikologischen Bewertung von Allergenen im Vergleich zu Toxinen hinsichtlich der Auswirkungen einer bestimmten Dosis sind im Kapitel 1.1.2 angeführt,^{5, 28} abgesehen davon gibt es jedoch auch innerhalb der Personengruppe, welche von einer Lebensmittelallergie betroffen ist, Unterschiede. So kann etwa der Schwellenwert, bei dessen Überschreitung es zu einer Reaktion kommt, von Person zu Person unterschiedlich sein, und zusätzlich können weitere Erkrankungen, die Einnahme bestimmter Medikamente sowie körperliche Belastungen eine Veränderung dieses Schwellenwertes zur Folge haben.²⁸

Lebensmittel, die nicht deklarierte Allergene enthalten, bedeuteten für Personen mit einer Lebensmittelallergie noch bis vor wenigen Jahren eine Gefährdung für die Gesundheit,²⁸ mittlerweile gibt es jedoch für diejenigen 14 Lebensmittel, welche am häufigsten eine Lebensmittelallergie oder eine Lebensmittel-Unverträglichkeit auslösen, eine EU-weite Kennzeichnungspflicht.⁶⁰ Diese gilt einerseits für vorverpackte Lebensmittel und andererseits laut den Ergänzungen der *Lebensmittelinformationsverordnung LMIV (EU) 1169/2011*,⁶¹ welche mit dem 13.12.2014 in Kraft getreten ist, mittlerweile auch für unverpackte Lebensmittel, die beispielsweise in Kantinen oder Bäckereien zum Verkauf angeboten werden.^{60, 61}

Abgesehen von der Kennzeichnungspflicht für unverpackte Lebensmittel gibt es in der genannten EU-Verordnung eine weitere Neuerung, welche die Verpflichtung zur besonderen

Hervorhebung allergieauslösender Inhaltsstoffe in der Zutatenliste von Lebensmitteln betrifft. Dabei müssen sich Lebensmittelallergene in der Auflistung deutlich von den restlichen Zutaten abheben, etwa durch eine andere Schriftart, einen anderen Schriftstil oder eine andere Hintergrundfarbe. Beide Neuerungen in der Kennzeichnung sollen Betroffenen die Vermeidung von Allergenen erleichtern.^{60, 61}

Allgemein gilt für die Kennzeichnung von Lebensmittelallergenen, dass diesbezügliche Angaben nicht irreführend, zweideutig oder missverständlich sein dürfen. Weiters ist eine Werbung mit Selbstverständlichkeiten nicht erlaubt.⁶⁰ So ist etwa die Bezeichnung „Käse, glutenfrei“ nicht zulässig, da dieser Hinweis suggerieren würde, dass es sich dabei um eine Besonderheit dieses Produktes handle, was einer Irreführung entsprechen würde. Die Beschreibung „Käse, von Natur aus glutenfrei“ ist hingegen möglich.⁶⁰

Den Mitgliedsstaaten der EU ist es laut der *LMIV (EU) 1169/2011* gestattet, eigene Regelungen für nicht vorverpackte Erzeugnisse zu erlassen. Dabei gilt grundsätzlich (wie bei vorverpackten Produkten) eine schriftliche Kennzeichnungspflicht, es ist jedoch darüber hinaus unter Einhaltung bestimmter Vorgaben auch eine mündliche Auskunft über Allergene erlaubt.^{60, 61} Dabei ist verpflichtend vorgeschrieben, dass sich die Kennzeichnung von Allergenen auf ein ganz bestimmtes Lebensmittel bezieht. Die Hinweise über enthaltene Allergene dürfen daher nicht für alle angebotenen Produkte zusammengefasst dargestellt werden.⁶⁰

Laut dem *Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich aus dem Jahr 2014 (175.Verordnung)*⁶² müssen Lebensmittelunternehmen in Österreich sicherstellen, dass die Informationen über kennzeichnungspflichtige Allergene in unverpackten Lebensmitteln jederzeit verfügbar sind und leicht zugänglich gemacht werden.⁶² Es ist dabei ausreichend, einen Hinweis, dass die genannten Informationen mündlich erfragt werden können, an einer gut sichtbaren Stelle anzubringen, eine Liste der in einem Erzeugnis enthaltenen Allergene muss jedoch auch in schriftlicher Form dokumentiert sein. Sollten die Informationen mündlich weitergegeben werden, hat dies durch dafür geschulte Personen zu erfolgen, wobei nachweislich alle drei Jahre eine Wiederholung der Schulung erfolgen muss.⁶²

Diejenigen 14 Lebensmittel, welche Allergien oder Unverträglichkeiten auslösen können und einer EU-weiten Kennzeichnungspflicht unterliegen, sind in **Tab. 3** aufgelistet, wobei es bei einigen der genannten Allergene laut der *Lebensmittelinformationsverordnung LMIV (EU) 1169/2011* Ausnahmen von der Kennzeichnungspflicht gibt, beispielsweise fallen Glucose-Sirupe auf Weizenbasis und andere aus einzelnen Allergenen in weiterer Verarbeitung gewonnene Erzeugnisse nicht unter die Kennzeichnungspflicht.^{60, 61} Wie **Tab. 3** zu entnehmen ist, müssen mit Ausnahme von Schwefeldioxid und mit Ausnahme der Sulfite alle übrigen genannten Allergene unabhängig von ihrer Konzentration im jeweiligen Lebensmittel gekennzeichnet werden.^{60, 61} Bei Schalenfrüchten und bei glutenhaltigem Getreide muss die

jeweils enthaltene Nuss- oder Getreidesorte jeweils in der Zutatenliste des Lebensmittels genannt werden, da die Nennung der Überbegriffe „Schalenfrüchte“ bzw. „Glutenhaltiges Getreide“ nicht ausreichend ist. Dies ist darin begründet, dass unter den Überbegriffen jeweils einige sehr unterschiedliche Allergene zusammengefasst werden, wodurch die Nennung der Überbegriffe zu allgemein und daher für Betroffene in Bezug auf die Vermeidung eines spezifischen Allergens unbrauchbar wäre.^{60, 61} Als „glutenfrei“ dürfen Produkte mit weniger als 20 mg Gluten pro kg Lebensmittel bezeichnet werden.^{60, 61}

Die Kennzeichnung von häufig zu Reaktionen führenden Allergenen auf Produkten gewährleistet eine wesentlich höhere Sicherheit für Betroffene und ist daher nicht nur in der EU, sondern mittlerweile auch in vielen weiteren Ländern gesetzlich verpflichtend vorgeschrieben, beispielsweise in den USA, in Australien, in Kanada und in Japan.²

Tab. 3: In der EU kennzeichnungspflichtige Lebensmittelallergene *nach* Demmel⁶⁰

Kennzeichnungspflichtige Lebensmittelallergene in der Europäischen Union
Glutenhaltiges Getreide <i>Namentlich:</i> Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut (sowie Hybridstämme der genannten Getreidesorten) und daraus gewonnene Erzeugnisse
Krebstiere und daraus gewonnene Erzeugnisse
Eier und daraus gewonnene Erzeugnisse
Fische und daraus gewonnene Erzeugnisse
Erdnüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse
Sojabohnen und daraus gewonnene Erzeugnisse
Milch und daraus gewonnene Erzeugnisse
Schalenfrüchte <i>Namentlich:</i> Mandeln, Haselnüsse, Walnüsse, Cashew-Nüsse, Pekannüsse, Paranüsse, Pistazien, Macadamia-Nüsse, Queensland-Nüsse und daraus gewonnene Erzeugnisse
Sellerie und daraus gewonnene Erzeugnisse
Senf und daraus gewonnene Erzeugnisse
Sesamsamen und daraus gewonnene Erzeugnisse
Schwefeldioxid und Sulfite in Konzentrationen von mehr als 10 mg/kg oder 10 mg/L im genussfertigen Lebensmittel
Lupinen und daraus gewonnene Erzeugnisse
Weichtiere und daraus gewonnene Erzeugnisse

1.1.12.1 Die Problematik „versteckter Allergene“ in Lebensmitteln

Die Kennzeichnungspflicht stellt für Betroffene eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Möglichkeit zur Vermeidung von Allergenen in zusammengesetzten Lebensmitteln oder Fertigprodukten dar.²⁸ Nachdem jedoch unbeabsichtigt in ein Produkt eingebrachte Allergene von der Kennzeichnungspflicht ausgenommen sind,⁶⁰ wird die Situation für Personen mit einer Lebensmittelallergie wiederum erschwert.²⁸ Derartige nicht erkennbare oder nicht einschätzbare Vorkommen von Allergenen in Lebensmitteln werden als „versteckte Lebensmittelallergene“ bezeichnet und können unterschiedliche Ursachen besitzen.⁶³

1) Allergene können versehentlich und ohne Wissen des Herstellers in Spuren in ein Produkt gelangen,²⁸ indem sie während des Transports, der Lagerung, Herstellung oder Verpackung in das Produkt „eingeschleppt“ werden.⁶³ Für Personen mit einer Lebensmittelallergie bedeutet dies, dass trotz des Studiums der Zutatenliste eines Produktes eine allergische Reaktion auftreten kann, bei einer hochallergischen Person im schlimmsten Fall sogar ein lebensbedrohlicher anaphylaktischer Schock.²⁸ Sollte ein Lebensmittelunternehmen einen derartigen Fall für eines seiner Produkte befürchten, so steht es diesem frei, gegebenenfalls aus Gründen der Produkthaftung eine Kennzeichnung vorzunehmen, obwohl diese gesetzlich nicht verpflichtend ist.⁶⁰

Für Lebensmittelunternehmen ist es im Allgemeinen unmöglich, den Eintrag von Spuren von Allergenen im Verarbeitungsprozess von Lebensmitteln vollständig auszuschließen, was zur Folge hat, dass Firmen ihre Produkte häufig zur Sicherheit mit vorbeugenden Hinweisen versehen, beispielsweise mit dem Hinweis „Kann Spuren von ... enthalten“.²⁸ Allerdings besitzt dies auch einige Nachteile: Einerseits kann es vorkommen, dass ein Produkt, obwohl ein derartiger Hinweis vorhanden ist, das betreffende Allergen überhaupt nicht enthält, wodurch Konsumentinnen und Konsumenten das Produkt meiden. Andererseits könnte es auch umgekehrt passieren, dass ein Lebensmittelunternehmen aufgrund der fehlenden Kennzeichnungspflicht keinen derartigen Hinweis anbringt, das Allergen jedoch trotzdem in Spuren im Produkt zu finden ist, was im Fall des Verzehrs schwerwiegende gesundheitliche Konsequenzen für Betroffene nach sich ziehen kann.²⁸ Konsumentinnen und Konsumenten müssen daher bei jedem Produkt entscheiden, ob sie dem Lebensmittelunternehmen genug Vertrauen entgegenbringen, beim Verzehr eines Produktes keinen gesundheitlichen Schaden zu erleiden.⁶³

In diesem Zusammenhang ergibt sich auch das Problem, dass es bisher keine genaue Definition des Begriffs „Allergenspuren“ gibt, sodass bei einem derartigen Hinweis auf einem Produkt nicht definiert ist, in welcher Konzentration das Allergen im betreffenden Produkt vorkommt. Es fehlen bisher zum Großteil klinische Daten zu den gerade noch tolerierbaren Schwellenwerten für Lebensmittelallergene, weshalb auch nicht klar ist, ab welchen Mengen die jeweiligen Allergene einer gesetzlichen Kennzeichnungspflicht unterliegen sollten.²⁸

Zusammengefasst lässt sich daher feststellen, dass Lebensmittelunternehmen, wenn es um Spuren von Allergenen geht, Konsumentinnen und Konsumenten gegenüber eine große Verantwortung besitzen, und dass Betroffene im Zweifelsfall lieber auf Fertigprodukte oder zusammengesetzte Lebensmittel verzichten sollten, wenn sie nicht sicher sein können, dass diese keine Spuren eines bestimmten Allergens enthalten.²⁸

2) Allergieauslösende Zutaten in Lebensmitteln sind teilweise nicht klar und leicht verständlich angegeben und daher für Allergiker trotz Studieren der Zutatenliste möglicherweise nicht erkennbar. Beispiele dafür sind die Kennzeichnungen „Molkenprotein“ und „Casein“, welche beide aus Milch gewonnen werden, „Tofu“ aus Soja, „Bulgur“ und „Couscous“ aus Weizen sowie „Ovalbumin“ aus dem Ei.⁶³

3) Eine weitere Quelle „versteckter Allergene“ sind unvermutet in einem Produkt vorkommende Allergene, beispielsweise, wenn das Allergen aufgrund der Packungs-Gestaltung nicht im Produkt vermutet wird, da es dort nicht abgebildet ist oder da es in der Bezeichnung des Produktes nicht vorkommt. Abgesehen davon kann es vorkommen, dass Lebensmittelunternehmen die Rezepturen von Produkten verändern, während die Verpackungsgestaltung gleichbleibt.⁶³

4) Der Konsum von Lebensmitteln aus Einzelverpackungen, welche sich ursprünglich in einer Großpackung befunden haben, kann ebenfalls zu Problemen führen, wenn beispielsweise auf der Einzelverpackung keine Zutaten angegeben sind und die Großpackung nicht mehr zur Verfügung steht.⁶³

5) Eine weitere Schwierigkeit tritt aufgrund neuer, bisher nicht kennzeichnungspflichtiger Allergene auf, da diese teilweise nicht in der Zutatenliste des Produkts genannt werden, beispielsweise im Fall von Gewürzmischungen.⁶³

1.2 MOHN und MOHNALLERGIE

1.2.1 Schlafmohn (*Papaver somniferum*)

Der Schlafmohn (*Papaver somniferum*) ist eine von etwa 70 Pflanzenarten der Gattung *Papaver*, welche der Pflanzenfamilie der *Papaveraceae* (Mohngewächse) angehört.⁶⁴ Der Schlafmohn stammt aus Mitteleuropa und/oder Südeuropa, wo er bereits im Neolithikum angepflanzt wurde, und besitzt zahlreiche Unterarten und Varietäten. Mittlerweile ist er in der gesamten Welt zu finden und besitzt in vielerlei Hinsicht eine lange Geschichte.⁶⁴

Schlafmohn wächst am besten auf warmen, nährstoffreichen, kalkhaltigen Böden, besitzt aber eine gute Anpassungsfähigkeit an verschiedene klimatische Bedingungen.⁶⁵ Neben dem Schlafmohn gibt es unter den Mohngewächsen noch weitere bekannte Vertreter, beispielsweise den Klatschmohn, den Stachelmohn und das Schöllkraut.⁶⁶ In Österreich ist der Schlafmohn ebenfalls eine sehr alte Kulturpflanze, und man findet als häufigste Varietäten den

Blaumohn sowie den heimischen, weit verbreiteten Graumohn,⁶⁷ wobei der Waldviertler Graumohn als „geschützte Ursprungsbezeichnung“ deklariert ist.⁶⁸

Die reifen Samen des Schlafmohns können in unterschiedlichen Farben auftreten, so zum Beispiel gelb, braun, blaugrau, schwarz⁶⁴ oder weiß, wobei sie ein nierenförmiges Aussehen besitzen und eine Größe von bis zu 1,5 mm erreichen.⁶⁵ Von den Blütenblättern existieren ebenfalls diverse Farbvarietäten, etwa weiß, rosa, violett, bläulich, leuchtendrot und schwarz.⁶⁴

1.2.1.1 Die Inhaltsstoffe von Schlafmohn und deren Verwendung

Ursprünglich fand der Schlafmohn vermutlich eine Verwendung als Nahrungs- und Rauschpflanze und war somit eine bedeutende Kulturpflanze. Abgesehen davon diente er im Lauf der Geschichte auch als wichtige Heilpflanze, da die schlaffördernde Wirkung bereits sehr früh bekannt war.⁶⁴

Schlafmohn enthält zahlreiche Inhaltsstoffe, darunter bis zu 40 unterschiedliche Alkaloide, welche sich hauptsächlich im Milchsaft der unreifen Mohnkapsel befinden, beispielsweise bis zu 23 % Morphin, 4 % Codein, 2 % Papaverin und viele weitere Alkaloide in unterschiedlichen Anteilen,⁶⁴ die eine große Bedeutung für die pharmazeutische Industrie besitzen.⁶⁹ Schlafmohn produziert beträchtliche Mengen an Milchsaft,⁴¹ welcher eine schmerzstillende Wirkung besitzt.⁶⁵ Dieser wird durch das Anschneiden der unreifen, ausgewachsenen Fruchtkapsel gewonnen, trocknet an der Luft und erhält dadurch schließlich seine typische braune Farbe.⁶⁵ Für die Alkaloid-Gewinnung ist ein besonders hoher Alkaloid-Gehalt in den Samen und in der Kapsel wünschenswert, für den sogenannten „Backmohn“ wird hingegen ein möglichst geringer Alkaloid-Gehalt angestrebt.⁶⁵

In den Samen findet man kein Morphin, und der Alkaloid-Gehalt in der reifen Mohnkapsel beträgt allgemein nur 0,4-1,5 %, ⁶⁵ sodass die reifen Mohnsamen höchstens Spuren von Alkaloiden enthalten⁶⁴ und im Gegensatz zum Milchsaft nicht narkotisierend wirken.⁴¹ Bei der Verdauung der Samen kann jedoch durch das Enzym Pepsin das Alkaloid Codein entstehen.⁶⁴ Die prozentuelle Zusammensetzung der Inhaltsstoffe ergibt, dass Mohnsamen 40-55 % Mohnöl,⁶⁵ bis zu 20 % Proteine, 20 % Ballaststoffe sowie 4 % Kohlenhydrate enthalten. Der Rest verteilt sich in etwa zu gleichen Teilen (jeweils etwa 6 %) auf Wasser und Mineralien, beispielsweise Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium, Mangan, Eisen, Kupfer, Zink und Phosphor.⁷⁰ Weiters sind einzelne Vitamine in kleineren Mengen enthalten, so zum Beispiel die Vitamine B₁, B₂ und B₆. Die in den Mohnsamen enthaltenen Proteine bestehen unter anderem aus allen acht essenziellen Aminosäuren (Histidin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin und Tryptophan).⁷⁰

Die Samen des Schlafmohns finden Anwendung in verschiedenen Bereichen, beispielsweise wird daraus Mohnöl gewonnen, welches einen hohen Anteil an Linolsäure (bis zu 74 %)⁶⁵ und Ölsäure (bis zu 30 %)⁶⁷ sowie in geringeren Anteilen auch Palmitinsäure (8-12 %) und

Stearinsäure (1-2 %) besitzt. Mohnöl ist ein wertvolles Speiseöl,⁶⁵ wird aber auch zur Herstellung von Malerfarben verwendet, da es sich an der Luft verfestigt und außerdem die höchste Schmierfähigkeit unter allen Pflanzenölen aufweist.⁶⁷ Weiters werden Mohnsamen in der Erzeugung von Backwaren eingesetzt, etwa von Brot, Gebäck, Mohntorten, Mohnkuchen,⁶⁵ Mohnstriezel, ⁴¹ Muffins,³⁶ Süßspeisen wie Mohnnudeln und Germknödeln.⁶⁵ Zusätzlich finden Mohnsamen eine Verwendung in asiatischen Gerichten und indischen Curry-Pasten³⁶ und werden gelegentlich auch zur Färbung, etwa von Hustensäften, eingesetzt.⁵¹

1.2.1.2 Medizinische Anwendungen von Schlafmohn

Es gibt Personen mit einer Opiat-Allergie, welche bei Verabreichung von Opiaten im Rahmen einer Anästhesie eine anaphylaktische Reaktion erleiden können.⁷¹ Die Diagnose einer Opiat-Allergie ist jedoch schwierig, da bei einem Skin-Prick-Test aufgrund der durch die aufgetragenen Opiate verursachten lokalen Degranulation der Mastzellen eine größere Anschwellung der Haut entsteht, welche aber unter Umständen nur durch das Opiat an sich und nicht immer durch eine Allergie gegen das Opiat bewirkt wird. Daher hat ein Skin-Prick-Test mit Opiaten keine Aussagekraft bezüglich des Vorliegens einer Opiat-Allergie.⁷¹

Es wurde daher vorgeschlagen, dass man mit Hilfe eines positiven Skin-Prick-Tests mit Mohnsamen und bei Vorliegen erhöhter IgE-Werte in einem Serum-Test mit Schlafmohnsamen-Extrakten eine Opiat-Allergie diagnostizieren könnte.⁷¹ Diese Annahme wurde jedoch in der Zwischenzeit ergänzt, da festgestellt wurde, dass ein positiver IgE-Serum-Test mit Schlafmohnsamen-Extrakten nicht als alleiniges Mittel zur Diagnose-Stellung herangezogen werden kann, und dass zusätzlich noch ein Provokationstest durchgeführt werden sollte, um Fehldiagnosen zu vermeiden.⁷²

Eine weitere Anwendung von Mohn zur Diagnose von Erkrankungen stellt der „Mohn-Test“ dar, worunter man die Verwendung von Mohnsamen zur Feststellung von enterovesikalen Fisteln bei der chronischen Darmerkrankung Morbus Crohn versteht. Die bei dieser Erkrankung entstehenden Fisteln besitzen in manchen Fällen einen sehr kleinen Durchmesser, wodurch sie mit gängigen bildgebenden Verfahren (Endoskopie, Magnetresonanztomografie, Computertomografie) nicht dargestellt werden können. In diesem Fall kann der Verzehr von Mohnsamen als Diagnosemittel eingesetzt werden, da diese sehr kleine Fisteln durchwandern und schließlich, etwa bei Auftreten einer Fistel zwischen dem Darm und der Harnblase, im Urin nachgewiesen werden können.⁷³

1.2.2 Epidemiologie der Mohnallergie

Sesam-, Senf-, Sonnenblumen-, Mohn- und Leinsamen können allergische Reaktionen auslösen, wobei Sesam unter den genannten Samen am häufigsten zu Symptomen führt.³⁶ Allergische Reaktionen gegen Samen nehmen allgemein zu, da diese immer mehr in die Ernährung einbezogen werden, allerdings besteht eine Schwierigkeit darin, Samen als Allergene zu erkennen. Abgesehen davon werden Allergien gegen Samen mit Ausnahme der Sesam-Allergie üblicherweise nicht ausreichend erfasst.⁴²

Mohnsamen werden im Vergleich zu anderen Lebensmitteln, beispielsweise Erdnüssen oder anderen Hülsenfrüchten wie Sojabohnen, in Europa und Nordamerika üblicherweise in eher kleineren Mengen konsumiert,⁷⁴ es gibt jedoch auch Länder, in denen Mohnsamen häufiger zum Einsatz kommen, etwa in Deutschland.⁷⁵ Mohnsamen werden jedoch, obwohl sie nicht in großen Mengen verwendet werden, weltweit konsumiert. Trotzdem gibt es nicht viele Literaturquellen mit Informationen über allergische Reaktionen nach dem Verzehr von Schlafmohnsamen, und die vorhandenen Daten über die Mohn-Allergie, aber auch über die Sonnenblumen-, Senf-, Kürbis- und Leinsamen-Allergie beziehen sich meistens auf einzelne Fallbeschreibungen.⁴²

Von den genannten Samen-Allergien ist die Sesam-Allergie die einzige, von der es Schätzungen der Häufigkeit (0,1-0,2 %) gibt,⁷⁶ ansonsten sind epidemiologische Daten rar, so in Bezug auf die Sonnenblumen-, Kürbis-, Leinsamen- und Mohn-Allergie.⁴² Da die Mohn-Allergie in Europa und weltweit nur selten auftritt,²⁰ Mohnsamen jedoch eine Anaphylaxie auslösen können, ist eine ausführliche Anamnese besonders wichtig.⁵¹

Samen lösen generell häufig anaphylaktische Reaktionen bei Kindern aus, so wurde etwa 2017 in Polen ermittelt, dass Samenproteine in 63 von 187 Fällen der Grund für eine anaphylaktische Reaktion bei Kindern waren, wobei darunter beispielsweise Speicherproteine von Sonnenblumen-, Sesam-, Wassermelonen- und Mohnsamen zu finden waren.⁷⁷

Eine weitere Studie aus Tschechien²⁰ aus dem Jahr 2014 ergab, dass Mohnsamen bei Kindern in 14 % und bei Erwachsenen sogar in 25 % der Fälle der Auslöser für eine anaphylaktische Reaktion waren, und dass die Schwellendosis allgemein sehr niedrig lag.²⁰

Die im Rahmen einer Studie⁷⁸ in Schweden, Dänemark, Estland, Litauen und Russland durchgeführten Umfragen zeigten, dass unter denjenigen Personen, die an Lebensmittel-Unverträglichkeiten litten, eine selbst berichtete Mohn-Unverträglichkeit am häufigsten in Schweden (10,0 %) auftrat, gefolgt von Litauen (5,5 %), Estland (4,5 %), Dänemark (4,0 %) und Russland (1,3 %).⁷⁸

1.2.3 Allergene in Schlafmohnsamen

Extrakte aus den Samen des Schlafmohns enthalten verschiedene Proteine und Glykoproteine, die an spezifische, aus den Blutseren von Personen mit einer Mohnallergie gewonnene IgE-Antikörper binden können.⁴⁰ Dazu wurde 1999 in Wien eine Studie⁴⁰ mit Blutseren von elf Patientinnen und Patienten mit einer Mohnallergie durchgeführt. Es zeigte sich, dass es zu einer Bindung von IgE-Antikörpern der Patientinnen und Patienten an mehrere Proteine aus dem Mohn-Extrakt kam, so bei zehn Personen an ein 45 kDa-Protein, bei vier an ein 34 kDa-Protein, bei jeweils fünf an ein 17 kDa-Protein sowie an ein 14 kDa-Protein und bei drei Personen an ein 5 kDa-Protein.⁴⁰ Bei einzelnen Patientinnen und Patienten konnte auch eine Bindung an 20, 25, 30 oder 40 kDa-Proteine festgestellt werden. Bei genaueren Untersuchungen wurden die 40 kDa- und 45 kDa-Proteine als Glykoproteine identifiziert, deren Kohlenhydratanteile Epitope enthielten.⁴⁰

Mittlerweile hat man die Allergene in Mohnsamen genauer untersucht, wobei Pap s, Pap s 1 (ein Bet v 1-Homolog), Pap s 2 (ein Profilin) und Pap s 34 kDa beschrieben wurden,²⁰ außerdem gibt es Hinweise darauf, dass ein 2S-Albumin in Mohnsamen ebenfalls eine Rolle als Allergen spielen und Kreuzallergien mit Prolaminen aus anderen Samen, Nüssen und Hülsenfrüchten auslösen könnte.³⁷

1.2.3.1 Schlafmohnsamen: *in vitro*-Kreuzreaktionen und klinische Kreuzreaktionen

Es ist wichtig, zwischen *in vitro*-Kreuzreaktionen aufgrund durchgeführter Immuno-Assays und klinischen Kreuzallergien zu unterscheiden, da eine *in vitro*-Kreuzreaktion zwar mit klinischen Symptomen einhergehen kann, aber nicht muss. Nicht alle *in vitro*-Kreuzreaktionen führen daher zum tatsächlichen Auftreten einer allergischen Reaktion.⁴²

Was die im Schlafmohnsamen-Extrakt identifizierten Proteine betrifft, so zeigte das 45 kDa-Glykoprotein in der beschriebenen Wiener Studie⁴⁰ bei zehn Patientinnen und Patienten eine Bindung an Schlafmohn-spezifische IgE-Antikörper aus dem Blutserum, weswegen man davon ausgeht, dass es sich um das Hauptallergen in Schlafmohnsamen handelt.⁴⁰ Dieses Glykoprotein zeigte in weiteren *in vitro*-Versuchen Kreuzreaktionen mit Bestandteilen von Birken-, Beifuß- und Wiesenlieschgraspollen-Extrakten.⁴⁰

Beim 34 kDa-Protein traten hingegen keine *in vitro*-Kreuzreaktionen mit den genannten Pollen-Extrakten auf, weswegen anzunehmen ist, dass es sich beim 34 kDa-Protein im Gegensatz zum 45 kDa-Glykoprotein um ein Schlafmohn-spezifisches Allergen handelt.⁴⁰ Weiters konnten Ähnlichkeiten der Proteine in den Mohnsamen-Extrakten mit den bekannten Pollenallergenen Bet v 1 und Profilin beobachtet werden,⁴⁰ und weitere Untersuchungen zeigten, dass das 45 kDa-Protein aus dem Schlafmohn-Extrakt homolog zu Bet v 1 und Bet v

2 ist. Bet v 1-Homologe werden auch als PR-10 bezeichnet und bei Bet v 2 handelt es sich um ein Profilin.⁴²

Bet v 1 und die Profileine besitzen eine so große Bedeutung für viele Pflanzenzellen, dass sie teilweise in weit entfernt verwandten Pflanzenfamilien zu finden sind. Dies erklärt generell das hohe Potenzial für Kreuzallergien zwischen Allergenen aus nicht näher verwandten Pflanzenfamilien.⁸ Bet v 1 und Profilin reagieren sehr empfindlich auf die Verdauungsvorgänge im Magen, daher erfolgt die Sensibilisierung in den meisten Fällen durch die Inhalation von Pollen. Bei Personen, bei welchen die Menge an Magensäure reduziert ist, ist jedoch auch eine Sensibilisierung gegen Bet v 1 und Profilin im Verdauungstrakt möglich.⁸

Weiters zeigte sich, dass die Schlafmohn-spezifischen IgE-Antikörper aus den Blutseren der Wiener Patientinnen und Patienten *in vitro* an Extrakte von Fenchel, Anis, Koriander und Kreuzkümmel binden konnten, was ein weiterer Hinweis auf ähnliche Strukturen mit kreuzreaktiven Eigenschaften ist.⁴⁰ Abgesehen davon gibt es Berichte von *in vitro*-Kreuzreaktionen von Schlafmohnsamen-Extrakten mit den Extrakten von Sesamsamen,^{44, 45} Kiwis,⁴⁴ Roggen,^{41, 44} Haselnüssen,^{43, 44} Erdnüssen, Sojabohnen, Walnüssen und Buchweizen.⁴³

In Buchweizen ist ein 11S-Globulin enthalten, das *in vitro*-Kreuzreaktionen mit ähnlichen Strukturen aus biologischen Arten anderer Pflanzenfamilien auslösen kann, wobei angenommen wird, dass die erste Sensibilisierung gegen das 11S-Globulin im Buchweizen erfolgt. Dieses 11S-Globulin kann anaphylaktische Reaktionen bewirken und aufgrund der Kreuzreaktionen auch zu klinisch beobachtbaren allergischen Reaktionen auf andere Lebensmittel führen.⁴³

Es wurde beispielsweise der Fall eines 7-jährigen Patienten mit einer anaphylaktischen Reaktion nach dem Verzehr von Buchweizen beschrieben, wobei schließlich *in vitro*-Kreuzreaktionen des 11S-Globulins aus dem Buchweizen mit den Extrakten aus Schlafmohn, Haselnuss, Erdnuss, Sojabohne, Walnuss und Sesam entdeckt wurden. Abgesehen davon wurden bei demselben Patienten auch zwei klinische Kreuzallergien beobachtet, und zwar eine anaphylaktische Reaktion nach dem Konsum von Haselnüssen sowie ein orales Allergiesyndrom nach dem Verzehr von Schlafmohnsamen.⁴³

Von den elf Patientinnen und Patienten der *Wiener Studie*⁴⁰ litten neun bereits an Allergien gegen Birken-, Beifuß- oder Wiesenlieschgraspollen, bevor sie die Schlafmohnallergie entwickelten, was abgesehen von den *in vitro* bestimmten immunologischen Kreuzreaktionen auch auf eine klinische Kreuzallergie zwischen Schlafmohn und Pollen hinweist.⁴⁰

Weitere klinisch beobachtete Reaktionen, welche bei den elf Patientinnen und Patienten auftraten, waren allergische Reaktionen gegen Nüsse, Sesamsamen, Zimt, Kiwis, Erdbeeren, Orangen, Zitronen, Äpfel, Soja, Sellerie, Erbsen, Senf, Eiweiß und Fisch.⁴⁰

Die im Zusammenhang mit den Samen des Schlafmohns beschriebenen *in vitro*-Kreuzreaktionen und klinischen Kreuzallergien sind zusammengefasst in **Tab. 4** aufgelistet, wobei jene Lebensmittel, bei welchen in der Literatur sowohl *in vitro*-Kreuzreaktionen als auch klinisch beobachtete Kreuzallergien beschrieben werden, fett gedruckt dargestellt sind.⁴⁰⁻⁴⁵

Tab. 4: Schlafmohnsamensamen: *in vitro*-Kreuzreaktionen und Kreuzallergien⁴⁰⁻⁴⁵

<i>in vitro</i>-Kreuzreaktionen	Kreuzallergien
Birkenpollen	Birkenpollen
Beifußpollen	Beifußpollen
Wiesenlieschgraspollen	Wiesenlieschgraspollen
Kiwi	Kiwi
Sesamsamen	Sesamsamen
Haselnuss	Haselnuss
Buchweizen	Buchweizen
Sojabohne	Soja
Fenchel	Nüsse
Anis	Zimt
Koriander	Erdbeeren
Kreuzkümmel	Orangen
Roggen	Zitronen
Erdnuss	Äpfel
Walnuss	Sellerie
	Erbsen
	Senf
	Eiweiß
	Fisch

1.2.3.2 Der Einfluss der Verarbeitung von Mohnsamensamen auf die Mohn-Allergie

Die allergieauslösende Wirkung von Gewürzen und Samen hängt allgemein von der Zubereitung ab, wobei in manchen Fällen (z.B. Paprika) die zu Bet v 1 bzw. Profilin homologen Allergene durch das Trocknen und Mahlen zerstört werden. In anderen Fällen, etwa bei den Samen des Schlafmohns, bleibt die allergieauslösende Wirkung jedoch beispielsweise nach dem Rösten⁸ oder Kochen erhalten, die enthaltenen Allergene sind also hochgradig thermostabil,⁵¹ wodurch sowohl frische als auch erhitzte Mohnsamensamen eine allergische Reaktion auslösen können.²⁰ Hinweise darauf liefern verschiedene Berichte, beispielsweise wurde bei einem 52-jährigen Patienten eine allergische Reaktion gegen Schlafmohnsamensamen beobachtet, wobei ein durchgeführter Skin-Prick-Test mit Extrakten von sowohl rohem als auch gebackenem Schlafmohn positiv verlief.⁷⁵

Abgesehen davon besitzen die Allergene in Schlafmohnsamensamen pro-anaphylaktische Eigenschaften, wirken sich also begünstigend auf anaphylaktische Reaktionen aus,²⁰ wobei Berichte darauf hindeuten, dass die Verwendung von gemahlenen im Vergleich zu nicht gemahlenen Mohnsamensamen das Risiko für das Auftreten einer anaphylaktischen Reaktion

erhöht. Es wurden in der Literatur jedoch auch anaphylaktische Reaktionen nach dem Verzehr von nicht gemahlenen Mohnsamen beschrieben.⁴¹ Die pro-anaphylaktische Wirkung von Mohnsamen könnte ein Zeichen dafür sein, dass es sich bei den auslösenden Allergenen nicht um Bet v 1- oder Profilin-Homologe handelt, sondern um Proteine aus einer anderen Proteinfamilie, möglicherweise um Vertreter der Samen-Speicherprotein-Familie.²⁰

Was das allergieauslösende Potenzial von Mohnöl betrifft, so ist dieses anscheinend nicht gegeben,⁵¹ da bisher kein einziger Fall einer allergischen Reaktion nach dem Verzehr von Mohnöl dokumentiert ist.⁴²

1.2.4 Symptome der Mohn-Allergie

Allergische Typ-I-Reaktionen gegen Schlafmohnsamen treten nur selten auf, jedoch kommt es häufig zu schwerwiegenden Reaktionen, insbesondere bei Personen mit einer Atopie⁷⁵ oder mit bereits vorhandenen Allergien gegen Pollen oder Nüsse.⁶⁶ Allgemein findet man bei etwa 80 % der Personen mit einer Mohnallergie eine atopische Vorgeschichte und zwei Drittel aller Betroffenen leiden gleichzeitig an einer oder mehreren weiteren Lebensmittelallergien.⁴¹ Dabei sind Personen mit einer Haselnuss-Allergie besonders gefährdet, eine durch Schlafmohnsamen ausgelöste allergische oder anaphylaktische Reaktionen zu erleiden.³⁷

Eine Mohn-Allergie kann durch den Verzehr sowie durch die Inhalation von Schlafmohnsamen ausgelöst werden, abgesehen davon auch durch eine körperliche Betätigung nach dem Konsum von Lebensmitteln, die Schlafmohnsamen enthalten.^{20, 37, 40, 41, 43, 45, 51, 66, 75, 77-81}

Typische Reaktionen bei einer Allergie gegen die Samen des Schlafmohns betreffen die Haut und die Schleimhäute, beispielsweise im Gastrointestinaltrakt und in den Bronchien.⁷⁵ Dabei können Symptome wie Juckreiz im Bereich des Mundes und der Lippen, Brechreiz und Atemnot⁷⁵ bis hin zu anaphylaktischen Reaktionen^{20, 37, 41, 45, 66, 75, 77, 79-81} und Sport-induzierten anaphylaktischen Reaktionen auftreten.^{21, 51} Weitere beschriebene Symptome nach der Aufnahme von Schlafmohnsamen sind allergischer Schnupfen, Husten, keuchender Atem, Asthma, eine Rötung der Haut, Urtikaria, Exanthema (entzündlicher Hautauschlag), Schmerzen im Bauchraum sowie Durchfall.⁴⁰

Abgesehen davon wurden ein durch Schlafmohnsamen verursachtes orales Allergiesyndrom nach vorheriger Sensibilisierung durch das 11S-Globulin von Buchweizen⁴³ sowie das Auftreten einer blasenförmigen Kontakt-Konjunktivitis durch das Entfernen von Kontaktlinsen nach dem Kontakt mit einem Mohnsamen-Brötchen beschrieben.⁴¹

Weiters wurden zwei Fälle beschrieben, bei welchen eine allergische Reaktion durch die Inhalation von Mohnsamen, die sich auf einem Mohnsamen-Kuchen in der Nähe der Betroffenen befunden haben, ausgelöst wurde.^{66, 80} Zu den Speisen, deren Verzehr im Zusammenhang mit einer Mohn-Allergie beschrieben wurden, zählen beispielsweise Mohnsamen-Kuchen,^{37, 41, 51, 66, 75, 80} Mohnsamen-Brötchen^{37, 41} sowie Mohnsamen-Chips.⁶⁶

Neben der Allergie gegen die Samen des Schlafmohns sind auch Allergien gegen weitere Vertreter der übergeordneten Familie der *Papaveraceae* (Mohngewächse) bekannt, beispielsweise allergische Reaktionen bei Kontakt mit *Papaver rhoeas* (Klatschmohn) sowie mit *Dicentra spectabilis* (Tränendes Herz).^{37, 82}

1.2.4.1 Die Mohn-Allergie bei Personen ohne weitere allergische Erkrankungen

Obwohl eine Mohn-Allergie in den meisten Fällen von anderen allergischen Erkrankungen begleitet wird, gibt es auch Einzelfälle von Personen, die weder an einer Atopie leiden noch allergisch gegen Nüsse oder Früchte sind, und trotzdem eine anaphylaktische Reaktion nach dem Verzehr von Mohnsamen erleiden. So traten im Fall des bereits im Kapitel 1.2.3.2 erwähnten 52-jährigen Patienten nur wenige Minuten nach dem Verzehr eines Mohnkuchens Symptome wie Oberbauchschmerzen, ein Angioödem sowie Atemnot auf.⁷⁵ Der Mann litt weder an anderen Lebensmittelallergien noch an Heuschnupfen oder weiteren Erkrankungen, und weder in der Familiengeschichte noch bei ihm selbst war eine Atopie dokumentiert worden. Ein Skin-Prick-Test bei dem Patienten zeigte jedoch ein positives Ergebnis in Bezug auf Haselnüsse, Walnüsse, Mandeln und Mohnsamen. Es wird daher vermutet, dass eine Mohn-Allergie auftreten kann, wenn gleichzeitig IgE-Antikörper gegen Nüsse nachgewiesen werden können, auch ohne Beobachtung klinischer Symptome einer Nuss-Allergie.⁷⁵

1.2.4.2 Anaphylaktische Reaktionen nach dem Verzehr von Mohnsamen

Es werden in der Literatur einige Fälle von durch Mohnsamen ausgelösten anaphylaktischen Reaktionen beschrieben, beispielsweise der eines 17-jährigen Jugendlichen, welcher eine systemische Reaktion nach dem Verzehr eines Kuchens mit Mohnsamen erlitt.⁸⁰ Dabei traten verschiedene Symptome wie akute Bauchschmerzen, Urtikaria und ein sehr niedriger Blutdruck (70/45 mm Hg) auf. Einige Wochen später aß der Jugendliche einen Topfenkuchen, welcher sich auf einem Teller in unmittelbarer Nähe eines weiteren Tellers mit einem Mohnkuchen befunden hatte.⁸⁰ Dabei wurden zwei verschiedene Messer zum Herunterschneiden der beiden Kuchen verwendet, und obwohl es auch sonst zu keinem direkten Kontakt zwischen den beiden Kuchen gekommen war, entwickelte sich beim Jugendlichen ein brennendes Gefühl im Mund, nachdem er den Topfenkuchen konsumiert hatte.⁸⁰ Die Reaktion war in diesem Fall um einiges schwächer als nach dem einige Wochen zuvor konsumierten Mohnkuchen, jedoch ist sie ein Hinweis darauf, dass eine allergische Reaktion gegen Mohnsamen nicht nur durch den Verzehr, sondern auch durch eine Inhalation ausgelöst werden kann.⁸⁰

Weiters wird ein zweiter Fall eines 16-jährigen Jugendlichen beschrieben, bei welchem die Inhalation von Mohnsamen nicht nur harmlose Symptome bewirkte, sondern unter anderem sogar zu einer Atemnot führte.⁶⁶

Ein weiterer Fall betrifft ein 17-jähriges Mädchen, welches einen einzigen Bissen eines Mohnsamen-Kuchens verzehrt hatte und zehn Minuten später eine anaphylaktische Reaktion mit Brechreiz, Hitzegefühl, Bauchschmerzen, Atemnot und letztendlich Bewusstlosigkeit erlitt, weswegen sie auf einer Intensivstation behandelt werden musste.⁴¹ Das Mädchen hatte bereits Jahre zuvor zweimal Reaktionen nach Kontakt mit Mohn erlebt, einmal Schwellungen und Juckreiz im Mundbereich nach dem Verzehr eines Mohnsamen-Brötchens und ein zweites Mal eine blasenförmige allergische Bindehautentzündung am Auge, als sie ihrer Familie Mohnsamen-Brötchen serviert und anschließend ihre Kontaktlinsen entfernt hatte. Außerdem hatte die Jugendliche bereits einige Zeit zuvor eine allergische Reaktion gegen Sesam erlitten, jedoch traten bei ihr weder Heuschnupfen noch Asthma oder atopische Dermatitis auf. Interessanterweise zeigte sich in einem Provokationstest keinerlei Reaktion auf bis zu zehn Gramm unbearbeitete Mohnsamen, es entwickelte sich jedoch eine anaphylaktische Reaktion nach dem Konsum der zehnfach geringeren Menge gemahlener Mohns, was darauf hinweist, dass die mechanische Zerstörung von Mohnsamen stark zur Entstehung anaphylaktischer Reaktionen beiträgt. Abgesehen davon wurde bei der 17-jährigen Patientin aufgrund von IgE-Serum-Tests und immunologischen Inhibitionstests die bis dahin (2006) noch nicht bekannte *in vitro*-Kreuzreaktion von Mohnsamen mit Buchweizen entdeckt.⁴¹

Weiters gibt es einen Bericht über einen 8-Jährigen, welcher im Abstand von zwei Jahren, im Alter von 6 und 8 Jahren, jeweils eine anaphylaktische Reaktion nach dem Verzehr eines Mohnsamen-Kuchens bzw. Mohnsamen-Brötchens entwickelt hatte.³⁷

1.2.4.3 Mohn-abhängige, Sport-induzierte anaphylaktische Reaktionen

Eine Sport-induzierte Anaphylaxie kann auch im Zusammenhang mit Mohnsamen auftreten. So wird vom Fall eines 46-jährigen Mannes berichtet, welcher etwa ein Jahr lang einmal pro Woche einen Kuchen mit Mohnsamen verzehrt hatte und aufgrund dessen insgesamt viermal in eine auf Allergien spezialisierte medizinische Einrichtung überwiesen wurde, da er jeweils innerhalb einer Stunde nach dem Verzehr des Mohnkuchens einen Nesselausschlag entwickelt hatte, welcher immer nur dann auftrat, wenn der Mann sich körperlich betätigte.⁵¹ Es wurden ein Skin-Prick-Test und ein IgE-Serum-Test durchgeführt und beide waren positiv in Bezug auf Mohnsamen, abgesehen davon ergab der Skin-Prick-Test auch positive Ergebnisse bei Hausstaub- und Vorratsmilben. Anschließend wurde ein Provokationstest durchgeführt und es zeigte sich selbst nach dem Verzehr von zwei Stück Mohnkuchen keinerlei allergische Reaktion. Einige Zeit später trat jedoch nach dem Verzehr eines

Mohnkuchens in Kombination mit Gartenarbeiten wieder ein Nesselausschlag auf, daher wurde dem Mann nahegelegt, den Konsum von Mohn in Zukunft zu vermeiden.⁵¹

Weiters wird der Fall eines 15-jährigen Mädchens beschrieben, welches an mehreren Vorerkrankungen (Nesselausschlag, Heuschnupfen, leichtes Asthma) litt.²¹ Das Mädchen hatte zwei Stunden nach dem Konsum eines Mohnsamen-Kuchens auf einem Laufband trainiert und daraufhin verschiedenste Symptome entwickelt, darunter einen Nesselausschlag, ein Angioödem, Atemnot, Husten und Keuchen. Ein Skin-Prick-Test ergab ein positives Ergebnis für Sesam, Mohnsamen, Hausstaub und Gräser, und ein Provokationstest führte zu dem Ergebnis, dass das Mädchen den Mohnkuchen ohne Probleme verzehren konnte, wenn sie danach keiner sportlichen Betätigung nachging. Daher wurde aufgrund der Krankengeschichte eine Lebensmittel-abhängige, Sport-induzierte Anaphylaxie diagnostiziert.²¹

1.2.5 Diagnose der Mohn-Allergie

Das wichtigste Mittel zur Diagnose einer Mohnallergie stellt wie bei allen anderen Lebensmittelallergien die Krankengeschichte des Patienten dar, welche durch einen Provokationstest bestätigt werden sollte.⁴² Ein Skin-Prick-Test und ein IgE-Serum-Test können ebenfalls durchgeführt werden, jedoch ist deren Aussagekraft in Bezug auf Allergien gegen Samen meist nicht sehr groß. Das Ausmaß der Reaktion bei einem Skin-Prick-Test beziehungsweise die Menge an spezifischen IgE-Antikörpern im Serum können jedoch dazu dienen, die individuell für den jeweiligen Patienten passende Dosis des Allergens für den Provokationstest abzuschätzen.⁴²

Allgemein besteht bei Samen oft das Problem, dass diese in einer Speise enthalten sind, was dem Patienten aber möglicherweise nicht bewusst ist. Daher sollte, nachdem eine allergische Reaktion auf die übrigen Bestandteile der Speise ausgeschlossen werden konnte, auch an eine Allergie gegen Samen gedacht werden,⁴² da diese häufig als „versteckte Allergene“ in Speisen zu finden sind. Im Zusammenhang mit der Mohn-Allergie ist die Ermittlung des auslösenden Allergens von besonders großer Bedeutung, da dies aufgrund der häufig schwerwiegenden Symptome lebensrettend sein kann.²¹

Ein weiterer Faktor, welcher in die Diagnose einfließen sollte, ist die Bestimmung möglicher Kreuzreaktionen mit anderen Lebensmitteln, wobei unter den vielen möglichen kreuzreaktiven Lebensmitteln diejenigen ermittelt werden sollten, welche bei der betroffenen Person tatsächlich zum Auftreten klinisch beobachtbarer allergischer Symptome führen.⁴³

1.2.6 Therapie der Mohn-Allergie

Allgemein gelten für Allergien gegen Samen, also auch für die Mohn-Allergie, ähnliche Therapie-Empfehlungen wie für andere Lebensmittelallergien, nämlich die konsequente Vermeidung des betreffenden Allergens sowie die Verfügbarkeit von Medikamenten für den Fall einer allergischen Reaktion.⁴² Die strikte Vermeidung gestaltet sich bei den häufig „versteckt“ in Lebensmitteln oder Speisen vorkommenden Samen jedoch äußerst schwierig. Daher ist die Verfügbarkeit eines Adrenalin-Auto-Injektors für Patienten mit einer möglichen anaphylaktischen Reaktion von ganz besonders großer Bedeutung. Eine Immuntherapie wurde bisher an Patienten mit Samen-Allergien generell noch nicht getestet.⁴² Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Therapie bei einer Mohn-Allergie besteht darin, Lebensmittel, welche eine Kreuzreaktion mit Mohn zeigen, ebenfalls zu vermeiden.⁴³ Allerdings sollte zuvor herausgefunden werden, welche der kreuzreaktiven Lebensmittel tatsächlich allergische Symptome und nicht nur eine *in vitro*-Kreuzreaktion in einem Immuno-Assay bewirken, und nur diese Lebensmittel sollten aus dem Speiseplan entfernt werden. Besonders wichtig ist dies bei der Behandlung von Kindern, da in diesem Alter ein regelmäßiger Konsum von Lebensmitteln für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer oralen Toleranz gegenüber Nahrungsbestandteilen sehr wichtig ist.⁴³

1.3 Bisherige Methoden zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln

Bisher existieren drei DNA-basierte Methoden zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln, eine im Jahr 2010 veröffentlichte Methode,⁸³ welche als Basis für diese Diplomarbeit dient, sowie zwei weitere Methoden, welche im Jahr 2016⁸⁴ sowie 2017⁸⁵ veröffentlicht wurden.

1.3.1 Grundlage dieser Diplomarbeit: Dissertation von Fatima Tazeen Husain⁸³

Diese Diplomarbeit baut auf der Dissertation von Fatima Tazeen Husain (2010)⁸³ auf, wobei die Methode zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln mittels Real-Time PCR in der vorliegenden Diplomarbeit weiter entwickelt wurde. Da diese Diplomarbeit ohne die vorherige Arbeit von Fatima Tazeen Husain nicht in dieser Form möglich gewesen wäre, werden an dieser Stelle die wichtigsten Ergebnisse der Dissertation von Fatima Tazeen Husain zusammengefasst.

Fatima Tazeen Husain beschäftigte sich mit der *Entwicklung analytischer Methoden zum Nachweis von Sesam, Lupine und Mohn*,⁸³ wobei hier nur diejenigen Methoden und Untersuchungen beschrieben werden, welche in Bezug auf Mohn entwickelt und durchgeführt wurden. Fatima Tazeen Husain entwarf mit Hilfe einer Computersoftware (Beacon Designer 7.0 von Premier Biosoft International) und mit Hilfe von Sequenzvergleichen mit BLAST (= Basic Local Alignment Search Tool) drei Primer-Paare sowie eine Sonde zum Nachweis von

Mohn-DNA mittels Real-Time PCR, welche schließlich von der Firma SIGMA Genosys synthetisiert wurden.⁸³

Die Primer-Paare wurden von Fatima Tazeen Husain in verschiedenen Konzentrationen (*Primer Forward (P_f) / Primer Reverse (P_r): 100/100, 100/200, 100/300, 200/100, 200/200, 200/300, 300/100, 300/200, 300/300 nM*) sowie bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen getestet (SYBR Green Assay und TaqMan Assay), wobei sich das Primer-Paar 1 als am günstigsten erwies.⁸³ Die Sonden-Konzentration wurde mit Hilfe eines TaqMan-Assays optimiert, wobei sechs verschiedene Sonden-Konzentrationen (25, 50, 75, 100, 150, 200 nM) getestet wurden und der niedrigste C_T-Wert bei einer Sonden-Konzentration von 150 nM erhalten wurde.⁸³

Es wurde schließlich das Primer-Paar 1 in den oben bereits angeführten neun verschiedenen Konzentrations-Kombinationen sowie mit einer Sonden-Konzentration von 150 nM in einem TaqMan-Assay bei vier verschiedenen Annealing-Temperaturen (55,9°C / 58,4°C / 60,3°C / 61,5°C) getestet, wobei sich eine Annealing-Temperatur von 61,5°C als am günstigsten erwies.⁸³ Allerdings wurde bei dieser Temperatur bei einigen niedrigeren Primer-Paar-Konzentrationen (P_f/P_r = 100/100, 100/200, 100/300, 200/100 nM) kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals gemessen, wohingegen bei einer Temperatur von 60,3°C (bei im Vergleich zur Temperatur von 61,5°C nur geringfügig erhöhten C_T-Werten) ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals für alle getesteten Primer-Paar-Konzentrationen erhalten wurde.⁸³ Aus diesem Grund wurden für diese Diplomarbeit das von Fatima Tazeen Husain entworfene *Primer-Paar 1* sowie die *Sonde* ausgewählt und bei einer Annealing-Temperatur von 60,3°C in der Real-Time PCR eingesetzt.

Fatima Tazeen Husain stellte mit der CTAB-Methode (CTAB=Cetyltrimethylammoniumbromid) DNA-Extrakte aus Blaumohn-Samen und aus gemahlenen Blaumohn-Samen her und testete die erhaltenen Extrakte in einer Real-Time PCR, wobei sich die Extrakte aus den Mohn-Samen als geeigneter für weitere Versuche herausstellten, da sie zu niedrigeren C_T-Werten führten als die Extrakte aus dem gemahlenen Mohn.⁸³

Anschließend wurde das *Primer-Paar 1* von Fatima Tazeen Husain in einem SYBR Green Assay **Kreuzreaktivitäts-Tests** mit vielen verschiedenen Lebensmitteln unterzogen, wobei bei Einsatz des Primer-Paares 1 bei den folgenden Lebensmittel-Extrakten kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet wurde: Sesam, schwarzer Sesam, Hafer, Weizen, Mais, Macadamia-Nuss, Peca-Nuss, Haselnuss, Schokolade, Soja, Sonnenblume, Mandel, Roggen, Paranuss und Kürbissamen. Ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals wurde hingegen bei den folgenden Lebensmitteln gemessen: Linse, Erdnuss, Pistazie, Cashew-Nuss, Kichererbse, Reis und Walnuss.⁸³

Die von Fatima Tazeen Husain mittels Real-Time PCR ermittelte Nachweisgrenze für Mohn-DNA betrug 0,0045 ng/µl bei einer Effizienz von 88,2 %.⁸³

Anschließend wurden von Fatima Tazeen Husain zwei **Modell-Lebensmittel** auf der Basis von Toastbrot und Grissini mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mohn (1 / 0,5 / 0,1 / 0,05 / 0,01 / 0,005 / 0,001 %) hergestellt, wobei sich beim Modell-Lebensmittel auf Toastbrot-Basis der Extrakt mit 0,005 % Mohn bei einer Effizienz von 79,9 % und beim Modell-Lebensmittel auf Grissini-Basis der Extrakt mit 0,01 % Mohn bei einer Effizienz von 96,2 % als Nachweisgrenze herausstellte.⁸³

Schließlich wurde von Fatima Tazeen Husain eine **Analyse kommerziell erhältlicher Produkte**, laut Deklaration mit oder ohne Mohn, durchgeführt, wobei das einzige Produkt mit Mohn, dessen Extrakt bei der photometrischen Messung keine ausreichende Reinheit und DNA-Konzentration zeigte, die Mohn-Schokolade war.⁸³ Diese wurde aufgrund der etwas zu niedrigen Konzentration in der PCR unverdünnt und die übrigen Extrakte in einer Konzentration von 45 ng/µl eingesetzt.

Es führten alle Extrakte von Produkten mit Mohn in der Zutatenliste mit Ausnahme von Mohnöl zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals, so die Extrakte aus dem Mohnbrötchen, dem Mohnstrudel, der Mohn-Schokolade, dem Mohn-Toast, dem Mohn-Bagel und dem Mohn-Brot. Bei den Produkten, auf deren Zutatenliste Mohn nicht angegeben war, führten der Extrakt eines Weckerls und eines Gouda-Weckerl, eines Frucht-Müslis, eines Sesam-Crackers und eines Sesam-Toasts zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals innerhalb der ersten 40 PCR-Zyklen, die übrigen Produkte ohne Mohn zeigten keine Amplifikation.⁸³

1.3.2 Weitere Methoden zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln

Abgesehen von der im Kapitel 1.3.1 beschriebenen Methode existieren noch zwei weitere DNA-basierte Methoden zum Nachweis von Mohn in Lebensmitteln. Bei der ersten Methode handelt es sich um eine *Duplex Real-Time PCR (TaqMan-Assay)* zur gleichzeitigen Detektion von Spuren von Sonnenblumensamen sowie von Samen des Klatschmohns (*Papaver rhoeas*) in kommerziell erhältlichen Produkten, wobei zum Nachweis beider Lebensmittel die ITS1-Region und jeweils eine TaqMan-Sonde zur Erzeugung eines Fluoreszenz-Signals herangezogen wurde.⁸⁴

Es wurden zahlreiche Kreuzreaktivitäts-Tests mit häufig in zusammengesetzten Produkten enthaltenen Lebensmitteln durchgeführt, wobei 50 pflanzliche und vier tierische Lebensmittel auf ihre Kreuzreaktion untersucht wurden, darunter verschiedene Nüsse, Früchte, Gemüse- und Getreidesorten sowie Rinder-, Schweine-, Schaf- und Ziegen-Fleisch. Das Ergebnis der Real-Time PCR zeigte, dass bei keinem der 54 untersuchten Lebensmittel eine Kreuzreaktion mit der entwickelten Methode zu beobachten war.⁸⁴

Schließlich wurden Modell-Lebensmittel mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sonnenblumensamen (roh/erhitzt) in einer Mohnsamen-Matrix sowie unterschiedlichen Konzentrationen an Mohnsamen (roh/erhitzt) in einer Sonnenblumensamen-Matrix

hergestellt.⁸⁴ Die Konzentrationen lagen dabei jeweils zwischen 0,1 und 100 000 mg pro kg Lebensmittel und die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) betrug 0,1 mg/kg.⁸⁴

Weiters wurden 238 kommerziell erhältliche Lebensmittel mit auf der Zutatenliste deklarierten beziehungsweise nicht deklarierten Sonnenblumen- und Mohn-Samen untersucht, wobei sich herausstellte, dass die Duplex Real-Time PCR-Methode hochsensitiv und sehr spezifisch war und sich daher sehr gut zum Nachweis von Spuren von Sonnenblumen- und Mohn-Samen eignete.⁸⁴

Abgesehen davon konnte mit Hilfe der Methode überprüft werden, wie effektiv Sonnenblumen- und Mohn-Samen im Herstellungsprozess von kommerziell erhältlichen Produkten durch Reinigung der entsprechenden Anlagen und Geräte entfernt werden.⁸⁴

Ein Vorteil der entwickelten Methode bestand darin, dass die Sonnenblumen- und Mohn-Samen gleichzeitig nachgewiesen werden konnten, was die Untersuchung beschleunigte, da beide Samen-Arten in einigen Produkten nebeneinander vorkamen und daher gemeinsam in einer Real-Time PCR untersucht werden konnten.⁸⁴

Eine weitere Methode zum Nachweis von Mohn ist eine *Multiplex PCR-Methode*, die sogenannte Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, welche zum gleichzeitigen Nachweis von Sonnenblumen, Klatschmohn (*Papaver rhoeas*), Leinsamen, Sesam und Soja in kommerziell erhältlichen Produkten dienen sollte.⁸⁵ Dabei wurde eine Kapillar-Elektrophorese zum Nachweis der amplifizierten Produkte verwendet. Es wurden zahlreiche Kreuzreaktivitäts-Tests mit häufig in kommerziell erhältlichen Produkten enthaltenen Lebensmitteln durchgeführt, wobei 46 pflanzliche und vier tierische Lebensmittel auf eine Kreuzreaktion untersucht wurden, darunter zahlreiche Nüsse, Früchte, Gemüse- und Getreidesorten sowie Rinder-, Schweine-, Schaf- und Ziegen-Fleisch.⁸⁵

Es zeigte sich, dass die entwickelte Methode keine Kreuzreaktivität mit den 50 untersuchten Lebensmitteln aufwies, wodurch die Spezifität der Methode demonstriert wurde. Weiters wurde die Nachweisgrenze der Methode untersucht, wobei eine Konzentration von 10 mg pro kg (0,001 %) in einem Modell-Lebensmittel (Keks) als Nachweisgrenze ermittelt wurde.⁸⁵

Abgesehen davon wurden 56 verschiedene kommerziell erhältliche Produkte mit Hilfe der entwickelten Multiplex-Methode untersucht, wobei in einigen Produkten das Vorkommen von nicht deklarierten allergieauslösenden Inhaltsstoffen (Sonnenblumen, Mohn, Leinsamen, Sesam oder Soja) nachgewiesen werden konnte, häufig sogar das Auftreten mehrerer der genannten Allergene in einem einzigen Produkt. Die Methode konnte daher für den Nachweis von Spuren der genannten Allergene in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln herangezogen werden.⁸⁵

2 ZIELSETZUNG

Lebensmittelallergien haben in den letzten Jahrzehnten zugenommen und bedeuten für Betroffene eine große Einschränkung in der Lebensqualität, da das auslösende Allergen besonders im Fall einer drohenden anaphylaktischen Reaktion strikt vermieden werden sollte. Diesbezüglich stellen Samen, beispielsweise von Mohn, ein besonderes Problem dar, da diese häufig als „versteckte Allergene“ in Speisen vorkommen und daher nicht immer auf den ersten Blick als Zutaten erkannt werden können.

Die Mohn-Allergie ist eine seltene Allergie, jedoch zeigen sich nach dem Verzehr von Mohnsamen häufig schwerwiegende bis hin zu anaphylaktischen Reaktionen. In der Europäischen Union gibt es eine Kennzeichnungspflicht für 14 Lebensmittelallergene und daraus in weiterer Verarbeitung gewonnene Produkte, wobei Mohn nicht unter diese Kennzeichnungspflicht fällt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Diplomarbeit war die **Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zum Nachweis von Mohn-DNA in Lebensmitteln**. Aufbauend auf der Dissertation von Fatima Tazeen Husain (2010)⁸³ sollten in dieser Diplomarbeit folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

Es sollten *Extrakte aus drei verschiedenen Mohnsorten* (Blaumohn, Graumohn, Weißmohn) hergestellt und mittels Real-Time PCR getestet, die *Primer- und Sonden-Konzentrationen* für die Real-Time PCR optimiert sowie *Kreuzreaktivitäts-Tests* mit 22 verschiedenen pflanzlichen Spezies, welche abgesehen von Mohn als Lebensmittelbestandteile in Produkten vorkommen können, durchgeführt werden.

Weiters sollten mit Hilfe von 3-fach-Bestimmungen und 10-fach-Bestimmungen verschiedener Konzentrationen von Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakten die *Effizienz* und die *Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)* der Methode ermittelt und diese anhand eines selbst hergestellten *Modell-Lebensmittels* (Muffins auf Schokoladekuchen-Basis) überprüft werden. Die Methode sollte schließlich an *kommerziell erhältlichen Produkten* mit und ohne Mohn auf der Zutatenliste getestet werden, um die Eignung als Routine-Methode zu untersuchen.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In dieser Diplomarbeit wurden zur DNA-Isolierung aus Lebensmitteln mit oder ohne Mohn die CTAB-Extraktionsmethode sowie der QIAamp DNA Mini Kit der Firma QIAGEN verwendet, zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der isolierten DNA wurden photometrische Messungen mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers von ThermoFisher Scientific durchgeführt, und zum Nachweis der DNA mit Hilfe der Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) wurde der iCycler der Firma BIORAD eingesetzt, wobei mit dem TaqMan-Assay gearbeitet wurde.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Vorteile und Nachteile molekularbiologischer Methoden

Molekularbiologische Methoden, deren Anfänge in die 1970er-Jahre zurückreichen, werden sehr häufig und in verschiedensten Fachgebieten eingesetzt, so etwa in der Medizin, in der Forensik, in biotechnologischen Verfahren und in der Lebensmittelanalytik. Molekularbiologische Methoden besitzen einige **Vorteile** gegenüber klassischen analytischen Verfahren, beispielsweise niedrigere Nachweisgrenzen sowie eine höhere Spezifität.⁸⁶

In der Lebensmittelanalytik wird sehr häufig mit DNA gearbeitet, da diese aus verschiedenen Gründen für bestimmte Fragestellungen besonders gut geeignet ist: DNA liegt in Zellen in einer bestimmten Anzahl an Kopien vor und ist widerstandsfähig gegenüber chemischen und physikalischen Prozessen, was auch eine Untersuchung verarbeiteter Produkte, etwa nach einer Hitzebehandlung, ermöglicht.⁸⁶

Vorteile von DNA-basierten Methoden wie der PCR gegenüber dem Nachweis von Proteinen mit einem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) sind, dass die in der PCR verwendeten Primer und Sonden weniger empfindlich auf Matrix-Effekte reagieren als die häufig in ELISAs eingesetzten monoklonalen Antikörper, und dass sehr geringe Mengen an DNA in einem zusammengesetzten Lebensmittel für den Nachweis eines Allergens ausreichen.³⁹

Abgesehen davon kann eine PCR dazu verwendet werden, Kreuzreaktionen verschiedener Lebensmittel aufgrund einer ähnlichen genetischen Zusammensetzung zu entdecken oder diese auszuschließen.³⁹ Ein weiterer Vorteil der PCR ist die Möglichkeit, die DNA mehrerer Lebensmittelallergene gleichzeitig nachzuweisen, während mit einem ELISA jeweils nur ein Analyt detektiert werden kann.³⁹

Die Verwendung von DNA in der Lebensmittel-Analytik besitzt jedoch auch einige **Nachteile**: Eine Grund-Voraussetzung für DNA-basierte Methoden ist, dass überhaupt DNA in der jeweiligen Probe vorhanden ist, eine starke Verarbeitung von Lebensmitteln kann jedoch zu

einer Abtrennung der DNA führen und molekularbiologische Untersuchungen unmöglich machen. Weiters kann die DNA, obwohl es sich um ein stabiles Molekül handelt, durch Scherkräfte während der Verarbeitung des Lebensmittels, durch aus Zellkompartimenten freigesetzte Enzyme sowie durch niedrige pH-Werte und eine anschließende Erhitzung in Bruchstücke gespalten werden.⁸⁶

Abgesehen davon können einzelne der zahlreich in einer Lebensmittelmatrix auftretenden Substanzen zu einer Hemmung der PCR führen, so zum Beispiel Polysaccharide, Polyphenole, Lipide⁸⁶ und Huminsäuren.³⁹ Diese bleiben teilweise als Verunreinigungen nach der Durchführung klassischer Extraktionsmethoden erhalten, verringern die Aktivität der in der PCR eingesetzten DNA-Polymerase oder inhibieren diese vollständig.⁸⁷ Abgesehen davon kann auch eine Kontamination der DNA-Probe mit der bei der CTAB-Methode verwendeten Chemikalie CTAB zu einer Beeinträchtigung beitragen.⁸⁷

Ein weiterer Punkt, welcher sich möglicherweise als Nachteil herausstellen kann, ist die Notwendigkeit, dass die DNA-Sequenz, die untersucht werden soll, bekannt sein muss, da nur unter dieser Voraussetzung spezifische Primer und DNA-Sonden entworfen werden können.⁸⁶

3.1.2 Isolierung von DNA aus Lebensmitteln

Das Ziel aller DNA-Extraktionsmethoden ist die Isolierung von DNA in einer Qualität, welche den Anforderungen einer darauffolgenden molekularbiologischen Analyse genügt, wobei die wichtigsten Voraussetzungen dafür die Freisetzung der DNA aus dem betreffenden Lebensmittel sowie die Entfernung unerwünschter Substanzen darstellen.⁸⁶

Die Wahl der verwendeten DNA-Isolierungs-Methode ergibt sich aus der Beschaffenheit der verwendeten Probe⁸⁶ sowie aus Überlegungen, welche die Zeit und die Kosten der Methode betreffen, und hat einen großen Einfluss auf die Qualität und Menge der gewonnenen DNA.⁸⁸ Das verwendete Material in der Lebensmittelanalytik stammt für gewöhnlich von Mikroorganismen, Pflanzen oder Tieren.⁸⁶

Um DNA aus einer Probe zu isolieren, ist zunächst ein Aufbrechen der Zellen notwendig, wobei sich bei Verwendung pflanzlicher Proben die Schwierigkeit ergibt, dass die pflanzliche Zellwand sich diesem Vorgang relativ stark widersetzt.⁸⁹ Allgemein werden bei jeder Art von Probenmaterial mechanische, chemische und/oder thermische Methoden angewandt, um den erwünschten Zellaufschluss zu erreichen. Ein geeignetes Mittel zur *mechanischen Bearbeitung* eines Lebensmittels ist beispielsweise die Verwendung einer Kugelmühle, ein *chemischer Zellaufschluss* kann mit Hilfe von Pufferlösungen, welche CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) oder andere Detergenzien enthalten, erfolgen, und als geeignete *thermische Methoden* haben sich das Erhitzen⁸⁶ oder das Einfrieren des verwendeten Materials erwiesen.⁸⁹

Die Reinigungsschritte können beispielsweise eine Fällung der DNA oder eine Anionen-Austausch-Chromatographie beinhalten,⁸⁶ wobei neben den bereits genannten PCR-Hemmstoffen auch die in Pflanzen vorkommenden Phenole, Ester und weitere Sekundär-Metabolite die Qualität der isolierten DNA beeinträchtigen können.⁹⁰

Beispiele für DNA-Extraktions-Methoden sind die CTAB-Methode und Verfahren, in welchen eine Bindung der DNA an Silica-Oberflächen erfolgt (z.B. Silica-Gel, Silica-Membranen oder magnetische Silica-Partikel),⁸⁶ wobei kommerziell erhältliche DNA-Extraktions-Kits zur Verfügung stehen.^{91, 92}

3.1.2.1 Die CTAB-Extraktionsmethode

Die CTAB-Methode zur Isolierung von DNA aus Zellkernen, Chloroplasten und Mitochondrien von Pflanzen wurde im Jahr 1980 von *Murray*⁹³ entwickelt und stellte einen Durchbruch in der Pflanzen-Genetik dar,⁸⁹ da die erhaltene DNA im Vergleich zu vorherigen Methoden sehr gut aufgereinigt war und auch deutlich größere Mengen an DNA erhalten wurden.⁹⁴

Mittlerweile dient die CTAB-Methode als Grundlage für verschiedenste weiterführende Methoden, unter anderem für das Klonieren von Pflanzen-DNA, für die Polymerase-Kettenreaktion sowie für die Identifizierung transgener Pflanzen oder pathogener DNA in Pflanzen, und sie wurde schließlich auch für die Anforderungen einer DNA-Extraktion aus Bakterien, Pilzen und Tieren⁸⁹ sowie für die Gewinnung von Pflanzen-DNA im Rahmen von Freiland-Arbeiten⁹⁵ und geringer Mengen an DNA für die Verarbeitung zahlreicher DNA-Proben in kurzer Zeit (Quick MiniPrep DNA-Isolation) adaptiert.⁹⁶

Allgemein ist bei der Anwendung der CTAB-Methode wichtig, dass die Chemikalie CTAB am Ende der DNA-Extraktion wieder aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird. Dies kann mit Hilfe wiederholter Ethanol-Fällungen erreicht werden, wobei zuvor einige Zentrifugier-Schritte sowie Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln erforderlich sind.⁸⁹

CTAB ($((C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br)$) ist ein kationisches Detergens mit oberflächenaktiven Eigenschaften, wobei es sich um den wesentlichen Bestandteil des Lyse-Puffers zum chemischen Zellaufschluss handelt.⁸⁶ Es verbindet sich in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen in einer Komplex-Bildungs-Reaktion mit Kohlenhydraten (z.B. Polysacchariden) und Proteinen,^{86, 97} welche an die DNA gebunden sind,⁹⁸ und entfernt diese aus der Lösung,⁹⁷ wodurch die DNA leichter aus den Zellen freigesetzt werden kann. Bei diesem Schritt ist die Verwendung einer hohen Salzkonzentration wesentlich, da die DNA nur unter dieser Voraussetzung in Lösung bleibt.⁸⁶ Im ursprünglichen CTAB-Protokoll wird hierfür eine 0,7-molare NaCl-Lösung empfohlen,⁹³ in später abgewandelten Protokollen werden für diesen Schritt auch höhere Salzkonzentrationen angegeben.^{39, 88, 89, 95}

Auf molekularer Ebene bewirken die in der NaCl-Lösung enthaltenen Na^+ -Ionen eine Abschirmung der negativ geladenen Phosphatgruppen im Rückgrat der DNA, wodurch die

DNA nicht mit CTAB reagieren kann und somit nicht ausfällt, sondern in Lösung bleibt.⁸⁶ Anschließend können die ausgefällten Komplexe, welche aus CTAB, denaturierten Proteinen und weiteren Inhaltsstoffen der Zellen bestehen, durch Zentrifugation von der gelösten DNA abgetrennt werden.⁸⁶

Weitere Reinigungsschritte erfolgen durch organische Lösungsmittel wie Phenol oder Chloroform, in welchen sich unter anderem DNA-abbauende Enzyme lösen, welche schließlich gemeinsam mit der organischen Phase aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden können.⁸⁶ Der nächste Schritt besteht im klassischen CTAB-Extraktionsprotokoll in der Zugabe eines Präzipitationspuffers, der wiederum CTAB enthält, jedoch in Anwesenheit einer niedrigen Salzkonzentration, wodurch diesmal die DNA einen Komplex mit CTAB bildet und dadurch ausgefällt wird.⁸⁶ Die Konzentration der Natriumchlorid-Lösung sollte dabei laut Original-CTAB-Protokoll maximal 0,4 M sein.⁹³

In einem weiteren Zentrifugier-Schritt wird nun die wässrige Phase von der ausgefällten DNA abgetrennt, die DNA daraufhin durch eine hohe Salzkonzentration wieder in Lösung gebracht und schließlich noch einmal mit Chloroform gewaschen.⁸⁶ Abschließend wird die DNA durch Zugabe eines Alkohols (z.B. Isopropanol), welcher die Hydrathülle der DNA verändert, ausgefällt.⁸⁶

Neben der Konzentrierung der DNA hat die Alkohol-Fällung den Vorteil, dass die DNA auch gereinigt wird, da andere Substanzen durch Alkohol weniger gut ausgefällt werden. Ein Vorteil der Verwendung des Alkohols Isopropanol ist, dass geringere Mengen (nur 0,6-0,8 Volums-Prozente im Verhältnis zur DNA-Lösung) notwendig sind als bei einer Fällung mit Ethanol, was in Bezug auf die Zentrifugation günstiger ist, da in den Zentrifugen-Röhrchen nur ein bestimmtes Maximalvolumen an Flüssigkeit Platz findet. Ein Nachteil ist, dass sich Isopropanol schlecht aus der Mischung entfernen lässt und am Ende noch ein Wasch-Schritt mit Ethanol (70 %) notwendig ist.⁹⁴

Abschließend muss der Überstand abgetrennt werden und die ausgefällte DNA kann nun in deionisiertem Wasser oder in einem geeigneten Puffer aufgenommen werden.⁸⁶

3.1.2.2 QIAamp DNA Mini Kit

Der QIAamp DNA Mini Kit der Firma QIAGEN dient der Aufreinigung genomischer, mitochondrialer und viraler DNA aus unterschiedlichen Geweben,⁹² wobei sich die Methode zur Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen, aber auch aus Lösungen eignet.⁹⁴

Die im QIAamp DNA Mini Kit verwendeten Pufferlösungen⁹² enthalten chaotrope Salze,⁹⁹ worunter man Salze versteht, welche die Struktur von Wasser sowie von Hydrathüllen verändern können und daher einen Einfluss auf Substanzen besitzen, welche in Wasser gelöst vorliegen.¹⁰⁰

Die Durchführung der DNA-Aufreinigung beginnt mit einem Lyse-Schritt, bei welchem die DNA in Anwesenheit der chaotropen Salze⁹⁴ und bei einem bestimmten pH-Wert spezifisch an die Silica-Membran bindet.⁹⁹ Proteine und andere Substanzen, welche eine nachfolgende PCR hemmen würden, bleiben hingegen nicht an der Membran haften.⁹⁹

Anschließend wird die DNA mit den Waschpuffern behandelt, was dazu dient, alle restlichen Verunreinigungen zu entfernen.⁹⁹ Im letzten Schritt wird die DNA nun durch eine weitere Pufferlösung von der Silica-Membran gelöst.^{94, 99}

3.1.2.3 Vergleich der CTAB-Methode mit Silica-Methoden

Ein Vergleich der CTAB-Methode mit Silica-basierten Methoden zeigt, dass die Reinheit der erhaltenen DNA in beiden Fällen etwa gleich hoch ist. Die CTAB-Methode ist zwar zeitintensiver, erweist sich jedoch von den Kosten her als günstiger.⁸⁶ Um sowohl die Vorteile der CTAB-Methode als auch die der Silica-Oberflächen zu nutzen, können die beiden Methoden auch kombiniert werden.⁹¹

3.1.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA

Die klassische photometrische Messung wird mit Hilfe eines Photometers mit einer UV-Lampe durchgeführt, wobei sich die Probelösung während der Messung in einer Quarz-Küvette befindet. Als Alternative dazu gibt es mittlerweile auch neuere Geräte, beispielsweise das NanoDrop-Spektrophotometer von ThermoFischer Scientific.^{94, 101}

Jede photometrische Messung beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz,⁸⁶ welches den Zusammenhang zwischen der Extinktion E , der Konzentration c der absorbierenden Substanz sowie der Schichtdicke d beschreibt: $E = \epsilon \times c \times d$.¹⁰²

Die Extinktion E ist eine dimensionslose Größe, die Einheit der Konzentration c ist mol/L, die Schichtdicke d wird in cm und der molare Extinktionskoeffizient ϵ in $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ angegeben.¹⁰¹ Beim molaren Extinktionskoeffizienten ϵ handelt es sich um einen für die jeweilige Substanz charakteristischen Proportionalitätsfaktor, der etwas darüber aussagt, wie viel Licht bei einer bestimmten Wellenlänge absorbiert wird.¹⁰¹ Der Extinktionskoeffizient hängt von verschiedenen Faktoren ab, so kann beispielsweise eine hohe Konzentration der untersuchten Makromoleküle zu Veränderungen von ϵ beitragen und so die Messung beeinträchtigen.¹⁰²

Nukleinsäuren (Nukleotide, RNA, einzelsträngige und doppelsträngige DNA) zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm,¹⁰³ weshalb sich die **Konzentration der DNA** in einer Probe durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) bestimmen lässt.⁹⁴ Ein Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.¹⁰² Die **Reinheit der DNA** und somit das Fehlen von Protein-Verunreinigungen ergibt sich durch

die Ermittlung des Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}), wobei ein Wert von 1,8-2,0 auf eine proteinfreie DNA-Lösung hinweist,⁹⁴ 1,8 bei einer reinen DNA-Lösung und 2,0 bei einer reinen RNA-Lösung.¹⁰⁴

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei 280 nm,¹⁰² und zu niedrige A_{260}/A_{280} -Werte können abgesehen von einer Verunreinigung mit Proteinen auch durch eine Kontamination mit Phenol oder anderen Reagenzien der DNA-Extraktion verursacht werden sowie auf eine sehr niedrige Nukleinsäure-Konzentration hinweisen.¹⁰⁴

Ein weiterer Wert, der etwas über mögliche Verunreinigungen aussagt, ist das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 230 nm (A_{260}/A_{230}), ein Wert, welcher für reine Nukleinsäure-Lösungen bei 2,0-2,2 liegt. Niedrigere Werte können durch Verunreinigungen mit Reagenzien der DNA-Extraktion entstehen, beispielsweise Phenol, Glykogen,¹⁰⁴ Guanidin-HCl und EDTA.¹⁰³

Bei klassischen UV-Photometern wird für ein aussagekräftiges Ergebnis eine DNA-Konzentration von 5-50 µg/ml benötigt, wohingegen mit dem NanoDrop-Spektrophotometer von ThermoFisher Scientific geringere DNA-Mengen (2 ng/µl bis 3,7 µg/µl) bestimmt werden können, und auch ein deutlich geringeres Volumen der Messlösung (1 µl) notwendig ist.⁹⁴

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden alle photometrischen Messungen mit dem NanoDrop-Spektrophotometer durchgeführt.

3.1.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde von *Dr. Karry Banks Mullis* entwickelt,¹⁰⁵ welcher 1983 auf der Suche nach einer Methode war, mit deren Hilfe man eine bestimmte DNA-Sequenz finden, milliardenfach kopieren und dadurch identifizieren konnte.¹⁰⁶

Das Grundprinzip der PCR besteht aus einem sich wiederholenden Ablauf von drei aufeinander folgenden Schritten, wobei Mullis zu diesem Zweck eine DNA-Polymerase einsetzte, welche anfangs bei jedem neuen Zyklus frisch zum Reaktionsgemisch hinzugefügt werden musste, da sie die Temperatur-Erhöhung im ersten Schritt nicht überstand.¹⁰⁶ Nach einiger Zeit fand sich jedoch die für die Weiterentwicklung der PCR entscheidende Möglichkeit, die thermostabile *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* zu verwenden, was die PCR deutlich beschleunigte und einfacher gestaltete.¹⁰⁶

Mullis veröffentlichte seine Methode 1986 und erhielt schließlich 1993 den Nobelpreis für Chemie¹⁰⁶ für die Entwicklung dieser bahnbrechenden Methode, welche zu einer zentralen Technik der Molekularbiologie und Biochemie wurde und als eine der weitreichendsten Erfindungen der modernen Wissenschaft gilt.¹⁰⁷

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation sehr geringer Mengen an DNA und kann in molekularbiologischen, zellbiologischen, medizinischen, immunologischen und forensischen Untersuchungen eingesetzt werden.¹⁰⁸ Anwendungen der PCR sind beispielsweise der Nachweis von DNA-Sequenzen in der Lebensmittelanalytik, um bestimmte Lebensmittelbestandteile, aber auch Mikroorganismen in Lebensmitteln zu identifizieren, darunter Bakterien wie *Escherichia coli* oder andere pathogene Organismen wie Listerien oder Salmonellen.⁸⁶ Weiters wird die PCR für die Erstellung genetischer Fingerabdrücke, für die Diagnose genetischer Erkrankungen und für zahlreiche weitere Anwendungen benötigt.^{107, 109} Man kann mit Hilfe der PCR sehr sensitiv und spezifisch bestimmte DNA-Abschnitte nachweisen,¹¹⁰ wobei der Begriff *Sensitivität* eine Bezeichnung dafür ist, dass sehr geringe DNA- oder RNA-Mengen für einen Nachweis ausreichend sind,¹⁰⁸ und die hohe *Spezifität* der PCR darin besteht, dass nur ein positives Ergebnis erhalten wird, wenn sich die gesuchte DNA tatsächlich in der Probe befindet, während alle weiteren vorhandenen DNA-Moleküle zu keinem positiven Ergebnis führen.¹¹¹

Die PCR ist außerdem durch eine hohe *Robustheit* gekennzeichnet, worunter man versteht, dass unabhängig von der experimentierenden Person und vom verwendeten Gerät gleiche Resultate erzielt werden.¹¹¹ Für die Durchführung der PCR wurden spezielle Geräte, die Thermocycler, entwickelt, welche ein Heizelement enthalten und die für eine PCR charakteristischen zyklischen Temperatur-Änderungen vollautomatisch herbeiführen.¹¹¹ Dabei werden Kühl- bzw. Heiz-Geschwindigkeiten von bis zu 5°C pro Sekunde erreicht,⁸⁶ wobei die Reaktionsmischung in exakt vorgegebenen zeitlichen Abständen erhitzt und wieder abgekühlt wird.¹¹¹

Der **Ablauf einer PCR** umfasst drei Schritte: Zunächst erfolgt die *Denaturierung* der doppelsträngigen DNA,¹⁰⁸ wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen der DNA gelöst werden. Dadurch entstehen zwei Einzelstränge, an welche im zweiten Schritt, dem *Annealing*, sogenannte Primer binden, welche der *Taq*-Polymerase schließlich im dritten Schritt als Ansatzstelle für die *Elongation* mit Hilfe von Nukleotiden dienen.¹¹¹ Für die Durchführung der PCR werden mehrere Komponenten benötigt: eine *doppelsträngige DNA* (Matrize, Templat), *Primer* (Oligonukleotide), *Desoxyribo-Nukleosid-Triphosphate* (dNTPs), das Enzym *DNA-Polymerase* sowie eine *Pufferlösung*, welche auf jeden Fall *Magnesium-Ionen* (Mg^{2+}) enthalten muss.¹⁰⁸

3.1.4.1 Struktur und Eigenschaften von DNA

Die genetische Information liegt in Form von Chromosomen, einer Kombination aus der Doppelhelix DNA (Desoxyribonucleic Acid) und Proteinen, im Zellkern vor.¹¹² In der DNA kommen vier verschiedene Basen vor, die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) sowie die Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C), welche sich im Inneren der Doppelhelix befinden,

sowie die außen liegenden Moleküle des Monosaccharids Desoxyribose, welche sich mit Phosphatgruppen abwechseln. Ein *Nukleotid* besteht aus einer der vier Basen, einer Desoxyribose sowie einer Phosphatgruppe,¹¹³ ein *Nukleosid* aus einer Base und einer Desoxyribose. An ein Nukleosid können bis zu drei Phosphatgruppen gebunden sein, ein Nukleotid ist daher ein Nukleosid-Monophosphat, und die in der PCR verwendeten *Desoxyribo-Nukleosid-Triphosphate* bestehen demnach aus einem Nukleosid und drei Phosphatgruppen.¹¹²

Der Informationsgehalt der DNA beruht auf der Basen-Sequenz, welche üblicherweise in 5'-3'-Richtung angegeben wird.^{113, 114} Die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den komplementären Basen A und T sowie G und C sind keine starken chemischen Wechselwirkungen, jedoch ist die DNA unter den Bedingungen, welche in Zellen vorherrschen, trotzdem ein stabiles Molekül.¹¹³ Bestimmte Faktoren können jedoch zu einer Denaturierung der beiden komplementären Stränge führen, beispielsweise eine Temperatur-Erhöhung oder Chemikalien wie die Natronlauge.¹¹³

3.1.4.2 Die Beschaffenheit der DNA-Probe

Die DNA, welche mit Hilfe der PCR vervielfältigt werden soll, kann aus verschiedenen Ausgangsmaterialien gewonnen werden, etwa aus Plasmiden, Phagen oder Bakterien⁶⁹ sowie aus pflanzlichen und tierischen Zellen.⁸⁶

Grundlegende Voraussetzung für die PCR ist die Kenntnis der Basen-Abfolge der DNA-Matrize, welche vervielfältigt werden soll,¹¹¹ außerdem gibt es weitere Faktoren, die einen Einfluss darauf haben, ob eine PCR erfolgreich ist, dazu zählen die Intaktheit sowie die Reinheit der DNA-Probe. In der DNA-Lösung sollten keine Substanzen aus der DNA-Extraktion mehr enthalten sein, die zu einer PCR-Hemmung führen können,¹⁰⁸ dazu zählen EDTA, Phenol, Ethanol,⁸⁶ Heparin oder SDS (Natriumdodecylsulfat),¹⁰⁸ da dies „falsch negative“ Ergebnisse zur Folge haben kann.¹¹⁰

Abgesehen davon ist eine bestimmte DNA-Menge für eine erfolgreiche PCR notwendig, wobei in der Theorie sogar ein einziges DNA-Molekül ausreichend sein kann. Die empfohlene DNA-Menge für die Vervielfältigung genomischer DNA liegt üblicherweise bei mindestens 1 ng und maximal 100 ng, welche DNA-Menge für die jeweilige PCR optimal ist, hängt jedoch auch von den weiteren Bestandteilen des Reaktionsgemisches ab.¹⁰⁸ Eine zu hohe DNA-Ausgangsmenge sollte aber auf jeden Fall vermieden werden, da dies zu Fehl-Hybridisierungen führen kann, welche das Ergebnis der PCR negativ beeinflussen können.⁹⁴

3.1.4.3 Eigenschaften der Primer

Die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit einer PCR-Methode beruhen zum überwiegenden Teil auf den eingesetzten Primern.¹⁰² Daher sollten verschiedene Überlegungen in die Auswahl geeigneter Primer einfließen, um zu gewährleisten, dass mit Hilfe der PCR beispielsweise nur die DNA *einer* bestimmten biologischen Spezies nachgewiesen wird, und dass im Reaktionsansatz vorhandene DNA anderer biologischer Arten nicht gleichzeitig vervielfältigt wird.⁸⁶

Generell sind Primer für die PCR notwendig, da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, DNA-Einzelstränge komplementär zu ergänzen, sondern zumindest an einer Stelle ein kurzes doppelsträngiges DNA-Stück mit einem freien 3'-OH-Ende benötigt, um mit der Neusynthese der DNA zu beginnen. Da Primer eine komplementäre Basenpaarung mit den 3'-Randabschnitten von DNA-Einzelsträngen eingehen können, sind sie dazu geeignet, als Starthilfe für die DNA-Polymerase zu fungieren.^{86, 110}

Bei Primern handelt es sich um Oligonukleotide aus 18 bis 30 Nukleotiden, wobei der Gehalt an Guanin und Cytosin insgesamt 40 bis 60 % betragen sollte.¹⁰² Falls die zu vervielfältigende DNA sehr lang ist, sollten Primer mit einer Länge von 25 bis 35 Nukleotiden eingesetzt werden.⁹⁴ Allgemein sollten in Primern nie mehr als vier gleiche Basen hintereinander liegen, da in diesem Fall das Risiko für Leserasterverschiebungen und falsche Hybridisierungen steigt. Ein weiterer wichtiger Faktor für ein gutes PCR-Ergebnis ist die gewählte Konzentration der eingesetzten Primer,⁹⁴ da zu hohe Konzentrationen zu Fehlhybridisierungen und zur Ausbildung von Primer-Dimeren führen können.⁸⁶

Abgesehen davon ist es auch wichtig, dass Primer keine stabilen Sekundärstrukturen innerhalb des Moleküls (z.B. Haarnadel-Strukturen) ausbilden.^{94, 102} Die Eignung entworfener Primer für die PCR kann mit Hilfe spezieller Computerprogramme getestet werden,^{94, 108} und die gewünschten Primer können schließlich von speziellen Firmen hergestellt werden.¹¹¹

Eine weitere wichtige Voraussetzung für das Gelingen der PCR ist die Auswahl der richtigen *Annealing-Temperatur*, der Temperatur für die Anlagerung der Primer.¹⁰² Diese hängt von der Salzkonzentration der Reaktionsmischung ab¹¹⁰ und liegt in den meisten Fällen etwa 5-10°C unter der *Schmelztemperatur* T_m ,⁹⁴ darunter versteht man jene Temperatur, bei welcher die Hälfte der DNA-Templates in ihre Einzelstränge getrennt sind¹⁰² oder anders ausgedrückt, bei der 50 % der Primer an die Einzelstränge der DNA-Templates gebunden sind.¹⁰⁸

Eine zu niedrige Annealing-Temperatur kann zu Fehlhybridisierungen¹⁰⁸ und somit zur Entstehung unspezifischer Produkte führen,⁸⁶ bei zu hohen Temperaturen kommt es zu keiner Anlagerung der Primer mehr und es wird daher kein Produkt erhalten.¹⁰⁸ Zur Ermittlung der passenden Annealing-Temperatur eignet sich beispielsweise eine Gradienten-PCR, bei welcher im PCR-Gerät ein Temperatur-Gradient erzeugt wird.⁹⁴

Die Schmelztemperatur lässt sich bei einer Länge des Primers von bis zu 25 Basen aufgrund der Basenzusammensetzung ermitteln, wobei folgende vereinfachte Berechnung als Hilfe dient: $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$. Wie man anhand der Formel erkennen kann, leistet das Basenpaar G-C einen doppelt so hohen Beitrag zur Schmelztemperatur wie das Basenpaar A-T. Allgemein ist es von Vorteil, wenn die beiden in der PCR verwendeten Primer, der Primer forward (P_f) und der Primer reverse (P_r), eine ähnliche Schmelztemperatur¹⁰² und somit Annealing-Temperatur aufweisen, und dass der prozentuelle Gehalt an G-C und A-T ähnlich ist.⁸⁶

3.1.4.4 Eigenschaften von DNA-Polymerasen

Die erste DNA-Polymerase, die in der PCR eingesetzt wurde, war die DNA-Polymerase I von *Escherichia coli* (*E. coli*), deren Aktivitätsmaximum bei 37°C liegt.¹⁰⁸ Mittlerweile gibt es verschiedene hitzestabile DNA-Polymerasen für die PCR,¹⁰² wobei die *Taq*-Polymerase wegen ihrer hohen DNA-Synthese-Rate,⁹⁴ ihrer Robustheit und ihres erschwinglichen Preises sehr häufig zum Einsatz kommt.¹⁰⁸

Generelle Anforderungen an DNA-Polymerasen sind eine hohe *Prozessivität*, eine hohe *Stabilität* bei einer Temperatur von 95°C¹¹⁰ und gegenüber Puffer- und Konzentrations-Schwankungen, eine hohe *Aktivität* bei der Elongations-Temperatur, eine geringe Aktivität bei Raumtemperatur sowie eine *geringe Fehlerrate*.¹⁰⁸ Allgemein sinkt die Aktivität von DNA-Polymerasen mit zunehmender Anzahl an durchgeführten PCR-Zyklen, wobei es gleichzeitig zur vermehrten Bildung unerwünschter Produkte kommt.⁸⁶

Der Begriff *Prozessivität* definiert die Anzahl der Nukleotide, die von einer DNA-Polymerase in einem Stück komplementär ergänzt werden können.⁹⁴ Dieser Wert liegt bei der *Taq*-Polymerase bei 35-100 Nukleotiden und im Vergleich dazu bei der *Pfu*-Polymerase bei nur 9-12 Nukleotiden, was die hohe Syntheserate der *Taq*-Polymerase erklärt.⁹⁴

Die *Taq*-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, dessen Lebensraum heiße Quellen sind, weshalb die höchste Aktivität der *Taq*-Polymerase bei einer Temperatur von 74°C liegt.⁹⁴ Die Halbwertszeit der *Taq*-Polymerase beträgt bei 100°C etwa fünf Minuten, bei anderen Polymerasen teilweise deutlich mehr, etwa bei der *Pfu*-Polymerase aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* mehr als vier Stunden bei einer Temperatur von 95°C.¹⁰²

Der optimale pH-Wert der *Taq*-Polymerase liegt bei über 8 und abgesehen davon, dass sie einzelsträngige DNA mit daran gebundenen Primern in 5'-3'-Richtung komplementär ergänzen kann, besitzt sie auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität⁹⁴ sowie eine 3'-Adenylierungs-Aktivität,¹⁰⁸ was bedeutet, dass sie am 3'-Ende der neu gebildeten DNA-Stränge Adenosin anhängen kann, wodurch überstehende Enden erzeugt werden.¹⁰²

Eine Eigenschaft, die der *Taq*-Polymerase fehlt, welche jedoch teilweise bei anderen DNA-Polymerasen vorhanden ist, ist eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, welche ein Korrektur-Lesen (Proof Reading) der bereits neu gebildeten DNA ermöglicht,⁹⁴ wodurch fehlerhaft eingebaute Nukleotide erkannt und entfernt werden können.¹⁰² Diese Eigenschaft ist von Vorteil, wenn eine besonders fehlerfreie DNA erwünscht ist, beispielsweise, wenn nach der PCR eine DNA-Sequenzierung durchgeführt werden soll.¹¹⁰

Die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase liegt im Vergleich zu Polymerasen mit Proof-Reading etwa um den Faktor zehn höher, jedoch ist sie dadurch schneller als viele andere DNA-Polymerasen und ihre Syntheserate beträgt etwa 2800 Nukleotide pro Minute. Die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase hängt auch von der verwendeten Pufferlösung ab.⁹⁴

3.1.4.5 Die Pufferlösung

Abgesehen von der DNA-Matrize, der DNA-Polymerase und den zwei Primern ist zusätzlich eine geeignete Pufferlösung essenziell für das Gelingen einer PCR. Die Pufferlösung enthält einzeln vorliegende dNTPs sowie Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) und muss auf einen für die DNA-Polymerase optimalen pH-Wert eingestellt sein.⁸⁶ Zusätzlich sind Chlorid-Ionen (Cl^-),¹⁰⁸ Sulfat-Ionen (SO_4^{2-})¹¹¹ sowie Kalium-Ionen (K^+) in Form der Salze Kaliumchlorid (KCl)⁹⁴ und Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) bzw. Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)⁸⁶ im Puffer enthalten, wobei die Konzentration der Magnesiumsalze üblicherweise zwischen 1,0 und 2,5 mM beträgt.¹⁰⁸

Die Desoxyribo-Nukleosid-Triphosphate dATP (Desoxyribo-**A**denosin-Triphosphat), dGTP (Desoxyribo-**G**uanosin-Triphosphat), dCTP (Desoxyribo-**C**ytidin-Triphosphat), und dTTP (Desoxyribo-**T**hymidin-Triphosphat) müssen in der Pufferlösung jeweils in gleichen Konzentrationen vorliegen und für den Einbau der Desoxyribo-Nukleosid-Triphosphate in die neu gebildeten DNA-Stränge werden Mg^{2+} -Ionen benötigt.⁸⁶

Die wichtigste Funktion der Mg^{2+} -Ionen besteht darin, dass sie eine Veränderung der räumlichen Struktur der dNTPs ermöglichen, was eine Voraussetzung für den Einbau dieser in die neu gebildeten DNA-Stränge darstellt.¹¹¹

Mg^{2+} -Ionen führen weiters zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA¹⁰⁸ und besitzen einen Einfluss auf die Anlagerung der Primer, die Bildung von Primer-Dimeren und die Fehlerrate der PCR.⁹⁴ Abgesehen davon sind frei in der Pufferlösung vorliegende Mg^{2+} -Ionen auch als Co-Faktoren für die DNA-Polymerase von ausschlaggebender Bedeutung, indem sie einen Einfluss auf deren Aktivität sowie auf die Spezifität und Ausbeute der PCR besitzen.⁸⁶

3.1.4.6 Die 1. Phase der PCR: Denaturierung der DNA-Doppelstränge

Am Beginn jeder PCR steht eine längere Phase der Denaturierung, bei welcher die Doppelstränge der DNA-Matrize möglichst vollständig in die jeweiligen Einzelstränge getrennt werden sollen.¹⁰⁸ Erst dann sind die DNA-Matrizen für die Primer und für die DNA-Polymerase zugänglich.¹¹¹ Dieser Schritt ist sehr wichtig, da eine zu geringe Denaturierung am Beginn der PCR die am Ende erhaltene Ausbeute an vervielfältigter DNA verringert.¹⁰⁸

Diese erste Phase der PCR, die vor den sich zyklisch wiederholenden drei Schritten ablaufen sollte, dauert üblicherweise ein bis fünf Minuten und wird bei einer Temperatur von 95°C¹⁰⁸ oder 94°C⁹⁴ durchgeführt. Anschließend beginnt die erste Phase der PCR-Zyklen, ebenfalls eine Denaturierungs-Phase, welche jedoch durch eine kürzere Dauer von nur 30 Sekunden gekennzeichnet ist.⁹⁴ Die hohe Temperatur während der Denaturierung besitzt einige Nachteile, so wird nicht nur die DNA, sondern auch die DNA-Polymerase teilweise denaturiert, es kommt zu einer Depurinierung der Primer und die Nukleotide werden zum Teil zerstört.⁹⁴

3.1.4.7 Die 2. Phase der PCR: Anlagerung der Primer (Annealing)

Nach der Denaturierungs-Phase wird die Temperatur so weit gesenkt, dass die zwei Primer an die nun als Einzelstränge vorliegenden DNA-Moleküle binden können, was als Hybridisierung oder Annealing bezeichnet wird.¹⁰² Die Annealing-Temperatur sollte dabei mindestens 50°C betragen und mindestens 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur (T_m) liegen,¹⁰² wobei die Annealing-Phase üblicherweise 30 Sekunden lang dauert¹⁰⁸ und die Annealing-Temperatur meist im Bereich von 52-65°C eingestellt ist.¹¹¹ Die zwei eingesetzten Primer begrenzen einen bestimmten DNA-Abschnitt, weshalb schließlich nur dieser zwischen den beiden Primern liegende Bereich amplifiziert wird.¹⁰² Der Primer forward bindet an den 3'-Beginn des 3'-5'-DNA-Einzelstrangs und der Primer reverse an das 3'-Ende des 5'-3'-DNA-Einzelstrangs.¹¹¹

3.1.4.8 Die 3. Phase der PCR: Elongation

In der dritten Phase der PCR, der Elongations-Phase, setzen DNA-Polymerase-Moleküle jeweils an den 3'-OH-Enden der Primer an und verlängern die kurzen doppelsträngigen DNA-Sequenzen mit Hilfe der dNTPs in 3'-Richtung.¹⁰⁸

Die Elongations-Phase wird bei jener Temperatur, welche dem Aktivitäts-Maximum der *Taq*-Polymerase entspricht, durchgeführt, und dauert eine Minute lang, wobei die *Taq*-Polymerase etwa 1000 Basen pro Minute hinzufügen kann. Die DNA-Polymerase-Moleküle setzen die Elongation so lange fort, bis die Temperatur wieder auf 95°C erhöht wird und somit ein neuer Zyklus mit dem nächsten Denaturierungs-Schritt beginnt.¹⁰⁸

In einer klassischen PCR werden 25 bis 30 Zyklen durchgeführt und eine höhere Zyklen-Anzahl wird nur für eine Real-Time-PCR empfohlen, da bei einer größeren Anzahl an Wiederholungen der drei Phasen auch unspezifische DNA-Abschnitte vervielfältigt¹⁰⁸ und Ausgangsstoffe verbraucht werden, und weil abgesehen davon die DNA-Polymerasen nicht mehr so effektiv arbeiten.⁸⁶

Nach dem letzten Zyklus wird üblicherweise noch eine abschließende Elongations-Phase bei 72°C durchgeführt, damit bis dahin nur teilweise amplifizierte Produkte noch fertiggestellt werden können. Diese letzte Phase der PCR kann fünf bis 15 Minuten lang dauern.¹⁰⁸

3.1.4.9 Die Amplifikations-Rate der PCR

Im Idealfall geht man davon aus, dass die zu vervielfältigenden DNA-Matrizen während der PCR exponentiell vermehrt werden, also mit einer Amplifikationsrate von 2^n , wobei n die Anzahl der sich wiederholenden Zyklen darstellt.⁸⁶ Diese Berechnung beruht darauf, dass sich die Anzahl der DNA-Moleküle theoretisch mit jedem Zyklus verdoppeln sollte.¹¹¹ Nach 30 Zyklen würde man daher etwa eine Milliarde DNA-Kopien der ursprünglich vorliegenden DNA-Matrize erwarten, tatsächlich liegt der Multiplikationsfaktor jedoch nicht bei 2^n , sondern nur bei etwa $1,6^n$ bis $1,7^n$.⁹⁴

Gründe dafür sind die zu Beginn und am Ende der PCR geringeren Amplifikationsraten, wobei zu Beginn deshalb weniger DNA vervielfältigt wird, weil die Wahrscheinlichkeit für ein Aufeinandertreffen aller dafür notwendigen Substanzen (DNA-Matrizen, Primer und DNA-Polymerasen) nicht besonders groß ist.⁹⁴ Die Hemmung der DNA-Synthese am Ende der PCR ergibt sich durch zerfallende dNTPs, durch DNA-Einzelstränge, welche miteinander hybridisieren anstatt vervielfältigt zu werden, sowie durch nicht mehr gut funktionierende DNA-Polymerase-Moleküle.⁹⁴

3.1.4.10 Detektion der PCR-Produkte

Die klassische Methode zur qualitativen Detektion von PCR-Produkten ist die Durchführung einer Gelelektrophorese zur Auftrennung der unterschiedlich langen, amplifizierten DNA-Fragmente, welche mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe markiert und so im Gel detektiert werden können.⁸⁶ Beispiele sind die Agarose-Gel-, die Polyacrylamid-Gel- und die Kapillar-Elektrophorese, wobei die DNA mit dem im UV-Licht fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt und durch Bestrahlung mit UV-Licht von 312 nm Wellenlänge detektiert werden kann. Für den Fall, dass man artspezifische DNA nachweisen möchte, sollte schließlich im Gel eine Bande in einem bestimmten Bereich zu finden sein, also ein DNA-Fragment bestimmter Länge vorliegen.⁸⁶

3.1.4.11 Die Real-Time PCR (Echtzeit-PCR)

Die Real-Time PCR ermöglicht den Echtzeit-Nachweis der im Verlauf der PCR zunehmenden Menge an vervielfältigter DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Farbstoffen.⁸⁶ Wesentliche Vorteile der Real-Time PCR bestehen darin, dass die Methode sehr schnell ist und das Risiko einer Kontamination minimal ist.¹¹⁰

Bei der Real-Time PCR kommt es ab einer bestimmten Anzahl an PCR-Zyklen beziehungsweise ab einer bestimmten Produktmenge zu einem Plateau-Effekt, welcher zu einer deutlich geringeren Amplifikations-Rate führt.⁹⁴ Ein exponentieller Anstieg ist erst nach Ablaufen einiger PCR-Zyklen und nur bis zum Eintreten des Plateau-Effekts zu erwarten.⁹⁴

Abb. 1 zeigt den Verlauf einer Real-Time PCR-Kurve, unter der Voraussetzung, dass sich die gesuchte DNA in der Probe befunden hat. Man erkennt den exponentiellen Anstieg mit einem linearen Bereich, welcher in eine nicht-exponentiell verlaufende Plateau-Phase übergeht. Das Fluoreszenz-Signal, welches auf der Y-Achse abzulesen ist, wird jeweils zu einem bestimmten Zeitpunkt während der PCR-Zyklen gemessen und ausgewertet, auf der X-Achse ist die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen.¹⁰²

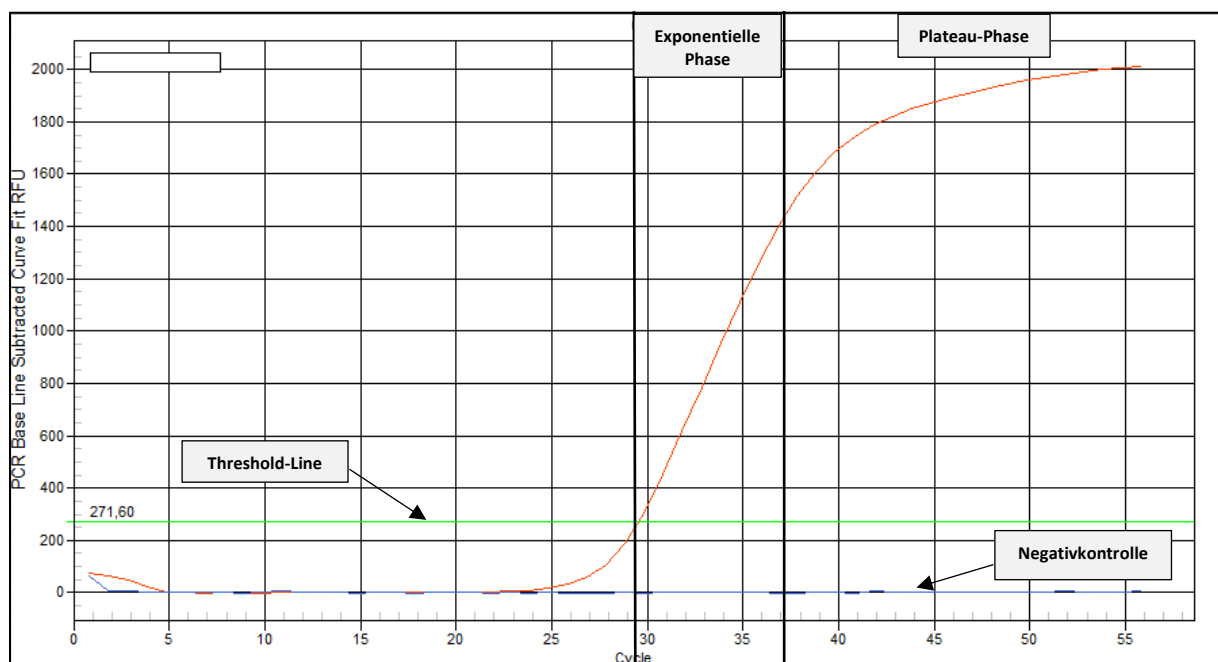


Abb. 1: PCR-Kurve mit exponentieller Phase und Plateau-Phase

Die in der PCR eingesetzten Fluoreszenz-Farbstoffe absorbieren kurzwelliges Licht mit einer Wellenlänge unter 495 nm und emittieren Licht mit einer Wellenlänge von 500 bis 800 nm.¹⁰⁸ Zur Erzeugung der Fluoreszenz-Signale werden fluoreszierende Sonden eingesetzt, beispielsweise die TaqMan-Sonde oder Hybridisierungs-Sonden, die dem Reaktionsgemisch zusätzlich zu allen weiteren für die PCR benötigten Substanzen hinzugefügt werden.¹¹¹

Bei der häufig verwendeten **TaqMan-Sonde** handelt es sich um ein Oligonukleotid, welches im Bereich zwischen dem Primer forward und dem Primer reverse an das einzelsträngige DNA-Template bindet.¹¹⁰

Die TaqMan-Sonde enthält an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Farbstoff, welcher als *Reporter* bezeichnet wird, sowie in 3'-Richtung in der Nähe des Reporters einen sogenannten *Quencher*. Bindet die TaqMan-Sonde während der Annealing-Phase an die DNA-Matrize, so befinden sich Reporter und Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander, wobei der Quencher für eine Unterdrückung des Fluoreszenz-Signals des Reporters sorgt. Zu diesem Zeitpunkt kann der Detektor des Thermocyclers daher keine Fluoreszenz messen.¹¹⁰

Trifft die DNA-Polymerase im Verlauf der Elongations-Phase auf eine Sonde, so baut sie diese durch hydrolytische Spaltung ab,¹⁰² wodurch der Reporter und der Quencher voneinander getrennt werden und der Quencher das Fluoreszenz-Signal des Reporters nicht mehr löschen kann.¹¹⁰ Die Stärke des Fluoreszenz-Signals ist daher direkt proportional zur Menge an amplifizierter DNA.¹⁰⁸

In dieser Diplomarbeit wurde eine TaqMan-Sonde mit dem FAM-Reporter und dem BHQ1-Quencher verwendet. Der *FAM-Reporter* absorbiert bei 488 nm und emittiert bei 518 nm Wellenlänge, der *Quencher BHQ1* absorbiert im Wellenlängen-Bereich von 450-560 nm.¹⁰⁸

Die Auswertung einer Real-Time PCR umfasst mehrere Parameter, dazu gehören der C_T -Wert sowie die Effizienz der Methode.⁹⁴

Der **C_T -Wert (Threshold Cycle)** gibt an, ab welcher Zyklus-Anzahl sich die Menge der vervielfältigten DNA und somit das Fluoreszenz-Signal deutlich vom „Hintergrund“, also von den Kurven nicht amplifizierter DNA-Matrizen, abhebt.⁹⁴ Der C_T -Wert wird von PCR-Geräten automatisch ermittelt,⁸⁶ wobei die sogenannte **Threshold-Line (Schwellenwert-Linie)** jene waagrechte Gerade darstellt, aus deren Schnittpunkt mit den jeweiligen PCR-Kurven sich der C_T -Wert ergibt.¹¹⁵

Die Threshold-Line sollte die PCR-Kurven jeweils am Beginn der exponentiellen Phase schneiden. Generell liegen die C_T -Werte umso niedriger, je höher die ursprünglich eingesetzte DNA-Konzentration war, da das Fluoreszenz-Signal in diesem Fall bereits bei einer niedrigeren Zyklus-Anzahl ansteigt.¹¹⁵

Aus den C_T -Werten kann schließlich eine Standardgerade erstellt werden. Zu diesem Zweck werden die verschiedenen, mittels Real-Time PCR ermittelten C_T -Werte der jeweiligen PCR-Kurven gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Konzentrationen ($\log c$) aufgetragen, wobei sich aus der Steigung der erstellten Standardgerade die **Effizienz E** berechnen lässt.⁸⁶ Dazu müssen aus einem Extrakt unterschiedliche Konzentrationen in Form einer Verdünnungsreihe hergestellt werden, um die Vervielfältigungs-Rate einer DNA-Matrize zu ermitteln.¹¹⁶

Ein Beispiel dafür ist die Herstellung eines Modell-Lebensmittels, in welches genau definierte, unterschiedliche Mengen eines Lebensmittelbestandteils eingebracht werden, daraus mit Hilfe eines Extraktions-Verfahrens die DNA isoliert wird, und schließlich mit Hilfe der gewonnenen DNA-Extrakte, die in bestimmten Konzentrations-Stufen vorliegen, eine Real-Time PCR durchgeführt wird.⁸⁶

Die Effizienz lässt sich nach der Gleichung $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ berechnen. Im Fall einer DNA-Verdoppelung in jedem Zyklus würde sich eine Effizienz von $2,0^{116}$ oder 100 % ergeben, was einer Steigung von -3,32 entspricht.¹¹⁷ Da dies jedoch in der Praxis unwahrscheinlich ist, sollte die Amplifikationsrate zumindest 1,8 betragen¹¹⁶ oder zwischen mindestens 90 und maximal 110 % liegen.⁸⁶

Abb. 2 und **Abb. 3** zeigen ein Beispiel für die Erstellung einer Standardgerade: In **Abb. 2** sind die PCR-Kurven, welche sich aus sechs verschiedenen Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes ergaben, dargestellt, und in **Abb. 3** ist die aus den entsprechenden C_T -Werten erstellte Standardgerade abgebildet, wobei sich eine Effizienz von 100,0 % ergibt.

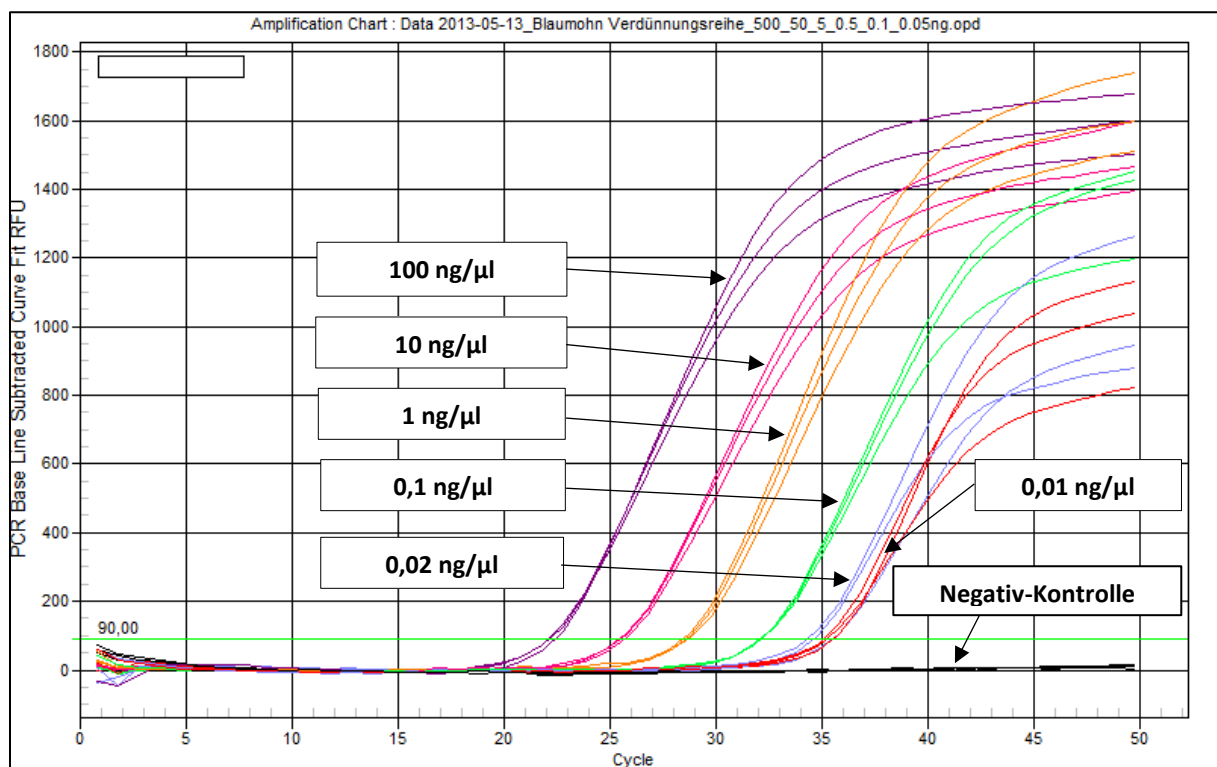


Abb. 2: PCR-Kurven für sechs verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes (n=3): 100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 ng/μl

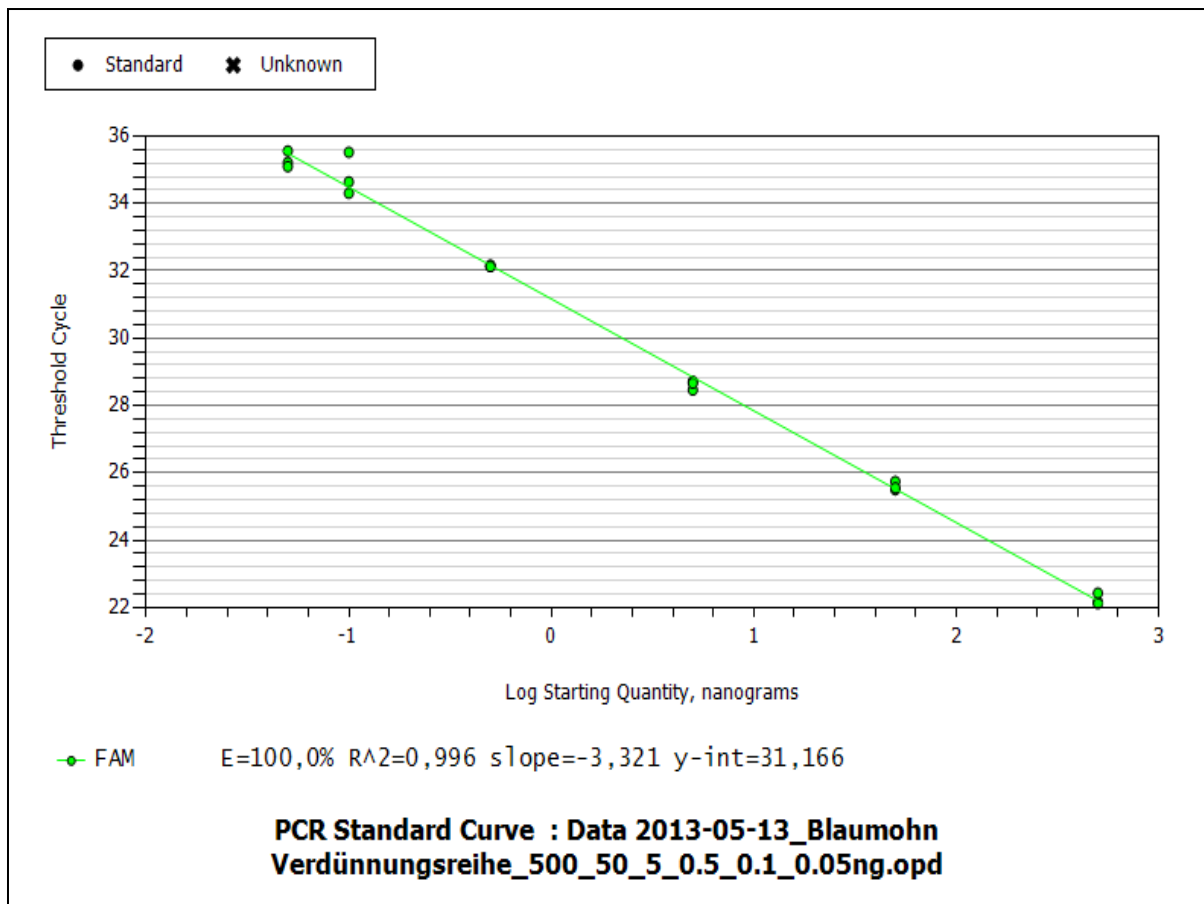


Abb. 3: Standardgerade aus der Analyse von sechs verschiedenen Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes: 100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 ng/μl (n=3, Threshold-Line: 90,00)

Wichtige Kennparameter für die Auswertung einer Real-Time PCR und generell für alle analytischen Verfahren sind abgesehen von der Effizienz auch die Nachweisgrenze sowie die Bestimmungsgrenze.⁸⁶

Die Definition der **Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)** einer analytischen Methode lautet allgemein, dass es sich dabei um die geringste Menge einer Substanz handelt, die mit Hilfe dieser Methode mit einer angegebenen Wahrscheinlichkeit detektiert werden kann.¹¹⁸ Häufig wird eine Wahrscheinlichkeit von 95 % angeführt, was bedeutet, dass die zu detektierende Substanz bei einer bestimmten Konzentration in 95 % der Fälle nachgewiesen werden kann.^{118, 119} Die Definition der **Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ)** lautet, dass der jeweilige Analyt (mit einer gewissen Ergebnis-Unsicherheit) unter Angabe einer gewünschten Genauigkeit und Richtigkeit *quantitativ* bestimmt werden kann.^{86, 118}

4 ERGEBNISSE und DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde zunächst mit Hilfe der CTAB-Methode aus drei verschiedenen Sorten des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), Blaumohn, Graumohn und Weißmohn, DNA extrahiert und die Extrakte anschließend einer photometrischen Messung unterzogen. Diejenigen Extrakte, welche aufgrund ihrer Konzentration ($> 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) und Reinheit (A_{260}/A_{280} : 1,8-2,0) geeignet waren, in einer Real-Time PCR eingesetzt zu werden, wurden schließlich für weitere Untersuchungen verwendet.

Es wurde getestet, ob die Real-Time PCR-Methode *selektiv* für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn ist, weiters wurden die Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakte als Positiv-Kontrollen in der Real-Time PCR eingesetzt, zur *Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentrationen* verwendet sowie zur Bestimmung der *Nachweisgrenze (LOD)* und *Effizienz* der Real-Time PCR-Methode herangezogen.

Weiters wurde mit Hilfe der CTAB-Methode und des QIAamp DNA Mini Kits aus 22 Lebensmittelbestandteilen, welche abgesehen von Mohn häufig in kommerziell erhältlichen Mohn-Produkten enthalten sind, DNA extrahiert, wobei 21 pflanzliche Lebensmittel sowie Backhefe untersucht wurden.

Mit denjenigen DNA-Extrakten, welche eine ausreichende Konzentration und Reinheit aufwiesen, wurden schließlich *Kreuzreaktivitäts-Tests* mittels Real-Time PCR durchgeführt, um die Spezifität des Real-Time PCR-Assays für Mohn zu untersuchen.

Es wurde ein *Modell-Lebensmittel* auf Schokoladekuchen-Basis hergestellt, wobei aus dem Basis-Teig sieben Teige mit unterschiedlichen Prozent-Gehalten an Mohn hergestellt wurden. Schließlich wurde sowohl aus dem Roh-Teig als auch aus dem gebackenen Teig DNA extrahiert und untersucht, ob es möglich ist, mit Hilfe der Real-Time PCR-Methode Mohn-DNA in einer Lebensmittel-Matrix nachzuweisen, und welche *Nachweisgrenze* und *Effizienz* der Real-Time PCR-Assay in einem komplex zusammengesetzten Lebensmittel aufweist.

Weiters wurde, wieder mit Hilfe der CTAB-Methode, aus 15 kommerziell erhältlichen Produkten mit und ohne auf der Zutatenliste deklariertem Mohn DNA extrahiert und anschließend die Extrakte von 14 Produkten verwendet, um die *Eignung der entwickelten Real-Time PCR-Methode als Routine-Methode* zu testen.

4.1 Ergebnisse der Untersuchungen von Blaumohn, Graumohn- und Weißmohn-Extrakten

In diesem Kapitel werden alle Ergebnisse der Untersuchungen, welche mit den DNA-Extrakten von Blaumohn, Graumohn und Weißmohn durchgeführt wurden, beschrieben:

Abgesehen von den Ergebnissen der photometrisch gemessenen Konzentration und Reinheit der DNA-Extrakte von Blaumohn, Graumohn und Weißmohn enthält dieses Kapitel die

Ergebnisse der mit den Blau-, Grau- und Weißmohn-Extrakten mittels Real-Time PCR durchgeführten Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentrationen sowie die Resultate der Bestimmung der Effizienz sowie der Nachweisgrenze des Real-Time PCR-Assays für Mohn.

4.1.1 Konzentration und Reinheit der Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakte

Tab. 5 zeigt die Mittelwerte der Konzentrationen und die Mittelwerte der A_{260}/A_{280} -Werte jener Extrakte, welche aus den Produkten „Blaumohn gemahlen“ (Back Mit), „Blaumohn, Samen, ganz“ (Back Mit Beachflower), „Graumohn, Samen ganz“ (Sonnentor), „Graumohn, Samen ganz“ (Holzweber) und „Weißmohn, Samen ganz“ (Sonnentor) hergestellt wurden.

Das Kriterium für eine Eignung der Extrakte für die Real-Time PCR war eine DNA-Konzentration von mindestens 10 ng/µl unter Verwendung eines speziellen Pipettierschemas oder eine Konzentration von mindestens 20 ng/µl bei Anwendung des gängigen Pipettierschemas, wobei die Pipettier-Schemata in den Kapiteln 6.2.1.3 und 6.2.1.5 beschrieben sind.

Die Anforderung an die Reinheit der Extrakte war ein A_{260}/A_{280} -Wert von 1,8 bis 2,0, es wurden jedoch auch Extrakte, bei welchen geringfügige Abweichungen von diesem Wert nach oben oder unten auftraten, als geeignet für den Einsatz in der Real-Time PCR betrachtet.

Tab. 5: Konzentration und Reinheit der DNA-Extrakte aus Blau-, Grau- und Weißmohn
^a Extrakte mit stark voneinander abweichenden Einzelwerten der DNA-Konzentration

Lebensmittel	Mittelwert DNA-Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A_{260}/A_{280} -Wert
Blaumohn (gemahlen)		
Firma Back Mit, keine Bearbeitung		
1. Extrakt	36,3	2,01
2. Extrakt	24,0	2,04
3. Extrakt	50,0	2,03
Blaumohn (Samen, ganz)		
Firma Back Mit Beachflower, Mörser		
1. Extrakt	22,7	2,01
2. Extrakt	22,3	2,05
Blaumohn (Samen, ganz)		
Firma Back Mit Beachflower, Mohn-Mühle		
1. Extrakt ^a	922,7	2,03
2. Extrakt ^a	1275,9	2,04
Graumohn (Samen, ganz)		
Firma Sonnentor, Mörser		
1. Extrakt	154,0	1,96
2. Extrakt	129,7	1,93
3. Extrakt	132,6	1,98
Graumohn (Samen, ganz)		
Firma Holzweber, Mörser		
1. Extrakt	11,6	2,14
2. Extrakt	38,1	1,89

Tab. 5: Fortsetzung

Lebensmittel	Mittelwert DNA-Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A₂₆₀/A₂₈₀-Wert
Graumohn (Samen, ganz) Firma Holzweber, Mohn-Mühle		
1. Extrakt	1014,4	2,03
2. Extrakt	1124,8	2,03
Weißmohn (Samen, ganz) Firma Sonnentor, Mörser		
1. Extrakt	35,7	2,14
2. Extrakt	33,2	2,14
3. Extrakt	26,7	2,13
Weißmohn (Samen, ganz) Firma Sonnentor, Mohn-Mühle		
1. Extrakt ^a	2109,4	2,06
2. Extrakt ^a	1327,7	2,04

Wie man **Tab. 5** entnehmen kann, waren alle untersuchten Extrakte von den Mittelwerten der DNA-Konzentrationen her für eine PCR geeignet, da die Konzentrationen jeweils über den geforderten 10 ng/μl lagen, jedoch ergaben sich bei den mit der Mohn-Mühle gemahlenden Blaumohn- und Weißmohn-Samen die Mittelwerte der Konzentrationen aus sehr stark voneinander abweichenden Einzelwerten, sodass die Mittelwerte nicht aussagekräftig waren und die Extrakte daher nicht für weiterführende Untersuchungen verwendet wurden:

Beim 1. Extrakt des mit der Mohnmühle gemahlenden Blaumohns betrugen die Einzelwerte der DNA-Konzentration 877,0, 908,9, 938,2 und 966,7 ng/μl und beim 2. Extrakt 1108,0, 1130,0, 1137,7 und 1728,5 ng/μl, beim 1. Extrakt des mit der Mohnmühle gemahlenden Weißmohns 879,9 und 3338,8 ng/μl und beim 2. Extrakt 1229,8, 1231,1, 1268,0, 1431,5 und 1477,0 ng/μl, sodass diese vier Extrakte aufgrund der stark voneinander abweichenden Einzelwerte, welche sich aus der Messung der Konzentration ergaben, nicht für den Einsatz in der Real-Time PCR herangezogen wurden. Alle übrigen Extrakte in **Tab. 5** waren für eine Weiterverwendung in der Real-Time PCR geeignet.

Die A₂₆₀/A₂₈₀-Werte lagen bei allen hergestellten Mohn-DNA-Extrakten im geforderten Bereich oder geringfügig außerhalb dieses Bereiches, weshalb alle Extrakte in Bezug auf die Reinheit für eine Real-Time PCR geeignet waren.

Was allgemein auffiel, waren die sehr hohen DNA-Konzentrationen bei denjenigen Extrakten, bei welchen die Mohn-Samen vor der Extraktion mit einer Mohn-Mühle gemahlen wurden, sowohl im Vergleich zum im Lebensmittelhandel erworbenen, maschinell gemahlenden Blaumohn als auch im Vergleich zu den Extrakten, welche nach der Zerkleinerung von Mohn-Samen in einem Mörser hergestellt wurden. Es wurde zur Herstellung aller DNA-Extrakte aus Blau-, Grau- und Weißmohn in dieser Diplomarbeit stets die CTAB-Methode verwendet, da keine weitere Extraktions-Methode notwendig war, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen.

4.1.2 Optimierung der Primer-Paar- und Sonden-Konzentration

Nach der Herstellung der Extrakte aus Blaumohn, Graumohn und Weißmohn und der Messung der Konzentration und Reinheit der Extrakte wurden die Primer-Konzentrationen und die Sonden-Konzentration für alle weiteren Versuche optimiert.

Die Primer-Konzentrationen und die Sonden-Konzentration wurden von *Fatima Tazeen Husain*⁸³ bereits für den TaqMan-Assay optimiert, jedoch für die Sonde nicht in allen Konzentrationen, welche in dieser Diplomarbeit untersucht werden sollten.

Die Optimierung der Primer-Konzentrationen (P_f/P_r : 100/100, 200/200, 300/300 nM) sowie der Sonden-Konzentration (100, 200, 300 nM) wurde jeweils mit einem Extrakt aus dem gemahlenden Blaumohn durchgeführt, welcher in einer Konzentration von 20 ng/μl (100 ng/Well) eingesetzt wurde. Die Pipettier-Schemata für den Mastermix für die verschiedenen Primer- und Sonden-Konzentrationen sind im Kapitel 6.2.1.6 beschrieben.

Es wurden für jede Konzentration jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und unter den optimalen Konzentrationen diejenigen verstanden, welche zu den niedrigsten C_T -Werten führten.

Abb. 4 zeigt die Real-Time PCR-Kurven für die getesteten Primer-Konzentrationen und in **Tab. 6** sind die jeweiligen C_T -Werte bei einer Threshold-Line von 100,00 sowie die aus den jeweils zwei Parallel-Bestimmungen gebildeten Mittelwerte angeführt:

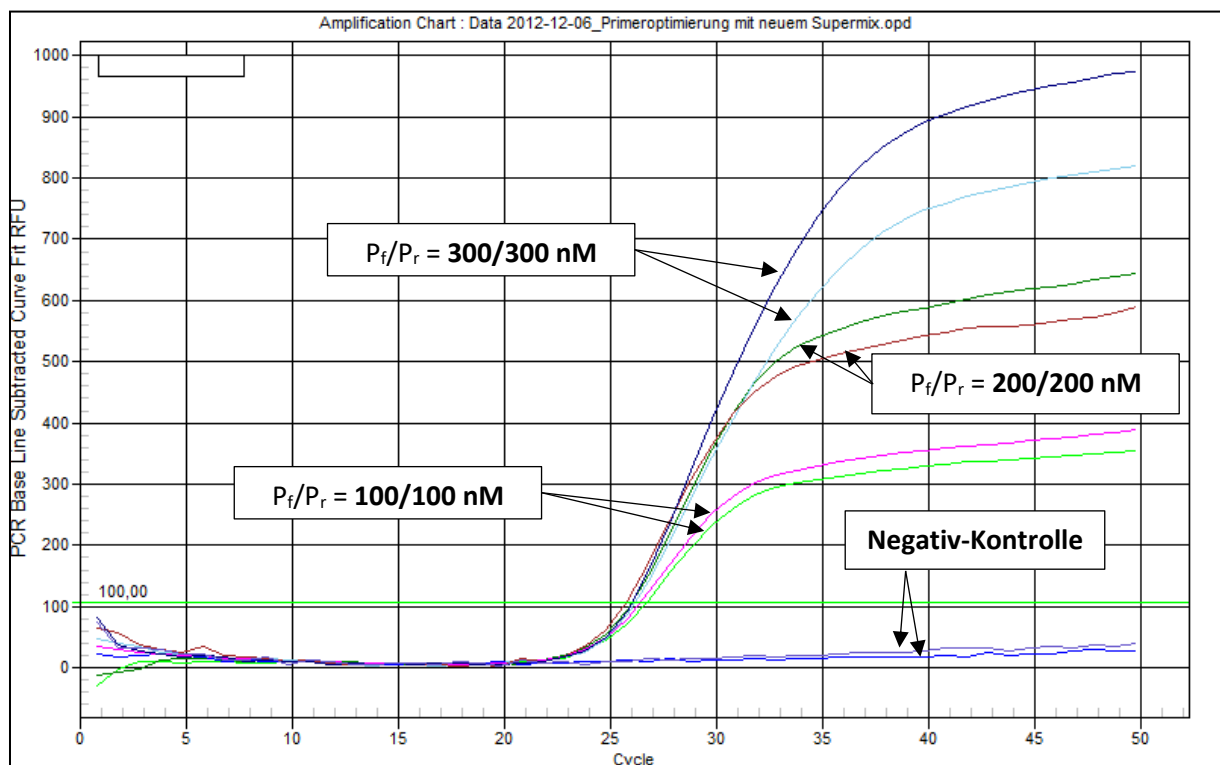


Abb. 4: Optimierung der Primer-Konzentrationen (P_f/P_r : 100/100, 200/200, 300/300 nM, $n=2$)

Tab. 6: Einfluss der Primer-Konzentration auf den C_T -Wert (Threshold-Line 100,00)
n.d. nicht detektiert (kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals)
- Keine Berechnung möglich

	Konzentration P _f /P _r 100/100 nM	Konzentration P _f /P _r 200/200 nM	Konzentration P _f /P _r 300/300 nM	Negativ- Kontrolle
C_T-Wert 1	26,77	26,05	26,19	n.d.
C_T-Wert 2	26,46	25,76	26,05	n.d.
Mittelwert	26,62	25,91	26,12	-

Wie man anhand von **Abb. 4** und **Tab. 6** erkennen kann, ergaben sich für die Primer-Paar-Konzentrationen 200/200 nM und 300/300 nM ähnliche C_T -Werte, wobei beide Werte im Vergleich zur Konzentration 100/100 nM etwas niedriger lagen und weniger Unterschiede zueinander als zur Konzentration 100/100 nM zeigten. Die Signalhöhe war bei den Konzentrationen 200/200 nM und 300/300 nM größer als bei 100/100 nM.

Die **Primer-Paar-Konzentration 200/200 nM** ergab den niedrigsten Mittelwert der C_T -Werte, daher wurde diese Konzentration in allen weiteren Versuchen eingesetzt.

Abb. 5 zeigt die Real-Time PCR-Kurven für die untersuchten Sonden-Konzentrationen, und die jeweiligen C_T -Werte bei einer Threshold-Line von 100,00 sowie die daraus gebildeten Mittelwerte sind in **Tab. 7** angeführt:

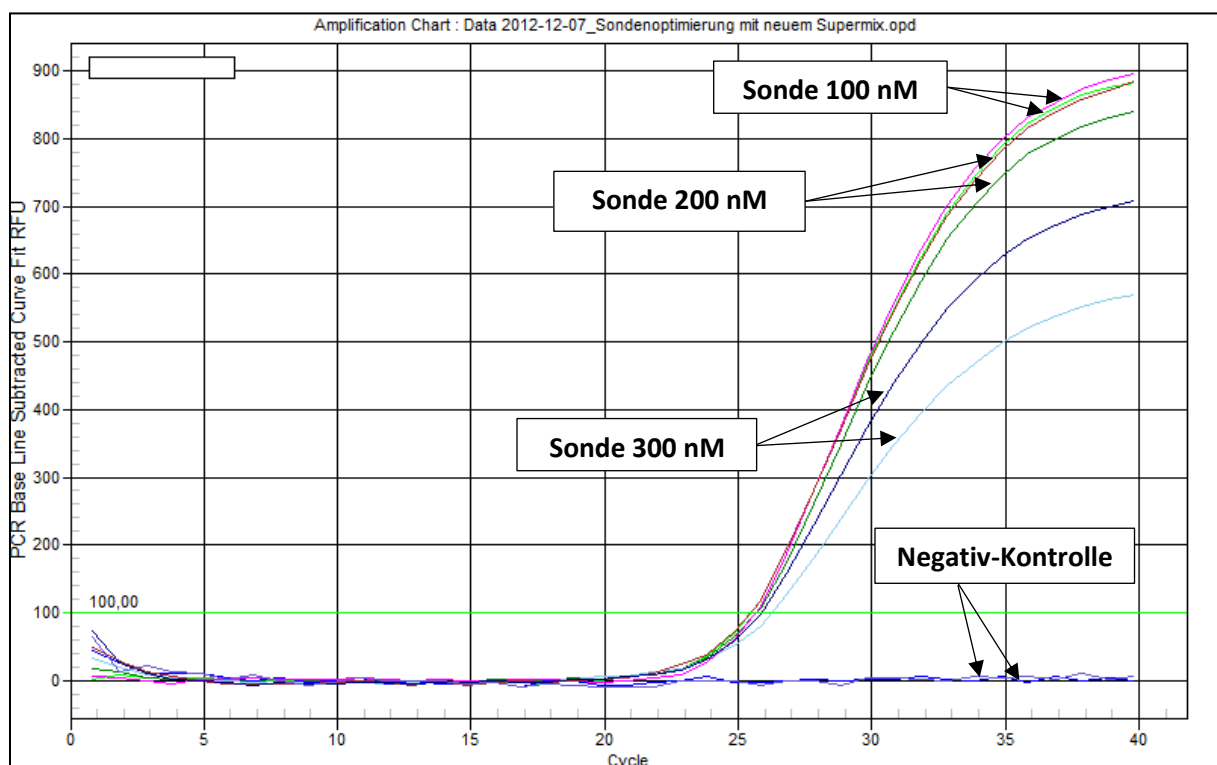


Abb. 5: Optimierung der Sonden-Konzentration (100, 200, 300 nM, n=2)

Tab. 7: Einfluss der Sonden-Konzentration auf den C_T-Wert (Threshold-Line 100,00)
n.d. nicht detektiert (kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals)
- Keine Berechnung möglich

	Konzentration Sonde 100 nM	Konzentration Sonde 200 nM	Konzentration Sonde 300 nM	Negativ- Kontrolle
C_T-Wert 1	25,48	25,68	26,26	n.d.
C_T-Wert 2	25,65	25,44	25,89	n.d.
Mittelwert	25,57	25,56	26,08	-

Bei der Optimierung der Sonden-Konzentration ergaben sich für die Konzentrationen von 100 und 200 nM die niedrigsten C_T-Werte, welche sehr ähnlich waren, und die Konzentration von 300 nM führte zu höheren C_T-Werten. Die Signalhöhen bei den Konzentrationen 100 nM und 200 nM lagen ähnlich hoch und höher als bei der Konzentration von 300 nM.

Für die **Sonden-Konzentration 200 nM** ergab sich der niedrigste Mittelwert der C_T-Werte, daher wurde diese Konzentration in allen weiteren Versuchen eingesetzt.

4.1.3 Selektivität des optimierten Assays für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn

Tab. 8 zeigt einen Vergleich der Mittelwerte der C_T-Werte, welche mit Hilfe von Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakten ermittelt wurden, wobei die Real-Time PCR unter den optimierten Bedingungen durchgeführt wurde. Die C_T-Werte wurden den Untersuchungen zur Bestimmung der Nachweisgrenze von Blau-, Grau- und Weißmohn (Kapitel 4.1.4.2) entnommen, da hier alle drei Mohn-Sorten untersucht wurden und daher die C_T-Werte für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn vorlagen. In **Tab. 8** sind die C_T-Werte der Positivkontrollen aus **Abb. 8, 9 und 10** bei einer Threshold-Line von 90,00 angegeben.

Tab. 8: Mittelwerte der C_T-Werte für Blau-, Grau- und Weißmohn-Extrakte (Threshold-Line: 90,00)

	Blaumohn	Graumohn	Weißmohn
C _T -Wert 1	24,00	24,22	24,29
C _T -Wert 2	24,13	24,40	24,57
Mittelwert	24,07	24,31	24,43

Aufgrund der erhaltenen C_T-Werte ließ sich feststellen, dass es möglich war, alle drei Mohn-Sorten mit Hilfe des Real-Time PCR-Assays zu detektieren, womit gezeigt werden konnte, dass die Real-Time PCR-Methode eine Selektivität für Blau-, Grau- und Weißmohn aufwies. Dies ist von Vorteil, da sowohl Blaumohn als auch Graumohn und Weißmohn in kommerziell erhältlichen Produkten enthalten sein und eine Lebensmittelallergie auslösen können.

Wie man in **Tab. 8** erkennen kann, führten die Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakte zu ähnlichen Mittelwerten der C_T-Werte, sodass die Extrakte aller drei Mohn-Sorten dafür geeignet waren, in weiteren Versuchen als Positiv-Kontrollen eingesetzt zu werden.

4.1.4 Bestimmung der Effizienz und Nachweisgrenze des Real-Time PCR-Assays

4.1.4.1 Effizienz

Zur Ermittlung der Effizienz des Real-Time PCR-Assays wurden sechs verschiedene Konzentrationen (**100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 ng/μl**) eines Extraktes, welcher aus in einem Mörser zerkleinerten Blaumohn-Samen hergestellt wurde, in 3-fach-Bestimmungen untersucht. Die erhaltenen PCR-Kurven bei einer Threshold-Line von 90,00 werden in **Abb. 6** gezeigt, die entsprechenden C_T-Werte sind in **Tab. 9** angeführt, und die aus den C_T-Werten ermittelte Standardgerade ist in **Abb. 7** dargestellt:

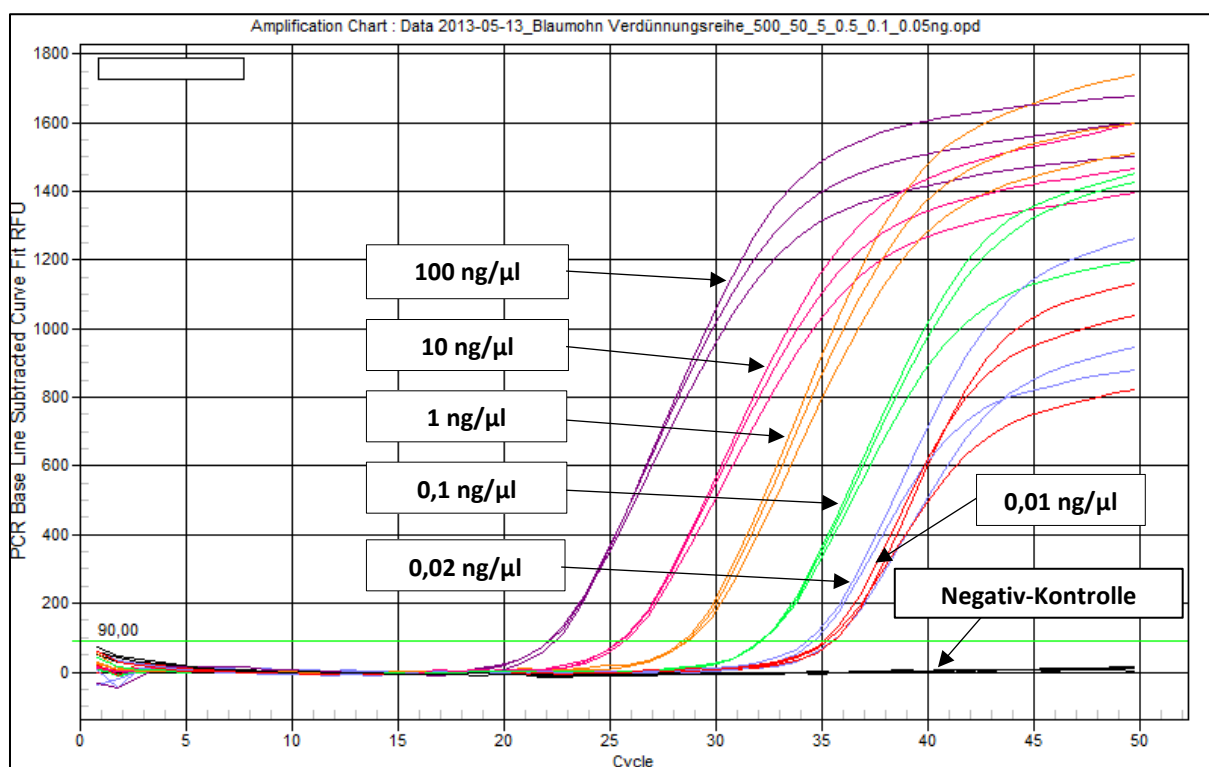


Abb. 6: PCR-Kurven für sechs verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes (n=3): 100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 ng/μl

Tab. 9: C_T-Werte für sechs verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes (Threshold-Line 90,00)

	Konz. 100 ng/μl	Konz. 10 ng/μl	Konz. 1 ng/μl	Konz. 0,1 ng/μl	Konz. 0,02 ng/μl	Konz. 0,01 ng/μl
Blaumohn						
C _T 1	22,12	25,50	28,46	32,13	34,30	35,09
C _T 2	22,17	25,55	28,67	32,13	34,64	35,22
C _T 3	22,43	25,74	28,72	32,17	35,52	35,56
Mittelwert	22,24	25,60	28,62	32,14	34,82	35,29

Aus der Steigung der in **Abb. 7** gezeigten Standardgerade (-3,321) ergab sich unter Einbeziehung der C_T -Werte aller sechs untersuchten Konzentrationen für Blaumohn eine **Effizienz** des Real-Time PCR-Assays von **100,0 %**.

Da alle Parallelbestimmungen der sechs getesteten Konzentrationen des Blaumohn-Extraktes jeweils zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals führten, wurde bei der Effizienz-Bestimmung für Graumohn und Weißmohn jeweils zusätzlich eine weitere Konzentration von 0,002 ng/µl untersucht. Abgesehen davon war die zusätzliche Konzentration von 0,002 ng/µl für die Bestimmung der Nachweisgrenze notwendig.

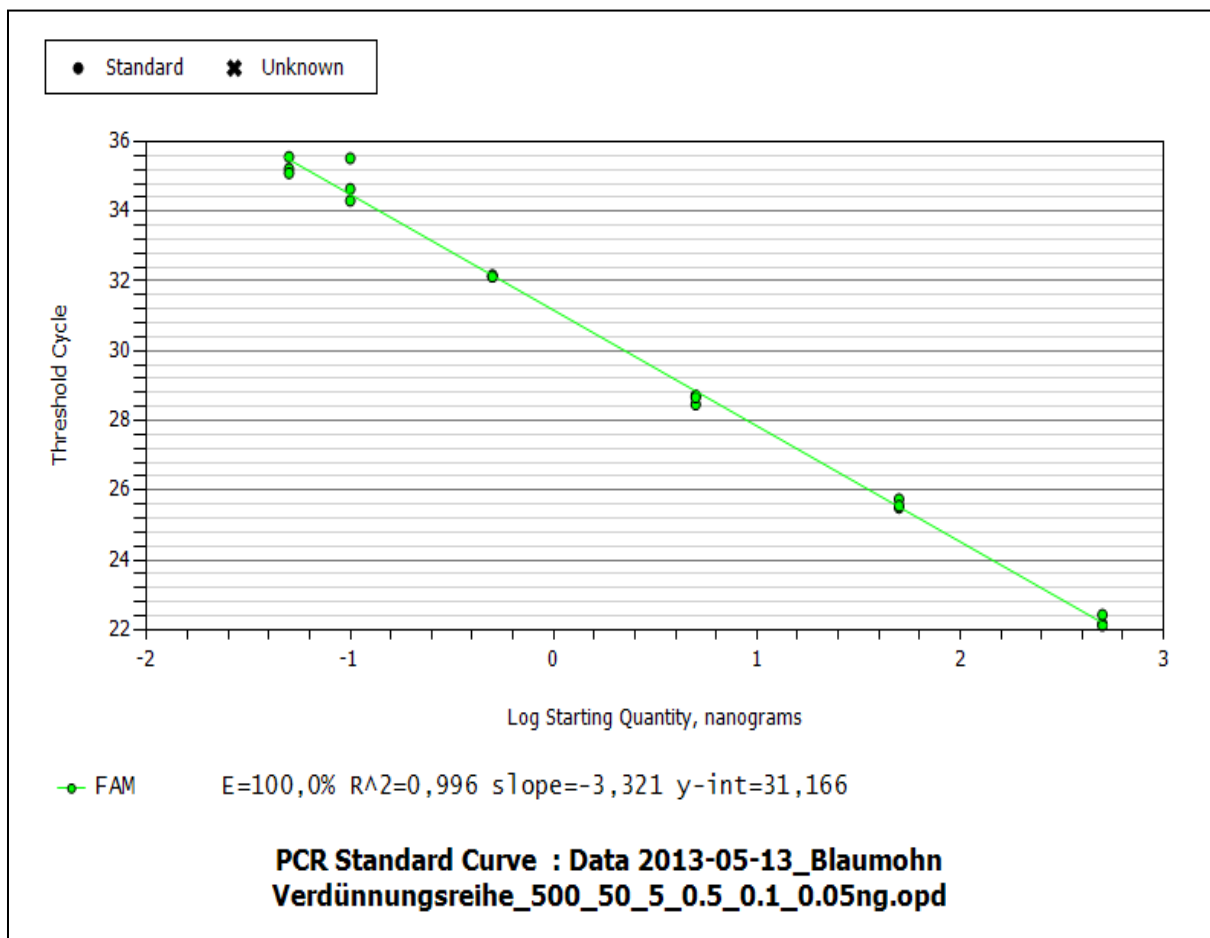


Abb. 7: Standardgerade aus der Analyse von sechs verschiedenen Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes: 100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 ng/µl (n=3, Threshold-Line: 90,00)

Die Ergebnisse der Real-Time PCR der Graumohn- und Weißmohn-Extrakte in sieben verschiedenen Konzentrationen (100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 / 0,002 ng/µl) können leider nicht gezeigt werden, da es zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals bei vier der sechs aufgetragenen Negativkontrollen kam. Die Graumohn- und Weißmohn-Extrakte führten zwar bei einer Threshold-Line von 90,00 zu ähnlichen Mittelwerten der C_T -Werte wie die Blaumohn-Extrakte, jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Extrakte ebenso wie die Negativkontrollen kontaminiert waren, weshalb die Ergebnisse nicht verwendbar waren.

4.1.4.2 Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)

Nach der Ermittlung der Effizienz des Real-Time PCR-Assays für Blaumohn wurden die Extrakte aller drei Mohn-Sorten in den drei Konzentrationen **0,02, 0,01 und 0,002 ng/μl** in 10-fach-Bestimmungen getestet, um die Nachweisgrenze zu ermitteln.

Die PCR-Kurven, die sich aus den drei verschiedenen Konzentrationen der Blau-, Grau- und Weißmohn-Extrakte ergaben, sind in **Abb. 8, 9 und 10** dargestellt, wobei alle Kurven der jeweiligen Parallel-Bestimmungen in der gleichen Farbe dargestellt sind. Die aus **Abb. 8, 9 und 10** ermittelten C_T -Werte bei einer Threshold-Line von 90,00 sind in **Tab. 10** angeführt.

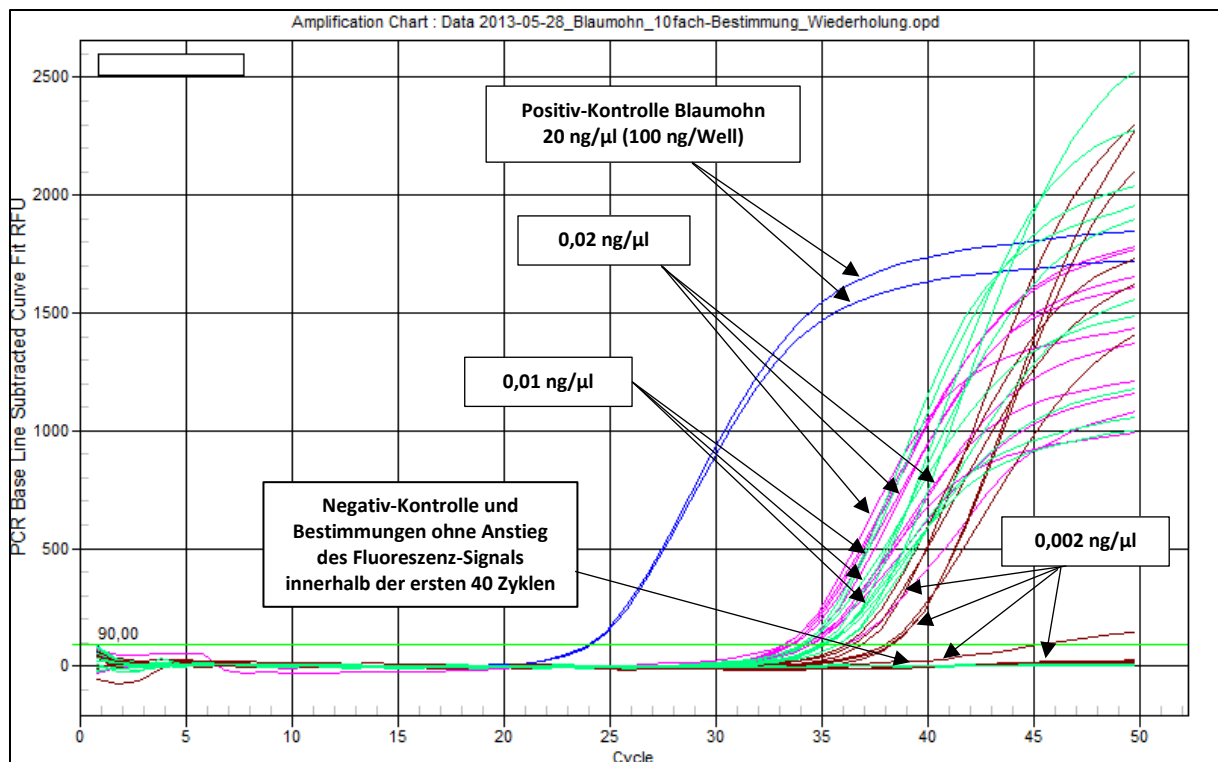


Abb. 8: PCR-Kurven für drei verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes (n=10): 0,02 ng/μl / 0,01 ng/μl / 0,002 ng/μl

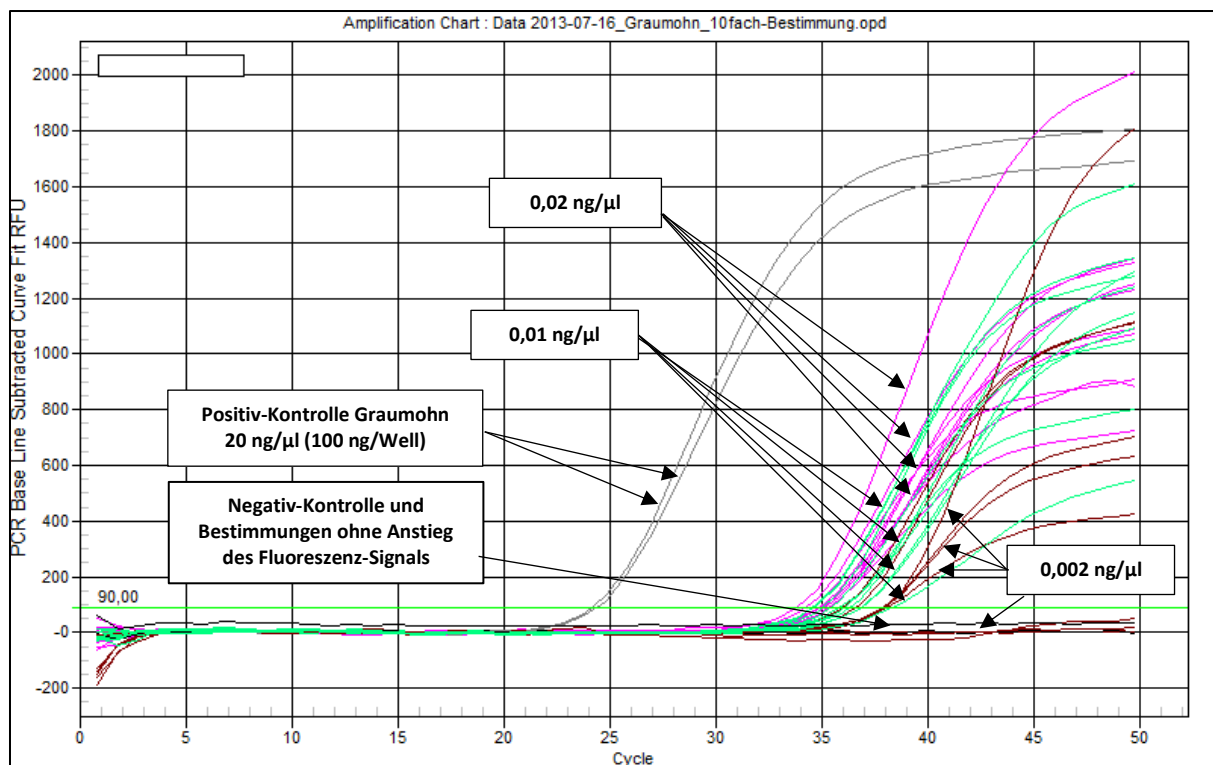


Abb. 9: PCR-Kurven für drei verschiedene Konzentrationen eines Graumohn-Extraktes (n=10): 0,02 ng/μl / 0,01 ng/μl / 0,002 ng/μl

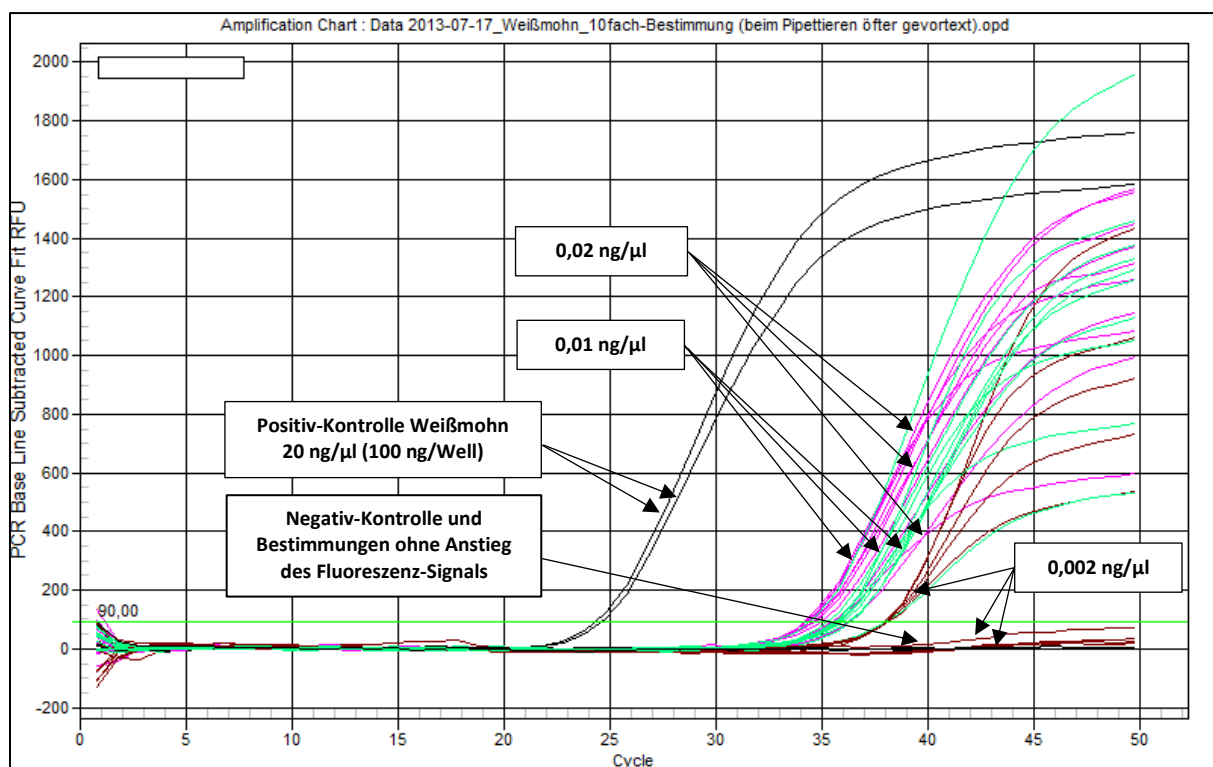


Abb. 10: PCR-Kurven für drei verschiedene Konzentrationen eines Weißmohn-Extraktes (n=10): 0,02 ng/μl / 0,01 ng/μl / 0,002 ng/μl

Tab. 10: C_T-Werte von Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakten (Threshold-Line: 90,00)
n.d. nicht detektiert (kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals innerhalb der ersten 40 Zyklen)
k.B.: Keine Berechnung, da kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals bei > 95 % der Bestimmungen
- nicht durchgeführt

	Konzentration 0,02 ng/µl (0,1 ng/Well)	Konzentration 0,01 ng/µl (0,05 ng/Well)	Konzentration 0,002 ng/µl (0,01 ng/Well)	Positiv-Kontrolle 20 ng/µl (100 ng/Well)
Blaumohn				
C _T -Wert 1	33,13	33,96	36,08	24,00
C _T -Wert 2	33,21	34,12	36,42	24,13
C _T -Wert 3	33,52	34,16	36,89	-
C _T -Wert 4	33,61	34,87	37,97	-
C _T -Wert 5	34,00	35,02	38,21	-
C _T -Wert 6	34,26	35,05	38,30	-
C _T -Wert 7	34,39	35,16	n.d.	-
C _T -Wert 8	34,49	35,19	n.d.	-
C _T -Wert 9	34,51	35,79	n.d.	-
C _T -Wert 10	36,17	35,81	n.d.	-
Mittelwert	34,13	34,91	k.B.	24,07
Graumohn				
C _T -Wert 1	33,88	34,61	36,02	24,22
C _T -Wert 2	34,24	34,65	36,66	24,40
C _T -Wert 3	34,62	35,06	37,91	-
C _T -Wert 4	34,96	35,44	37,95	-
C _T -Wert 5	34,96	35,87	37,99	-
C _T -Wert 6	34,97	36,07	38,11	-
C _T -Wert 7	35,09	36,32	n.d.	-
C _T -Wert 8	35,11	36,94	n.d.	-
C _T -Wert 9	35,37	36,95	n.d.	-
C _T -Wert 10	35,43	38,39	n.d.	-
Mittelwert	34,86	36,03	k.B.	24,31
Weißmohn				
C _T -Wert 1	34,17	34,37	37,96	24,29
C _T -Wert 2	34,21	35,24	38,01	24,57
C _T -Wert 3	34,23	35,54	38,03	
C _T -Wert 4	34,43	35,65	38,10	
C _T -Wert 5	34,60	35,80	38,15	
C _T -Wert 6	34,63	35,87	n.d.	
C _T -Wert 7	34,97	35,93	n.d.	
C _T -Wert 8	35,45	36,16	n.d.	
C _T -Wert 9	35,53	36,32	n.d.	
C _T -Wert 10	36,25	38,00	n.d.	
Mittelwert	34,85	35,89	k.B.	24,43

Wie man **Tab. 10** entnehmen kann, wurde bei den Extrakten aller drei Mohn-Sorten bei den Konzentrationen von 0,02 ng/μl und 0,01 ng/μl jeweils bei allen zehn Bestimmungen ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet. Bei der niedrigsten Konzentration von 0,002 ng/μl wurde bei den Blaumohn- und Graumohn-Extrakten jeweils bei sechs von zehn Bestimmungen und beim Weißmohn-Extrakt bei fünf von zehn Bestimmungen ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals gemessen.

Die **Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD)** des Real-Time PCR-Assays zum Nachweis von Mohn-DNA lag daher für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn bei jeweils **0,01 ng/μl (0,05 ng Mohn-DNA)**.

4.2 Kreuzreaktivitäts-Tests

Um zu untersuchen, ob der Real-Time PCR-Assay spezifisch für Mohn war, oder ob auch bei Lebensmittel-Extrakten aus anderen biologischen Spezies ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals zu beobachten war, wurden mittels Real-Time PCR Kreuzreaktivitäts-Tests mit insgesamt 22 verschiedenen Lebensmitteln, 21 pflanzlichen Spezies sowie Backhefe, durchgeführt:

Getreide-Arten: Dinkel, Roggen, Weizen, Reis

Nuss-Arten: Haselnuss, Walnuss, Pinie, Muskat, Pistazie

Gemüse-Arten: Karotte, Kartoffel, Ingwer, Rote Linse, Mais

Frucht-Arten: Weintraube, Zitrone, Johannisbeere, Pflaume, Mandel

Gewürz-Arten: Vanille, Zimt

Einzelliger Pilz: Backhefe

Es wurden für die Kreuzreaktivitäts-Tests Lebensmittelbestandteile ausgewählt, welche häufig neben Mohn in kommerziell erhältlichen Mohn-Produkten (z.B. Mohn-Kuchen, Mohn-Kipferl, Mohn-Strudel, usw.) enthalten sind. Die Produktnamen der für die Kreuzreaktivitäts-Tests verwendeten Lebensmittel und deren Herstellerfirmen, die verwendeten mechanischen Methoden und die DNA-Extraktionsmethoden sind im Kapitel 6.1.3.2 aufgelistet.

Aus den genannten Lebensmitteln wurde mit der CTAB-Methode bzw. bei manchen Lebensmitteln zusätzlich mit dem QIAamp DNA Mini Kit DNA extrahiert, und mit denjenigen Extrakten, welche sich aufgrund der photometrisch gemessenen DNA-Konzentration und Reinheit als geeignet herausstellten, wurde eine Real-Time PCR durchgeführt.

Dabei wurden eine DNA-Konzentration der Extrakte von mindestens 10 ng/μl sowie ein A_{260}/A_{280} -Wert von 1,8-2,0 mit geringfügigen Abweichungen nach unten oder oben als erforderliche Kriterien für den Einsatz in der Real-Time PCR betrachtet.

4.2.1 Ergebnisse der photometrischen Messungen der DNA-Extrakte

4.2.1.1 Konzentration und Reinheit der Extrakte der 1. Extraktion (CTAB-Methode)

Zunächst wurde unter Anwendung der CTAB-Methode in einer ersten Extraktion in jeweils mindestens zwei Parallel-Ansätzen DNA aus den folgenden Lebensmitteln extrahiert:

Getreide:	Dinkelmehl, Roggenvollkornmehl, Weizenmehl, Reis
Nüsse:	Haselnuss, Walnuss, Pinienkern, Muskatnuss (gemahlen), Pistazie
Gemüse:	Karotte (roh), Kartoffel (roh), Ingwer (Knolle), Rote Linse, Maisstärke
Früchte:	Rosine, Zitrone, Ribisel- Konfitüre , Pflaumen mus , Mandel
Gewürze:	Vanillezucker , Zimt (gemahlen)
Einzelliger Pilz:	Backhefe (Germ)

Die Ergebnisse der photometrischen Messungen der mit der CTAB-Methode erhaltenen DNA-Extrakte aus der ersten Extraktion sind in **Tab. 11** aufgelistet:

Tab. 11: Konzentration und Reinheit der Extrakte der 1. Extraktion (CTAB-Methode)

^a Bei beiden Extrakten wurde bei der photometrischen Messung das gleiche Ergebnis erhalten

- Keine mechanische Methode verwendet

< LOD: DNA-Konzentration < LOD

n.d.: Kein Messergebnis erhalten, da die DNA-Konzentration < LOD

k.B.¹: Keine Berechnung des Mittelwertes aufgrund sehr stark voneinander abweichender Einzelwerte; Angabe der Einzelwerte

k.B.²: Keine Berechnung des Mittelwertes, da die Messung teilweise negative Werte ergab

Lebensmittel	Mechanische Methode	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
GETREIDE				
Dinkelmehl				
1. Extrakt	-	CTAB	315,8	1,90
2. Extrakt	-	CTAB	k.B. ¹ 32,6 / 211,7 / 212,0 / 213,7 / 4039,6	1,89
Roggenvollkornmehl				
1. Extrakt	-	CTAB	365,7	1,98
2. Extrakt	-	CTAB	268,6	1,94
Weizenmehl				
1. Extrakt	-	CTAB	99,1	1,84
2. Extrakt	-	CTAB	67,2	1,85
Reis				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	22,0	2,00
2. Extrakt	Mörser	CTAB	3,9	2,45
NÜSSE				
Haselnuss				
1. Extrakt	-	CTAB	19,1	2,06
2. Extrakt	-	CTAB	11,6	2,00

Tab. 11: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Walnuss				
1. Extrakt	-	CTAB	18,7	1,10
2. Extrakt	-	CTAB	45,0	1,16
3. Extrakt	-	CTAB	14,8	2,33
4. Extrakt	-	CTAB	< LOD	n.d.
Pinienkern				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	153,7	1,89
2. Extrakt	Mörser	CTAB	93,6	1,85
Muskatnuss (gemahlen)				
1. Extrakt	-	CTAB	7,3	2,10
2. Extrakt	-	CTAB	6,9	1,95
Pistazie				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	116,5	1,98
1. Extrakt	Mörser	CTAB	57,9	1,94
GEMÜSE				
Karotte (roh)				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	8,3	2,25
2. Extrakt	Mörser	CTAB	3,6	2,68
Kartoffel (roh)				
1. und 2. Extrakt ^a	-	CTAB	< LOD	n.d.
Ingwer (Knolle)				
1. und 2. Extrakt ^a	Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Rote Linse				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	48,7	1,96
2. Extrakt	Mörser	CTAB	43,4	1,99
Maisstärke				
1. Extrakt	-	CTAB	0,8	k.B. ²
2. Extrakt	-	CTAB	0,97	k.B. ²
FRÜCHTE				
Rosine				
1. und 2. Extrakt ^a	-	CTAB	< LOD	n.d.
Zitrone				
1. Extrakt	-	CTAB	1,0	6,50
2. Extrakt	-	CTAB	0,8	k.B. ²
Ribisel-Konfitüre				
1. Extrakt	-	CTAB	1,1	4,17
2. Extrakt	-	CTAB	0,85	k.B. ²
Pflaumenmus				
1. Extrakt	-	CTAB	2,2	1,74
2. Extrakt	-	CTAB	3,3	1,48
Mandel				
1. Extrakt	-	CTAB	30,3	1,71
2. Extrakt	-	CTAB	50,0	1,85

Tab. 11: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A_{260}/A_{280}
GEWÜRZE				
Vanillezucker				
1. und 2. Extrakt ^a	-	CTAB	< LOD	n.d.
Zimt (gemahlen)				
1. Extrakt	-	CTAB	0,98	92,80
2. Extrakt	-	CTAB	0,7	k.B. ²
EINZELLIGER PILZ				
Backhefe (Germ)				
1. Extrakt	-	CTAB	112,7	1,84
2. Extrakt	-	CTAB	148,9	1,83

Wie man anhand von **Tab. 11** erkennen kann, konnte aus einigen Lebensmitteln mittels der CTAB-Methode DNA in der geforderten Konzentration und Reinheit gewonnen werden, so beim **Dinkelmehl**, **Roggenvollkornmehl**, **Weizenmehl** und **Reis**, bei der **Haselnuss**, der **Walnuss**, dem **Pinienkern**, der **Pistazie**, der **Roten Linse**, der **Mandel** und der **Backhefe**. Die Mittelwerte der DNA-Konzentrationen bzw. die Mittelwerte der A_{260}/A_{280} -Werte aller Extrakte, welche für die Verwendung in einer Real-Time PCR geeignet waren, sind in **Tab. 11** fett gedruckt dargestellt.

Aus einigen Lebensmitteln wurde keine DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit erhalten: bei der *Muskatnuss (gemahlen)*, der *Karotte (roh)*, der *Kartoffel (roh)*, beim *Ingwer (Knolle)*, bei der *Maisstärke*, der *Rosine*, der *Zitrone*, der *Ribisel-Konfitüre*, beim *Pflaumenmus*, beim *Vanillezucker* und beim *Zimt (gemahlen)*. Daher wurde in einer zweiten Extraktion mit der CTAB-Methode noch einmal versucht, DNA aus diesen Lebensmitteln zu extrahieren.

4.2.1.2 Konzentration und Reinheit der Extrakte der 2. Extraktion (CTAB-Methode)

Diejenigen Lebensmittel, aus welchen in der ersten Extraktion keine DNA in der geforderten Qualität gewonnen werden konnte, wurden vor der zweiten Extraktion speziell bearbeitet oder in einer anderen Form eingesetzt:

So wurde statt der Muskatnuss (gemahlen) eine **Muskatnuss (ganz)** mit einem Reibeisen gerieben und anschließend in einem Mörser mechanisch zerkleinert, die **Karotte** und die **Kartoffel** wurden nicht roh eingesetzt, sondern vor der Extraktion gekocht, es wurde statt einer Ingwer-Knolle ein im Lebensmittelhandel erhältliches **Ingwerpulver** verwendet, und es wurden statt der Maisstärke **Maiskörner** eingesetzt, die in dem Mörser mechanisch zerkleinert wurden. Die **Rosine** und das Fruchtfleisch der **Zitrone** wurden jeweils zunächst in Wasser eingeweicht und schließlich in einem Mörser zerkleinert, statt der Ribisel-Konfitüre wurden tiefgefrorene **Ribisel-Früchte** zunächst aufgetaut und anschließend in einem Mörser

mechanisch zerkleinert, und statt dem Pflaumenmus wurden **Dörripflaumen** verwendet, welche in Wasser eingeweicht und ebenfalls in einem Mörser mechanisch zerkleinert wurden. Anstelle der Verwendung von Vanillezucker wurde eine **Vanilleschote** mit einem Messer der Länge nach aufgeschnitten und es wurden mit Hilfe eines Spatels die weichen, inneren Anteile abgeschabt, und es wurde statt dem gemahlenden Zimtpulver eine **Zimt-Stange** eingesetzt, welche zunächst in Wasser eingeweicht, anschließend mit einem Reibeisen gerieben und danach in einem Mörser mechanisch zerkleinert wurde.

Tab. 12 zeigt die Ergebnisse der photometrischen Messungen der Extrakte aus der zweiten Extraktion:

Tab. 12: Konzentration und Reinheit der Extrakte der 2. Extraktion (CTAB-Methode)

^a Bei beiden Extrakten wurde bei der photometrischen Messung das gleiche Ergebnis erhalten

- Keine mechanische Methode verwendet

< LOD: DNA-Konzentration < LOD

n.d.: Kein Messergebnis erhalten, da die DNA-Konzentration < LOD

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
NÜSSE				
Muskatnuss (ganz)				
1. und 2. Extrakt ^a	Reibeisen, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
GEMÜSE				
Karotte (gekocht)				
1. Extrakt	-	CTAB	7,7	2,37
2. Extrakt	-	CTAB	11,3	2,37
Kartoffel (gekocht)				
1. Extrakt	-	CTAB	2,2	3,55
2. Extrakt	-	CTAB	4,5	1,91
Ingwerpulver				
1. Extrakt	-	CTAB	9,6	1,35
2. Extrakt	-	CTAB	11,4	1,22
Maiskorn				
1. und 2. Extrakt ^a	Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
FRÜCHTE				
Rosine				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Zitrone				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Ribiselfrucht (tiefgefroren)				
1. und 2. Extrakt ^a	Auftauen, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Dörripflaume				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.

Tab. 12: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A_{260}/A_{280}
GEWÜRZE				
Vanilleschote				
1. Extrakt	Messer, Spatel	CTAB	1,9	2,00
2. Extrakt	Messer, Spatel	CTAB	2,8	1,77
Zimtstange				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Reibeisen, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.

Wie man anhand von **Tab. 12** erkennen kann, gab es nur zwei Extrakte, welche die geforderte Konzentration aufwiesen, das Ingwerpulver sowie die Karotte (gekocht), beide Extrakte zeigten jedoch beim A_{260}/A_{280} -Verhältnis keinen idealen Wert, insbesondere der Extrakt aus dem Ingwerpulver. Alle restlichen Extrakte waren von der Konzentration bzw. von der Reinheit her nicht für den Einsatz in einer Real-Time PCR geeignet. Der nächste Schritt bestand deshalb darin, in einer dritten Extraktion zu versuchen, mit Hilfe weiterer mechanischer Bearbeitungsmethoden sowie mit dem QIAamp DNA Mini Kit aus den betreffenden Lebensmitteln eine ausreichende Menge an DNA zu extrahieren.

4.2.1.3 Konzentration und Reinheit der Extrakte der 3. Extraktion (CTAB, QIAamp DNA Mini Kit)

In einer dritten Extraktion wurde aus zwei Lebensmitteln noch einmal mit der CTAB-Methode DNA extrahiert, wobei die Lebensmittel wieder anders als zuvor bearbeitet wurden oder in einer anderen Form eingesetzt wurden: Es wurde anstatt der Kartoffelknolle **Kartoffel-Stärkemehl** verwendet und die **Vanilleschote** wurde zunächst in Wasser eingeweicht, schließlich der Länge nach aufgeschnitten und der Inhalt mit einem Spatel entnommen. Weiters wurde aus denjenigen Lebensmitteln in **Tab. 12**, für welche keine ausreichende DNA-Konzentration erzielt wurde, versucht, DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit zu gewinnen. Dazu wurden manche Lebensmittel noch einer zusätzlichen mechanischen Bearbeitung (Kenwood-Mixer, Ultra-Turrax (Hochleistungs-Dispergiergerät)) ausgesetzt.

Die mechanischen Methoden, die Extraktionsmethoden und die Konzentration und Reinheit der Extrakte der dritten Extraktion sind in **Tab. 13** angeführt und die Ergebnisse werden im Kapitel 4.2.1.4 bei der Zusammenfassung und Diskussion aller Ergebnisse beschrieben.

Tab. 13: Konzentration und Reinheit der Extrakte der 3. Extraktion (CTAB, DNA Mini Kit)^a Bei beiden Extrakten wurde bei der photometrischen Messung das gleiche Ergebnis erhalten

- Keine mechanische Methode verwendet

< LOD: DNA-Konzentration < LOD

n.d.: Kein Messergebnis erhalten, da die DNA-Konzentration < LOD

k.B.¹: Keine Berechnung des Mittelwertes aufgrund sehr stark voneinander abweichender Einzelwerte; Angabe der Einzelwertek.B.²: Keine Berechnung des Mittelwertes, da die Messung teilweise negative Werte ergab

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
NÜSSE				
Muskatnuss (gemahlen)				
1. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	12,5	1,87
2. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	15,9	1,98
GEMÜSE				
Kartoffel-Stärkemehl				
1. Extrakt	-	CTAB	< LOD	n.d.
2. Extrakt	-	CTAB	< LOD	n.d.
Kartoffel (roh)				
1. Extrakt	Reibeisen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	11,2	1,82
2. Extrakt	Reibeisen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	10,1	1,96
Maiskorn (Dose)				
1. Extrakt	Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	10,5	1,86
2. Extrakt	Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	11,0	1,96
FRÜCHTE				
Rosine				
1. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	32,8	1,15
2. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	32,0	1,16
Rosine				
1. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	15,7	1,25
2. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	3,0	1,61
Zitrone (Fruchtfleisch und Schale)				
1. Extrakt	Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	6,8	2,18
2. Extrakt	Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	11,0	1,91
Ribiselfrucht				
1. Extrakt	Auftauen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	k.B. ²	k.B. ²
2. Extrakt	Auftauen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	15,6	1,71
Dörrpflaume				
1. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	55,4	1,11
2. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	60,2	1,14
Dörrpflaume				
1. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	146,6	1,41
2. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	k.B. ²	1,41

Tab. 13: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
GEWÜRZE				
Vanilleschote				
1. Extrakt	H ₂ O, Spatel	CTAB	1,7	k.B. ²
2. Extrakt	H ₂ O, Spatel	CTAB	< LOD	n.d.
Vanilleschote				
1. Extrakt	Messer, Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	19,5	1,09
2. Extrakt	Messer, Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	7,9	1,40
Vanilleschote				
1. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	14,7	1,19
2. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	10,3	1,18
Zimt (gemahlen)				
1. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	26,6	0,85
2. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	k.B. ¹ 14,2 / 68,0 / 68,3	k.B. ²
Zimtstange				
1. Extrakt	H ₂ O, Ultra-Turrax, Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	18,9	1,42
2. Extrakt	H ₂ O, Ultra-Turrax, Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	18,2	0,69

4.2.1.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der drei Extraktionen

In **Tab. 14** sind alle Lebensmittel, aus welchen DNA mit der CTAB-Methode und mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert wurde, aufgelistet.

Tab. 14 ist nach den Lebensmitteln geordnet, um einen Vergleich zu ermöglichen, welche mechanischen Bearbeitungsmethoden bzw. welche Extraktionsmethoden bei einem bestimmten Lebensmittel zu einer höheren DNA-Konzentration beitrugen.

Tab. 14: Konzentration und Reinheit aller Extrakte (CTAB-Methode, QIAamp DNA Mini Kit)

^a Bei beiden Extrakten wurde bei der photometrischen Messung das gleiche Ergebnis erhalten

- Keine mechanische Methode verwendet

< LOD: DNA-Konzentration < LOD

n.d.: Kein Messergebnis erhalten, da die DNA-Konzentration < LOD

k.B.¹: Keine Berechnung des Mittelwertes aufgrund sehr stark voneinander abweichender Einzelwerte; Angabe der Einzelwerte

k.B.²: Keine Berechnung des Mittelwertes, da die Messung teilweise negative Werte ergab

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
GETREIDE				
Dinkelmehl				
1. Extrakt	-	CTAB	315,8	1,90
2. Extrakt	-	CTAB	k.B. ¹ 32,6 / 211,7 / 212,0 / 213,7 / 4039,6	1,89

Tab. 14: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A₂₆₀/A₂₈₀
Roggenvollkornmehl				
1. Extrakt	-	CTAB	365,7	1,98
2. Extrakt	-	CTAB	268,6	1,94
Weizenmehl				
1. Extrakt	-	CTAB	99,1	1,84
2. Extrakt	-	CTAB	67,2	1,85
Reis				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	22,0	2,00
2. Extrakt	Mörser	CTAB	3,9	2,45
NÜSSE				
Haselnuss				
1. Extrakt	-	CTAB	19,1	2,06
2. Extrakt	-	CTAB	11,6	2,00
Walnuss				
1. Extrakt	-	CTAB	18,7	1,10
2. Extrakt	-	CTAB	45,0	1,16
3. Extrakt	-	CTAB	14,8	2,33
4. Extrakt	-	CTAB	< LOD	n.d.
Pinienkern				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	153,7	1,89
2. Extrakt	Mörser	CTAB	93,6	1,85
Muskatnuss (gemahlen)				
1. Extrakt	-	CTAB	7,3	2,10
2. Extrakt	-	CTAB	6,9	1,95
Muskatnuss (ganz)				
1. und 2. Extrakt ^a	Reibeisen, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Muskatnuss (gemahlen)				
1. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	12,5	1,87
2. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	15,9	1,98
Pistazie				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	116,5	1,98
1. Extrakt	Mörser	CTAB	57,9	1,94
GEMÜSE				
Karotte (roh)				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	8,3	2,25
2. Extrakt	Mörser	CTAB	3,6	2,68
Karotte (gekocht)				
1. Extrakt	-	CTAB	7,7	2,37
2. Extrakt	-	CTAB	11,3	2,37
Kartoffel (roh)				
1. und 2. Extrakt ^a	-	CTAB	< LOD	n.d.

Tab. 14: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A₂₆₀/A₂₈₀
Kartoffel (gekocht)				
1. Extrakt	-	CTAB	2,2	3,55
2. Extrakt	-	CTAB	4,5	1,91
Kartoffel-Stärkemehl				
1. Extrakt	-	CTAB	< LOD	n.d.
2. Extrakt	-	CTAB	< LOD	n.d.
Kartoffel (roh)				
1. Extrakt	Reibeisen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	11,2	1,82
2. Extrakt	Reibeisen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	10,1	1,96
Ingwer (Knolle)				
1. und 2. Extrakt ^a	Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Ingwerpulver				
1. Extrakt	-	CTAB	9,6	1,35
2. Extrakt	-	CTAB	11,4	1,22
Rote Linse				
1. Extrakt	Mörser	CTAB	48,7	1,96
2. Extrakt	Mörser	CTAB	43,4	1,99
Maisstärke				
1. Extrakt	-	CTAB	0,8	k.B. ²
2. Extrakt	-	CTAB	0,97	k.B. ²
Maiskorn				
1. und 2. Extrakt ^a	Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Maiskorn				
1. Extrakt	Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	10,5	1,86
2. Extrakt	Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	11,0	1,96
FRÜCHTE				
Rosine				
1. und 2. Extrakt ^a	-	CTAB	< LOD	n.d.
Rosine				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Rosine				
1. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	32,8	1,15
2. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	32,0	1,16
Rosine				
1. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	15,7	1,25
2. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	3,0	1,61
Zitrone				
1. Extrakt	-	CTAB	1,0	6,50
2. Extrakt	-	CTAB	0,8	k.B. ²
Zitrone				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.

Tab. 14: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A₂₆₀/A₂₈₀
Zitrone (Fruchtfleisch + Schale)				
1. Extrakt	Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	6,8	2,18
2. Extrakt	Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	11,0	1,91
Ribisel-Konfitüre				
1. Extrakt	-	CTAB	1,1	4,17
2. Extrakt	-	CTAB	0,85	k.B. ²
Ribiselfrucht (tiefgefroren)				
1. und 2. Extrakt ^a	Auftauen, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Ribiselfrucht (tiefgefroren)				
1. Extrakt	Auftauen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	k.B. ²	k.B. ²
2. Extrakt	Auftauen, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	15,6	1,71
Pflaumenmus				
1. Extrakt	-	CTAB	2,2	1,74
2. Extrakt	-	CTAB	3,3	1,48
Dörrpflaume				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Dörrpflaume				
1. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	55,4	1,11
2. Extrakt	H ₂ O, Mörser	QIAamp DNA Mini Kit	60,2	1,14
Dörrpflaume				
1. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	146,6	1,41
2. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	k.B. ²	1,41
Mandel				
1. Extrakt	-	CTAB	30,3	1,71
2. Extrakt	-	CTAB	50,0	1,85
GEWÜRZE				
Vanillezucker				
1. und 2. Extrakt ^a	-	CTAB	< LOD	n.d.
Vanilleschote				
1. Extrakt	Messer, Spatel	CTAB	1,9	2,00
2. Extrakt	Messer, Spatel	CTAB	2,8	1,77
Vanilleschote				
1. Extrakt	H ₂ O, Messer, Spatel	CTAB	1,7	k.B. ²
2. Extrakt	H ₂ O, Messer, Spatel	CTAB	< LOD	n.d.
Vanilleschote				
1. Extrakt	Messer, Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	19,5	1,09
2. Extrakt	Messer, Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit	7,9	1,40
Vanilleschote				
1. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	14,7	1,19
2. Extrakt	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	10,3	1,18

Tab. 14: Fortsetzung

Lebensmittel	Mechanische Methode(n)	Extraktions-Methode	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Zimt (gemahlen)				
1. Extrakt	-	CTAB	0,98	92,80
2. Extrakt	-	CTAB	0,7	k.B. ²
Zimtstange				
1. und 2. Extrakt ^a	H ₂ O, Reibeisen, Mörser	CTAB	< LOD	n.d.
Zimt (gemahlen)				
1. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	26,6	0,85
2. Extrakt	-	QIAamp DNA Mini Kit	k.B. ¹ 14,2 / 68,0 / 68,3	k.B. ²
Zimtstange				
1. Extrakt	H ₂ O, Ultra-Turrax, Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	18,9	1,42
2. Extrakt	H ₂ O, Ultra-Turrax, Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit	18,2	0,69
EINZELLIGER PILZ				
Backhefe (Germ)				
1. Extrakt	-	CTAB	112,7	1,84
2. Extrakt	-	CTAB	148,9	1,83

Wie man **Tab. 14** entnehmen kann, konnte aus den vier untersuchten **Getreide-Sorten**, *Dinkelmehl*, *Roggenvollkornmehl*, *Weizenmehl* und *Reis*, mit der CTAB-Methode DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit gewonnen werden, und die höchste DNA-Ausbeute aller untersuchten Extrakte wurde mit 365,7 ng/µl beim Roggenvollkornmehl erzielt. Es waren daher bei allen vier Getreidesorten keine weiteren DNA-Extraktionen notwendig.

Auffällig war der Unterschied der DNA-Konzentrationen der Extrakte der drei Mehl-Sorten mit der DNA-Konzentration des Extraktes von Reis, welcher in einem Mörser mechanisch zerkleinert wurde. Es ließ sich erkennen, dass aus maschinell vorgemahlenen Lebensmitteln größere DNA-Mengen extrahiert werden konnten als aus einem händisch zerkleinerten Lebensmittel.

Was die **Nuss-Sorten** betraf, konnte bei der *Haselnuss*, der *Walnuss*, dem *Pinienkern* und der *Pistazie* mit der CTAB-Methode DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit extrahiert werden, nur bei der Walnuss lag der A₂₆₀/A₂₈₀-Wert mit 2,33 etwas oberhalb des idealen Bereiches, der Extrakt wurde jedoch, da die Abweichung von 2,0 nicht sehr groß war, trotzdem als geeignet für den Einsatz in der Real-Time PCR betrachtet. Daher waren bei den vier genannten Nuss-Sorten keine weiteren DNA-Extraktionen notwendig.

Die einzige Nuss-Sorte, bei welcher es nicht möglich war, mit der CTAB-Methode eine ausreichende Menge an DNA zu extrahieren, war die *Muskatnuss*. Hier wurde zunächst ein bereits gemahlenes Produkt verwendet und mit der CTAB-Methode DNA-Konzentrationen von weniger als 10 ng/µl erzielt, weshalb in einer weiteren CTAB-Extraktion versucht wurde, durch

das Reiben einer ganzen Muskatnuss mit Hilfe eines Reibeisens sowie einer anschließenden Zerkleinerung in einem Mörser die DNA-Ausbeute zu erhöhen.

Das Ergebnis der zweiten Extraktion war jedoch eine DNA-Konzentration, welche unterhalb der Nachweisgrenze lag, woraus man, so wie bei den Mehl-Sorten bereits beobachtet, schließen konnte, dass aus einem maschinell vorgemahlenen Produkt mehr DNA gewonnen werden konnte als aus einem händisch bearbeiteten Lebensmittel.

Ein Vergleich der Ergebnisse der zwei Extraktions-Methoden bei Verwendung des gleichen Produktes (Muskatnuss, gemahlen) zeigte, dass mit dem QIAamp DNA Mini Kit im Gegensatz zur CTAB-Methode eine ausreichende DNA-Konzentration und Reinheit erzielt werden konnte. Bei den **Gemüse-Sorten** ließ sich am Beispiel der *Karotte* beobachten, dass eine thermische Vorbehandlung durch das Kochen der Karotte im Vergleich zur Verwendung der rohen Karotte zu einer höheren DNA-Ausbeute führte, obwohl die gekochte Karotte keiner mechanischen Zerkleinerung unterzogen wurde, während die rohe Karotte mit einem Mörser bearbeitet wurde. Die Konsistenz eines Lebensmittels hatte also einen Einfluss auf die DNA-Ausbeute. Dies ließ sich auch bei der *Kartoffel* beobachten, da die mit der CTAB-Methode gewonnene DNA bei der rohen Kartoffel eine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze aufwies, während aus der gekochten Kartoffel zumindest geringe Mengen an DNA gewonnen werden konnten, welche jedoch nicht die notwendigen Anforderungen für die Real-Time PCR erfüllten. Die Extraktion von DNA aus dem Kartoffel-Stärkemehl mit der CTAB-Methode führte genauso wie die Extraktion aus der rohen Kartoffel zu einem Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze. Bei Verwendung des DNA Mini Kits konnte aus der rohen Kartoffel eine ausreichende DNA-Menge gewonnen werden, jedoch ließ sich keine Aussage darüber machen, ob dies an der Extraktionsmethode oder an der im Vergleich zur CTAB-Methode zusätzlichen mechanischen Bearbeitung mit einem Reibeisen und einem Mörser lag.

Beim *Ingwer* zeigte sich wieder, dass bei einem gemahlenen Lebensmittel eine größere DNA-Ausbeute erzielt werden konnte als bei einem händisch in einem Mörser zerkleinerten Lebensmittel, da beim Ingwerpulver die erforderliche DNA-Konzentration erreicht wurde, während diese bei der im Mörser zerkleinerten Ingwer-Knolle unterhalb der Nachweisgrenze lag, wobei beide Extraktionen mit der CTAB-Methode durchgeführt wurden.

Beim *Mais* zeigte sich im Vergleich der beiden Extraktions-Methoden, dass bei mechanischer Zerkleinerung in einem Mörser nur mit dem DNA Mini Kit eine ausreichende Konzentration und Reinheit erreicht werden konnte, während die DNA-Konzentration der Extrakte, welche mit der CTAB-Methode hergestellt wurden, unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Bei den **Früchten** ließ sich bei der *Rosine* das gleiche Ergebnis beobachten, da sich auch hier bei Verwendung der CTAB-Methode eine DNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze ergab, während mit dem DNA Mini Kit bei gleicher Bearbeitungsmethode DNA-Konzentrationen von 32,8 bzw. 32,0 ng/μl erreicht wurden. Überraschenderweise besaßen die

Extrakte der Rosinen, welche ebenfalls mit dem DNA Mini Kit hergestellt wurden, bei welchen die Rosinen jedoch statt mit einem Mörser mit einem Mixer zerkleinert wurden, mit 15,7 und 3,0 ng/µl geringere DNA-Konzentrationen.

Der Einfluss der Extraktionsmethode auf die DNA-Konzentration ließ sich ebenso bei der *Ribiselfrucht* und bei der *Dörrpflaume* beobachten, während bei der *Zitrone* keine Aussage darüber gemacht werden konnte, ob die höhere DNA-Konzentration bei Verwendung des DNA Mini Kits an der Extraktionsmethode oder an der zusätzlichen Verwendung der Zitronenschale lag. Bei der Dörrpflaume konnte bei gleicher mechanischer Bearbeitung mit Hilfe eines Mörsers nur mit dem DNA Mini Kit eine ausreichende DNA-Konzentration erzielt werden, während die DNA-Konzentration der Extrakte, welche mit der CTAB-Methode hergestellt wurden, unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Zusätzlich ließ sich bei Vergleich der zwei Extraktionen aus der Dörrpflaume, welche mit dem DNA Mini Kit durchgeführt wurden, der Einfluss der mechanischen Bearbeitung auf die DNA-Konzentration erkennen, da diese wie zu erwarten durch den Einsatz des Küchenmixers und die damit verbundene stärkere Zerkleinerung deutlich höher lag als bei der Verwendung eines Mörsers.

Was die untersuchten **Gewürze** betrifft, so führten bei der Vanille nur zwei von fünf und beim Zimt nur zwei von vier Extraktionen zu einer ausreichenden DNA-Konzentration. Wie man anhand von **Tab. 14** erkennen kann, führten bei der *Vanille* alle drei mit der CTAB-Methode durchgeführten Extraktionen zu keiner ausreichenden DNA-Konzentration, weder beim Vanillezucker noch bei Verwendung einer Vanilleschote unter Einsatz eines Messers und eines Spatels oder beim zusätzlichen Einweichen in Wasser. Mit dem DNA Mini Kit wurde bei beiden Extraktionen aus der Vanilleschote, welche einmal unter Verwendung eines Messers und eines Reibeisens und das zweite Mal mit Hilfe eines Küchenmixers bearbeitet wurde, eine ausreichende DNA-Konzentration erzielt.

Ob der Grund dafür die stärkere mechanische Bearbeitung der Vanilleschote oder die Extraktionsmethode war, ließ sich nicht mit Sicherheit sagen, da jedoch die Verwendung des DNA Mini Kits bei allen Lebensmitteln im Vergleich zur CTAB-Methode zu einer größeren DNA-Ausbeute führte, und da eine stärkere mechanische Bearbeitung in den meisten Fällen ebenfalls zu einer höheren DNA-Konzentration beitrug, hatten vermutlich beide Faktoren einen Einfluss auf die höhere DNA-Ausbeute.

Der Einfluss der Extraktionsmethode auf die DNA-Konzentration ließ sich auch beim *Zimt* beobachten, da sich aus dem gemahlenen Zimt nur mit dem DNA Mini Kit eine ausreichende DNA-Menge extrahieren ließ.

Die Vanilleschote und die Zimtstange waren die zwei schwierigsten Lebensmittel in Bezug auf die Bearbeitung, wobei die Zimtstange aufgrund ihrer Härte besonders schwer zu bearbeiten war. Erfolgreich war schließlich nur eine sehr starke mechanische Bearbeitung mit dem Ultra-

Turrax-Gerät sowie zusätzlich mit einem Küchenmixer, sodass schlussendlich 18,2 bzw. 18,9 ng/μl DNA erhalten wurden. Trotzdem enthielten die Extrakte aus dem gemahlenden Zimt aufgrund der stärkeren mechanischen Zerkleinerung eine höhere DNA-Konzentration als die Extrakte aus der mit dem Küchenmixer und dem Ultraturrax-Gerät zerkleinerten Zimtstange. Aus der Backhefe konnte mit der CTAB-Methode DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit gewonnen werden, sodass keine weiteren Extraktionen notwendig waren.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die CTAB-Methode in vielen Fällen zu Extrakten mit einer DNA-Konzentration von weniger als 10 ng/μl führte, während die meisten Extrakte, welche mit dem QIAamp DNA Mini Kit hergestellt wurden, eine ausreichende Konzentration für den Einsatz in der Real-Time PCR aufwiesen. Die **Wahl der Extraktionsmethode** besaß also einen großen Einfluss auf die erhaltene DNA-Konzentration, besonders bei „schwierigen“ Lebensmitteln.

Bei den folgenden Lebensmitteln war es nicht möglich, mit der CTAB-Methode eine ausreichende DNA-Menge zu extrahieren: *Muskatnuss, Kartoffel, Mais, Rosine, Zitrone, Ribisel, Pflaume, Vanille* und *Zimt*. Aus diesen Lebensmitteln konnten nur mit dem DNA Mini Kit Extrakte in der erforderlichen DNA-Konzentration hergestellt werden.

Trotzdem ließ sich auch mit der CTAB-Methode aus vielen Lebensmitteln DNA in ausreichender Konzentration gewinnen: aus dem Dinkelmehl, dem Roggenvollkornmehl, dem Weizenmehl, dem Reis, der Haselnuss, der Walnuss, dem Pinienkern, der Pistazie, der gekochten Karotte, dem Ingwerpulver, der roten Linse und der Backhefe.

Ein weiterer Faktor, welcher abgesehen von der Wahl der Extraktionsmethode zu einer höheren DNA-Konzentration beitrug, war die **mechanische Bearbeitung**, wobei besonders bei gemahlenden Lebensmitteln, aber auch bei Verwendung eines Küchenmixers anstelle eines Mörsers eine höhere DNA-Ausbeute zu beobachten war. Es ließ sich bis auf eine Ausnahme, welche die mit einem Küchenmixer zerkleinerten Rosinen im Vergleich zur Verwendung eines Mörsers betraf, feststellen, dass eine stärkere mechanische Zerkleinerung zu einer höheren DNA-Ausbeute führte.

Weiters ergaben sich durch die **thermische Bearbeitung** (Kochen des Lebensmittels) vor der Extraktion höhere DNA-Konzentrationen im Vergleich zum nicht gekochten Lebensmittel.

Was die Reinheit der Extrakte betraf, so lagen die A_{260}/A_{280} -Werte bei den Extrakten, welche durch Verwendung des DNA Mini Kits hergestellt wurden, in einigen Fällen zu niedrig und ließen sich auch nicht durch eine stärkere mechanische Bearbeitung erhöhen.

Trotzdem wurden alle Extrakte, welche eine DNA-Konzentration von mindestens 10 ng/μl aufwiesen, in der Real-Time PCR eingesetzt, sodass schließlich alle 22 untersuchten Lebensmittel in die Kreuzreaktivitäts-Tests einbezogen wurden. Dabei wurden alle Extrakte, welche eine DNA-Konzentration zwischen 10 und 20 ng/μl enthielten, unter Verwendung eines speziellen Pipettierschemas eingesetzt, welches im Kapitel 6.2.1.5 beschrieben ist.

4.2.2 Untersuchung der Kreuzreaktivität des Real-Time PCR-Assays

Es wurden 22 Lebensmittel, darunter 21 pflanzliche Lebensmittel (Dinkelmehl, Roggenvollkornmehl, Weizenmehl, Reis, Haselnuss, Walnuss, Pinienkern, Muskatnuss, Pistazie, Karotte, Kartoffel, Ingwer, Rote Linse, Mais, Rosine, Zitrone, Ribisel, Pflaume, Mandel, Vanille, Zimt) sowie Backhefe (Germ) mittels Real-Time PCR getestet.

Die PCR-Kurven der Kreuzreaktivitäts-Tests sind in **Abb. 11** und **Abb. 12** dargestellt:

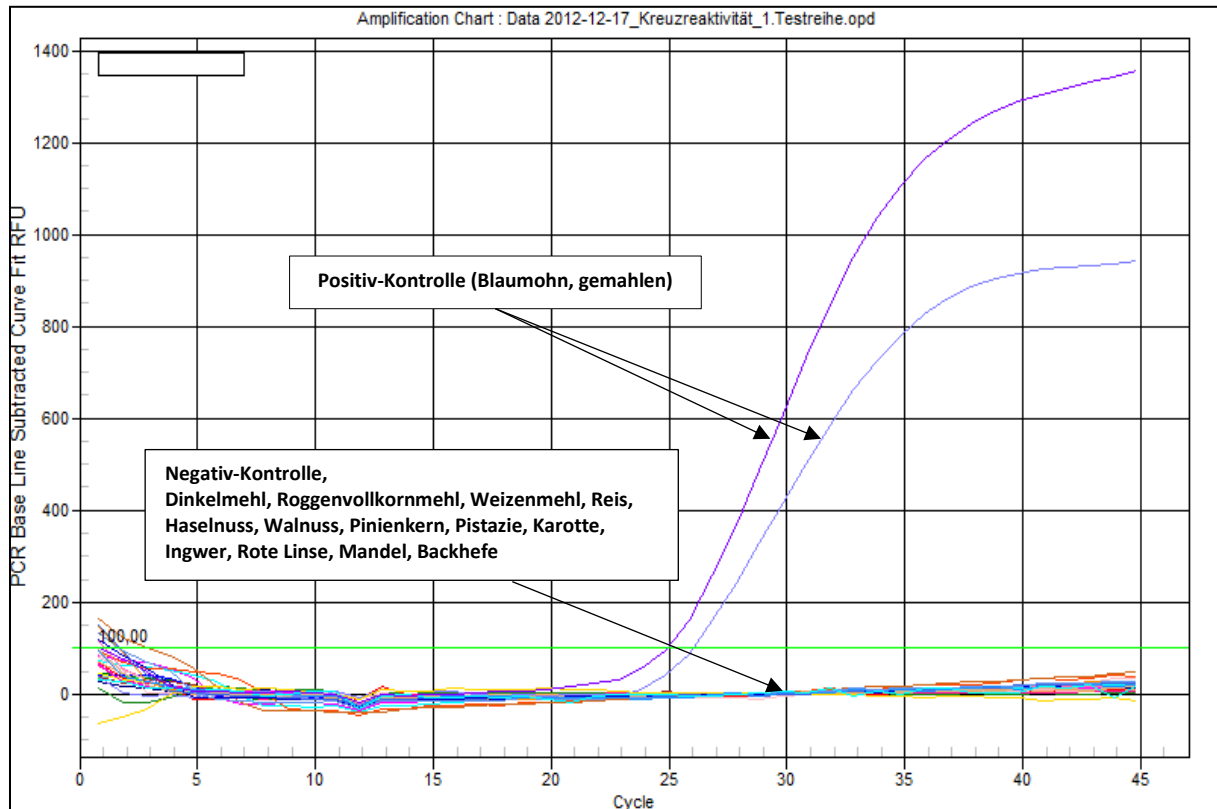


Abb. 11: Bei der Kreuzreaktivitätsbestimmung erhaltene Amplifikationskurven von: Blaumohn, gemahlen (Positiv-Kontrolle), Dinkelmehl, Roggenvollkornmehl, Weizenmehl, Reis, Haselnuss, Walnuss, Pinienkern, Pistazie, Karotte, Ingwer, Rote Linse, Mandel, Backhefe

Wie man in **Abb. 11** und **Abb. 12** erkennen kann, wurden nur für die Positiv-Kontrollen typische PCR-Kurven erhalten, während bei den Negativ-Kontrollen und bei allen 22 untersuchten Lebensmitteln kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet wurde. Obwohl beim PCR-Lauf in **Abb. 12** höhere Signale erhalten wurden und eine der beiden Kurven einen unregelmäßigen Verlauf besaß, konnte trotzdem gezeigt werden, dass die neun getesteten Lebensmittel-Extrakte zu keinem Anstieg des Fluoreszenz-Signals führten.

Es ließ sich daher feststellen, dass der Real-Time PCR-Assay keine Kreuzreaktion mit den 22 untersuchten Lebensmitteln aufwies, und es konnte somit gezeigt werden, dass der Real-Time PCR-Assay eine **Spezifität** für Mohn-DNA besaß.

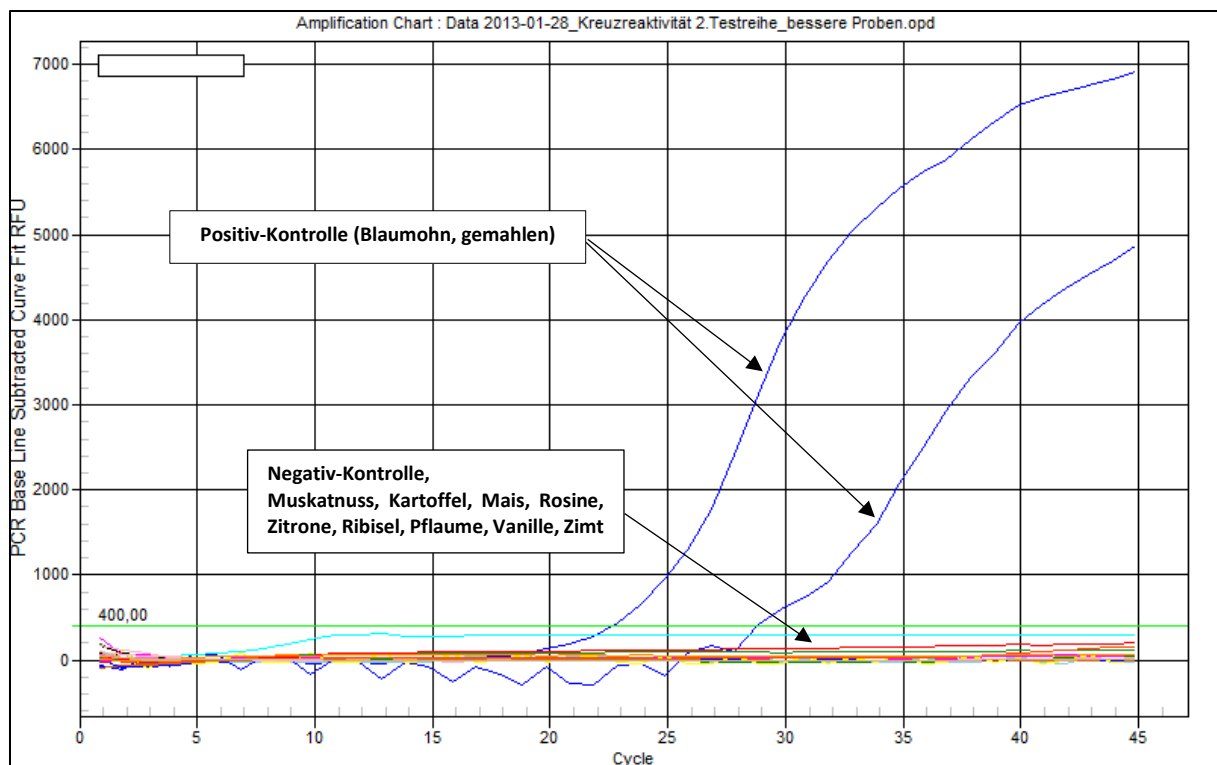


Abb. 12: Bei der Kreuzreaktivitätsbestimmung erhaltene Amplifikationskurven von: Blaumohn, gemahlen (Positiv-Kontrolle), Muskatnuss, Kartoffel, Mais, Rosine, Zitrone, Ribisel, Pflaume, Vanille, Zimt

4.3 Bestimmung der Nachweisgrenze und Effizienz in einem Modell-Lebensmittel

Für das Modell-Lebensmittel wurden aus einer Schokoladekuchen-Matrix Teige mit sieben verschiedenen Prozentgehalten an Blaumohn hergestellt, wobei folgende Konzentrationen an Blaumohn in den Basis-Teig eingearbeitet wurden: **0 %**, **0,0010 %**, **0,0050 %**, **0,010 %**, **0,050 %**, **0,10 %** und **0,50 %**. Die Herstellung der Teige (siehe Kapitel 6.1.3.3), insbesondere das Abwägen auf der Präzisionswaage, erforderte sehr viel Geduld und war sehr zeitaufwendig, da der klebrige Teig schwer zu dosieren war. Aus diesem Grund wurden Spritzen zur besseren Dosierbarkeit verwendet.

Aus den sieben verschiedenen rohen Teigen wurden mittels CTAB-Extraktion 14 verschiedene Extrakte in jeweils zwei Parallel-Ansätzen (insgesamt 28 Extrakte) hergestellt, sieben Extrakte aus den sieben rohen Teigen (insgesamt 14 Extrakte) und sieben Extrakte aus den sieben gebackenen Teigen (insgesamt 14 Extrakte). Die Herstellung der gebackenen Teige (Muffins) ist im Kapitel 6.1.3.3 beschrieben. Durch den Gewichtsverlust beim Backen ergaben sich für die Muffins folgende Konzentrationen an Blaumohn: **0,0012 %** (statt 0,0010 %), **0,0058 %** (statt 0,0050 %), **0,011 %** (statt 0,010 %), **0,059 %** (statt 0,050 %), **0,12 %** (statt 0,10 %) und **0,59 %** (statt 0,50 %).

Anschließend wurde eine photometrische Messung zur Ermittlung der Konzentration und Reinheit der Extrakte durchgeführt und die Extrakte wurden mittels Real-Time PCR analysiert, um die Nachweisgrenze und Effizienz des Real-Time PCR-Assays im Modell-Lebensmittel zu bestimmen.

4.3.1 Konzentration und Reinheit der Extrakte aus den rohen und gebackenen Teigen

In **Tab. 15** sind die Ergebnisse der photometrischen Messungen der Extrakte aus den rohen Teigen und den gebackenen Teigen (Muffins) angeführt:

Tab. 15: Konzentration und Reinheit der Extrakte aus den rohen und gebackenen Teigen

ROHER TEIG	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A_{260}/A_{280}
Roher Teig 1 (0 % Blaumohn)		
1. Extrakt	37,3	1,81
2. Extrakt	33,4	1,75
Roher Teig 2 (0,0010 % Blaumohn)		
1. Extrakt	21,0	1,80
2. Extrakt	30,5	1,79
Roher Teig 3 (0,0050 % Blaumohn)		
1. Extrakt	24,5	1,76
2. Extrakt	16,3	1,89
Roher Teig 4 (0,010 % Blaumohn)		
1. Extrakt	43,7	1,78
2. Extrakt	40,3	1,73
Roher Teig 5 (0,050 % Blaumohn)		
1. Extrakt	37,3	1,80
2. Extrakt	20,8	1,76
Roher Teig 6 (0,10 % Blaumohn)		
1. Extrakt	38,5	1,74
2. Extrakt	12,4	1,89
Roher Teig 7 (0,50 % Blaumohn)		
1. Extrakt	24,4	1,80
2. Extrakt	8,6	2,10
GEBACKENER TEIG (MUFFINS)		
Gebackener Teig 1 (0 % Blaumohn)		
1. Extrakt	16,0	1,79
2. Extrakt	15,2	1,70
Gebackener Teig 2 (0,0012 % Blaumohn)		
1. Extrakt	22,3	1,45
2. Extrakt	12,5	1,68

Tab. 15: Fortsetzung

GEBACKENER TEIG (MUFFINS)	Mittelwert Konzentration (ng/µl)	Mittelwert A_{260}/A_{280}
Gebackener Teig 3 (0,0058 % Blaumohn)		
1. Extrakt	22,6	1,58
2. Extrakt	14,9	1,63
Gebackener Teig 4 (0,011 % Blaumohn)		
1. Extrakt	53,9	1,44
2. Extrakt	21,3	1,11
Gebackener Teig 5 (0,059 % Blaumohn)		
1. Extrakt	22,4	1,50
2. Extrakt	20,4	1,57
Gebackener Teig 6 (0,12 % Blaumohn)		
1. Extrakt	22,9	1,69
2. Extrakt	17,4	1,58
Gebackener Teig 7 (0,59 % Blaumohn)		
1. Extrakt	24,2	1,49
2. Extrakt	27,9	1,54

Wie man anhand von **Tab. 15** erkennen kann, wiesen alle Extrakte abgesehen vom zweiten Extrakt des rohen Teiges mit einer Konzentration von 0,50 % Blaumohn die erforderliche Konzentration von mindestens 10 ng/µl auf. Was die Reinheit der Extrakte betraf, so fiel auf, dass die Extrakte aus den gebackenen Teigen zum Großteil Abweichungen (nach unten) im Vergleich zum idealen Wert von 1,8 bis 2,0 zeigten, was möglicherweise auf das Erhitzen während des Backvorgangs zurückzuführen war, während die A_{260}/A_{280} -Werte der Extrakte aus den rohen Teigen im idealen Bereich oder nur sehr geringfügig darunter oder darüber lagen. Die Extrakte aus den gebackenen Teigen wurden trotzdem als geeignet für den Einsatz in der Real-Time PCR betrachtet, da die Reinheit bei manchen Extrakten zwar nicht im idealen Bereich lag, da jedoch vermutet wurde, dass sich die Reinheit auch bei nochmaliger Extraktion nicht verbessern würde.

Schließlich wurden die sieben Extrakte aus den rohen Teigen und die sieben Extrakte aus den gebackenen Teigen mittels Real-Time PCR untersucht, wobei für jede Konzentration acht Parallel-Bestimmungen durchgeführt wurden.

4.3.2 C_T -Werte der Extrakte aus den rohen und gebackenen Teigen

Die C_T -Werte der sieben Extrakte aus den rohen Teigen und der sieben Extrakte aus den gebackenen Teigen, jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen an Blaumohn, sind in **Tab. 16** angeführt, wobei ein Vergleich der C_T -Werte, welche für die rohen und für die gebackenen Teige erhalten wurden, in Bezug auf die geringfügig unterschiedlichen Konzentrationen an enthaltenem Blaumohn möglich ist:

Tab. 16: C_T-Werte der acht Parallelbestimmungen der Extrakte aus den rohen Teigen und aus den gebackenen Teigen
n.d.: nicht detektiert (kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals)
k.B.: Keine Berechnung, da kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals bei > 95 % der Bestimmungen

ROHER TEIG	C_T-Werte	GEBACKENER TEIG (MUFFINS)	C_T-Werte
Roher Teig 1 (0 % Blaumohn)		Gebackener Teig 1 (0 % Blaumohn)	
1. - 8. Extrakt	n.d.	1. - 8. Extrakt	n.d.
Roher Teig 2 (0,0010 % Blaumohn)		Gebackener Teig 2 (0,0012 % Blaumohn)	
C _T -Wert 1	44,86	C _T -Wert 1	38,91
C _T -Wert 2	n.d.	C _T -Wert 2	39,27
C _T -Wert 3	n.d.	C _T -Wert 3	40,95
C _T -Wert 4	n.d.	C _T -Wert 4	n.d.
C _T -Wert 5	n.d.	C _T -Wert 5	n.d.
C _T -Wert 6	n.d.	C _T -Wert 6	n.d.
C _T -Wert 7	n.d.	C _T -Wert 7	n.d.
C _T -Wert 8	n.d.	C _T -Wert 8	n.d.
Mittelwert	k.B.	Mittelwert	k.B.
Roher Teig 3 (0,0050 % Blaumohn)		Gebackener Teig 3 (0,0058 % Blaumohn)	
C _T -Wert 1	37,70	C _T -Wert 1	36,43
C _T -Wert 2	38,67	C _T -Wert 2	36,59
C _T -Wert 3	39,43	C _T -Wert 3	36,97
C _T -Wert 4	39,50	C _T -Wert 4	37,00
C _T -Wert 5	39,54	C _T -Wert 5	37,12
C _T -Wert 6	n.d.	C _T -Wert 6	37,58
C _T -Wert 7	n.d.	C _T -Wert 7	37,69
C _T -Wert 8	n.d.	C _T -Wert 8	38,14
Mittelwert	k.B.	Mittelwert	37,19
Roher Teig 4 (0,010 % Blaumohn)		Gebackener Teig 4 (0,011 % Blaumohn)	
C _T -Wert 1	35,83	C _T -Wert 1	33,46
C _T -Wert 2	36,00	C _T -Wert 2	33,51
C _T -Wert 3	36,48	C _T -Wert 3	33,80
C _T -Wert 4	36,59	C _T -Wert 4	33,88
C _T -Wert 5	36,67	C _T -Wert 5	34,08
C _T -Wert 6	37,01	C _T -Wert 6	34,10
C _T -Wert 7	37,03	C _T -Wert 7	34,20
C _T -Wert 8	37,16	C _T -Wert 8	34,46
Mittelwert	36,60	Mittelwert	33,94

Tab. 16: Fortsetzung

ROHER TEIG	C_T- Werte	GEBACKENER TEIG (MUFFINS)	C_T- Werte
Roher Teig 5 (0,050 % Blaumohn)		Gebackener Teig 5 (0,059 % Blaumohn)	
C _T -Wert 1	33,95	C _T -Wert 1	32,50
C _T -Wert 2	33,99	C _T -Wert 2	32,68
C _T -Wert 3	34,06	C _T -Wert 3	32,75
C _T -Wert 4	34,25	C _T -Wert 4	32,78
C _T -Wert 5	34,27	C _T -Wert 5	32,84
C _T -Wert 6	34,43	C _T -Wert 6	32,87
C _T -Wert 7	35,16	C _T -Wert 7	33,06
C _T -Wert 8	35,28	C _T -Wert 8	33,08
Mittelwert	34,42	Mittelwert	32,82
Roher Teig 6 (0,10 % Blaumohn)		Gebackener Teig 6 (0,12 % Blaumohn)	
C _T -Wert 1	32,03	C _T -Wert 1	31,32
C _T -Wert 2	32,27	C _T -Wert 2	31,59
C _T -Wert 3	32,47	C _T -Wert 3	31,88
C _T -Wert 4	32,49	C _T -Wert 4	32,03
C _T -Wert 5	32,56	C _T -Wert 5	32,21
C _T -Wert 6	32,57	C _T -Wert 6	32,22
C _T -Wert 7	32,62	C _T -Wert 7	32,22
C _T -Wert 8	33,21	C _T -Wert 8	32,39
Mittelwert	32,53	Mittelwert	31,98
Roher Teig 7 (0,50 % Blaumohn)		Gebackener Teig 7 (0,59 % Blaumohn)	
C _T -Wert 1	30,18	C _T -Wert 1	27,96
C _T -Wert 2	30,24	C _T -Wert 2	27,97
C _T -Wert 3	30,35	C _T -Wert 3	28,05
C _T -Wert 4	30,50	C _T -Wert 4	28,07
C _T -Wert 5	30,72	C _T -Wert 5	28,11
C _T -Wert 6	30,76	C _T -Wert 6	28,14
C _T -Wert 7	30,82	C _T -Wert 7	28,27
C _T -Wert 8	31,88	C _T -Wert 8	28,28
Mittelwert	30,68	Mittelwert	28,11

Ein Vergleich der Mittelwerte der C_T-Werte, welche für die rohen und gebackenen Teige erhalten wurden, zeigte, dass die Extrakte aus den gebackenen Teigen generell zu niedrigeren C_T-Werten führten als die Extrakte aus den entsprechenden rohen Teigen. Weiters fiel auf, dass beim gebackenen Teig mit 0,0012 % Blaumohn bei drei der acht Parallel-Bestimmungen und beim rohen Teig mit 0,0010 % Blaumohn nur bei einer von acht Bestimmungen ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet wurde. Beim gebackenen Teig mit 0,0058 % Blaumohn konnte bei allen acht Bestimmungen und beim rohen Teig mit 0,0050 % Blaumohn nur bei fünf

von acht Bestimmungen ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet werden. Als mögliche Erklärung für die niedrigeren Mittelwerte der C_T -Werte sowie für die größere Anzahl an Bestimmungen mit einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals für die gebackenen Teige könnten die leicht erhöhten Konzentrationen an Blaumohn im gebackenen Teig dienen.

4.3.3 Nachweisgrenze und Effizienz des Real-Time PCR-Assays im Modell-Lebensmittel

Wie aus **Tab. 16** ersichtlich, lag die **Nachweisgrenze** im rohen Teig bei **0,01 % Mohn** sowie im **gebackenen Teig** bei **0,0058 % Mohn**. Es wurde schließlich anhand der erhaltenen C_T -Werte die Effizienz des Real-Time PCR-Assays in rohem und gebackenem Teig bestimmt, indem die C_T -Werte jeweils gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen wurden.

Abb. 13 zeigt die für den rohen Teig ermittelte Standardgerade, wobei aufgrund der Nachweisgrenze nur die vier höchsten Konzentrationen (0,5 / 0,1 / 0,05 / 0,01 % Blaumohn) einbezogen wurden:

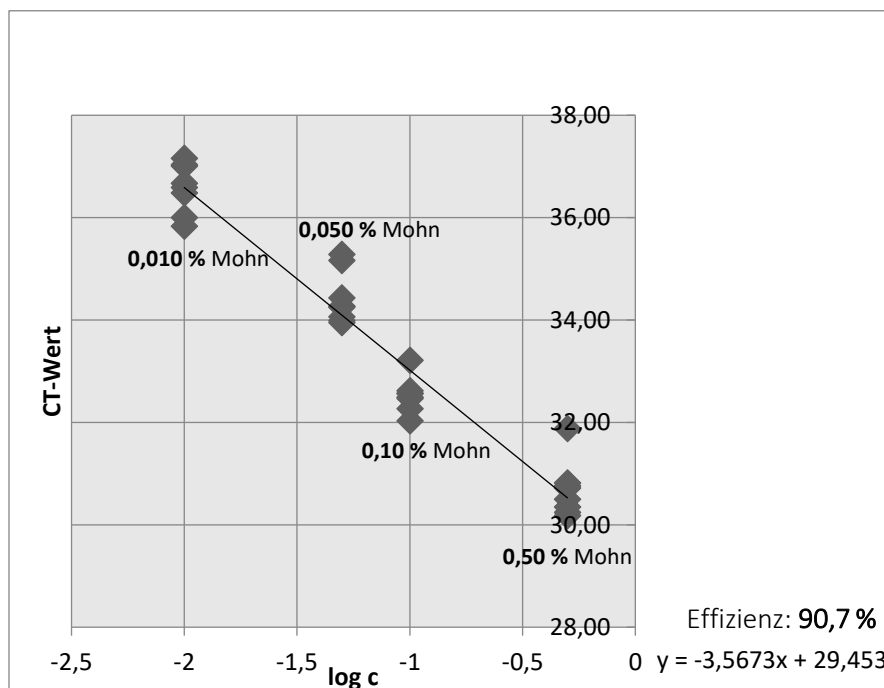


Abb. 13: Bestimmung der Effizienz des Real-Time PCR-Assays für Blaumohn in rohem Teig

Aus der Steigung der Standardgerade (-3,5673) wurde eine **Effizienz** des Real-Time PCR-Assays von **90,7 %** für Blaumohn in **rohem Teig** ermittelt.

Beim gebackenen Teig konnte aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenze von 0,0058 % auch diese Konzentration in die Standardgerade einbezogen werden, sodass die fünf höchsten Konzentrationen (0,59 / 0,12 / 0,059 / 0,011 / 0,0058 % Blaumohn) zur Ermittlung der Effizienz herangezogen wurden.

Abb. 14 zeigt die Standardgerade, welche durch Auftragen der C_T -Werte der Extrakte aus dem gebackenen Teig gegen den Logarithmus der Konzentrationen ermittelt wurde:

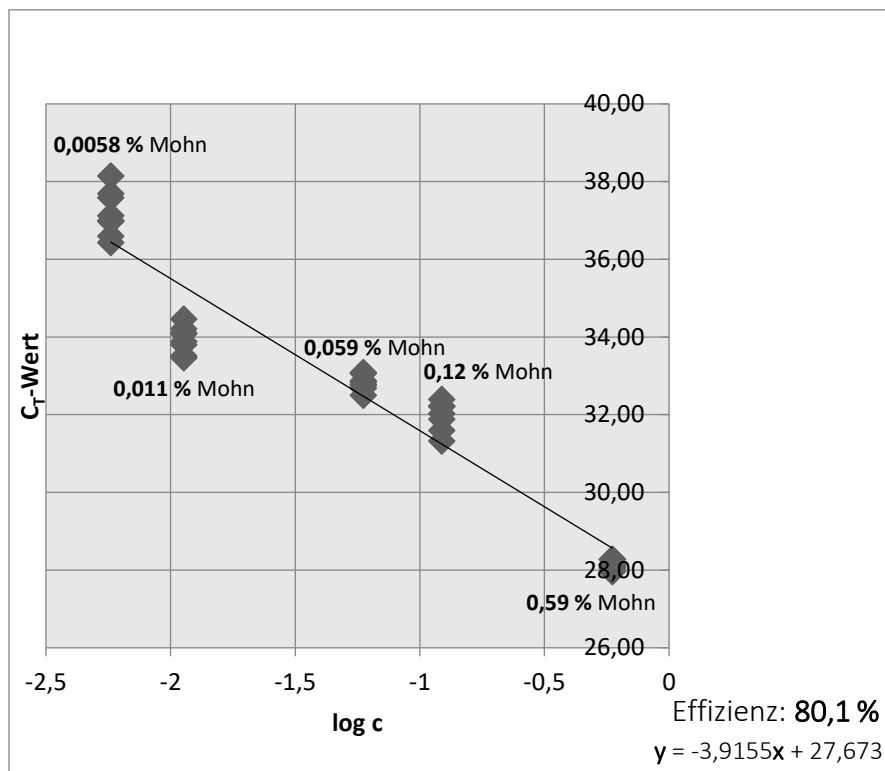


Abb. 14: Bestimmung der Effizienz des Real-Time PCR-Assays für Blaumohn in gebackenem Teig

Aus der Steigung der Standardgerade (-3,9155) wurde eine **Effizienz** des Real-Time PCR-Assays von **80,1 %** für Blaumohn in **gebackenem Teig** ermittelt, wobei die geringere Effizienz im Vergleich zum rohen Teig dadurch erklärt werden könnte, dass die DNA durch die Hitzebehandlung teilweise denaturiert wurde.

Zusammengefasst lag die Nachweisgrenze für Blaumohn in rohem Teig bei **0,01 % (Effizienz: 90,7 %)**, und in **gebackenem Teig** bei **0,0058 % (Effizienz: 80,1 %)**.

4.4 Nachweis von Mohn-DNA in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln

Zum Nachweis von Mohn-DNA in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln wurden mit der CTAB-Methode Extrakte aus 15 verschiedenen Produkten, drei Produkten ohne und 12 Produkten mit auf der Zutatenliste deklariertem Mohn, hergestellt, wobei die Produktnamen, die Herstellerfirmen, der in den Produkten jeweils enthaltene Mohngehalt und die enthaltene Mohn-Sorte in **Tab. 17** nach ansteigendem Mohngehalt geordnet aufgelistet sind:

Tab. 17: Produkte ohne und mit auf der Zutatenliste deklariertem Mohn
- Kein Mohn auf der Zutatenliste deklariert

PRODUKT	Mohn-Gehalt (%)	Mohn-Sorte
BAHLEN Haselnuss comtess, klein & fein	-	-
ÖLZ Topfenkipfel ohne Rosinen	-	-
THURNER Nuss-Strudel	-	-
BAHLEN Mohn-Marzipan comtess, klein & fein	4,1	Blaumohn
ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE Dinkelkräcker mit Mohn	5,0	Blaumohn
ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade	6,0	Graumohn
JOMO Mohnkuchen	7,5	Blaumohn
THURNER Powidl-Mohnstrudel	10,0	Blaumohn
THURNER Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung	12,5	Blaumohn
ÖLZ Mohnkipfel	14,5	Blaumohn
THURNER Mohnstrudel mit saftiger Mohnfüllung	16,0	Blaumohn
ANKER Mohn-Strudel	25,0	Blaumohn
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Guglhupf	26,0	Graumohn
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Zelten	39,0	Graumohn
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Strudel	40,0	Graumohn

Bei den vier Produkten „Waldviertler Graumohn-Zelten“, „Waldviertler Graumohn-Strudel“, „Waldviertler Graumohn-Guglhupf“ und „Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade“ war der Waldviertler Graumohn als Zutat angegeben, wobei es sich um eine geschützte Ursprungsbezeichnung⁶⁸ handelt. Waldviertler Graumohn muss daher in der Zutatenliste von Lebensmitteln namentlich genannt werden.

Graumohn aus außerhalb des Waldviertels liegenden Gebieten und Weißmohn werden üblicherweise ebenfalls namentlich erwähnt, da es sich dabei um in Produkten selten vorkommende Mohn-Sorten handelt. Daher enthalten alle Produkte, bei welchen nicht konkret „Waldviertler Graumohn“, „Graumohn“ oder „Weißmohn“, sondern nur „Mohn“ als Zutat genannt ist, üblicherweise Blaumohn.

Nach der Extraktion wurden mit Hilfe einer photometrischen Messung die Konzentration und die Reinheit der hergestellten Extrakte ermittelt. Anschließend sollte getestet werden, ob eine Anwendung des Real-Time PCR-Assays auf Produkte, welche im Lebensmittelhandel erworben werden konnten, möglich war, sodass sich die Real-Time PCR-Assay als Routine-Methode zum Nachweis von Mohn in einer komplex zusammengesetzten Lebensmittelmatrix eignete.

4.4.1 Konzentration und Reinheit der Extrakte aus Produkten mit und ohne Mohn

In **Tab. 18** sind die Produkte mit den von den Herstellerfirmen angegebenen prozentuellen Mohngehalten sowie die Mittelwerte der Konzentrationen und der A_{260}/A_{280} -Werte der aus den jeweiligen Produkten hergestellten Extrakte angeführt, wobei aus jedem Produkt zwei Extrakte hergestellt wurden:

Tab. 18: Konzentration und Reinheit der Extrakte aus 15 Produkten mit und ohne Mohn in der Zutatenliste
- Kein Mohn auf der Zutatenliste deklariert

PRODUKT	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A_{260}/A_{280}
BAHLESEN Haselnuss comtess, klein & fein (-)		
1. Extrakt	16,4	1,93
2. Extrakt	15,5	1,84
ÖLZ Topfenkipfel ohne Rosinen (-)		
1. Extrakt	33,1	1,81
2. Extrakt	35,2	1,82
THURNER Nuss-Strudel (-)		
1. Extrakt	19,7	1,91
2. Extrakt	22,7	1,88
BAHLESEN Mohn-Marzipan comtess, klein & fein (4,1 %)		
1. Extrakt	25,7	1,83
2. Extrakt	37,6	1,89
ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE Dinkelkräcker mit Mohn (5,0 %)		
1. Extrakt	92,6	1,92
2. Extrakt	335,6	1,94
ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade (6,0 %)		
1. Extrakt	3,6	2,45
2. Extrakt	2,0	3,75
JOMO Mohnkuchen (7,5 %)		
1. Extrakt	46,7	1,82
2. Extrakt	65,4	1,82
THURNER Powidl-Mohnstrudel (10,0 %)		
1. Extrakt	10,9	1,83
2. Extrakt	22,6	1,90
THURNER Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung (12,5 %)		
1. Extrakt	91,9	1,86
2. Extrakt	85,5	1,85
ÖLZ Mohnkipfel (14,5 %)		
1. Extrakt	104,5	1,91
2. Extrakt	65,0	1,89

Tab. 18: Fortsetzung

PRODUKT	Mittelwert Konzentration (ng/μl)	Mittelwert A ₂₆₀ /A ₂₈₀
THURNER Mohnstrudel mit saftiger Mohnfüllung (16,0 %)		
1. Extrakt	71,7	1,88
2. Extrakt	74,0	1,84
ANKER Mohn-Strudel (25,0 %)		
1. Extrakt	195,1	1,89
2. Extrakt	90,4	1,82
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Guglhupf (26,0 %)		
1. Extrakt	81,6	1,86
2. Extrakt	1,8	2,81
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Zelten (39,0 %)		
1. Extrakt	210,2	1,90
2. Extrakt	213,4	1,90
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Strudel (40,0 %)		
1. Extrakt	65,2	1,78
2. Extrakt	58,0	1,76

Wie man **Tab. 18** entnehmen kann, konnte aus allen Produkten mit Ausnahme des Produktes „*Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade*“ zumindest ein Extrakt mit DNA in der erforderlichen Konzentration von mindestens 10 ng/μl sowie in der geforderten Reinheit (A₂₆₀/A₂₈₀: 1,8-2,0, mit geringfügigen Abweichungen) gewonnen werden.

Aus einigen Produkten konnte **DNA in besonders hoher Konzentration** extrahiert werden, dazu zählen die „*Dinkelkräcker mit Mohn*“ (335,6 ng/μl), die „*Waldviertler Graumohn-Zelten*“ (213,4 ng/μl), der „*Mohn-Strudel*“ (195,1 ng/μl) sowie das „*Mohnkipfel*“ (104,5 ng/μl).

Drei Extrakte erzielten eine Konzentration von **weniger als 10 ng/μl**, darunter beide Extrakte aus dem Produkt „*Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade*“ (3,6 / 2,0 ng/μl) sowie der zweite Extrakt aus dem Produkt „*Waldviertler Graumohn-Guglhupf*“ (1,8 ng/μl). Der Großteil des zweiten Extraktes aus dem „*Waldviertler Graumohn-Guglhupf*“ wurde während der Durchführung der Extraktion versehentlich verschüttet, was die niedrige Konzentration dieses Extraktes erklärte. Da jedoch der erste Extrakt aus dem „*Waldviertler Graumohn-Guglhupf*“ DNA in ausreichender Konzentration (81,6 ng/μl) und Reinheit enthielt, konnte dieser in der Real-Time PCR analysiert werden.

Unter den Extrakten mit einer **DNA-Konzentration zwischen 10 und 20 ng/μl** waren beide Extrakte des Produktes „*Haselnuss comtess, klein & fein*“ (16,4 / 15,5 ng/μl) sowie der jeweils erste Extrakt der Produkte „*Nuss-Strudel*“ (19,7 ng/μl) und „*Powidl-Mohn-Strudel*“ (10,9 ng/μl), wobei bei den zwei letztgenannten Produkten jeweils der zweite Extrakt, welcher eine höhere Konzentration enthielt, in der PCR eingesetzt wurde. Alle weiteren, bisher nicht beschriebenen Extrakte in **Tab. 18** wiesen **DNA-Konzentrationen zwischen 20 und 100 ng/μl** auf.

Weiters wurde für alle Extrakte mit Ausnahme der zwei Extrakte aus „*Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade*“ sowie des zweiten Extraktes aus dem „*Waldviertler Graumohn-Guglhupf*“ ein optimaler A_{260}/A_{280} -Wert von **1,8 bis 2,0** mit nur geringfügigen Abweichungen bei den zwei Extrakten aus dem Produkt „*Waldviertler Graumohn-Strudel*“ (1,78 / 1,76) ermittelt, weshalb auch diese Extrakte von der Reinheit her als optimal betrachtet wurden. Die A_{260}/A_{280} -Werte der zwei Extrakte aus dem Produkt „*Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade*“ (2,45 / 3,75) sowie des zweiten Extraktes aus dem Produkt „*Waldviertler Graumohn-Guglhupf*“ (2,81) lagen weit außerhalb des geforderten Bereiches. Das Produkt „*Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade*“ konnte aufgrund der zu niedrigen DNA-Konzentration beider Extrakte als einziges Produkt nicht mittels Real-Time PCR analysiert werden, jedoch konnten alle weiteren Produkte in **Tab. 18** in der Real-Time PCR eingesetzt werden, wobei für den Extrakt aus dem Produkt „*Haselnuss comtess, klein & fein*“ ein spezielles Pipettierschema verwendet wurde (siehe Kapitel 6.2.1.5).

4.4.2 Untersuchung der Eignung des Real-Time PCR-Assays für kommerzielle Lebensmittel

Abb. 15 zeigt die PCR-Kurven für die Positivkontrolle (Blaumohn) sowie für die Extrakte aus 14 Produkten mit und ohne Mohn in der Zutatenliste, wobei alle PCR-Kurven beschriftet sind, abgesehen von den Kurven für die Extrakte aus drei Produkten (mit jeweils zwei Parallelbestimmungen), dem „*Mohnkipfel*“ (14,5 % Blaumohn), dem „*Mohnstrudel mit saftiger Mohnfüllung*“ (16,0 % Blaumohn) und dem „*Mohn-Strudel*“ (25,0 % Blaumohn). Die entsprechenden Kurven sind in violetten Farbtönen dargestellt.

Für die C_T -Werte der zwei Parallelbestimmungen der Positiv-Kontrolle (Graumohn) wurden die PCR-Kurven zur Ermittlung der Nachweisgrenze von Graumohn (siehe **Abb. 9**, Kapitel 4.1.4.2) herangezogen, jedoch bei einer Threshold-Line von 100,00, um einen Vergleich mit dem PCR-Lauf in **Abb. 15** herstellen zu können.

In **Abb. 15** lässt sich erkennen, dass die Negativkontrolle und die Extrakte aus zwei von drei Produkten ohne Mohn in der Zutatenliste, „*Haselnuss comtess, klein & fein*“ und „*Topfenkipfel ohne Rosinen*“, zu keinem Anstieg des Fluoreszenz-Signals führten. Bei den zwei Parallelbestimmungen des Extraktes aus dem „*Nuss-Strudel*“, dem dritten untersuchten Produkt ohne Mohn in der Zutatenliste, wurde jeweils ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals bei deutlich höheren C_T -Werten als bei den restlichen Produkten sowie bei der Positivkontrolle (Blaumohn) und (siehe **Tab. 19**) bei der Positivkontrolle (Graumohn) beobachtet.

Zwei weitere Produkte, „*Mohn-Marzipan comtess, klein & fein*“ (4,1 % Blaumohn) und „*Dinkelkräcker mit Mohn*“ (5,0 % Blaumohn) führten im Vergleich zur Positivkontrolle (Blaumohn) zu leicht erhöhten C_T -Werten, wobei allgemein zu erwähnen ist, dass die

Positivkontrolle (Blaumohn) in diesem PCR-Lauf zu einem höheren Mittelwert der C_T -Werte (26,94) führte als in anderen PCR-Läufen.

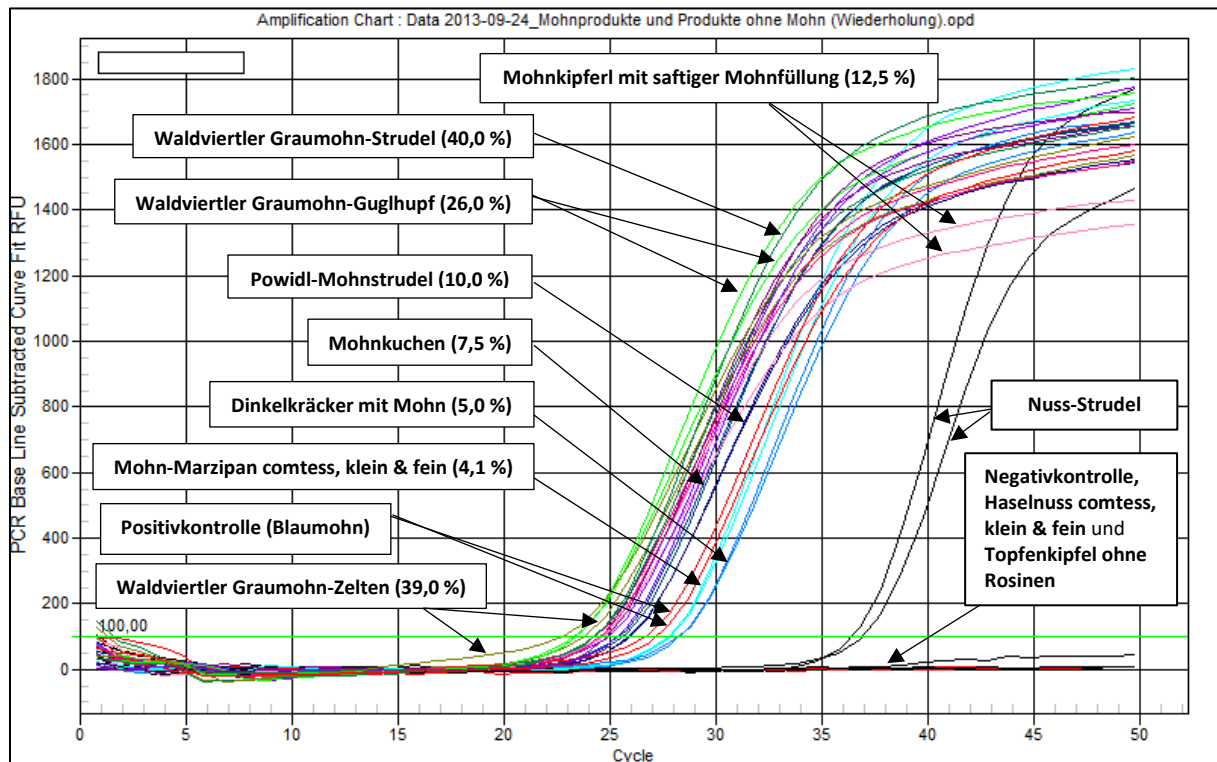


Abb. 15: PCR-Kurven für die Positiv-Kontrolle (Blaumohn) sowie für elf Produkte mit und drei Produkte ohne Mohn in der Zutatenliste:

Haselnuss comtess, klein & fein / Topfenkipfel ohne Rosinen / Nuss-Strudel /
Mohn-Marzipan comtess, klein & fein / Dinkelkräcker mit Mohn / Mohnkuchen /
Powidl-Mohnstrudel / Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung / Mohnkipfel /
Mohnstrudel mit saftiger Mohnfüllung / Mohn-Strudel / Waldviertler Graumohn-Guglhupf /
Waldviertler Graumohn-Zelten / Waldviertler Graumohn-Strudel

In **Tab. 19** sind die C_T -Werte für die 14 untersuchten Produkte sowie für die Positivkontrolle (Blaumohn) und die Positivkontrolle (Graumohn) bei einer Threshold-Line von 100,00 angeführt, wobei die Produkte nach ansteigendem Mohn-Gehalt geordnet sind.

Ein Vergleich der Mittelwerte der C_T -Werte, welche für die drei Produkte der Firma WALDLAND ermittelt wurden, mit dem Mittelwert der C_T -Werte, der für die *Positivkontrolle Graumohn* (24,48) erhalten wurde, zeigte, dass die Extrakte aus den drei Graumohn-Produkten überraschenderweise zu niedrigeren C_T -Werten führten als die Positivkontrolle Graumohn. Dabei ergab sich für den Extrakt aus dem „Waldviertler Graumohn-Strudel“ (40,0 % Graumohn) ein nur geringfügig niedrigerer Mittelwert der C_T -Werte (24,26), während die Extrakte aus den „Waldviertler Graumohn-Zelten“ (39,0 % Graumohn) und aus dem „Waldviertler Graumohn-Guglhupf“ (26,0 % Graumohn) zu deutlich niedrigeren Mittelwerten der C_T -Werte (23,34 / 23,38) im Vergleich zur Positiv-Kontrolle führten.

Trotz der niedrigeren C_T -Werte der Extrakte aus den Graumohn-Produkten im Vergleich zur Positiv-Kontrolle ließ sich feststellen, dass der Real-Time PCR-Assay dazu geeignet war, *Graumohn* in allen drei untersuchten Graumohn-Produkten *nachzuweisen*. Es ließ sich jedoch *kein Zusammenhang zwischen dem prozentuellen Graumohn-Gehalt und den jeweiligen C_T -Werten* herstellen.

Tab. 19: C_T -Werte für 14 Produkte mit und ohne Mohn in der Zutatenliste sowie für Blaumohn und Graumohn (Threshold-Line: 100,00)
n.d.: nicht detektiert
k.B.: Keine Berechnung möglich

Produktname	Mohn (%)	C_T -Wert 1	C_T -Wert 2	Mittelwert
BAHLESEN Haselnuss comtess, klein & fein	0 %	n.d.	n.d.	k.B.
ÖLZ Topfenkipfel ohne Rosinen	0 %	n.d.	n.d.	k.B.
THURNER Nuss-Strudel	0 %	36,40	36,93	36,67
BAHLESEN Mohn-Marzipan comtess, klein & fein	4,1 %	27,84	27,88	27,86
ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE Dinkelkräcker mit Mohn	5,0 %	28,29	28,22	28,26
JOMO Mohnkuchen	7,5 %	25,63	25,40	25,52
THURNER Powidl-Mohnstrudel	10,0 %	25,98	25,93	25,96
THURNER Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung	12,5 %	24,74	24,59	24,67
ÖLZ Mohnkipfel	14,5 %	24,28	24,54	24,41
THURNER Mohnstrudel	16,0 %	24,94	25,35	25,15
ANKER Mohn-Strudel	25,0 %	24,59	24,90	24,75
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Guglhupf	26,0 %	23,35	23,41	23,38
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Zelten	39,0 %	23,83	22,84	23,34
WALDLAND Waldviertler Graumohn-Strudel	40,0 %	24,24	24,28	24,26
Positivkontrolle 1 (Graumohn)	100,0 %	24,37	24,59	24,48
Positivkontrolle 2 (Blaumohn)	100,0 %	26,68	27,19	26,94

Bei den acht Produkten mit auf der Zutatenliste angeführtem Blaumohn zeigte ein Vergleich der Mittelwerte der C_T -Werte, dass nur zwei Produkte, „*Mohn-Marzipan comtess, klein & fein*“ (4,1 % Blaumohn) und „*Dinkelkräcker mit Mohn*“ (5,0 % Blaumohn), zu höheren C_T -Werten führten als die Positivkontrolle (Blaumohn). Für die übrigen sechs Blaumohn-Produkte ergaben sich niedrigere C_T -Werte als für die Positivkontrolle (Blaumohn), dazu zählen in

ansteigender Reihenfolge der Mittelwerte der C_T -Werte das „*Mohnkipfel*“ mit 14,5 % Blaumohn (24,41), das „*Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung*“ mit 12,5 % Blaumohn (24,67), der „*Mohn-Strudel*“ mit 25,0 % Blaumohn (24,75), der „*Mohnstrudel*“ mit 16,0 % Blaumohn (25,15), der „*Mohnkuchen*“ mit 7,5 % Blaumohn (25,52) und der „*Powidl-Mohnstrudel*“ mit 10,0 % Blaumohn (25,96).

Es ließ sich daher feststellen, dass der Real-Time PCR-Assay dazu geeignet war, *Blaumohn* in allen untersuchten kommerziell erhältlichen Blaumohn-Produkten *nachzuweisen*, und dass die erhaltenen *Mittelwerte der C_T -Werte* bei zwei Produkten zwar *wie erwartet höher* lagen als der Mittelwert der C_T -Werte der *Positivkontrolle*, dass sich jedoch für die sechs anderen Produkte mit Blaumohn deutlich niedrigere Mittelwerte der C_T -Werte ergaben als für die Positivkontrolle (Blaumohn). Weiters ergab die Analyse, dass bei den acht untersuchten Blaumohn-Produkten *kein Zusammenhang* zwischen den erhaltenen Mittelwerten der C_T -Werte und den *prozentuellen Mohn-Gehalten* beobachtet werden konnte.

Ein Grund für die fehlende Korrelation zwischen den prozentuellen Blaumohn- bzw. Graumohn-Gehalten und den erhaltenen C_T -Werten könnte sein, dass zwar bei allen Produkten jeweils ein größerer Teil entnommen und dieser vor der Probenahme für die CTAB-Extraktion jeweils mit einem Küchenmixer sowie mit einem Mörser homogenisiert wurde, dass jedoch jeweils nicht das gesamte Produkt verwendet wurde, sodass keine repräsentative Stichprobe eingesetzt wurde.

Ein weiterer Grund könnte sein, dass bei der Extraktion nicht gleich viel Mohn-DNA extrahiert wurde wie DNA von den übrigen Lebensmittelbestandteilen.

Weiters wäre möglich, dass manche Produkte aufgrund der Bedingungen im Produktionsprozess einen anderen Mohn-Gehalt aufwiesen als auf der Packung angeführt.

Abgesehen davon müssen Produkte, sofern ein bestimmter Prozentgehalt eines Lebensmittels auf der Zutatenliste angeführt ist, diesen Prozentgehalt mindestens aufweisen, wodurch Hersteller möglicherweise zur Sicherheit etwas höhere Prozentgehalte an Mohn in den Teig mischen könnten als angegeben, was wiederum zu niedrigeren C_T -Werten führen könnte.

Was die unerwartet hohen C_T -Werte der Positivkontrolle (Blaumohn) betraf, gab es hingegen keine Hinweise, wodurch diese verursacht wurden.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Produkten mit Graumohn oder Blaumohn wurden zum Vergleich *drei Produkte* untersucht, welche *laut Zutatenliste keinen Mohn* enthielten, wobei es sich um die ersten drei Produkte in **Tab. 19** handelte.

Bei den Produkten „*Haselnuss comtess, klein & fein*“ und „*Topfenkipfel ohne Rosinen*“ ließ sich der nicht auf der Zutatenliste deklarierte Mohn auch anhand des fehlenden Anstiegs des Fluoreszenz-Signals nachvollziehen, wie auch in **Abb. 15** erkennbar ist. Beim Produkt „*Nuss-Strudel*“ hingegen, dem dritten untersuchten Produkt ohne Mohn in der Zutatenliste, wurde ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals gemessen, wobei der Mittelwert der C_T -Werte (36,67)

deutlich höher lag als bei allen Produkten mit Mohn in der Zutatenliste, sogar viel höher als bei Produkten mit einem sehr geringen Prozentsatz an Mohn, was aus **Abb. 15** und **Tab. 19** hervorgeht.

Der Extrakt aus diesem Produkt wurde schließlich in einer weiteren PCR getestet, wobei wieder ein ähnliches Ergebnis erhalten wurde. Es entstand daher zunächst die Vermutung, dass der Extrakt möglicherweise während der Durchführung der Extraktion mit Mohn-DNA aus einem anderen Produkt kontaminiert wurde, weshalb ein weiterer Extrakt aus dem „*Nuss-Strudel*“ mit der CTAB-Methode hergestellt wurde. Der neu hergestellte Extrakt führte jedoch in einer weiteren PCR wieder zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals, wobei ähnliche C_T -Werte wie bei den ersten zwei PCR-Läufen des ersten Extraktes beobachtet wurden.

Es konnte daher eine Verunreinigung des Extraktes aus dem „*Nuss-Strudel*“ mit Mohn während der Extraktion als Ursache ausgeschlossen werden.

Ein möglicher Grund für den Nachweis von Mohn in einem Produkt, welches laut Zutatenliste keinen Mohn enthielt, wäre, dass es eventuell zu einer Kontamination des Produktes mit Spuren von Mohn während des Produktions-Prozesses gekommen sein könnte. Da von derselben Firma auch Produkte mit Mohn im Lebensmittelhandel erworben werden konnten, beispielsweise der „*Powidl-Mohnstrudel*“ mit 10,0 % Mohn, das „*Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung*“ mit 12,5 % Mohn sowie der „*Mohnstrudel*“ mit 16,0 % Mohn, könnte dies als möglicher Hinweis auf eine eventuelle Kontamination im Produktionsprozess dienen, wobei der hohe Mittelwert der C_T -Werte ebenfalls auf geringe Spuren an Mohn hinweisen würde. Dies sind jedoch nur Vermutungen und es könnten auch andere Gründe, welche hier nicht bedacht wurden, vorliegen.

Zusammengefasst ließ sich feststellen, dass sich die entwickelte Real-Time PCR-Methode sehr gut zum Nachweis von Mohn-DNA in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln eignete, da bei allen elf untersuchten Produkten mit auf der Zutatenliste angegebenem Mohn ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals gemessen wurde, sowohl bei den Graumohn- als auch bei den Blaumohn-Produkten. Die C_T -Werte ließen jedoch keinen Rückschluss auf den enthaltenen Prozent-Gehalt an Mohn zu, abgesehen davon lagen die C_T -Werte, welche sich aus den Extrakten aller drei Graumohn-Produkte sowie aus den Extrakten von sechs der acht untersuchten Blaumohn-Produkte ergaben, im Vergleich zu den C_T -Werten der Positiv-Kontrollen niedriger. Nur die Extrakte von zwei der acht untersuchten Blaumohn-Produkte führten wie erwartet zu höheren C_T -Werten als die Positivkontrolle (Blaumohn).

Weiters wurden drei Produkte ohne Mohn in der Zutatenliste analysiert, wobei sich bei dem Extrakt aus einem der drei Produkte bei höheren C_T -Werten ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals ergab, jedoch bei den Extrakten aus den zwei übrigen Produkten wie erwartet kein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet wurde.

5 SCHLUSSBETRACHTUNG

Lebensmittelallergien haben sich in den letzten 20 bis 30 Jahren zu einem immer größer werdenden gesundheitlichen Problem für Millionen Menschen weltweit entwickelt und bedeuten für Betroffene eine Einschränkung in der Lebensqualität, da das auslösende Allergen insbesondere im Fall möglicher schwerwiegender Reaktionen strikt vermieden werden sollte.

Die Samen des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) lösen bei Personen mit einer Mohn-Allergie häufig anaphylaktische Reaktionen aus, wobei sich das Problem ergibt, dass Mohn-Samen in vielen Fällen unerkant als „versteckte Allergene“ in Speisen zu finden sind und daher nicht immer auf den ersten Blick als Zutat erkannt werden können. Da die Mohn-Allergie jedoch nur sehr selten vorkommt, zählen die Samen des Schlafmohns nicht zu den innerhalb der EU kennzeichnungspflichtigen 14 Lebensmittelallergenen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Diplomarbeit war die *Entwicklung einer Real-Time PCR-Methode zum Nachweis von Mohn-DNA in Lebensmitteln*: Es sollte eine selektive Methode für den Nachweis von Blaumohn, Graumohn und Weißmohn entwickelt werden, welche eine hohe Spezifität für Mohn aufweisen sollte. Weiters sollten die Nachweisgrenze und Effizienz der Methode ermittelt und mit Hilfe eines Modell-Lebensmittels überprüft, und die Eignung als Routinemethode zum Nachweis von Mohn-DNA in kommerziell erhältlichen Produkten untersucht werden.

Es konnte aus allen drei Mohn-Sorten (Blau-, Grau- und Weißmohn) mit der CTAB-Methode DNA in ausreichender *Konzentration* ($> 10 \text{ ng}/\mu$) und *Reinheit* (A_{260}/A_{280} : 1,8-2,0) gewonnen werden. Es wurden drei Primerpaar-Konzentrationen (100/100, 200/200, 300/300 nM) und drei Sonden-Konzentrationen (100, 200, 300 nM) getestet. Die *Primer-Paar-Konzentration 200/200 nM* und die *Sonden-Konzentration 200 nM* führten zu den niedrigsten C_T -Werten in der Real-Time PCR und wurden daher in allen weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Die Extrakte aller drei Mohn-Sorten führten in der Real-Time PCR zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals und zu ähnlichen Mittelwerten der C_T -Werte (Blaumohn: 24,07, Graumohn: 24,31, Weißmohn: 24,43). Somit konnte die *Selektivität* des Real-Time PCR-Assays für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn gezeigt werden, und es konnten die Extrakte aller drei Mohn-Sorten in weiteren Untersuchungen eingesetzt werden. Für *Blaumohn* wurde eine *Effizienz von 100,0 %* bestimmt, und die Effizienz für Graumohn und Weißmohn wurde untersucht, jedoch konnten die Ergebnisse aufgrund einer Kontamination einzelner Negativkontrollen nicht gezeigt werden. Als *Nachweisgrenze (LOD)* des Real-Time PCR-Assays wurde für Blaumohn, Graumohn und Weißmohn jeweils eine DNA-Konzentration von *0,01 ng/ μ l* ermittelt.

Die Nachweisgrenze und die Effizienz der Methode in einer komplex zusammengesetzten Lebensmittelmatrix wurden anhand eines selbst hergestellten *Modell-Lebensmittels* auf Basis eines Schokoladekuchen-Teiges, aus welchem Teige mit sieben unterschiedlichen Konzentrationen an Blaumohn (0 / 0,001 / 0,005 / 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,5 %) produziert wurden, überprüft. Dabei wurden als *Nachweisgrenzen* im *rohen Teig* 0,01 % Mohn sowie im *gebackenen Teig (Muffins)* 0,0058 % Mohn ermittelt.

Weiters wurden Kreuzreaktivitäts-Test mit 22 Lebensmittelbestandteilen, darunter 21 pflanzliche Spezies sowie Backhefe, welche sich neben Mohn in kommerziell erhältlichen Produkten befinden können, durchgeführt. Es konnte *keine Kreuzreaktion* des Real-Time PCR-Assays mit *Dinkelmehl, Roggenvollkornmehl, Weizenmehl, Reis, Haselnuss, Walnuss, Pinienkern, Muskatnuss, Pistazie, Karotte, Kartoffel, Ingwer, Rote Linse, Mais, Rosine, Zitrone, Ribisel, Pflaume, Mandel, Vanille, Zimt* und *Backhefe* beobachtet werden.

Um die *Eignung des Real-Time PCR-Assays als Routinemethode* zu untersuchen, wurden 14 Produkte mit oder ohne Mohn in der Zutatenliste untersucht. Es konnte Mohn-DNA in allen *elf untersuchten Blaumohn- und Graumohn-Produkten* (Mohn-Marzipan comtess, klein & fein, Dinkelkräcker mit Mohn, Mohnkuchen, Powidl-Mohnstrudel, Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung, Mohnkipfel, Mohnstrudel mit saftiger Mohnfüllung, Mohn-Strudel, Waldviertler Graumohn-Guglhupf, Waldviertler Graumohn-Zelten, Waldviertler Graumohn-Strudel) *nachgewiesen* werden.

Es ließ sich daher feststellen, dass sich die entwickelte Real-Time PCR-Methode sehr gut zum Nachweis von Blaumohn- und Graumohn-DNA in komplex zusammengesetzten Lebensmitteln eignete. Die ermittelten C_T-Werte ließen jedoch keinen Rückschluss auf den jeweils im Produkt enthaltenen Prozentgehalt an Blau- oder Graumohn zu, und die Extrakte aus neun von elf untersuchten Mohn-Produkten führten, verglichen mit den jeweiligen Positiv-Kontrollen, zu niedrigeren C_T-Werten.

Weiters konnte gezeigt werden, dass *in zwei von drei Produkten ohne Mohn in der Zutatenliste* (Haselnuss comtess, klein & fein, Topfenkipfel ohne Rosinen) tatsächlich *keine Mohn-DNA nachweisbar* war. Bei *einem weiteren Produkt* (Nuss-Strudel) *ohne Mohn in der Zutatenliste* führte der Extrakt jedoch bei höheren C_T-Werten (Mittelwert: 36,67) zu einem *Anstieg des Fluoreszenz-Signals*.

6 EXPERIMENTELLES

6.1 DNA-Extraktion

6.1.1 CTAB-Methode

6.1.1.1 Reagenzien der CTAB-Extraktions-Methode

Im Folgenden werden die Reagenzien, welche zur Extraktion von DNA aus verschiedenen Lebensmitteln mit Hilfe der CTAB-Methode verwendet wurden, angeführt, wobei die Lösungen, welche selbst hergestellt wurden, fett gedruckt dargestellt sind.

- 1) **CTAB-Extraktionslösung:** 20 g/L CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
1,4 M NaCl (Natriumchlorid)
0,1 M Tris (Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan)
0,02 M EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
mit HCl (Salzsäure) → pH-Wert von 8,0 einstellen
- 2) **CTAB-Präzipitationslösung:** 5 g/L CTAB
0,04 M NaCl
- 3) **1,2 M NaCl-Lösung**
- 4) Chloroform p.a.
- 5) 70 % (v/v) Ethanol p.a. (eisgekühlt)
- 6) Isopropanol p.a.
- 7) HCl p.a.
- 8) **Proteinase K-Lösung:** 100 mg in 4 ml 50 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- 9) **RNAse A-Lösung** (20 µg/ml)
- 10) H₂O_{dd}

6.1.1.2 Herstellung der Lösungen für die CTAB-Extraktion

Für die **CTAB-Extraktionslösung** wurden 2,0 g CTAB, 8,19 g NaCl, 1,21 g Tris und 0,74 g EDTA gemischt, in H₂O_{dd} gelöst, mit HCl auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit H₂O_{dd} auf 100 ml aufgefüllt. Für die **CTAB-Präzipitationslösung** wurden 0,5 g CTAB und 0,23 g NaCl in H₂O_{dd} gelöst und mit H₂O_{dd} auf 100 ml aufgefüllt.

Für die **Proteinase K-Lösung** wurden 100 mg Proteinase K mit 4 ml 50 % Glycerin in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gemischt und die Lösung bei -20°C aufbewahrt. Für die **RNAse A-Lösung** wurde die erhaltene Lösung (24 mg/ml in 50 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) verdünnt, um eine Konzentration von 20 µg/ml zu erhalten. Dazu wurden 4,1 µl RNAse A-Lösung mit 5 ml 50 % Glycerin gemischt, die Lösung wurde schließlich aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

6.1.1.3 Durchführung der CTAB-Extraktion

1. Es wurden **ca. 100 mg** der zerkleinerten Probe auf einer Präzisions-Waage in einem Eppendorf-Gefäß eingewogen und die genaue Einwaage notiert.
2. Es wurden **500 µl CTAB-Extraktionslösung** zur Probe hinzugefügt und gründlich gemischt (20 Sekunden gevortext). Anschließend wurde 30 Minuten lang bei 65°C im Trockenschrank inkubiert, wobei nach jeweils 10 Minuten gevortext wurde (1 Minute).
3. Anschließend wurden **15 µl Proteinase K-Lösung** hinzugefügt, es wurde gevortext und für mindestens 60 Minuten (oder über Nacht) bei 50°C im Trockenschrank inkubiert.
4. Es wurden **20 µl RNase A-Lösung** zugegeben und es wurde gevortext, anschließend wurde 2 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und in der Tischzentrifuge 5 Minuten bei 10000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert.
5. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit **200 µl Chloroform** versetzt, daraufhin wurde 1 Minute lang kräftig gevortext und zur Phasentrennung 5 Minuten (10000 rpm) zentrifugiert.
6. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, es wurden **2 Volumenteile CTAB-Präzipitationslösung** hinzugefügt und es wurde gemischt. Anschließend wurde 60 Minuten lang inkubiert (Raumtemperatur) und 5 Minuten lang zentrifugiert (10000 rpm).
7. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in **350 µl 1,2 M NaCl** gelöst.
8. Die Lösung wurde mit **350 µl Chloroform** versetzt und 1 Minute lang kräftig gevortext, anschließend 5 Minuten zur Phasentrennung zentrifugiert (10000 rpm).
9. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit **0,6 Volumenteilen Isopropanol** versetzt, 5 Minuten zentrifugiert (10000 rpm) und der Überstand anschließend verworfen.
10. Das Sediment wurde mit **500 µl eisgekühltem 70 % Ethanol** versetzt, kräftig gemischt, anschließend 5 Minuten zentrifugiert (10000 rpm) und der Überstand vorsichtig mit einer Gilson-Pipette abgezogen.
11. Das DNA-Sediment wurde über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet (Eppendorf-Gefäß geöffnet und mit einer Küchenrolle bedeckt).
12. Am nächsten Tag wurde das DNA-Sediment in **100 µl H₂O_{dd}** gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Die DNA-Extrakte wurden schließlich mit **H₂O_{dd}** als „**Blank**“ mit dem NanoDrop-Spektrophotometer (ThermoFischer Scientific) gemessen und im Fall einer ausreichenden Konzentration und Reinheit in der Real-Time PCR eingesetzt.

6.1.2 QIAamp DNA Mini Kit (Firma QIAGEN)

6.1.2.1 Durchführung der Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit

1. **25-50 mg** der zerkleinerten Probe wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen, die Einwaage notiert und die Probe mit **180 µl Puffer ATL** versetzt.
2. Es wurden **20 µl Proteinase K-Lösung** hinzugefügt, es wurde gut gemischt und anschließend im Trockenschrank bei 56°C über Nacht (ca. 20 Stunden lang) inkubiert, wobei etwa 20 Minuten nach Beginn der Inkubation 1x 30 Sekunden gevortext wurde.
3. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden **20 µl RNase A** (20 µg/ml) zugegeben, es wurde gut gemischt (15 Sekunden „Puls-gevortext“), 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nochmals kurz zentrifugiert.
4. Es wurden **200 µl Puffer AL** hinzugefügt, es wurde gut gemischt (15 Sekunden „Puls-gevortext“) und 10 Minuten lang bei 70°C im Trockenschrank inkubiert.
5. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden **200 µl Ethanol** (96-100 %) zugegeben, es wurde kräftig gemischt (15 Sekunden „Puls-gevortext“) und kurz zentrifugiert.
Die Mischung (inklusive des Präzipitats) wurde vorsichtig in eine QIAamp Spin-Säule (in einem 2 ml Auffang-Gefäß) überführt, diese verschlossen und 1 Minute zentrifugiert (8000 rpm), bis die gesamte Lösung durch die Membran geflossen war. Falls das nicht der Fall war, musste nochmals bei einer höheren Geschwindigkeit zentrifugiert werden. Anschließend wurde das Filtrat verworfen.
6. Die Spin-Säule wurde in ein neues Auffang-Gefäß überführt und es wurden in einem Wasch-Schritt **500 µl Puffer AW1** (in 96-100 % Ethanol verdünnt) zur Spin-Säule hinzugefügt. Anschließend wurde 1 Minute zentrifugiert (8000 rpm), die Säule in ein neues Auffang-Gefäß gestellt und das Filtrat verworfen.
7. Im nächsten Wasch-Schritt wurden **500 µl Puffer AW2** (in 96-100 % Ethanol verdünnt) hinzugefügt, es wurde 3 Minuten lang zentrifugiert (10000 rpm) und das Filtrat verworfen.
8. Nach Überführung der QIAamp-Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden **200 µl Puffer AE** zugegeben, es wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 Minute zentrifugiert (8000 rpm).
9. Das Eluat wurde wieder in dieselbe Säule eingebracht und der Elutions-Schritt (Zugabe von **200 µl Puffer AE**) wiederholt, anschließend wurde nochmals 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 1 Minute lang zentrifugiert (8000 rpm).
10. Der im Eluat vorliegende DNA-Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Anschließend wurden die DNA-Extrakte einer photometrischen Messung mit dem NanoDrop-Spektrophotometer unterzogen, wobei als „**Blank**“ der **Elutionspuffer AE** verwendet wurde, da die extrahierte DNA in diesem Puffer gelöst vorlag. Extrakte mit einer ausreichenden Konzentration und Reinheit wurden schließlich in einer Real-Time PCR eingesetzt.

6.1.3 DNA-Extrakte aus Lebensmitteln mit/ohne Mohn in der Zutatenliste

Alle für die DNA-Extraktionen verwendeten Lebensmittel wurden in lokalen Supermärkten erworben, wobei die DNA aus einigen Produkten direkt extrahiert und aus einigen Produkten zunächst ein Modell-Lebensmittel hergestellt und die DNA aus diesem extrahiert wurde.

6.1.3.1 Herstellung und Verwendung der Extrakte aus Blau-, Grau- und Weißmohn

In **Tab. 20** ist angeführt, aus den Produkten welcher Firmen die Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakte hergestellt und welche mechanischen Methoden jeweils vor der Extraktion angewandt wurden, wobei die DNA aus allen in **Tab. 20** angeführten Produkten mit der CTAB-Methode extrahiert wurde.

Tab. 20: Blau-, Grau- und Weißmohn: Produktnamen, Firmen und mechanische Methoden
- keine mechanische Methode

Lebensmittel	Firma / Produktname	Mechanische Methode
Blaumohn (gemahlen)	Back Mit	-
Blaumohn (Samen, ganz)	Back Mit Beachflower „Trockenfrüchte Blaumohn“	Mörser
Blaumohn (Samen, ganz)	Back Mit Beachflower „Trockenfrüchte Blaumohn“	Mohn-Mühle
Graumohn (Samen, ganz)	Sonnenor	Mörser
Graumohn (Samen, ganz)	Holzweber „Waldviertler Graumohn“	Mörser
Graumohn (Samen, ganz)	Holzweber „Waldviertler Graumohn“	Mohn-Mühle
Weißmohn (Samen, ganz)	Sonnenor	Mörser
Weißmohn (Samen, ganz)	Sonnenor	Mohn-Mühle

Alle in **Tab. 20** angeführten Mohn-Sorten mit Ausnahme des Blaumohns (gemahlen) der Firma Back Mit wurden vor der Extraktion einer mechanischen Zerkleinerung in einem Mörser oder mit einer Mohn-Mühle unterzogen, um eine ähnliche Konsistenz wie beim vorgemahlenen Blaumohn zu erhalten, und um die Ausbeute bei der DNA-Extraktion zu erhöhen.

Die DNA-Extrakte des Blaumohns (gemahlen, Firma Back Mit) wurden in der Real-Time PCR als Positiv-Kontrollen in den *Kreuzreaktivitäts-Tests* sowie zur Ermittlung der *optimalen Primer-Paar- und Sonden-Konzentrationen* eingesetzt.

Die nach der mechanischen Zerkleinerung in einem Mörser und durch anschließende Durchführung der CTAB-Methode erhaltenen DNA-Extrakte des Blaumohns (Samen, ganz),

des Weißmohns (Samen, ganz) und des Graumohns (Samen, ganz) wurden zur Ermittlung der *Effizienz* der Real-Time PCR-Methode verwendet. Dazu wurden aus dem Blaumohn-Extrakt sechs verschiedene Konzentrationen (**100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 ng/µl**) und aus dem Weiß- sowie dem Graumohn-Extrakt jeweils sieben verschiedene Konzentrationen (**100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,02 / 0,01 / 0,002 ng/µl**) hergestellt und mittels Real-Time PCR untersucht. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden die niedrigsten drei Konzentrationen eingesetzt.

6.1.3.2 Herstellung der Extrakte für die Kreuzreaktivitäts-Tests

In **Tab. 21** sind alle Lebensmittel aufgelistet, aus welchen DNA für die Kreuzreaktivitäts-Tests extrahiert wurde. **Tab. 21** enthält Informationen darüber, von welchen Firmen die Produkte stammten, mit welchen mechanischen Methoden (z.B. Reibeisen, Mörser, Einweichen in Wasser, Kenwood-Mixer, Ultra-Turrax) die Lebensmittel jeweils vor der DNA-Extraktion bearbeitet wurden und welche DNA-Extraktionsmethode jeweils angewandt wurde:

Tab. 21: Herstellung der Extrakte für die Kreuzreaktivitäts-Tests
- Keine mechanische Methode verwendet

Lebensmittel	Firma / Produktname	Mechanische Methode	Extraktions- Methode
GETREIDE			
Dinkelmehl (gemahlen)	Spar Vital Keimkraft Dinkelmehl	-	CTAB
Roggenvollkornmehl (gemahlen)	Natur Pur (Spar) Bio-Roggen-Vollkornmehl	-	CTAB
Weizenmehl (gemahlen)	Korngold Weizenmehl naturrein, griffig (Type 480)	-	CTAB
Reis	Keine Information	Mörser	CTAB
NÜSSE			
Haselnuss	Happy Harvest	-	CTAB
Walnuss	Keine Information	-	CTAB
Pinienkerne	Keine Information	Mörser	CTAB
Muskatnuss (gemahlen)	Kotányi „Muskatnuss gemahlen“	-	CTAB
Muskatnuss (gemahlen)	Kotányi „Muskatnuss gemahlen“	-	QIAamp DNA Mini Kit
Muskatnuss (ganz)	Kotányi „Muskatnuss ganz“	Reibeisen + Mörser	CTAB
Pistazien	Clever Kalifornische Pistazien	Mörser	CTAB
GEMÜSE			
Karotte (roh)	Keine Information	Mörser	CTAB
Karotte (gekocht)	Keine Information	-	CTAB
Kartoffel (roh)	Keine Information	-	CTAB
Kartoffel (roh)	Keine Information	Reibeisen + Mörser	QIAamp DNA Mini Kit
Kartoffel (gekocht)	Keine Information	-	CTAB
Kartoffel-Stärkemehl	RUMA	-	CTAB

Tab. 21 (Fortsetzung)

Lebensmittel	Firma / Produktname	Mechanische Methode	Extraktions- Methode
Ingwer (ganze Knolle)	Keine Information	Mörser	CTAB
Ingwerpulver (gemahlen)	Kotányi „Ingwer gemahlen“	-	CTAB
Rote Linsen	Keine Information	Mörser	CTAB
Maisstärke	MAIZENA	-	CTAB
Maiskörner (aus der Dose)	Keine Information	Mörser	CTAB
Maiskörner (aus der Dose)	Keine Information	Mörser	QIAamp DNA Mini Kit
FRÜCHTE			
Rosinen	FARMGOLD „Spezialrosinen“	-	CTAB
Rosinen	FARMGOLD „Spezialrosinen“	Einweichen (H ₂ O) + Mörser	CTAB
Rosinen	FARMGOLD „Spezialrosinen“	Einweichen (H ₂ O) + Mörser	QIAamp DNA Mini Kit
Rosinen	FARMGOLD „Spezialrosinen“	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit
Zitrone (Fruchtfleisch)	Keine Information	-	CTAB
Zitrone (Fruchtfleisch)	Keine Information	Einweichen (H ₂ O) + Mörser	CTAB
Zitrone (Fruchtfleisch+Schale)	Keine Information	Halbieren + Reibeisen (Schnittfläche)	QIAamp DNA Mini Kit
Ribisel-Konfitüre	UWE Ribisel Konfitüre extra, 45 % Frucht	-	CTAB
Ribiselfrüchte (tiefgekühlt)	Keine Information	Auftauen + Mörser	CTAB
Ribiselfrüchte (tiefgekühlt)	Keine Information	Auftauen + Mörser	QIAamp DNA Mini Kit
Pflaumenmus	Darbo Naturrein „DELIKATESS POWIDL Pflaumenmus“	-	CTAB
Dörripflaumen	Pesendorfer „Pflaumen getrocknet“	Einweichen (H ₂ O) + Mörser	CTAB
Dörripflaumen	Pesendorfer „Pflaumen getrocknet“	Einweichen (H ₂ O) + Mörser	QIAamp DNA Mini Kit
Dörripflaumen	Pesendorfer „Pflaumen getrocknet“	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit
Mandeln	Keine Information	-	CTAB
GEWÜRZE			
Vanillezucker	bella	-	CTAB
Vanilleschote	Kotányi „Vanille Bourbon“	Aufschneiden und Inneres mit einem Spatel entnehmen	CTAB
Vanilleschote	Kotányi „Vanille Bourbon, Vanilleschote ganz“	Einweichen (H ₂ O) + Spatel	CTAB
Vanilleschote	Kotányi „Vanille Bourbon, Vanilleschote ganz“	Messer + Reibeisen	QIAamp DNA Mini Kit
Vanilleschote	Kotányi „Vanille Bourbon, Vanilleschote ganz“	Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit
Zimt (gemahlen)	Kotányi „Zimt gemahlen“	-	CTAB
Zimt (gemahlen)	Kotányi „Zimt gemahlen“	-	QIAamp DNA Mini Kit
Zimtstange	Kotányi	Einweichen (H ₂ O) + Reibeisen + Mörser	CTAB

Tab. 21 (Fortsetzung)

Lebensmittel	Firma / Produktname	Mechanische Bearbeitung	Extraktions-Methode
Zimtstange	Kotányi	Anfeuchten (H ₂ O) + Ultra-Turrax + Kenwood-Mixer	QIAamp DNA Mini Kit
EINZELLIGER PILZ			
Backhefe (Germ)	Natur Pur (Spar) Bio-Germ	-	CTAB

6.1.3.3 Herstellung der Extrakte aus dem Modell-Lebensmittel

Es wurde ein Modell-Lebensmittel auf der Basis eines Schokoladekuchen-Rezeptes hergestellt, aus welchem sieben Teige mit unterschiedlichen Prozentgehalten an Mohn erzeugt wurden. Anschließend wurden DNA-Extrakte aus den sieben rohen Teigen sowie aus daraus hergestellten, gebackenen Muffins gewonnen.

Der **Basis-Teig (Schokoladekuchen-Matrix)** wurde nach dem folgenden Rezept hergestellt:

400 g	Bio-Dinkel-Kuchenmehl (SPAR NATUR*PUR)
600 g	Bio-Rohrzucker (WIENER ZUCKER)
400 g	Naturjoghurt (SPAR FREE FROM (laktosefrei))
125 g	Kakao (BENSDORF)
200 g	Geriebene Walnüsse (SPAR)
320 g	Maiskeimöl (SPAR 100 % Echtes Maiskeimöl)
6 Stk.	Bio-Freilandeier (SPAR NATUR*PUR)

Alle Zutaten wurden gemischt und es wurden in sieben Versuchs-Ansätzen folgende Konzentrationen an Blaumohn in den Basisteig eingearbeitet: **0 % (Basis-Teig ohne Blaumohn), 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 % und 0,5 % Blaumohn**. Dazu wurden mit Hilfe einer Präzisionswaage und mit Spritzen zur genauen Dosierung des rohen Teiges folgende Mischungen hergestellt:

Für den **Teig mit 0,001 % Blaumohn** wurden 99,999 g roher Teig mit 0,001 g Blaumohn gemischt, für den **Teig mit 0,005 % Blaumohn** 99,995 g roher Teig mit 0,005 g Blaumohn, für den **Teig mit 0,01 % Blaumohn** 99,990 g roher Teig mit 0,010 g Blaumohn, für den **Teig mit 0,05 % Blaumohn** 99,950 g roher Teig mit 0,050 g Blaumohn, für den **Teig mit 0,1 % Blaumohn** wurden in 99,900 g rohen Teig 0,100 g Blaumohn sowie für den **Teig mit 0,5 % Blaumohn** in 99,500 g rohen Teig 0,500 g Blaumohn eingearbeitet.

Es wurde versucht, die Teigmischungen mit Hilfe eines Küchenmixers so gut wie möglich zu homogenisieren, um eine gleichmäßige Verteilung des eingearbeiteten Blaumohns in der Lebensmittel-Matrix zu erzielen. Es wurde schließlich jeweils ein Teil von allen sieben

Konzentrationen des rohen Teiges in jeweils eine Muffin-Form gefüllt und bei 180°C (Ober- und Unterhitze) 35 Minuten lang in einem Backofen gebacken, wobei jeweils ein roher Teig aufbewahrt wurde.

Anschließend wurden mit der CTAB-Methode aus jeder Konzentrationsstufe zwei Arten von DNA-Extrakten gewonnen, jeweils ein Extrakt aus dem rohen Teig und ein Extrakt aus den gebackenen Teigen (Muffins), sodass schließlich 14 verschiedene Extrakte für die Real-Time PCR zur Verfügung standen. Die Konzentrationsänderungen, welche sich durch den Gewichtsverlust bei den gebackenen Muffins im Vergleich zum rohen Teig ergaben, wurden schließlich korrigiert.

6.1.3.4 Herstellung der Extrakte aus kommerziell erhältlichen Produkten mit und ohne Mohn

Im Folgenden sind alle in lokalen Supermärkten erworbenen Produkte angeführt, aus welchen nach einer Homogenisierung DNA-Extrakte gewonnen wurden, um die Eignung der Real-Time PCR-Methode zum Nachweis von Mohn-DNA als Routine-Methode zu testen:

BAHLEN Haselnuss comtess, klein & fein

ÖLZ Topfenkipfel ohne Rosinen

THURNER Nuss-Strudel

ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE, Mohn-Zwetschke, handgeschöpfte Schokolade

BAHLEN Mohn-Marzipan comtess, klein & fein

ZWETTLER STIFTSSCHÄTZE Dinkelkräcker mit Mohn

JOMO Mohnkuchen

THURNER Powidl-Mohnstrudel

THURNER Mohnkipferl mit saftiger Mohnfüllung

ÖLZ Mohnkipfel

THURNER Mohnstrudel mit saftiger Mohnfüllung

ANKER Mohn-Strudel

WALDLAND Waldviertler Graumohn-Guglhupf

WALDLAND Waldviertler Graumohn-Zelten

WALDLAND Waldviertler Graumohn-Strudel

6.2 Real-Time PCR

6.2.1 Materialien, Durchführung und Auswertung der PCR

Für die Real-Time PCR wurde der iCycler mit der Detektionseinheit iQ5 (BIORAD) verwendet. Alle Untersuchungen wurden unter Anwendung eines **TaqMan-Assays** durchgeführt, wobei die Primer (Primer forward (P_f), Primer reverse (P_r)) und die Sonde von *Fatima Tazeen Husain*⁸³ entworfen wurden. Als Supermix wurde der iQTM-Supermix (BIORAD) eingesetzt.

6.2.1.1 Eigenschaften von Primer Forward, Primer Reverse und Sonde

Die in dieser Diplomarbeit verwendeten, von *Fatima Tazeen Husain*⁸³ entworfenen Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich und die von *Fatima Tazeen Husain*⁸³ entworfene Sonde von der Firma metabion bezogen.

Der **Primer forward** mit der Basensequenz **5'-TAGATTGGTTACTTCTGCATTGGC-3'** wurde mit Hilfe einer Reverse-Phase-Kartusche aufgereinigt¹²⁰ und war laut Herstellerfirma durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet: Er bildete keine Dimere und nur sehr schwache Sekundärstrukturen aus, besaß einen GC-Gehalt von 41,6 %, und die Schmelztemperatur (T_m) betrug 64,9°C.¹²⁰

Der **Primer Reverse** mit der Basensequenz **5'-AGCTTTAGATATGGCTTTCACTGC-3'** wurde mit Hilfe einer Reverse-Phase-Kartusche aufgereinigt¹²⁰ und besaß laut Herstellerfirma folgende Eigenschaften: Er bildete keine Dimere und nur schwache Sekundärstrukturen aus, wies einen GC-Gehalt von 41,6 % auf und die Schmelztemperatur (T_m) betrug 63,5°C.¹²⁰

Die **Sonde** wurde mit Hilfe einer HPLC aufgereinigt, und die Basensequenz des Oligonukleotids lautete **5'-FAM-TGGTTGATGTGCGCGGTACGG-BHQ-1-3'**.¹²¹

Die Sonde war mit dem **Reporter FAM** und dem **Quencher BHQ-1** markiert und bestand aus 21 Basen mit einem GC-Gehalt von 61,9 % und einer Schmelztemperatur (T_m) von 65,0°C.¹²¹

6.2.1.2 Arbeitsplatz

Zum Pipettieren gab es einen separaten Arbeitsplatz, welcher in einem eigenen Raum und daher von den restlichen Arbeitsplätzen im Labor getrennt lag, um Kontaminationen zu vermeiden. Der Arbeitsplatz wurde jeweils vor dem Pipettieren unter Verwendung des DNA-Exitus-Sprays von DNA-Kontaminationen befreit.

6.2.1.3 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes pro Well

Für die PCR wurden in jedem Reaktionsansatz (pro Well) insgesamt **25 µl** eingesetzt, deren Zusammensetzung aus iQTM-Supermix (BIORAD), Mastermix, DNA und H₂O_{dd} in **Tab. 22** angeführt ist. Der iQTM-Supermix wurde bei -20°C gelagert und jeweils zum Schluss zugegeben.

Tab. 22: Reaktionsansatz der PCR (Gesamtvolumen: 25 µl pro Well)

VOLUMEN	LÖSUNG
12,5 µl	iQTM-Supermix (BIORAD): DNA-Polymerase, Pufferlösung
7,5 µl	Mastermix (P _f , P _r , Sonde, H ₂ O _{dd})
5 µl	DNA oder (im Fall der Negativ-Kontrolle) H₂O_{dd}

6.2.1.4 Mastermix

Der Mastermix wurde vor jeder Real-Time PCR frisch hergestellt.

Es wurde jeweils das Vielfache der für jedes Well benötigten 7,5 µl (Anzahl der benötigten Ansätze x 7,5 µl) hergestellt, zusätzlich wurden noch sechs Ansätze (6 x 7,5 µl) hinzugerechnet – zwei Ansätze für die Positiv-Kontrollen, zwei Ansätze für die Negativ-Kontrollen und zwei Ansätze als Toleranzproben.

Beide Primer und die Sonde, welche zu Beginn jeweils in einer Konzentration von 100 µM vorlagen, wurden zunächst auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt, und daraus wurden die benötigten Volumina für den Mastermix entnommen.

6.2.1.5 Pipettierschema für die DNA-Extrakte und für die Positiv- und Negativ-Kontrollen

Zur Berechnung der für die Real-Time PCR benötigten Volumina wurden die Mittelwerte der photometrisch bestimmten DNA-Konzentrationen der jeweiligen Extrakte herangezogen, wobei die **DNA-Extrakte** auf eine Konzentration von **20 ng/µl** eingestellt wurden.

Betrug die DNA-Konzentration eines Extraktes 10-20 ng/µl, so wurde dieser auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt und es wurde ein spezielles Pipettierschema verwendet: Dazu wurden im Reaktionsansatz das doppelte Volumen (10 µl) des DNA-Extraktes sowie beim Mastermix 5 µl weniger H₂O_{dd} pipettiert, sodass die insgesamt DNA-Menge (100 ng pro Well) und das insgesamt Volumen pro Well gleich groß blieben.

Für die Positiv-Kontrollen wurden jeweils 5 µl (20 ng/µl) der Blaumohn-, Graumohn- oder Weißmohn-Extrakte und für die Negativ-Kontrollen 5 µl H₂O_{dd} anstatt der DNA eingesetzt.

6.2.1.6 Pipettier-Schemata für die Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration

Zur Optimierung der Primer-Konzentration wurde der DNA-Extrakt aus dem gemahlenden Blaumohn (Firma Back Mit) mittels Real-Time PCR mit *drei verschiedenen Primer-Paar-Konzentrationen (100/100, 200/200, 300/300 nM)* analysiert, wobei die Sonden-Konzentration jeweils 100 nM betrug.

Zur Optimierung der Sonden-Konzentration wurde der DNA-Extrakt aus dem gemahlenden Blaumohn mittels Real-Time PCR mit *drei verschiedenen Sonden-Konzentrationen (100/200/300 nM)* analysiert, wobei die Primer-Paar-Konzentration 200/200 nM betrug.

Die Pipettierschemata, welche für die Optimierung der Primer-Konzentrationen verwendet wurden, sind in **Tab. 23, 24 und 25** angeführt, und jene für die Optimierung der Sonden-Konzentration in **Tab. 24, 26 und 27**.

Tab. 23: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P_f, P_r, Sonde: 100 nM)

VOLUMEN	SUBSTANZ	KONZENTRATION pro Well (25 µl)
0,25 µl	Primer Forward (P _f)	100 nM
0,25 µl	Primer Reverse (P _r)	100 nM
0,25 µl	Sonde	100 nM
6,75 µl	H ₂ O _{dd}	-

Tab. 24: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P_f, P_r: jeweils 200 nM, Sonde: 100 nM)

VOLUMEN	SUBSTANZ	KONZENTRATION pro Well (25 µl)
0,50 µl	Primer Forward (P _f)	200 nM
0,50 µl	Primer Reverse (P _r)	200 nM
0,25 µl	Sonde	100 nM
6,25 µl	H ₂ O _{dd}	-

Tab. 25: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P_f, P_r: jeweils 300 nM, Sonde: 100 nM)

VOLUMEN	SUBSTANZ	KONZENTRATION pro Well (25 µl)
0,75 µl	Primer Forward (P _f)	300 nM
0,75 µl	Primer Reverse (P _r)	300 nM
0,25 µl	Sonde	100 nM
5,75 µl	H ₂ O _{dd}	-

Tab. 26: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P_f, P_r, Sonde: jeweils 200 nM)

VOLUMEN	SUBSTANZ	KONZENTRATION pro Well (25 µl)
0,50 µl	Primer Forward (P _f)	200 nM
0,50 µl	Primer Reverse (P _r)	200 nM
0,50 µl	Sonde	200 nM
6,00 µl	H ₂ O _{dd}	-

Tab. 27: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P_f, P_r: jeweils 200 nM, Sonde: 300 nM)

VOLUMEN	SUBSTANZ	KONZENTRATION pro Well (25 µl)
0,50 µl	Primer Forward (P _f)	200 nM
0,50 µl	Primer Reverse (P _r)	200 nM
0,75 µl	Sonde	300 nM
5,75 µl	H ₂ O _{dd}	-

6.2.1.7 Temperaturprogramm

Für die Real-Time PCR wurde das von *Fatima Tazeen Husain*⁸³ entwickelte Temperatur-Programm verwendet, wobei das Fluoreszenz-Signal während der Elongations-Phase gemessen wurde:

Tab. 28: Temperatur-Programm der Real-Time PCR

Phase vor den PCR-Zyklen		PCR-Zyklen	
Initiale Denaturierung	1 Denaturierung	2 Annealing	3 Elongation
95°C	95°C	60,3°C	72°C
3 Minuten	20 Sekunden	40 Sekunden	11 Sekunden

6.2.1.8 Auswertung der PCR: Threshold-Line, Nachweisgrenze und Effizienz

Für die Real-Time PCR wurde der iCycler mit der Detektionseinheit iQ5 (BIORAD) verwendet, wobei die **Threshold-Line** bei der Auswertung der PCR manuell in die passende Höhe verschoben werden konnte. Die Threshold-Line in dieser Diplomarbeit wurde meistens auf einen Wert von 100,00 oder 90,00 auf der Y-Achse (PCR Base Line Subtracted Curve Fit RFU) verschoben, um C_T-Werte verschiedener PCR-Läufe vergleichbar zu machen.

Als Nachweisgrenze der Real-Time PCR-Methode wurde die niedrigste Konzentration an Mohn-DNA definiert, bei welcher mindestens 95 % der Parallelbestimmungen ein positives Ergebnis (Anstieg des Fluoreszenz-Signals innerhalb der ersten 40 Zyklen) in der Real-Time PCR lieferten.

7 ANHANG

ABSTRACT

Lebensmittelallergien bedeuten für Betroffene eine große Einschränkung in der Lebensqualität, wobei Mohn-Samen ein besonderes Problem darstellen, da sie häufig „versteckt“ in Speisen vorkommen. Die Mohn-Allergie ist selten, führt jedoch häufig zu anaphylaktischen Reaktionen. Mohn zählt nicht zu den in der EU kennzeichnungspflichtigen 14 Lebensmittelallergenen.

In dieser Diplomarbeit wurde ein Real-Time PCR-Assay zum Nachweis von Mohn-DNA in Lebensmitteln entwickelt, basierend auf einer bereits publizierten Dissertation. Nach der Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration wurde die Anwendbarkeit auf drei Sorten von Schlafmohn (*Papaver somniferum*) untersucht. Der Assay ermöglicht den Nachweis von Blaumohn, Graumohn und Weißmohn, wobei für Blaumohn eine Amplifikationseffizienz von 100,0 % ermittelt wurde. Die Nachweisgrenze lag für alle drei Mohn-Sorten bei einer DNA-Konzentration von 0,1 ng/µl.

Der Real-Time PCR-Assay erwies sich als spezifisch für Mohn, es wurde keine Kreuzreaktion mit Dinkelmehl, Roggenvollkornmehl, Weizenmehl, Reis, Haselnuss, Walnuss, Pinienkern, Muskatnuss, Pistazie, Karotte, Kartoffel, Ingwer, Rote Linse, Mais, Rosine, Zitrone, Ribisel, Pflaume, Mandel, Vanille, Zimt und Backhefe beobachtet.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze in einer komplex zusammengesetzten Lebensmittelmatrix wurde ein Schokoladekuchenteig als Modell-Lebensmittel hergestellt. Im rohen Teig betrug die Nachweisgrenze 0,01 % Mohn, im gebackenen Teig 0,0058 % Mohn.

Bei der Anwendung des Real-Time PCR Assays auf 14 kommerzielle Lebensmittel wurde Mohn in jedem der elf Mohnprodukte und in einem von drei Produkten, die laut Zutatenliste keinen Mohn enthielten, nachgewiesen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
A ₂₈₀	Extinktion bei 280 nm
BHQ1	Black Hole Quencher 1
C	Cytosin
C _T	Threshold Cycle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyribo-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxyribo-Cytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyribo-Guanosin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribo-Nukleosid-Triphosphate
dTTP	Desoxyribo-Thymidin-Triphosphat
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
E. coli	Escherichia coli (Bakterium)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
FAM	6-Carboxyfluorescein
FcεRI	Fcε-Rezeptoren
G	Guanin
H ₂ O _{dd}	Bidestilliertes Wasser
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-4	Interleukin-4
LMIV	Lebensmittelinformationsverordnung
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
M-Zelle	Microfold cell (spezialisierte Epithelzelle des Darms)
OAS	Orales Allergiesyndrom
OFC	Oral Food Challenge
PAF	Platelet activating factor (Plättchen-aktivierender Faktor)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
P _f	Primer forward

Pfu	Polymerase des Bakteriums <i>Pyrococcus furiosus</i>
PKU	Phenylketonurie
P _r	Primer reverse
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Runs per Minute (Umdrehungen pro Minute)
SPT	Skin-Prick-Test
T	Thymin
Taq	Polymerase des thermophilen Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
WAO	World Allergy Organization
WHO	World Health Organization

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: PCR-Kurve mit exponentieller Phase und Plateau-Phase.....	61
Abb. 2: PCR-Kurven für sechs verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes.....	63
Abb. 3: Standardgerade aus der Analyse von sechs verschiedenen Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes.....	64
Abb. 4: Optimierung der Primer-Konzentration.....	68
Abb. 5: Optimierung der Sonden-Konzentration.....	69
Abb. 6: PCR-Kurven für sechs verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes.....	71
Abb. 7: Standardgerade aus der Analyse von sechs verschiedenen Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes.....	72
Abb. 8: PCR-Kurven für drei verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes.....	73
Abb. 9: PCR-Kurven für drei verschiedene Konzentrationen eines Graumohn-Extraktes.....	74
Abb. 10: PCR-Kurven für drei verschiedene Konzentrationen eines Weißmohn-Extraktes.....	74
Abb. 11: Bei der Kreuzreaktivitätsbestimmung erhaltene Amplifikationskurven von: Blaumohn, gemahlen (Positiv-Kontrolle), Dinkelmehl, Roggenvollkornmehl, Weizenmehl, Reis, Haselnuss, Walnuss, Pinienkern, Pistazie, Karotte, Ingwer, Rote Linse, Mandel, Backhefe.....	91
Abb. 12: Bei der Kreuzreaktivitätsbestimmung erhaltene Amplifikationskurven von: Blaumohn, gemahlen (Positiv-Kontrolle), Muskatnuss, Kartoffel, Mais, Rosine, Zitrone, Ribisel, Pflaume, Vanille, Zimt.....	92
Abb. 13: Bestimmung der Effizienz des Real-Time PCR-Assays für Blaumohn in rohem Teig.....	97
Abb. 14: Bestimmung der Effizienz des Real-Time PCR-Assays für Blaumohn in gebackenem Teig.....	98
Abb. 15: PCR-Kurven für die Positiv-Kontrolle (Blaumohn) sowie für elf Produkte mit und drei Produkte ohne Mohn in der Zutatenliste.....	103

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Häufigkeit von Symptomen in verschiedenen Organsystemen <i>nach</i> Hauber-Schwenk ³²	15
Tab. 2: Eintrittswege von Lebensmittelallergenen, betroffene Organe und Symptome <i>nach</i> Baltes; Matissek, ⁵ Hauber-Schwenk; Schwenk ³² und Murphy; Weaver ³⁴	16
Tab. 3: In der EU kennzeichnungspflichtige Lebensmittelallergene <i>nach</i> Demmel ⁶⁰	30
Tab. 4: Schlafmohnsamen: <i>in vitro</i> -Kreuzreaktionen und Kreuzallergien ⁴⁰⁻⁴⁵	38
Tab. 5: Konzentration und Reinheit der DNA-Extrakte aus Blau-, Grau- und Weißmohn.....	66-67
Tab. 6: Einfluss der Primer-Konzentration auf den C _T -Wert.....	69
Tab. 7: Einfluss der Sonden-Konzentration auf den C _T -Wert.....	70
Tab. 8: Mittelwerte der C _T -Werte für Blau-, Grau- und Weißmohn-Extrakte.....	70
Tab. 9: C _T -Werte für sechs verschiedene Konzentrationen eines Blaumohn-Extraktes.....	71
Tab. 10: C _T -Werte von Blaumohn-, Graumohn- und Weißmohn-Extrakten.....	75
Tab. 11: Konzentration und Reinheit der Extrakte der 1. Extraktion (CTAB-Methode)....	77-79
Tab. 12: Konzentration und Reinheit der Extrakte der 2. Extraktion (CTAB-Methode)....	80-81
Tab. 13: Konzentration und Reinheit der Extrakte der 3. Extraktion (CTAB, DNA Mini Kit).....	82-83
Tab. 14: Konzentration und Reinheit aller Extrakte (CTAB-Methode, QIAamp DNA Mini Kit).....	83-87
Tab. 15: Konzentration und Reinheit der Extrakte aus den rohen und gebackenen Teigen.....	93-94
Tab. 16: C _T -Werte der acht Parallelbestimmungen der Extrakte aus den rohen Teigen und aus den gebackenen Teigen.....	95-96
Tab. 17: Produkte ohne und mit auf der Zutatenliste deklariertem Mohn.....	99
Tab. 18: Konzentration und Reinheit der Extrakte aus 15 Produkten mit und ohne Mohn in der Zutatenliste.....	100-101
Tab. 19: C _T -Werte für 14 Produkte mit und ohne Mohn in der Zutatenliste sowie für Blaumohn und Graumohn.....	104
Tab. 20: Blau-, Grau- und Weißmohn: Produktnamen, Firmen und mechanische Methoden.....	112
Tab. 21: Herstellung der Extrakte für die Kreuzreaktivitäts-Tests.....	113-115

Tab. 22: Reaktionsansatz der PCR (Gesamtvolumen: 25 µl pro Well).....	118
Tab. 23: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P _f , P _r , Sonde: 100 nM).....	119
Tab. 24: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P _f , P _r : jeweils 200 nM, Sonde: 100 nM).....	119
Tab. 25: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P _f , P _r : jeweils 300 nM, Sonde: 100 nM).....	119
Tab. 26: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P _f , P _r , Sonde: jeweils 200 nM).....	119
Tab. 27: Pipettierschema für 7,5 µl Mastermix (P _f , P _r : jeweils 200 nM, Sonde: 300 nM).....	120
Tab. 28: Temperatur-Programm der Real-Time PCR.....	120

LITERATURVERZEICHNIS

1. Sicherer, S. H.; Sampson, H. A., Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018, **141**, 41-58.
2. Renz, H.; Allen, K. J.; Sicherer, S. H.; Sampson, H. A.; Lack, G.; Beyer, K. *et al.*, Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers* 2018, **4** (17098), 1-20.
3. Jones, S. M.; Burks, A. W., Food allergy. *The New England Journal of Medicine* 2017, **377**, 1168-1176.
4. Iweala, O.; Choudhary, S.; Commins, S., Food allergy. *Current Gastroenterology Reports* 2018, **20**, 1-6.
5. Baltes, W.; Matissek, R., *Lebensmittelchemie*. 7., vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg 2011, p 351-365.
6. Chesterton, C. M.; Leung, A. K. C.; Kamat, D., *Food allergies - New research*. Nova Science Publishers, Inc., New York 2008, p 91-120.
7. Ćirković Veličković, T.; Gavrović-Jankulović, M., *Food allergens - Biochemistry and molecular nutrition*. 1st Edition 2014 ed., Springer Science + Business Media: New York 2014, p 1-9.
8. Schöll, I.; Jensen-Jarolim, E., Allergenic potency of spices: Hot, medium hot or very hot. *International Archives of Allergy and Immunology* 2004, **135** (3), 247-261.
9. Jäger, L.; Wüthrich, B., *Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen*. 1. Aufl. ed., Fischer: Ulm 1998, p 125-129.
10. Sicherer, S. H.; Sampson, H. A., Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014, **133**, 291-307.
11. Gupta, R. S.; Springston, E. E.; Warrier, M. R.; Smith, B.; Kumar, R.; Pongracic, J. *et al.*, The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics* 2011, **128**, e17.
12. Asero, R.; Ballmer-Weber, B. K.; Beyer, K.; Conti, A.; Dubakiene, R.; Fernandez-Rivas, M. *et al.*, IgE-Mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007, **51**, 135-147.
13. Wood, R. A., The natural history of food allergy. *Pediatrics* 2003, **111**, 1631-1637.
14. Schoemaker, A. A.; Sprickelman, A. B.; Grimshaw, K. E.; Roberts, G.; Grabenhenrich, L.; Rosenfeld, L. *et al.*, Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children - EuroPrevall birth cohort. *Allergy* 2015, **70**, 972.
15. Xepapadaki, P.; Fiocchi, A.; Grabenhenrich, L.; Roberts, G.; Grimshaw, K. E.; Fiandor, A. *et al.*, Incidence and natural history of hen's egg allergy in the first 2 years of life - the EuroPrevall birth cohort study. *Allergy* 2016, **71**, 357.
16. Peters, R. L.; Allen, K. J.; Dharmage, S. C.; Koplin, J. J.; Dang, T.; Tilbrook, K. P. *et al.*, Natural history of peanut allergy and predictors of resolution in the first 4 years of life: A population-based assessment. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014.

17. Peters, R. L.; Koplin, J. J.; Gurrin, L. C.; Dharmage, S. C.; Wake, M. M.; Ponsonby, A.-L. *et al.*, The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017, **140**, 153.e8.
18. Osborne, N. J.; Koplin, J. J.; Martin, P. E.; Gurrin, L. C.; Lowe, A. J.; Matheson, M. C. *et al.*, Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011, **127**, 676.e2.
19. Prescott, S. L.; Pawankar, R.; Allen, K. J.; Campbell, D. E.; Sinn, J. K.; Fiocchi, A. *et al.*, A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organization Journal* 2013, **6**, 21.
20. Belohlavkova, S.; Kabrnova, R.; Pospisilova, T.; Fuchs, M., P34 - Food-induced anaphylaxis in children: Most common triggers in the Czech Republic. *3rd Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM), Clinical and Translational Allergy: Athens 2014*, Vol. 4 (Suppl 1), p 89.
21. Dalal, I., Allergy to seeds. *Pediatric Allergy Immunology* 2011, **22** (1), e150-e154.
22. Leung, A. S.; Wong, G. W.; Tang, M. L., Food allergy in the developing world. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018, **141**, 76-78; 78.e1.
23. Botha, M.; Basera, W.; Facey-Thomas, H. E.; Gaunt, B.; Gray, C. L.; Ramjith, J. *et al.*, Rural and urban food allergy prevalence from the South African Food Allergy (SAFFA) study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2019, **143**, 668.e2.
24. Hu, Y.; Chen, J.; Li, H., Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999. *Pediatrics International* 2010, **52**, 824.
25. Koplin, J. J.; Peters, R. L.; Ponsonby, A. L.; Gurrin, L. C.; Hill, D.; Tang, M. L. *et al.*, Increased risk of peanut allergy in infants of Asian-born parents compared to those of Australian-born parents. *Allergy* 2014, **69**, 1647.
26. Panjari, M.; Koplin, J. J.; Dharmage, S. C.; Peters, R. L.; Gurrin, L. C.; Sawyer, S. M. *et al.*, Nut allergy prevalence and differences between Asian-born children and Australian-born children of Asian descent: A state-wide survey of children at primary school entry in Victoria, Australia. *Clinical & Experimental Allergy* 2016, **46**, 609.
27. Ärztezeitung, Klärung - Lebensmittelallergie oder Intoleranz? *Ärztezeitung* 2016.
28. Richter, K.; Rubin, D.; Lampen, A., Aktuelle Aspekte zur Risikobewertung von Allergenspuren in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 3: Berlin Heidelberg 2012, Vol. 55, pp 394-401.
29. Rahman Anas, M. A., *Food allergy - Methods of detection and clinical studies*. CRC Press: Boca Raton (Florida) 2017, p 1-34.
30. Johansson, S. G.; Hourihane, J. O.; Bousquet, J.; Bruijnzeel-Koomen, C.; Dreborg, S.; Haahtela, T. *et al.*, A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001, **56**, 813-824.
31. Jakob, T.; Rafei-Shamsabadi, D.; Spillner, E.; Müller, S., Diagnostics in Hymenoptera venom allergy: Current concepts and developments with special focus on molecular allergy diagnostics. *Allergo Journal International* 2017, **26** (3), 93-105.

32. Hauber-Schwenk, G.; Schwenk, M., *dtv-Atlas Ernährung*. Deutscher Taschenbuch Verlag: München 2000, p 148-151.
33. Campbell, N. A.; Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wassermann, S. A.; Minorsky, P. V. *et al.*, *Biologie*. 8., aktualisierte Auflage, Pearson Studium: München u.a. 2009, p 1224-1232; 1259-1262; 1282-1307; 1784-1852.
34. Murphy, K.; Weaver, C., *Janeway Immunologie*. 9. Auflage ed., Springer-Verlag GmbH Deutschland: Berlin Heidelberg 2018, p 783-825.
35. Vogel, G.; Angermann, H., *dtv-Atlas Biologie*. Band 2 ed., Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co: München 2002, p 284-289; 322-325.
36. James, J. M.; Burks, W.; Eigenmann, P. A., *Food Allergy*. Elsevier/Saunders: Edinburgh [u.a.] 2012, p 1-13; 49-127; 165-184; 271-272.
37. Kowalczyk, A.; Kuczyńska, R.; Zbikowska-Gotz, M.; Bartuzi, Z.; Krogulska, A., Anaphylaxis in an eight-year-old boy following the consumption of poppy seed. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 2020, 30(4), 1-6.
38. Martin, M.; Resch, K., *Immunologie*. UTB / Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart 2009, p 19-31; 91-215.
39. Pafundo, S.; Gulli, M.; Marmioli, N., Comparison of DNA extraction methods and development of duplex PCR and real-time PCR To detect tomato, carrot and celery in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, 59, 10414-10424.
40. Jensen-Jarolim, E.; Gerstmayer, G.; Kraft, D.; Scheiner, O.; Ebner, H.; Ebner, C., Serological characterization of allergens in poppy seeds. *Clinical and Experimental Allergy* 1999, 29, 1075-1079.
41. Oppel, T.; Thomas, P.; Wollenberg, A., Cross-Sensitization between poppy seed and buckwheat in a Food-Allergic patient with Poppy Seed Anaphylaxis. *International Archives of Allergy and Immunology* 2006, 140, 170-173.
42. Patel, A.; Bahna, S. L., Hypersensitivities to sesame and other common edible seeds. *Allergy* 2016, 71 (10), 1405-1413.
43. Varga, E.-M.; Kollmann, D.; Zach, M.; Bohle, B., Anaphylaxis to buckwheat in an atopic child: A risk factor for severe allergy to nuts and seeds? *International Archives of Allergy and Immunology* 2011, 156, 112-116.
44. Vocks, E.; Borga, A.; Szliska, C.; Seifert, H. U.; Seifert, B.; Burow, G. *et al.*, Common allergenic structures in hazelnut, rye grain, sesame seeds, kiwi, and poppy seeds. *Allergy* 1993, 48 (3), 168-72.
45. Gloor, M.; Kägi, M.; Wüthrich, B., Poppyseed anaphylaxis. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 1995, 125 (30), 1434-7.
46. Faller, A.; Schünke, M.; Schünke, G., *Der Körper des Menschen - Einführung in Bau und Funktion*. 13., komplett überarbeitete und neu gestaltete Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart 1999, p 296-306; 377-440.
47. Linss, W.; Franghänel, J., *Histologie, Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie*. Walter de Gruyter: Berlin 1999, p 174-188.

48. Biesalski, H. K.; Grimm, P., *Taschenatlas der Ernährung*. 3., erweiterte und aktualisierte Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart 2004, p 44-129.
49. Stallmach, A.; Vehreschild, M. J. G. T., *Mikrobiom*. De Gruyter: Berlin Boston 2016, p 1-5.
50. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.; Hein, L., *Pharmakologie und Toxikologie*. 18., vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York 2016, p 147-153; 216; 273-277.
51. Kütting, B.; Brehler, R., Exercise-induced anaphylaxis. *Allergy* 2000, 55 (6), 585-586.
52. Deutsches Ärzteblatt, Scombroid-Fischvergiftung. *Deutsches Ärzteblatt* 1993, 90.
53. Du Toit, G.; Sampson, H. A.; Plaut, M.; Burks, A. W.; Akdis, C. A.; Lack, G., Food allergy: Update on prevention and tolerance. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2018, 141, 30-40.
54. Koplin, J. J.; Allen, K. J., Optimal timing for solids introduction – why are the guidelines always changing? *Clinical & Experimental Allergy* 2013, 43, 834.
55. Du Toit, G. F.; Katz, Y. M.; Sasieni, P. P.; Mesher, D. M.; Maleki, S. J.; Fisher, H. R. et al., Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, 122, 991.
56. Du Toit, G.; Roberts, G.; Sayre, P. H.; Bahnson, H. T.; Radulovic, S.; Santos, A. F. et al., Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *The New England Journal of Medicine* 2015, 372, 813.
57. Du Toit, G.; Sayre, P. H.; Roberts, G.; Sever, M. L.; Lawson, K.; Bahnson, H. T. et al., Effect of avoidance on peanut allergy after early peanut consumption. *The New England Journal of Medicine* 2016, 374, 1443.
58. Koplin, J. J.; Osborne, N. J.; Wake, M. M.; Martin, P. E.; Gurrin, L. C.; Robinson, M. N. et al., Can early introduction of egg prevent egg allergy in infants? A population-based study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, 126, 813.
59. Burks, A. W.; Tang, M.; Sicherer, S.; Muraro, A.; Eigenmann, P. A.; Ebisawa, M. et al., Food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012, 129, 906-920.
60. Demmel, A.; Waiblinger, H.-U.; Busch, U., Lebensmittelrechtliche Regelungen für Allergene in der EU. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 7, Springer-Verlag: Berlin - Heidelberg 2016, Vol. 59, pp 872-877.
61. Amtsblatt der Europäischen Union, *Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011*. 2011, L 304/18 - L 304/63.
62. Österreich, *Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, Jahrgang 2014, Teil II, 175. Verordnung*, Österreichische Staatsdruckerei: Wien 2014.
63. Schnadt, S., Problematik "versteckter Allergene" in Lebensmitteln aus Sicht des allergischen Verbrauchers. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 3 2012, Vol. 55, pp 385-393.
64. Rätsch, C., *Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen*. 7. Auflage ed., AT Verlag: Aarau (Schweiz) 2004, p 401-414.

65. Dachler, M.; Pelzmann, H., *Arznei- und Gewürzpflanzen*. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage, Österreichischer Agrarverlag: Klosterneuburg 1999.
66. Keskin, O.; Sekerel, B. E., Poppy seed allergy: A case report and review of the literature. *Allergy & Asthma Proceedings* 2006, 27, 396.
67. Köppl, P., Anbau- und Kulturanleitung Mohn (*Papaver somniferum* L.) *Landwirtschaftskammer Oberösterreich* 2010, p 1-10.
68. Jacoby, A., Bei aller Bergromantik glasklare Strategien. *Lebensmittel Zeitung* 2003, 42.
69. Será, B.; Gajdová, I.; Šerý, M.; Špatenka, P., New physicochemical treatment method of poppy seeds for agriculture and food industries. *Plasma Science and Technology* 2013, 15, 935-938.
70. Senser, F.; Souci, S. W.; Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, *Der kleine "Souci-Fachmann-Kraut": Lebensmitteltabelle für die Praxis*. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart 1991.
71. Armentia, A.; Ruiz-Muñoz, P.; Quesada, J. M.; Postigo, I.; Herrero, M.; Martín-Gil, F. J., Clinical value of morphine, pholcodine and poppy seed IgE assays in drug-abusers and allergic people. *Allergologia et Immunopathologia* 2011, 41(1), 37-44.
72. Van Gasse, A. L.; Hagendorens, M. M.; Sabato, V.; Bridts, C. H.; De Clerck, L. S.; Ebo, D. G., IgE to poppy seed and morphine are not useful tools to diagnose opiate allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 2015, 3, 396-399.
73. Liu, W.-S., Der Mohn-Test. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2007, 6, 556-557.
74. Mills, E. N.; Shewry, P. R., *Plant Food Allergens*. Blackwell Science Ltd: Oxford 2004, p 145.
75. Frantzen, B.; Bröcker, E.-B.; Trautmann, A., Immediate-type allergy caused by poppy seed. *Allergy* 2000, 55 (1), 97-98.
76. Dalal, I.; Goldberg, M.; Katz, Y., Sesame Seed Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports* 2012, 12, 345.
77. Blazowski, L.; Kurzawa, R., A first molecular profile of seed proteins causing anaphylaxis in children. 2S Albumins are the most frequent trigger of severe food anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2017, 139 (400).
78. Eriksson, N. E.; Möller, C.; Werner, S.; Magnusson, J.; Bengtsson, U.; Zolubas, M., Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania, and Russia. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 2004, 14(1), 70-79.
79. Crivellaro, M.; Bonadonna, P.; Dama, A.; Senna, G. E.; Mezzelani, P.; Mistrello, G. et al., Severe systemic reactions caused by poppy seed. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 1999, 9, 59.
80. Panasoff, J., Poppy Seed Anaphylaxis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2008, 18(3), 224-225.
81. Braun, W.; Kövary, P. M., Poppy seed allergy. *Zeitschrift für Hautkrankheiten* 1988, 63 (4), 344.

82. Gamboa, P. M.; Jauregui, I.; Gonzalez, G.; Barturen, P.; Antepara, I., Allergic contact urticaria from poppy flowers (*Papaver rhoeas*). *Contact Dermatitis* 1997, 37, 140-141.
83. Husain, F. T., *Dissertation: Development of analytical methods for the detection of various food allergens*. Universität Wien 2010, p 20-21; 127-148; 180-189.
84. López-Calleja, I. M.; de La Cruz, S.; González, I.; García, T.; Martín, R., Duplex real-time PCR using TaqMan® for the detection of sunflower (*Helianthus annuus*) and poppy (*Papaver rhoeas*) in commercial food products. *LWT - Food Science and Technology* 2016, 65, 999-1007.
85. López-Calleja, I. M.; García, A.; Madrid, R.; García, T.; Martín, R.; González, I., Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for simultaneous detection of DNA from sunflower, poppy, flaxseed, sesame and soy allergenic ingredients in commercial food products. *Food Control* 2017, 71, 301-310.
86. Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M., *Lebensmittelanalytik*. 5., vollständig überarbeitete Ausgabe, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg 2014, p 15-33; 137-155.
87. Di Pinto, A.; Forte, V.; Guastadisegni, M. C.; Martino, C.; Schena, F. P.; Tantillo, G., A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food control* 2007, 18, 76-80.
88. Zhang, W.; Xing, F.; Selvaraj, J. N.; Liu, Y., Comparison of DNA extraction methods for GM rice and GM rice-derived food products in China. *Journal of Food Biochemistry* 2014, 38, 388-396.
89. Allen, G.; Flores-Vergara, M.; Krasnyanski, S.; Kumar, S.; Thompson, W., A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols* 2006, Vol. 1, 2320-2325.
90. Li, J.; Wang, S.; Yu, J.; Wang, L.; Zhou, S., A Modified CTAB protocol for plant DNA extraction. *Chinese Bulletin of Botany* 2013, 48(1), 72-78.
91. Fu, Z.-y.; Song, J.-c.; Jameson, P. E., A rapid and cost effective protocol for plant genomic DNA isolation using regenerated silica columns in combination with CTAB extraction. *Journal of Integrative Agriculture* 2017, 16(8), 1682-1688.
92. Qiagen, *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Vol. 04/2010, p 33-36. <https://www.qiagen.com/ch/resources/resourcedetail?id=bf602afb-cc1e-4032-b762-6e364adf39ff&lang=en> (letzter Zugriff 15.04.2021).
93. Murray, M. G.; Thompson, W. F., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, U.K. 1980, 8, 4321-4325.
94. Mülhardt, C., *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg 2013, p 26-42; 81-114.
95. Štorchová, H.; Hrdličková, R.; Chrtěk, J.; Tetera, M.; Fitze, D.; Fehrer, J., An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon* 2000, 49, 79-84.
96. Weigel, D.; Glazebrook, J., Quick miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009, 4 (3), 1-2.
97. Clarke, J. D., Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009, 4 (3), 1-2.

98. Irfan, M.; Ting, Z. T.; Yang, W.; Chunyu, Z.; Qing, M.; Lijun, Z.; *et al.*, Modification of CTAB protocol for maize genomic DNA extraction. *Research Journal of Biotechnology* 2013, 8(1), 41-45.
99. Qiagen, *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Vol. 05/2016, p 5-18, 44-50. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en> (letzter Zugriff 15.04.2021)
100. Rao, A.; Gebauer, D.; Cölfen, H., Modulating nucleation by kosmotropes and chaotropes: Testing the waters. *Crystals* 2017, 7, 1-15.
101. Harris, D. C., *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. 8. Auflage ed., Springer-Verlag: Berlin Heidelberg 2014, p 443-452.
102. Jansohn, M.; Rothhämel, S., *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage ed., Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg 2012, p 1-18; 95-100; 132-171.
103. Thermo Fisher Scientific, 260 / 280 and 260 / 230 Ratios. In *T009-Technical Bulletin NanoDrop 1000 & 8000*, Wilmington, Delaware USA, p 1-2.
104. Thermo Fisher Scientific, Assessment of nucleic acid purity. In *T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*, Wilmington, Delaware USA, p 1-2.
105. Shaughnessy, M. F., *The inventions and discoveries of the world's most famous scientists*. Nova Science Publishers, Inc.: New York 2018, p 289-297.
106. Weiss, J., Luminaries in laboratory medicine: Kary Mullis. *Laboratory Medicine* 2009, 40, 441-442.
107. Karnath, L., Remembering Dr. Kary Mullis, Inventor of PCR. *Molecular Frontiers Journal* 2019, 3, 101-102.
108. Müller, H.-J.; Prange, D. R., *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. 2. Auflage ed., Springer-Verlag: Berlin Heidelberg 2016, p 1-15; 65-76.
109. Morkes, J., PCR inventor Kary Mullis - biotech's untamed genius. *R & D* 1991, 33 (10).
110. Busch, U., *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen*. Springer Verlag: Berlin Heidelberg 2010, p 19-47; 253-270.
111. Ableitner, O., *Einführung in die Molekularbiologie: Basiswissen für das Arbeiten mit DNA und RNA im Labor*. 2., überarbeitete Auflage, Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH: Wiesbaden 2018, p 19-31; 36-47; 70-73.
112. Murken, J.; Grimm, T.; Holinski-Feder, E., *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 7., vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2006, p 3-7.
113. Passarge, E., *Taschenatlas der Genetik*. 2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York 2004, p 30-41.
114. Vogel, G.; Angermann, H., *dtv-Atlas Biologie*. Band 1 ed., Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH & Co: München 2001, p 32-35.

115. Kontanis, E. J.; Reed, F. A., Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *Journal of Forensic Sciences* 2006, 51, 795-804.
116. Wiedemann, C.; Schulz, H. L.; Weber, B. H., Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum* 2004, 1/04, 99-102.
117. Biorad, Real-Time PCR Applications Guide. *Bulletin* 5279 2006, 1-6.
118. Forootan, A.; Sjöback, R.; Björkman, J.; Sjögreen, B.; Linz, L.; Kubista, M., Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification* 2017, 12, 1-6.
119. Burns, M.; Valdivia, H., Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology* 2008, 226, 1513-1524.
120. Sigma, Technical Datasheet (Mohn f and Mohn r). 2011, *Bin Numer: 553*.
121. Metabion, Synthesereport (Mohn-Sonde). 2012, *Order Counter: 4230*.