

Entwicklung von DNA-basierten Nachweismethoden pflanzlicher Inhaltsstoffe in Phytopharmaka

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation
von

M.Sc. Kai-Oliver Mutz
geboren am 20.10.1982 in Hannover

Referent:

Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent:

Prof. Dr. Andreas Hahn

Tag der Promotion:

21.11.2012

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover (Deutschland) in der Zeit vom April 2009 bis Juni 2012 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Frank Stahl durchgeführt. Ich versichere hiermit, dass ich die Dissertation zum Thema

Entwicklung von DNA-basierten Nachweismethoden pflanzlicher Inhaltsstoffe in Phytopharmaka

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Master-, Diplom- oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, Juni 2012

Kai-Oliver Mutz

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe sowie seine stets freundlichen Unterstützung.

Ein großes Dankeschön auch an Prof. Dr. Andreas Hahn für die Übernahme des Korreferats.

Besonderer Dank gilt Dr. Frank Stahl für die nachhaltige Unterstützung in fachlichen Fragen, Förderung und das ausgezeichnete Arbeitsklima.

Dr. Johanna Walter danke ich sehr für ihre fachliche und nichtfachliche Unterstützung, für nette Gespräche und das intensive Korrekturlesen.

Danke an Martin Pähler für seine umfangreichen Hilfestellungen im Labor und die angenehme Pausengestaltung.

Martina Weiss danke ich besonders für ihre Hilfe bei diversen FPLC-Problemen und für viele wertvolle Tipps.

Dank den Zellkulturmädels Sonja, Sophia und Tonya für ihre Hilfe auf unbekanntem Terrain sowie Mike für die Reaktorsache.

Für die wichtige Hilfe im Labor bedanke ich mich bei meiner Heerschar an HiWis, Schwerpunktlern, Diplomanden, Masteranden Franziska Sambale, Eugenia Erbes, Ki-duk Seo, Amal Ahlab, Jörg Schmidt-Hager, Daniel Schaper, Mariam Suleiman, Claudia Räke und Bufdi Anna.

Meinen gesamten Kollegen am TCI danke ich für eine besondere Zeit. Ich fühlte mich sehr wohl und wir hatten viel Spaß. In den vielen Treffen auch außerhalb der Arbeitszeit sind Freundschaften entstanden. Danke dafür!

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern für die jahrelange Geduld und Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Kurzfassung

In Übereinstimmung mit europäischen Richtlinien erwartet das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte eine umfassende qualitative und quantitative Charakterisierung der Inhaltsstoffe von pflanzlichen Arzneimitteln für deren Zulassung. Heute werden hauptsächlich mikroskopische oder chemische Analysetechniken verwendet. Ihr großer Nachteil ist die eingeschränkte Möglichkeit zur Differenzierung zwischen mehreren verschiedenen pflanzlichen Bestandteilen eines medizinischen Mischprodukts. Sekundäre pflanzliche Naturstoffe sind häufig nicht speziesspezifisch und notwendige Studien bezüglich der Spezifität von Proteinen sind nicht vorhanden. In der Taxonomie erfolgt eine verwandtschaftliche Zuordnung von Lebewesen seit geraumer Zeit aufgrund von Sequenzunterschieden der DNA. Diese Spezifität der DNA wird sich zunehmend auch in der Qualitätskontrolle pflanzlicher Produkte zu Nutze gemacht. Mit DNA-basierten Analysen kann heute die Identifizierung von hunderten von verschiedenen Arzneipflanzen realisiert werden. In dieser Arbeit wurden für das pflanzliche Arzneimittel Lefteria und seine pflanzlichen Inhaltsstoffe Bärlauch, Mistel und Weißdorn auf Grundlage der PCR-Technik drei verschiedene qualitative und eine quantitative Strategie mittels *real-time* PCR umgesetzt. Vor deren Realisierung wurde in weiteren Ansätzen eine geeignete DNA-Extraktionsmethode gefunden und etabliert. Sowohl Extraktions- als auch PCR-Methoden wurden charakterisiert und verglichen. Darüber hinaus wurde auf Basis von ionischen Wechselwirkungen eine neuartige Variante zur Isolierung pflanzlicher DNA entwickelt. Es wurde festgestellt, dass die selbstentwickelte DNA-Extraktion auf Basis von positiv geladenen Magnetpartikeln die optimale Methode zur DNA-Isolierung aus Lefteria-Tabletten ist. Die optimierte Multiplex-Nested-PCR für die qualitative Analyse ist hochgradig spezifisch und arbeitet mit einer Analysekorrektheit von nahezu 100%. Die ebenfalls vollkommen spezifische *real-time* PCR zur quantitativen Analyse hat DNA-Nachweisgrenzen im Femtogrammbereich, liefert stets reproduzierbare Ergebnisse und kann, statistisch nachgewiesen, Abweichungen von der Lefteria-Originalrezeptur ab 5% nahezu fehlerfrei detektieren.

Schlagwörter: *DNA-Extraktion, Multiplex-PCR, Arzneipflanzen, real-time PCR*

Abstract

The Federal Institute for Drugs and Medical Devices complies with European guidelines in terms of qualitative and quantitative characterization for the registration of herbal medicinal products and their ingredients. Today most approaches are based on microscopic or chemical analyses. Their main disadvantage is the limited differentiation between species concerning plant compositions. Secondary natural products are usual not species-specific and suitable studies about protein specificity are unavailable. In phylogenetic taxonomy all life-forms became classified by specific DNA barcoding. For this reason it is also possible to use DNA as a plant specific marker for quality control of herbal medicinal products. So DNA based analyses are increasingly widespread for the identification of hundreds of medicinal plants. In this thesis the plant components ramsons, mistletoe, and hawthorn of the traditional medicinal product Lefteria could be identified by several state-of-the-art PCR techniques. Moreover, real-time PCR was used to quantify these ingredients. But first of all suitable DNA extraction methods had to be established. Both DNA extraction and PCR applications were characterized, compared, and rated. In this context a novel option for plant DNA isolation based on ionic interactions was developed. It was found out that self-developed DNA extraction by amine-modified magnetic beads is best for DNA isolation from Lefteria tablets. Optimized multiplex nested PCR for plant identification is absolute specific and provides results with almost 100% correctness. The specific real-time PCR for quantification has femtogram detection limits. The method is completely reproducible and 5% deviations from Lefteria composition can be detected without fault.

Key words: *DNA extraction, multiplex PCR, medicinal plants, real-time PCR*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	2
3	Theoretische Grundlagen	3
3.1	Phytopharmaka	3
3.2	Arzneipflanzen	4
3.2.1	Bärlauch	5
3.2.2	Mistel	6
3.2.3	Weißdorn	7
3.3	Zulassung und Registrierung von Phytopharmaka in der Europäischen Union	8
3.3.1	Arten von Phytopharmaka	10
3.3.2	Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe	11
3.4	Methoden zur Identifikation und Quantifizierung pflanzlicher Inhaltsstoffe	12
3.4.1	Klassische Nachweismethoden	12
3.4.2	Immunologische Nachweismethoden	14
3.4.3	DNA-basierte Methoden zur Identifizierung	14
3.5	Situation bei Bärlauch, Mistel und Weißdorn	18
3.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR	21
3.6.1	Ablauf der Reaktion	21
3.6.2	PCR-Effizienz	23
3.6.3	Relative Quantifizierung	25
3.6.4	Absolute Quantifizierung	27
3.6.5	Detektionsmethoden	28
4	Experimentelle Arbeiten	31
4.1	Verschiedene Methoden zur Extraktion von genomischer DNA	31
4.1.1	DNA-Präzipitation und Silica-basierte Adsorption	35
4.1.1.1	Evaluierung der Extraktionsprotokolle	36
4.1.1.2	DNA-Ausbeute bei den verschiedenen Pflanzenmatrizen	38
4.1.1.3	Qualität der genomischen DNA	40

4.1.1.4	Zusammensetzung der DNA-Proben	41
4.1.1.5	Zwischenfazit: Vergleich konventioneller Extraktionsmethoden	42
4.1.2	Extraktion pflanzlicher DNA mittels magnetischer Partikel	44
4.1.3	Extraktion pflanzlicher DNA mittels Silica-beschichteter <i>beads</i>	46
4.1.3.1	Vergleich kommerzieller Kits	46
4.1.3.2	Verwendung selbst hergestellter Puffer	49
4.1.3.3	Zwischenfazit: Silica- <i>beads</i>	49
4.1.4	Entwicklung der auf ionischen Wechselwirkungen basierten DNA-Extraktion	50
4.1.4.1	Bestimmung einer geeigneten <i>bead</i> -Menge	50
4.1.4.2	Einfluss von Salzgehalt und pH-Wert auf die Elution	52
4.1.4.3	Zwischenfazit: Methodenentwicklung	54
4.1.5	Extraktion pflanzlicher DNA mittels Amino-beschichteter <i>beads</i>	54
4.1.5.1	Zwischenfazit: Amino- <i>beads</i>	56
4.1.6	Vergleich der <i>bead</i> -basierten Extraktionsmethoden	57
4.1.6.1	Zwischenfazit: DNA-Ausbeute und -Qualität der <i>bead</i> -basierten Methoden	59
4.1.7	Abschließende Bewertung sämtlicher Extraktionsmethoden	60
4.1.8	Speziesspezifische DNA-Extraktion	61
4.1.9	Zusammenfassung: DNA-Extraktion	65
4.2	Entwicklung qualitativer Methoden zur Identifizierung der Listeria-Inhaltsstoffe	66
4.2.1	Multiplex-PCR	67
4.2.1.1	Target-Sequenzen und Primerdesign	67
4.2.1.2	Evaluierung der PCR-Primer	69
4.2.1.3	Entwicklung des Multiplex-Assays	71
4.2.1.4	Optimierung der Multiplex-PCR	73
4.2.1.5	Analytische Spezifität	74
4.2.1.6	Nachweisgrenzen	76
4.2.1.7	Dynamischer PCR-Bereich	77
4.2.1.8	Reproduzierbarkeit und diagnostische Sensitivität	78
4.2.1.9	Zwischenfazit: Multiplex-PCR	79
4.2.2	Nested-PCR	80
4.2.2.1	Analytische Leistungsmerkmale	82
4.2.2.2	Zwischenfazit: Nested-PCR	86
4.2.3	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>	87
4.2.3.1	Primerdesign	87
4.2.3.2	Ablauf der Amplifikation	89
4.2.3.3	LAMP-Nachweis für Bärlauch, Mistel und Weißdorn	90
4.2.3.4	Analytische Leistungsmerkmale	91

4.2.3.5	Zwischenfazit: <i>Loop-mediated isothermal amplification</i>	94
4.2.4	Zusammenfassung: Qualitative Nachweise der Lefteria-Inhaltsstoffe	96
4.3	Entwicklung eines Systems zur absoluten Quantifizierung der Lefteria-Inhaltsstoffe	97
4.3.1	Target-Sequenzen und Primerdesign	98
4.3.2	Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen	101
4.3.3	Herstellung von Plasmidstandards	103
4.3.4	PCR-Effizienzen	111
4.3.5	Molekulare Zusammensetzung von Lefteria-DNA	112
4.3.6	Target-Kopien in den Pflanzengenomen	115
4.3.7	Korrelation von DNA-Menge, Genomgröße und Pulvermenge	116
4.3.8	Zwischenfazit: Aufbau des <i>real-time</i> PCR-Assays	119
4.3.9	Dynamische Messbereiche und Nachweisgrenzen	119
4.3.10	Analytische Spezifität	123
4.3.11	Zwischenfazit: Auswahl der geeignetsten Targets	124
4.3.12	Analyse von DNA-Gemischen	125
4.3.13	Diagnostische Sensitivität der <i>real-time</i> PCR	126
4.3.14	Diagnostische Sensitivität des Gesamtassays	128
4.3.15	Zwischenfazit: Analytische Leistungsmerkmale	130
4.3.16	Vorstellung des fertig entwickelten Gesamtassay	131
4.3.17	<i>Real-time</i> Multiplex-PCR	132
4.3.18	Zwischenfazit: <i>Real-time</i> Multiplex-PCR	136
4.3.19	Zusammenfassung: <i>Real-time</i> PCR	137
5	Zusammenfassung und Ausblick	138
A	Anhang	142
A.1	Polyploidie und Genomgrößenbestimmung	142
A.1.1	Durchflusszytometrische Bestimmung	144
A.1.2	Bestimmung der Genomgrößen von Bärlauch, Mistel und Weißdorn	148
A.1.3	<i>Real-time</i> PCR-basierte Bestimmung der Genomgrößen	149
A.1.4	Zusammenfassung: Genomgrößenbestimmung	155
A.2	Etablierung molekularbiologischer Methodenprotokolle	156
A.2.1	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	156
A.2.2	pET-Vektorsystem	156
A.2.3	Klonierungsstrategien	157
A.2.4	Stammselektion	160
A.2.5	Proteinproduktion	168
A.2.6	Proteinaufreinigung	169

A.2.7	Bioaktivitätstest	172
A.2.8	Zusammenfassung: Methodenetablierung	173
A.3	Verwendete Materialie	174
A.3.1	Chemikalien	174
A.3.2	Enzyme und Proteine	175
A.3.3	Kits	175
A.3.4	Lösungen, Medien, Vektoren und Zellen	176
A.4	Primer und Sonden	177
A.4.1	Multiplex-PCR	177
A.4.2	Nested-PCR	178
A.4.3	LAMP	178
A.4.4	<i>Real-time</i> PCR	178
A.4.5	Klonierung von Plasmidstandards	179
A.4.6	TaqMan-Sonden	179
A.4.7	Genomgrößenbestimmung	179
A.4.8	VEGF-Experimente	180
A.5	Verwendete Methoden	180
A.5.1	Nukleinsäureisolierungen	180
A.5.2	Amplifikationsreaktionen	188
A.5.3	Klonierungen	191
A.5.4	Kultivierungen und Proteinassays	194
A.5.5	Genomgrößenbestimmung	196
A.6	Zusätzliche experimentelle Daten	197
	Literaturverzeichnis	199
	Abkürzungsverzeichnis	227
	Abbildungsverzeichnis	228
	Tabellenverzeichnis	231
	Lebenslauf	233
	Publikationsliste	234

1 Einleitung

Arzneipflanzen werden schon seit Tausenden von Jahren verwendet. In den Entwicklungsländern sind viele Menschen heute noch auf pflanzliche Arzneimittel angewiesen. Infolge der Etablierung von Standards für Sicherheit und Qualität pflanzlicher Präparate steigt auch in Europa und Nordamerika das Interesse an pflanzlichen Medizinprodukten als Alternative zu synthetischen Wirkstoffen seit einigen Jahren wieder stark an. Pflanzliche Arzneimittel sind zu einem wichtigen Bestandteil der Medizin geworden und stellen bei zahlreichen Erkrankungen einen gleichwertigen Ersatz für konventionelle Medikamente dar. Sie enthalten im Unterschied zu chemisch-synthetischen Produkten Inhaltsstoffe aus pflanzlichen Extrakten. Wie für konventionelle Medikamente gelten auch für pflanzliche Arzneimittel die rechtlichen Bestimmungen von Arzneimittelgesetzen und -verordnungen. Auf europäischer Ebene sehen diese Bestimmungen als Voraussetzung für ein Inverkehrbringen detaillierte Anforderungen für eine Zulassung bzw. Registrierung vor. Für ein pflanzliches Arzneimittel werden qualitative und quantitative Spezifizierungen der wirksamen Hauptbestandteile gefordert. Klassischerweise werden für eine entsprechende Inhaltsstoffanalytik morphologische oder chemisch-physikalische Untersuchungen verwendet. Deren größter Nachteil besteht darin, dass sie zur Analyse eines pflanzlichen Mischprodukts speziesspezifische Marker benötigen, z.B. sekundäre Naturstoffe oder Proteine, deren Etablierung oftmals schwierig bis unmöglich ist.

Schon aus der modernen Taxonomie ist die DNA für ihre teils hochspezifischen Sequenzabschnitte bekannt. Mit der wachsenden Verbreitung molekularbiologischer Methoden in den letzten Jahren, hielten auch DNA-basierte Analysetechniken Einzug in die Kontrolle pflanzlicher Arzneimittel. Für Hunderte von Arzneipflanzen, zumeist aus dem asiatischen Raum, wurden inzwischen DNA-basierte Identifikationstests entwickelt, welche sich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bedienen. Ein limitierender Faktor ist momentan noch die Quantifizierung der pflanzenspezifischen Anteile der Präparate. Zwar sind für einige wenige Arzneipflanzen einzelne quantitative PCR-Analysen beschrieben worden, in keinem bekannten Fall aber wurden von der DNA-Ebene Rückschlüsse auf die Zusammensetzung eines realen pflanzlichen Arzneimittels gezogen. In diesem Zusammenhang besteht eine weitere Problematik pflanzlicher PCR-Assays darin, dass bisher keine umfangreichen Studien zur Isolierung von DNA aus zu Medizinprodukten verarbeiteten Pflanzenmaterial existieren.

2 Aufgabenstellung

Diese Dissertation gliedert sich in die drei Hauptziele DNA-Extraktion, qualitative und quantitative PCR-Analysen. Die Ziele sollten am Beispiel des Präparats Lefteria (Dr. Pandalis Urheimische Medizin, Glandorf) erarbeitet werden. Bei Lefteria handelt es sich laut Hersteller um ein traditionelles pflanzliches Arzneimittel, welches aus den drei einheimischen Arzneipflanzen Bärlauch, Mistel und Weißdorn hergestellt wird. Um die generelle Anwendbarkeit von PCR zur Analyse und Quantifizierung pflanzlicher Bestandteile aus Fertigarzneimitteln zu demonstrieren, wurden für das Medizinprodukt selbst und seine pflanzlichen Bestandteile existierende Methoden zur Extraktion von DNA aus pflanzlicher Matrix verglichen sowie neuartige Methoden entwickelt. Dabei wurde der Schwerpunkt auf eine hohe DNA-Qualität und gute Reproduzierbarkeit gelegt. Für die Neuentwicklungen wurden im Wesentlichen zwei Ansätze verfolgt. Zum einen basierte die DNA-Extraktion auf ionischen Wechselwirkungen zwischen der DNA und einer geladenen Oberfläche. Zum anderen wurde sich die spezifische Hybridisierung von komplementärer DNA zu Nutze gemacht. Für pflanzliche DNA ist beides in dieser Form bisher nicht untersucht worden. Für den zweiten Schwerpunkt sollten unterschiedliche PCR-Varianten für eine qualitative Identifizierung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn in Tabletten des Arzneimittels etabliert und optimiert werden. Die analytische Leistungsfähigkeit wurde herausgearbeitet, Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden wurden verglichen und bewertet. Im Hinblick auf das Fehlen einer quantitativen DNA-basierten Analytik für pflanzliche Arzneimittelinhaltsstoffe, hatte diese Arbeit als dritte Zielsetzung, eine solche zu entwickeln. Auf Grundlage der quantitativen *real-time* PCR sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, aus der DNA-Zusammensetzung einer aus dem Arzneimittel extrahierten Probe die Pflanzenzusammensetzung des Arzneimittels zu bestimmen. Die entwickelte Strategie wurde umfangreich optimiert und ihre Analyseleistung charakterisiert.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Phytopharmaka

In der ägyptischen Bilderschrift gibt es eine Pflanze als Hieroglyphe. Sie symbolisiert die Medizin gegen Asthma, Bauchkrankheiten und Zahnschmerzen [1]. Noch heute sind traditionelle Hausmittel insbesondere Kräuter beliebt und verbreitet. Herstellung und Verwendung folgen aber nur noch sehr entfernt alten Traditionen. Wurden erste pflanzliche Arzneimittel auf sehr einfache Weise zubereitet, sind heutige Phytopharmaka Ergebnis der Forschung an Pflanzen und ihren Inhaltsstoffen mit den Methoden der modernen Naturwissenschaften.

Der Begriff Phytopharmakon setzt sich aus den griechischen Vokabeln für Pflanze *phyton* und Arznei *pharmakon* zusammen. Phytopharmaka sind per Definition zugelassene oder registrierte Arzneimittel. Ihr wirksamer Anteil ist definiert als die Gesamtheit aller Wirkstoffe, wobei diese zwingend pflanzlicher Herkunft sein müssen. Daneben können Phytopharmaka nicht pflanzliche Zusatzstoffe enthalten, welche z.B. zur Bildung der Tablettenform benötigt werden. Zur Herstellung werden entweder Pflanzenextrakte oder getrocknete Pflanzen eingesetzt. Der Gewinnung der Extrakte geht ein mehrstufiger Extraktions- und Aufreinigungsprozess voraus. Unerwünschte Pflanzeninhaltsstoffe werden z.B. entfernt, wenn sie sich negativ auf die Verträglichkeit auswirken. Sowohl Extraktion als auch Trocknung führen zu einer Anreicherung der wirksamen Verbindungen, dienen zur Standardisierung der Inhaltsstoffzusammensetzung und steigern damit die Qualität eines Präparats [2].

Im Rahmen dieser Dissertation dient das Phytopharmakon Lefteria als Modell für die Entwicklung DNA-basierter Inhaltsstoffnachweise zur Qualitätskontrolle pflanzlicher Arzneimittel. Lefteria wird von der Firma Dr. Pandalis Urheimische Medizin hergestellt und vertrieben. Die Firma ist Teil von Naturprodukte Dr. Pandalis und konzentriert sich vollständig auf die Herstellung von Arzneimitteln und Medizinprodukten, während Naturprodukte Dr. Pandalis Nahrungsergänzungsmittel und Kosmetika anbietet. Entsprechend aktuellen Regeln zu Klassifizierung von Phytopharmaka (siehe **3.3**) handelt es sich bei Lefteria um ein traditionelles pflanzliches Arzneimittel zur Unterstützung der Herz-Kreislauf-Funktion ausschließlich aufgrund Überlieferung und langjähriger Erfahrung¹. Laut Originalrezeptur des Herstellers ist Lefteria aus getrockneten Bärlauchblättern, Mistelkraut, Weißdornblättern und Weißdornfrüchten aus biologischem Anbau

¹www.urheimische-medizin.de/produkte/06-Traditionelles-pflanzliches-Arzneimittel-Lefteria.htm

Tab. 3.1: Originalrezeptur einer Tablette des Präparats Lefteria laut den Herstellerangaben auf der Verpackung. Das Trockengewicht einer Tablette beträgt insgesamt 326 mg.

Inhaltsstoffe	Menge [mg]	Anteil [%]	Referenz
Bärlauchblätter	70	21,47	-
Mistelkraut	50	15,34	DAB ^a
Weißdornblätter	40	12,27	DAC ^b
Weißdornfrüchte	20	6,13	Ph.Eur. ^c
kristalline Zellulose	111,2	34,11	Ph.Eur.
Zellulosepulver	14	4,29	Ph.Eur.
Carboxymethylstärke	12,8	3,93	Ph.Eur.
Siliciumoxid	4,8	1,47	Ph.Eur.
Magnesiumstearat	3,2	0,98	Ph.Eur.

^a Deutsches Arzneibuch

^b Deutscher Arzneimittel-Codex

^c Pharmacopoea Europaea = Europäisches Arzneibuch

sowie den sonstigen Bestandteilen Zellulose, modifizierte Kartoffelstärke, hochdisperses Siliciumdioxid und pflanzliches Magnesiumstearat zusammengesetzt. Die wirkaktiven Inhaltsstoffe sind Bärlauch, Mistel und Weißdorn [3]. Tab. 3.1 gibt die genaue Zusammensetzung inklusiver aller nicht pflanzlichen Zusatzstoffe wieder. Lefteria ist ausschließlich in Tablettenform erhältlich, eine Originalpackung enthält 100 Tabletten. Da es sich bei Lefteria um ein Arzneimittel handelt, kann es nur über Apotheken bezogen werden.

Im Folgenden werden die Eigenschaften der zu Lefteria verarbeiteten Pflanzen und ihre medizinische Wirkung genauer erläutert. Daneben wird der aktuelle Stand der Technik in Bezug auf Identifizierung und Gehaltsbestimmung von Arzneipflanzen vorgestellt. Es wird sowohl auf klassische Methode als auch auf aktuell schon realisierte DNA-basierte Ansätze eingegangen. Bisher nur wenig genutzt, aber mit großem Zukunftspotential, liegt auf der Methode *real-time* PCR besonderes Augenmerk.

3.2 Arzneipflanzen

Laut Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellen Arzneipflanzen ca. 70% des Ausgangsmaterials für pharmazeutische Produkte [4]. Weltweit werden mindestens 35.000 Pflanzenarten für medizinische Zwecke verwendet. Vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern ist ihr Anteil bedeutend, aber auch viele der wichtigsten industriell gefertigten Arzneimittelprodukte wurden auf Grundlage von Inhaltsstoffen aus rund 90 Pflanzenarten entwickelt [5]. Im Gegensatz zu reinen Naturstoffen, die Basis konventioneller Arzneimittel, sind die biochemischen Mechanismen der Wirkung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn bisher nicht vollständig verstanden. Nachfolgend wird eine kurze Übersicht gegeben. Eine Zusammenstellung zusätzlicher Informationen ist Tab. 3.2 zu entnehmen.

3.2.1 Bärlauch

Bärlauch (*Allium ursinum*) gehört zur 200–600 Arten umfassenden Gattung der Lauchgewächse (*Allium*). Er wächst bevorzugt in schattigen und feuchten Gebieten. In Deutschland findet sich Bärlauch zumeist in Wäldern und ist in Norddeutschland teilweise vom Aussterben bedroht. Bärlauch ist eine ausdauernde krautige Pflanze und erreicht Wuchshöhen zwischen 20 und 50 cm. Er verfügt über ca. 6 cm langen Knollen sowie Scheindolden mit weißen Blüten welche, ähnlich vielen Obstsorten, kleine Kerne enthalten, die mit schwarzen Samen gefüllt sind [6]. Blätterform und Blütenstand sind in Abb. 3.1 dargestellt.

Da Knoblauch (*Allium sativum*) unter allen *Allium*-Arten am besten beschrieben ist, wurden viele biochemische Kenntnisse auf Bärlauch übertragen. Dies funktioniert allerdings nicht universell. Wichtige posttranslationale Modifikationen sind im Vergleich zu Knoblauch sehr unterschiedlich [7]. Generell ist belegt, dass Bärlauchextrakt verglichen mit Knoblauch größere Effekte auf die Blutchemie hat [8].

Bärlauch werden vor allem Wirkungen als Antibiotikum zugesprochen, was ihn zu einem beliebten Mittel gegen Magen-Darmstörungen macht [10]. Er findet ebenso Anwendung gegen Arteriosklerose [11], Bluthochdruck [12] und Hautausschläge [3] sowie bei Leberbeschwerden [13]. Zudem wurden *anti-aging*- [14], antioxidative, antidiabetische sowie krebsbekämpfende Eigenschaften näher beschrieben [15–17]. Hauptverantwortlich für die medizinische Wirksamkeit sind S-(2-Propenyl)-L-cysteinsulfoxid (Alliin) und Isolalliin. Schmitt *et al.* (2005) [13] konnten den Erntezeitpunkt eingrenzen, da sie zeigten, dass diese Naturstoffe fast ausschließlich im März und April kurz vor der Blüte gebildet werden. Alliin ist ein flüchtiges geruchloses Öl, welches vom Enzym Alliinase zur Alkylsulfonsäuren (Allicin) umgesetzt werden kann [18]. Das Enzym erreicht in frischen Pflanzen einen Gehalt von bis zu 1% Gesamtproteinmenge [19]. Die Alliinase ist der des Knoblauchs sehr ähnlich [13], bildet aber mit Bärlauchlektinen ungewöhnlich stabile Komplexe [20, 21]. Die meisten Daten über die Alliin-Chemie stammen aus *in vitro* Vergleichsuntersuchungen mit Knoblauchextrakten [16]. Es zeigte sich, dass Allicin alleine nicht stabil ist und spontan Di- und Trisulfide bildet, welche letztendlich die therapeutisch wirksamen Verbindungen darstellen.



Abb. 3.1: Bärlauch [9]

Schnitte von Bärlauchblättern werden oft ohne weitere Aufkonzentration verabreicht. Das Allicin ist dadurch weniger tränenreizend, wirkt aber dennoch stark antibakteriell. Selbst in hoher

Verdünnung hat Allicin immer noch eine letale Wirkung sowohl auf grampositive als auch gramnegative Bakterien [22]. *In vitro* und im Tierversuch konnte auch eine Lipid-senkende Wirkung nachgewiesen werden, was Allicin zu einer Therapiemöglichkeit bei einem zu hohen Cholesterinspiegel macht [22]. In einer seit 2005 andauernden Studie wird untersucht, wie sich eine zytotoxische Wirkung von Allicin auch zur Krebstherapie nutzen lässt [23]. Dabei wird das deutlich langlebigere Alliin verabreicht und erst im Körper von an Tumorzellen bindenden Antikörpern, welche mit Alliinase modifiziert sind, zum wirksamen Allicin umgesetzt. Auf lange Sicht soll dies eine neue und wenig belastende Möglichkeit zur Krebstherapie werden [23].

3.2.2 Mistel

Der einzige einheimische Vertreter der Gattung Mistel (*Viscum*) ist die Weißbeerige Mistel (*V. album*), daneben gibt es weltweit rund 90 weitere Arten. Sie gehören zur Familie der Sandholzwächse (*Santalaceae*). Misteln wachsen als gelbgrüne, immergrüne und ausdauernde Pflanzen halbschmarotzend auf Sträuchern oder Bäumen. Ihrem Wirt entziehen sie dabei Wasser und Mineralien. Anders als Vollscharotzer haben sie die Fähigkeit zur Photosynthese aber nicht verloren. Misteln senken ihre Wurzeln durch die Rinde des Wirts hindurch in die Kambiumschicht und bis hinein ins Holz. Die Äste der Mistel verzweigen sich immer wieder, wodurch die charakteristische Kugelform entsteht (Abb. 3.2).

Die Mistel gilt als eine der ältesten bekannten Arzneipflanzen überhaupt und wurde bereits im ersten Jahrhundert nach Christus schriftlich erwähnt. Seit dem 19. Jahrhundert wird sie bei Bluthochdruck, Epilepsie und Leberleiden eingesetzt [25]. Heute gehört die Misteltherapie in der Tumorbehandlung zu den am häufigsten verwendeten Alternativmethoden [26]. Misteln haben im Vergleich zu vielen anderen Arzneipflanzen einen hohen Anteil phenolischer Antioxidantien und zeigen sich antimikrobiell gegen diverse Mikroorganismen [27]. Die medizinisch wirksamen Inhaltsstoffe sind verschiedene Lektine und Viscotoxine. Als weitere Substanzklassen finden sich Flavonoide, Phenylpropane, Polysaccharide und Triterpene. Obwohl deren Beitrag zur Wirkung als gering angesehen wird, spielen sie insofern eine Rolle, als dass sie mit Lektinen und Viscotoxinen interagieren [28].

Eine Bindung von Lektinen an Kohlenhydrate auf Oberflächen von Zellen des Immunsystems führt zu ihrer Stimulierung. Dieser immunmodulierende Effekt wird hauptsächlich auf die Mistellektine ML I, ML II und ML III zurückgeführt [25, 29]. Wie die Lektine aber genau das Immunsystem



Abb. 3.2: Mistel [24]

beeinflussen ist nicht vollständig geklärt. Viscotoxine spielen eine Rolle bei der Tumorzellyse. Von ihnen sind mehrere Isoformen bekannt, sechs von sieben Isoformen zeigen Zytotoxizität und fördern die Tumorzellyse [28].

Selbst in der einfachsten Darreichungsform als mazerierter Kräutertee konnten noch 43% aktive Mistellektine nachgewiesen werden. In Aufgusstees sind die Lektine zwar thermisch degradiert, allerdings werden so 12% Flavonoide extrahiert [30]. Moderne kommerzielle Kapselpräparate zur Misteltherapie haben einen auf Nanogramm normierten Lektiningehalt. Für ihre Herstellung war die Aufklärung von Transportwegen der Mistellektine im Körper durch Lyu *et al.* (2008, 2010) [31, 32] wesentlich. Es wurde gezeigt, dass eine orale Applikation von Mistelpräparaten in der Krebstherapie sinnvoll ist. Sowohl Alginat-Chitosan-basierte Mikrokapseln zur oralen Aufnahme, wie auch eine Einbettung der Lektine mit Polyacryl für die rektale Aufnahme können ohne nennenswerten Aktivitätsverlust genutzt werden [33].

Eine umfassende Publikation zur Wirkung und klinischer Verwendung der Mistel zeigt das breite Profil an Einsatzgebieten, die bis heute erarbeitet werden konnten [34]. In mehreren Reviews wurden zudem insgesamt 46 klinische Studien zu *V. album* beurteilt. Alle kamen zu dem gemeinsamen Ergebnis, dass die positiven Eigenschaften der Mistel statistisch signifikant sind [35–37].

3.2.3 Weißdorn

Weißdorne (*Crataegus*) sind eine Gattung der Unterfamilie der Kernobstgewächse (*Pyrinae*) mit etwa 100–600 Arten. In Mitteleuropa kommen der Eingriffelige Weißdorn (*C. monogyna*) und der Zweigriffelige Weißdorn (*C. laevigata*) vor. Die Namensgebung leitet sich von der Art der Blüten ab [38]. Bei Weißdorn handelt es sich um einen strauchartigen Baum, welcher bis zu 12 m hoch wachsen kann. Weißdorn besitzt dornige, stark verzweigte Äste. Die Früchte sind rot. Seine Blätter sind auf der Unterseite hellgrün und auf der Oberseite etwas dunkler (Abb. 3.3).

Weißdorn ist wie Bärlauch und Mistel eine traditionelle Arzneipflanze. Er wird seit langer Zeit in der europäischen Volksmedizin und in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet [40]. Aufgrund ihrer Wirkung und der geringen Toxizität werden Weißdornextrakte weithin in kommerziellen pharmazeutischen Präparaten gegen Herzinsuffizienz verwendet. Dabei variiert je nach Pflanzenteil der Anteil verschiedener Inhaltsstoffe stark [41]. Das Spektrum der Einsatzmöglichkeiten reicht darüber hinaus von Bluthochdruck bis hin zu chronischer Herzinsuffizienz [42, 43]. Die medizinische und therapeutische Wirkung von Weißdorn ist dem Zusammenspiel der enthaltenen Inhaltsstoffe, den Flavonoiden und oligomeren Procyanidinen zuzuschreiben [44–46] und kann allgemein mit kardioprotektiven Eigenschaften zusammengefasst werden [44, 47–55]. Inzwischen sind 33 verschiedene Flavonoide beschrieben [56]. Procyanidinen wurden radikalangefangene Eigenschaften nachgewiesen [57]. Zusätzlich sind in Weißdorn Phenol- [58], Triterpensäuren [59] und Sterole [60] enthalten, denen auch ein Anteil an der Wirksamkeit zugesprochen wird.

Der genaue Mechanismus der pharmakologischen kardiovaskulären Aktivität ist sehr komplex und bis heute nicht komplett verstanden [60]. Die Wirksamkeit wurde aber umfassend wissenschaftlich nachgewiesen. An Menschen bewirkt Weißdorn schon beim Herzgesunden eine Verstärkung der Herztätigkeit, bei Herzkranken nach längerer Medikation eine subjektive Besserung. Eine klinische Studie nach GCP-Richtlinie (*good clinical practice*) z.B. konnte zeigen, dass die Verabreichung von frischen Weißdornbeeren bei Patienten mit einem Herzfehler zu einer signifikanten Verbesserung ihres Befindens führen [54]. Weißdornextrakte zeigten zudem u.a. ihr Potential bei der Migränetherapie, sie inhibierten signifikant messbar die Blutplättchenaggregation [61] und sogar Strahlenschutzigenschaften wurden nachgewiesen [62].



Abb. 3.3: Weißdorn [39]

3.3 Zulassung und Registrierung von Phytopharmaka in der Europäischen Union

Pflanzliche Arzneimittel werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die Klassifizierung erfolgt nach Richtlinie 2004/24/EG der Europäischen Union (EU). Wurde Anwendung und Nutzen der Phytopharmaka durch rationale und wissenschaftlich überprüfbare Ergebnisse aus klinischen Studien nachgewiesen, handelt es sich um rationale Phytopharmaka. Beruht ihre Verwendung dagegen auf langjährigen Erfahrungen und historisch belegter Wirksamkeit, werden sie als traditionelle Phytopharmaka klassifiziert. Alternative Phytopharmaka werden in der alternativen Medizin eingesetzt. Präparate der ayurvedischen und der traditionellen chinesischen Medizin werden als transkulturelle Phytopharmaka bezeichnet. Homöopathische Arzneimittel und reine Naturstoffgemische gelten hingegen nicht als Phytopharmaka [93].

Nach Definition der EU sind pflanzliche Arzneimittel komplexe Präparate, zusammengesetzt aus Stoffen oder Formulierungen, welche aus Pflanzen gewonnen wurden. Ihre Zulassung ist vom Hersteller zu beantragen und muss laut Arzneimittelprüfrichtlinie nach § 26 Arzneimittelgesetz (AMG) sämtliche Angaben zum Arzneimittel wie z.B. Bezeichnung, Darreichungsform, Anwendungsgebiete, Dosierung und Risikoangaben enthalten sowie eine Dokumentation der pharmazeutischen Qualität, der Unbedenklichkeit und der Wirksamkeit. Pflanzliche Arzneimittel sind chemisch-synthetischen Arzneimittel in dieser Hinsicht vollkommen gleichgestellt [94]. Das AMG wurde mit der Richtlinie 2001/83/EG an geltendes europäisches Recht angepasst und damit europaweit vereinheitlicht.

Tab. 3.2: Übersicht in der Literatur beschriebener medizinischer Eigenschaften der Arzneipflanzen.

Extrakt \ Inhaltsstoff	Eigenschaft \ Wirkung	Referenz
▷ Bärlauch (<i>Allium ursinum</i>)		
allgemeine Informationen	Extraktionsmittel: Methanol, Ethanol	[8]
Bärlauchhomogenisat	antibakteriell, blutdrucksenkend und kardioprotektiv	[63, 64]
Allicin	inhibiert 5-Lipoxygenase, Cyclooxygenase und Thrombozyten-agglomeration durch PAF (<i>platelet activating factor</i>)	[65]
	inhibiert Hypercholestinämie und Angiotensin-konv. Enzym (ACE)	[22, 66]
Flavonoide, Carotinoide	Abbau von Sauerstoffradikalen	[67]
Glykoside	normalisieren Herzrhythmus, verringert Blutgerinnung, Cholesterinaufnahme und Herzinfarktrisiko	[68]
Mannose-bindendes Lektin	neuartiges Tool in der HIV-Forschung	[7]
Mineralien, Vitamine	gesundheitsfördernde Eigenschaften	[69]
Senfglykosid	Anregung des Stoffwechsels	[68]
▷ Mistel (<i>Viscum album</i>)		
allgemeine Informationen	Extraktionmittel: Wasser	[28]
	botanischen Untergruppen, die sich in der Quantität und Qualität der Inhaltsstoffe unterscheiden	[25]
Mistelextrakt	antimikrobiell gegen diverse Mikroorganismen	[27]
	wirkt auf Immunsystem und Tumorzellen	[70]
Wurzelextrakt	antiulzerogene Wirkung im Magen	[71]
Mistellektin	inhibiert Lungenmetastasen von Melanom- und Karzinomzellen, Lebermetastasen von Lymphomzellen und erhöht Aktivität von Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK)	[72]
	reguliert Makrophagen und Tumornekrosefaktors (<i>tnf-α</i>)	[73]
	wirkt gegen Brustkrebs und gynäkologische Krebsarten	[74–76]
	Rückbildung von Kopf-Hals-Karzinomen und Leukämiezellen	[77–79]
	Zytokin- und Monokinexpression in Epithel-, IgA- und IgB-Zellen	[80, 81]
	Apoptose von Endothelzellen zur Tumorregression	[82]
Viscotoxin	immunstimulierend und tumorzellzytotoxisch	[83, 84]
	initiiert Abwehrmechanismen, aktiviert Immunreaktionen auslösende Makrophagen und destabilisiert Membranen von Mikroorganismen	[28]
Terpene	aktivieren antioxidativen Enzymen und zytotoxisch bei Ehrlich-Ascites-Karzinomen (EAC)	[85]
▷ Weißdorn (<i>Crataegus laevigata</i>)		
allgemeine Informationen	Extraktionmittel: Ethanol, Phenol	[42, 86]
	beliebt in Gelees, Marmeladen, Obstkonserven, Säften und Weinen	[87]
Weißdornextrakt	verbessert Sauerstoff-, Nährstoffzufuhr und Durchblutung von Herzmuskeln und -gefäßen	[42, 44]
	kardiovaskuläre, kardiotonische, antiarrhythmische, hypotensive und hypolipidemische Effekte	[47–55]
	gastroprotektive Wirkung, Verdauungstörungen und Arteriosklerose	[60]
	Gastritis, Diarrhoe, abdominale Schmerzen wie auch Amenorrhoe	[88]
Flavonoide	antioxidativer Effekt	[89]
Procyanide	radikalfangende Eigenschaften	[43, 90]
	inhibiert Phosphodiesterase und steigert cAMP-Konzentration	[91]
	inhibiert Natrium-Kalium-ATPasen in kardialem Muskelgewebe	[38, 53]
	steigert Stickstoffmonoxidproduktion im vaskulären Endothel	[45, 46]
	inhibiert das ACE	[92]
	inhibiert LDL-Cholesterin und erhöht LDL-Katabolismus	[48, 49]

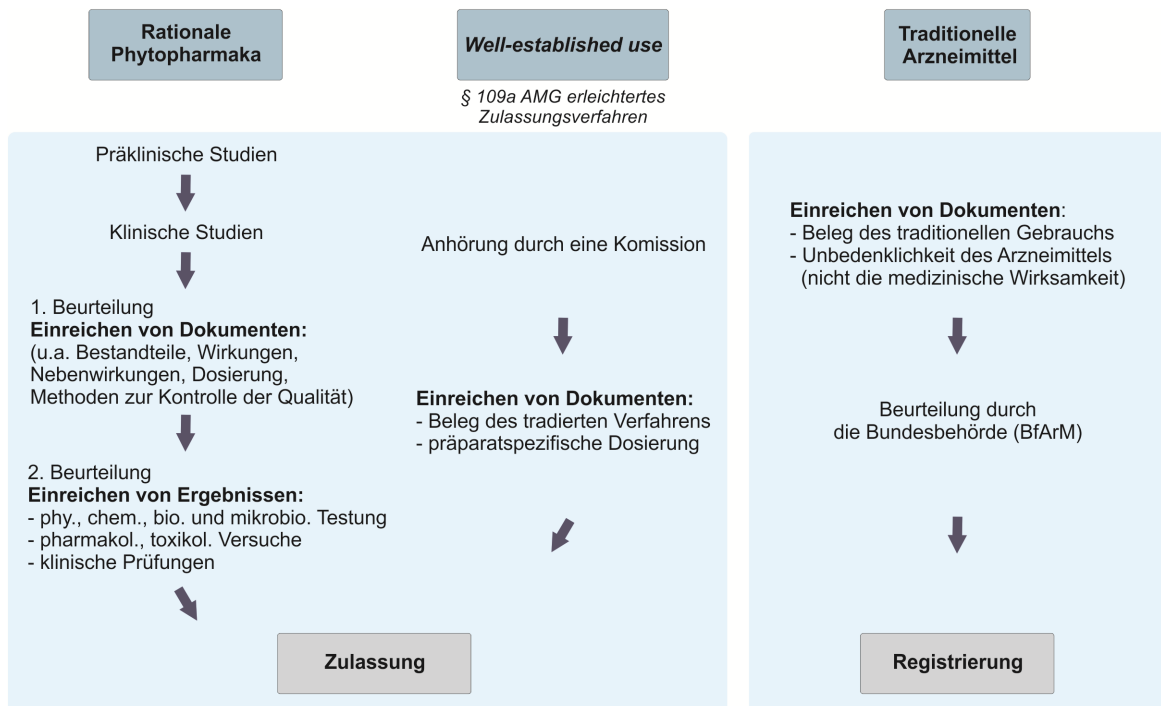


Abb. 3.4: Verschiedene Wege zum Inverkehrbringen pflanzlicher Arzneimittel. Rationale Phytopharmaka benötigen eine mit konventionellen Medikamenten vergleichbare Zulassung. Traditionelle pflanzliche Arzneimittel können auch zugelassen werden, häufig reicht auch eine Registrierung.

3.3.1 Arten von Phytopharmaka

Um einem stärkeren Schutz des Verbrauchers vor Arzneimittelrisiken Rechnung zu tragen, wurde ein Zulassungssystem eingeführt, das detaillierten Anforderungen an den Nachweis der Qualität stellt [94]. In Deutschland müssen Phytopharmaka vor ihrem Inverkehrbringen beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zugelassen oder registriert werden (Abb. 3.4). Die EU hat mit den Richtlinien 2004/24/EG und 2004/27/EG übergeordnete Regelungen erlassen. Die Zulassungskriterien für pflanzliche Formulierungen sind demnach in Kategorien mit unterschiedlichen Anforderungen eingeteilt.

Rationale Phytopharmaka: Nach aktueller Novelle des AMG bedürfen rationale Phytopharmaka einer Vollzulassung beim BfArM. Für die Zulassung sind Unterlagen zum Nachweis der Qualität, der Wirksamkeit und der Unbedenklichkeit einzureichen. Die Qualität des Präparats muss den Angaben des Deutschen Arzneibuchs (DAB) [95] entsprechen. Außerdem muss die Indikation wissenschaftlich dokumentiert sein (§ 55 AMG). Das Identifikationsverfahren kann analytisch, pharmakologisch oder toxikologisch realisiert werden. Das Präparat muss zudem zuverlässig standardisierbar sein, d.h. eine stets gleiche Zusammensetzung muss nachgewiesen werden können. Entsprechende Methoden zur Gehaltsbestimmung werden ebenfalls vom DAB definiert. Das BfArM kann, wenn wissenschaftlich belegt, auch nicht im DAB niedergeschriebene Methoden anerkennen.

Well-established use: Entsprechend § 109a AMG sind *well-established use* traditionelle Präparate, die eine vereinfachte bibliographische Zulassung besitzen. Nach den Vorgaben von § 10a Richtlinie 2001/83/EG reichen für eine bibliographische Zulassung Daten bezüglich der Qualität des Präparats und publizierte Daten, welche die Sicherheit und Wirksamkeit belegen, aus.

Traditionelle Arzneimittel: Nach §§ 39a–d des AMG wird für traditionelle Präparate oft nur eine Registrierung beim BfArM benötigt. Die Registrierung umfasst Angaben zur Qualität und eine Erklärung, dass die Wirksamkeit und Unschädlichkeit aufgrund 30-jähriger (davon mindestens 15 Jahre in der EU) Anwendung bewiesen ist.

3.3.2 Qualität und Quantität der Inhaltsstoffe

Unter der Qualität von Arzneimitteln wird nach deutscher Arzneimittelrichtlinie (AM-RL) verstanden, dass die eingesetzten Inhaltsstoffe den Anforderungen des DAB entsprechen. Pflanzliche Ausgangsstoffe müssen möglichst frei sein von Erde, Staub sowie mikrobiologischen und tierischen Verunreinigungen. Für Aflatoxine, Pestizide und Schwermetalle existieren gewisse Grenzwerte. Einfluss auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe dürfen Ausgangsdroge, Auszugsmittel, Herstellungsverfahren und -anlagen haben. Nach der Definition des übergeordneten Europäischen Arzneibuchs (Ph.Eur.) [96] sind pflanzliche Drogen organischen Ursprungs und bestehen aus unverarbeiteten ganzen, zerkleinerten oder geschnittenen Pflanzen, Pflanzenteilen, Algen, Pilzen oder Flechten [97].

Pflanzen dürfen nur verwendet werden, wenn ihre Identität nachweisbar und die erforderliche Reinheit im DAB oder Ph.Eur. niedergeschrieben ist. Formulierungen getrockneter Pflanzen sind z.B. Pulver oder Teeschnitte. Entsprechende pharmazeutische Produkte sind durch Trocknung in einen lagerfähigen Zustand zu bringen. Die einzelnen Inhaltsstoffe werden in die folgenden vier Kategorien eingeordnet:

- Hauptinhaltsstoffe: Allein verantwortlich oder mitbestimmend für die Wirksamkeit
- Inhaltsstoffe mit wirksamkeitsmitbestimmendem Charakter
- Nebenwirkstoffe: Können der Identifizierung dienen
- Begleitstoffe: Sind wichtig für die Pharmakokinetik

Dem deutschen Verfahren übergeordnet, regelt das Herbal Medicinal Products Committee (HMPC) der European Medicines Agency (EMA) europaweite Zulassungs- bzw. Registrierungskriterien. Insbesondere für rationale Phytopharmaka wird eine detaillierte Definition der Zusammensetzung (CPMP/QWP/2819/00) erwartet, welche eine umfangreiche qualitative und quantitative Spezifizierung umfasst. Die EMA hat Definitionen für jedes Spezifizierungskonzept als Richtlinie CPMP/QWP/2820/00 herausgegeben. Ein Identifikationstest muss zwischen den

unterschiedlichen enthaltenen Pflanzenarten unterscheiden können. Quantitative Analysen sollen eine Messung der Hauptinhaltsstoffe des Arzneimittels umfassen (CPMP/ICH/381/95). Das Ph.Eur. listet Mindestanforderungen und chemische Referenzsubstanzen auf, die falls nötig durch das European Directorate for the Quality of Medicine (EDQM) bezogen werden können [97].

3.4 Methoden zur Identifikation und Quantifizierung pflanzlicher Inhaltsstoffe

Von Seiten der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie erfahren Pflanzeninhaltsstoffe aktuell eine starke Nachfrage. Botanische Extrakte gelten als neue Hightech-Produkte nicht nur bei Naturheilmitteln oder Diätprodukten, sondern auch bei Nahrungsergänzungsmitteln und Kosmetika [98]. Der Trend ist getrieben durch den steigenden Wunsch nach mehr Natürlichkeit von Produkten seitens der Verbraucher. Die modernen Biowissenschaften ermöglichen diesen Trend ihrerseits durch ein breites Angebot an verschiedenen modernen Analysemethoden. Die Zulassung als Phytopharmaka gemäß EMEA erfordert als Qualitätsnachweis diesen analytischen Aufwand, welcher sich aufgrund lukrativer Apothekenmarktpreise und langem Patentschutz lohnt [99]. In der Folge wird ein Überblick des aktuellen Stands der Technik hinsichtlich Pflanzennachweismethoden gegeben.

3.4.1 Klassische Nachweismethoden

In der Praxis erfolgt die Identifizierung von Medizinpflanzen aktuell hauptsächlich durch morphologische und chemisch-physikalische Analysen. Viele internationale Arzneibücher [100–102] verweisen insbesondere auf makroskopische und mikroskopische Evaluationen („rein visuell“ über die Histologie und Morphologie) sowie auf chemische Untersuchungen (Dünnschicht- (TLC), Hochleistungsflüssigkeits- (HPLC), Gaschromatographie (GC), Infrarot- (IR), Röntgenstrahlung oder Kernspinresonanz (NMR)) für die Qualitätskontrolle und Standardisierung von rohem und verarbeitetem Pflanzenmaterial [103–105]. Häufig sind auch eine genaue Rückverfolgbarkeit der Ausgangsstoffe oder botanische Ansätze ausreichend.

Morphologische Methoden stoßen bei der Analyse von gemahlenem Pflanzenmaterial an ihre Grenzen. Bei den gängigsten chemisch-physikalischen Verfahren werden charakteristische sekundäre Naturstoffe nach Desorption mit einem Lösungsmittel oder einer Extraktion mit überkritischem CO₂ über TLC-, HPLC- oder GC/MS-Analysen (Massenspektrometrie) analysiert. Dies kann mit entsprechenden Standards auch quantitative Ergebnisse liefern. Des Weiteren wurden Screenings mittels Liposomen sowie mit verschiedenen Bakterienstämmen entwickelt [106]. Andere Prüfparameter sind Bestimmung des Kohlenstoffgehalts mittels TOC-Methode², pH-Wert- und Leitfähigkeitsmessungen [107].

²Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (*total organic carbon*, TOC)

Ein sehr gut beschriebenes Beispiel für morphologische Analysen sind tibetanische Heilpflanzen. Studien konnten zeigen, dass mittels Lichtmikroskopie die Authentizität von *Halenia elliptica* sowie fünf Vertretern der Dickblattgewächse (*Crassulaceae*) eindeutig nachgewiesen werden kann [108, 109]. Alleine zur TLC wurde 1996 ein komplettes Buch über alle bekannten Anwendungs- und Methodenvarianten veröffentlicht [110].

Am Beispiel von Ginko (*Ginko biloba*) lässt sich sehr eingängig das Vorgehen bei der chemischen Qualitätskontrolle verdeutlichen. Als Ginko-spezifische Marker sind Anthocyane, Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, Polyprenole oder Terpene beschrieben. Ihre Extraktion wird mit Methanol, Wasser oder Gemischen davon durchgeführt. Außerdem sind überkritische Fluid-Extraktion und subkritische Wasserextraktion möglich. Es folgt eine Aufreinigung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Essigsäureethylester. Separation und Detektion werden per RP-HPLC (*reversed-phase*) mit Lichtstreu- (ELSD), Brechungsindexdetektor (RI) oder MS sowie GC mit Flammenionisationsdetektor (FID) bzw. MS nach vorheriger Silylierung durchgeführt. Eine Hydrolyse mit anschließender LC/MS- (Flüssigchromatographie) oder LC/MS/MS-Analytik erlaubt eine parallele Untersuchung von Flavonoiden und Terpenen [111]. Für Alkaloide und Flavonoide wurden zudem kapillarelektrophoretische (CE) Assays etabliert [112]. Eine sehr umfangreiche Übersicht chemischer Methoden bieten Hänsel *et al.* (2007) [97] mit detaillierten Beispielen für viele bekannte Arzneipflanzen.

Alle diese Methoden werden von genetischen und ökologischen Faktoren beeinflusst, was zu dem Problem führt, dass die große chemische Variabilität eines Pflanzenmaterials bzw. -extrakts eine sichere Identifizierung oft nicht ermöglicht. Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe rührt unter anderem von Anbauggebiet, Wachstums- und Lagerbedingungen ebenso wie von der Erntemethode her [99]. Der Gehalt einzelner Inhaltsstoffe sowie ihr Verhältnis unterliegen jahreszeitlichen und umweltbedingten Schwankungen. Auch sind häufig Stoffgemische die wirksame Basis pflanzlicher Arzneimittel. Dabei ist es meist nicht möglich alle wirksamkeitsbestimmenden Naturstoffe zu ermitteln. Oft ist auch nur bekannt, dass ein Pflanzenextrakt zwar wirkt, aber nicht welche seiner Inhaltsstoffe dafür verantwortlich, d.h. zu analysieren wären. Besteht ein Phytopharmakon aus mehreren Pflanzen, werden spezifische Marker für jede Pflanze notwendig. Für qualitative und quantitative Analysen kommen also nur Pflanzenmetabolite als Marker infrage, welche von äußeren Faktoren unabhängig und spezifisch sind. Das Auffinden und eine entsprechende Verifizierung solcher sekundären Naturstoffe oder Proteine ist aufwendig bis unmöglich [113]. Für eine mikroskopische Kontrolle andererseits ist große botanische Expertise notwendig, um unter verwandten Pflanzen mit sehr ähnlichen Eigenheiten unterscheiden zu können [99]. Diese Problematik erklärt die seit den frühen 1990er Jahren, parallel zur starken Zunahme an genetischen Informationen, aufgekommene Entwicklung genombasierter Identifizierungen von Arzneipflanzen [98] auf welche im Folgenden genauer eingegangen wird. Zuvor werden kurz die Möglichkeiten immunologischer Methoden beleuchtet.

3.4.2 Immunologische Nachweismethoden

Die ersten molekularbiologischen Methoden, welche Einzug in die Identifizierung pflanzlichen Materials hielten, waren immunologische Assays wie z.B. Durchflusszytometrie, Immuno-Blotting. Viele Arzneibücher sehen heute alternativ zu den herkömmlichen Methoden auch den *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) vor. Mit einem ELISA werden Pflanzenproteine nachgewiesen. Hierbei wird die Eigenschaft spezifischer Antikörper genutzt, an nachzuweisende Antigene zu binden. Für solche Tests existieren kommerzielle Kits im 96-Lochplattenformat, welche mit Hilfe eines entsprechenden Plattenlesers ausgewertet werden. Bei der Detektion werden drei Arten unterschieden: Homogen, kompetitiv oder Sandwich.

Im Bereich der Pflanzenanalytik etablierten sich Immunoassays zunächst als Nachweis von kennzeichnungspflichtigen Allergenen (2000/13/EG und 2003/89/EG) in Lebensmitteln. Poms *et al.* (2006) [114] stellten dazu eine übersichtliche Auswahl häufiger Allergene und ihrer Nachweismethoden zusammen. Immunologische Nachweise erfolgen auch mit Biosensoren, welche darauf abzielen, die Aktivität von pflanzlichen Inhaltsstoffen zu quantifizieren [115]. Im Bereich der Arzneipflanzen wurde z.B. ein ELISA zum Nachweis von Inhaltsstoffen des Echten Johanniskrauts (*Hypericum perforatum*) entwickelt [116].

Für einen Inhaltsstoffnachweis bietet ELISA den Vorteil einer sehr einfach zu realisierenden Quantifizierung. Als großer Nachteil stellt sich aber häufig die nicht gegebene Vergleichbarkeit von Ergebnissen heraus. Antikörper und Standards verschiedener Hersteller führen nicht selten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Eine allgemein anerkannte Standardisierung konnte bisher nicht etabliert werden [117].

3.4.3 DNA-basierte Methoden zur Identifizierung

Die molekulare Taxonomie hat gezeigt, dass DNA abschnittsweise speziesspezifisch ist. Mit dem Aufkommen der modernen Molekularbiologie und Pflanzengenetik in den letzten Jahrzehnten wurden mehr und mehr genetische Nachweismethoden realisierbar. Im Gegensatz zu den Markermolekülen der chemischen Methoden, welche stark von Alter, physiologischen und Umgebungsbedingungen beeinflusst werden, ist DNA ein sehr stabiles Makromolekül, welches kaum von äußeren Faktoren angegriffen wird. DNA lässt sich aus frischem, trockenem und bereits verarbeitetem biologischen Material isolieren [99]. Außerdem ist sie für eine Pflanze universell, d.h. nicht abhängig von der Art des Gewebes. Die Verwendung von DNA zur Qualitätskontrolle ist eine Idee aus der Lebensmittelanalytik. Mit dem Nachweis allergener Zutaten in Lebensmitteln [118], der Herkunftsanalyse von Zutaten (z.B. Gewürze, Marzipan, Zimt, etc.) [119] und dem Nachweis genetisch modifizierter Organismen (GMO) [120–123] gibt es drei wichtige Einsatzgebiete. Die Methoden bieten eine zuverlässige und sichere Authentifizierung pflanzlichen Materials auf DNA-Ebene.

Aktuell nimmt die Zahl von DNA-basierten Methoden, welche molekulare Marker zur Identifizierung von Arzneipflanzen nutzen, stark zu [124–127]. DNA als Marker ist insbesondere interessant bei Taxa³ mit mehreren medizinisch verwendeten Spezies, die morphologisch oder chemisch kaum zu unterscheiden sind. Auch werden zunehmend teure Arzneipflanzen mit billigen Alternativen verfälscht. Für mehr als 200 Pflanzenspezies finden sich derzeit veröffentlichte DNA-basierte Nachweise in der PubMed-Datenbank [99]. Die DNA-basierten Methoden lassen sich grundlegend in zwei Typen einteilen: Nicht PCR-basierte und PCR-basierte Methoden.

Bei der Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) z.B. werden unterschiedliche Muster von Restriktionsfragmenten untersucht. Aufgrund von Sequenzunterschieden erzeugen Restriktionsenzyme beim Verdau von sog. Markersequenzen pflanzenspezifische Fragmentierungsmuster, welche mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und mittels Southern Blotting detektiert werden können. Polymorphismen als Erkennungsmerkmale einzelner Spezies werden durch das Vorhandensein oder Fehlen von Banden detektiert [128]. Das Verfahren ist recht aufwendig und benötigt verhältnismäßig viel DNA.

PCR-basierte Marker sind spezifische DNA-Loci, welche sich mit Oligonukleotid-Primern und einer thermisch stabilen DNA-Polymerase amplifizieren lassen. Der große Vorteil der PCR ist, dass nur eine sehr geringe Menge an DNA für einen Nachweis nötig ist und dass die Analyse in kurzer Zeit durchgeführt werden kann. Hierbei werden wiederum Methoden, welche keine Sequenzinformationen benötigen (*amplified fragment-length polymorphism* (AFLP), AP-PCR (mit *arbitrary primers*), *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD)) und Methoden mit speziesspezifischen Primern unterschieden, welche als am genauesten gelten [113].

Bei sequenzunabhängigen Techniken werden kurze Zufallsprimer mit einer Länge von acht bis zwölf Nukleotiden verwendet. Aus der genomischen DNA vervielfältigen sich dann nur sog. Markersequenzbereiche, die von den Sequenzen der Primer eingeschlossen werden. Mit geeigneten Primern ergeben sich durch Elektrophorese individuell spezifische Bandenmuster, die es erlauben, unterschiedliche Spezies zu identifizieren. Einige Methoden nutzen zudem Restriktionsanalysen [129–132]. Heubl (2010) [99] hat eine umfassende Liste aller Arzneipflanzen veröffentlicht, deren Nachweis DNA-basiert etabliert wurde, mit Angabe entsprechender Methoden und Marker.

Für Studien in welchen Marker mit bekannter Sequenz (sequenziert und in einer Datenbank hinterlegt) verwendet werden, um verschiedene medizinisch relevante Taxa zu unterscheiden, eignen sich orthologe Sequenzen als PCR-Targets [133]. Vor allem die *internal transcribed spacer* (*its*) der 18S- und 26S-rRNA-Gene und *intergenic spacer* zwischen tRNA-Genen (*trn*) haben sich als sehr wichtige und hilfreiche Loci für das sog. DNA-*barcoding* erwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass sich anhand des *its*-Locus zwischen etwa 4.800 Spezies mit einer Wahrscheinlichkeit von 92,7% diskriminieren lässt [134, 135]. In 4.2.1.1 und 4.3.1 werden diese orthologen Regionen von Bärlauch, Mistel und Weißdorn genauer beleuchtet.

³Als Taxon wird eine systematische Einheit (Verwandtschaft) von Lebewesen bezeichnet.

Tab. 3.3: Überblick von DNA-Markern als Targets zur Identifizierung von Arzneipflanzen-Taxa und Referenzen.

Target	Arzneipflanzenspezies		Referenz	Fortsetzung			
	system. Name	dtsch. Name					
<i>its</i>	<i>Anoectochilus</i>	-	[136]	<i>atpB-rbcL</i>	<i>Fallopia</i>	Knöterich	[137]
	<i>Asarum</i>	Haselwurz	[138–140]		<i>Phyllanthus</i>	-	[141]
	<i>Astragalus</i>	Tragant	[142–144]	<i>atpF-atpA</i>	<i>Angelica</i>	Engelwurz	[145]
	<i>Brassicaceae</i>	Kreuzblütler	[146]	<i>atpF-atpH</i>	<i>Amborella</i>	-	[147]
	<i>Bupleurum</i>	Hasenohr	[148]	<i>psbA-trnH</i>	<i>Aconitum</i>	Eisenhut	[149]
	<i>Cimicifuga</i>	Wanzenkraut	[150]		<i>Dendrobium</i>	-	[151]
	<i>Dendrobium</i>	-	[152–155]		<i>Ericaceae</i>	Rhododendron	[156]
	<i>Echinacea</i>	Sonnenhut	[157]		<i>Fraxinus</i>	Eschen	[158]
	<i>Epimedium</i>	Elfenblume	[159]		<i>Lonicera</i>	Heckenkirsche	[160]
	<i>Euphorbia</i>	Wolfsmilch	[161, 162]		<i>Orobanchaceae</i>	Wurzwegwächs	[163]
	<i>Fallopia</i>	Knöterich	[164]		<i>Pteridophyta</i>	Farn	[165]
	<i>Fritillaria</i>	Liliengewächs	[166]		<i>Sabia</i>	-	[167]
	<i>Gentiana</i>	Enzian	[157, 168]		<i>Scutellaria</i>	-	[169]
	<i>Hedysarum</i>	Süßklee	[144]		-	Seegräser	[170]
	<i>Matricaria</i>	Kamille	[171]		-	Zierpflanzen	[133]
	<i>Leonurus</i>	Herzgespann	[172]	<i>psbK-psbI</i>	<i>Amborella</i>	-	[147]
	<i>Orchidaceae</i>	Orchidee	[173]	<i>trnC-trnD</i>	<i>Panax</i>	Araliengewächs	[174]
	<i>Panax</i>	Ginseng	[175, 176]	<i>trnD-trnT</i>	<i>Dyosma</i>	-	[177]
	<i>Papaver</i>	Schlafmohn	[178]	<i>trnK</i>	<i>Actinidia</i>	Strahlengriffel	[179]
	<i>Paris</i>	Einbeere	[180]		<i>Atractylodes</i>	Wurzelstock	[181]
	<i>Paphiopedilum</i>	Frauenschuh	[182]		<i>Curcuma</i>	Ingwer	[183]
	<i>Perilla</i>	Sesamblatt	[184]	<i>trnL</i>	-	Gräser	[185]
	<i>Plantago</i>	Wegerich	[186]	<i>trnL-trnF</i>	<i>Artemisia</i>	Korbblütler	[187]
	<i>Rehmannia</i>	Wurzwegwächs	[188]		<i>Drynaria</i>	-	[189]
	<i>Rutaceae</i>	Rautengewächs	[190]		<i>Ephedra</i>	Meerträubel	[191]
	<i>Salvia</i>	Salbei	[192]		<i>Helleborus</i>	Nieswurz	[193]
	<i>Swertia</i>	-	[194]		<i>Lophophora</i>	Kaktee	[195]
	<i>Taxaceae</i>	Eibe	[196]		<i>Pueraria</i>	Hülsenfrucht	[188]
	<i>Uncaria</i>	-	[197]		<i>Rheum</i>	Rhabarber	[198]
		-	mex. Kakteen	[199]			

Hauptsächlich für chinesische Arzneipflanzen wurden bisher PCR-basierte Authentifizierungen entwickelt [200, 201]. Gerade im chinesischen Raum werden zur Kostenersparnis häufig Naturpräparate mit Ersatzstoffen verfälscht. Es sind Fälle dokumentiert, wo Austauschstoffe, entweder keine Wirkung hatten oder sogar zu Vergiftungen führten. Ersatzstoffe und Verwechslungs- bzw. Verfälschungsmittel lassen sich ebenfalls mit verschiedenen DNA-basierten Techniken nachweisen [99]. Die Gruppe der Farnartigen Pflanzen (*Pteridophyten*) z.B. ist in der traditionellen chinesischen Medizin weit verbreitet. Mittels DNA-*barcoding* mit universellen Primern und entsprechenden Variationen lassen sich sämtliche im Chinesischen Arzneibuch [102] aufgeführte Vertreter der *Pteridophyten* anhand ihrer *psbA-trnH*-Regionen identifizieren [165]. Für die Familie der *Fallopia* (Knöteriche) wurde ein Nachweis mittels *atpB-rbcL*-Spacer etabliert [137] und Kakteenarten *Lophophora williamsii* sowie *L. diffusa* sind anhand ihrer *trnL-trnF*-Spacer zu unterscheiden

[195]. Weitere interessante Beispiele sind in der Literatur beschrieben [159, 196]. Tab. 3.3 gibt einen Überblick über alle medizinisch verwendeten Pflanzen, welche sich bisher anhand von Markern entsprechender bekannter Spacer-Loci mit konventioneller PCR identifizieren ließen. Hao *et al.* (2010) [98] haben alle einsetzbaren Methoden zusammengestellt und erläutert.

Eines der wenigen Beispiele für eine PCR mittels spezifischem Target, welches im europäischen Raum Anwendung findet, ist die Kamille. Für sie selbst und mögliche Verfälschungen mit günstigen Pflanzenalternativen wurde gezeigt, dass eine reproduzierbare Identifizierung über ihre *its*-Regionen möglich ist [202]. Ebenso wurde versucht, den Pflanzenextrakt der Kamille in seiner Gesamtheit zu erfassen und mittels *metabolic fingerprinting* zu klassifizieren [171]. Auch *Echinacea* ließ sich anhand der *its*-Region authentifizieren [157]. Bei allen beschriebenen Beispielen handelt es sich ausschließlich um qualitative Nachweismethoden, bei denen der elektrophoretische Endpunktnachweis des spezifischen Amplifikats als Identifizierung der jeweiligen Pflanze gilt [113, 203]. Produkte dieser Pflanzen sind zumeist traditionelle Phytopharmaka, eine Gehaltsbestimmung wird also nicht erwartet.

Im Vergleich mit makroskopischen, mikroskopischen und chemischen Analysen haben molekulare Authentifizierungsmethoden zahlreiche klare Vorteile. Es gibt aber auch gewisse Limitierungen. Bei der Herstellung von Phytopharmaka kann der Einsatz von hohen Temperaturen und extremen pH-Werten nötig sein. Dies führt zu mehr oder weniger starker DNA-Degradation und behindert vor allem Techniken, die lange Markersequenzen (> 200 bp) verwenden [204]. In Pflanzen häufig vorliegende hohe Konzentrationen an sekundären Naturstoffen (Alkaloide, ätherische Öle, Phenole, Polysaccharide, etc.) können die DNA-Isolierung stören oder PCR-inhibierend wirken [205]. Insbesondere Polysaccharide inhibieren die Aktivität von Polymerasen, Ligasen und Restriktionsenzymen. Polyphenole verhindern oft Restriktionsreaktionen, da sie irreversibel an DNA binden. Ein häufiges Problem von Heilpflanzen ist die Kontamination mit endophytischen Pilzen, deren DNA eine Sequenzierung der Pflanzen problematisch macht [99]. Darüber hinaus nimmt die Etablierung von speziesspezifischen Primern viel Zeit in Anspruch. Kreuzreaktivität mit anderen Spezies müssen ausgeschlossen werden und botanische Kontaminationen oder Verfälschungen sollten ausgeschlossen sein.

Zusammengefasst sind die vorgestellten DNA-Techniken leistungsstarke und sichere Methoden zur Identifizierung von Taxa in Phytopharmaka. Sie liefern reproduzierbare Ergebnisse, welche nicht von auf die Proben einwirkenden äußeren Faktoren beeinflusst werden. Mit zunehmender Nachfrage nach Heilpflanzen von hoher Qualität, wird weiterhin der Bedarf an Authentifizierungen auf DNA-Ebene steigen, um die therapeutische Effizienz, den fairen Handel mit Arzneidrogen und das Vertrauen der Konsumenten sicherzustellen [99]. Mit der *real-time* PCR steht eine weitere zu diesem Zweck kaum eingesetzte Technik zur Verfügung, welche neben der Identifizierung auch eine Quantifizierung des Ursprungsmaterials möglich macht. In der Lebensmittelanalytik hat sie sich schon durchgesetzt, im Bereich der Arzneipflanzen finden sich nur einige wenige Beispiele.

In Zukunft werden neue Tools zur DNA-Analyse die Palette der Möglichkeiten erweitern. Diese *next-generation*-Techniken umfassen Minisequenzierung [206, 207], *nanoscale DNA sequencing* [208] und *microsphere based suspension array* [209]. Dazu haben Methoden wie *arrayed primer extension reaction* (APEX) [210, 211] und *oligonucleotide ligation assay* (OLS) [212] das Potential die Authentifizierungsmethoden in hohem Grad durch *multiplexing* zu beschleunigen.

Im nächsten Abschnitt werden zunächst Möglichkeiten zum Nachweis von Bärlauch, Mistel und Weißdorn beleuchtet, welche vom BfArM anerkannt sind. Anschließend erfolgt eine Bewertung hinsichtlich der Fragestellung, welche Methode sich zum parallelen Nachweis der drei Pflanzen in *Lefteria* eignet.

3.5 Situation bei Bärlauch, Mistel und Weißdorn

Bärlauch: Das DAB macht bezüglich von Gehaltsanalysen keine Vorgaben, zudem sind keine Verfälschungen bekannt [95]. Alle bekannten Nachweise dienen nur der Identifizierung. Dabei ist zu beachten, dass Bärlauchextrakte je nach Extraktionsmethode eine unterschiedliche Zusammensetzung genuiner und nicht genuiner Inhaltsstoffe aufweisen. Cysteinsulfoxide sind nach saurer Hydrolyse nachweisbar [10]. Thiosulfate, wasserdampfvlüchtige Bestandteile sowie freie Aminosäuren werden mittels Wasserextraktion isoliert, ätherische Öle mit Chloroform/n-Hexan bzw. Aceton/Chloroform [213]. Die Identifizierung der Inhaltsstoffe kann mikroskopisch anhand der Blattepidermis oder über einen Nachweis der organischen Schwefelverbindungen stattfinden. Im Allgemeinen werden Färbungen mit Zinkstaub, Natriumhydroxid oder Natriumpentacyanonitrosylferrat(II) verwendet. Alternativ kann eine Silberspiegelprobe oder eine TLC mit Anisaldehyd-Reagenz durchgeführt werden [213].

Mistel: Ein Identitätsassays für die Viscotoxine ist papierelektrophoretisch und ebenso mit TLC oder HPLC möglich [214, 215]. Auch ein HPLC-Nachweis der Flavonoide ist zulässig [215, 216]. Mistelpräparate enthalten je nach Herkunft unterschiedliche Konzentrationen an Mistellektinen (ML). Da die Lektine ihre Aktivität bereits bei hoher Verdünnung zeigen und in Mengen im Mikrogrammbereich giftig sind [217], wurden Methoden zu Bestimmung der Gesamtkonzentration an ML I-III in Mistelpräparaten mit FPLC (*fast protein*), HPLC sowie ELISA entwickelt. Die von Ziska *et al.* (1985) [218], Vang *et al.* (1986) [219] und Willer *et al.* (1991) [220] etablierten ELISA sind relativ unspezifisch. Nachweismethoden wie Immundiffusion [221] oder über Hämagglutination [222] arbeiten zwar spezifisch, sind aber nur semiquantitativ. Aktueller Stand der Technik ist laut DAB eine ELISA-basierte Gehaltsbestimmung, welche gleichzeitig vorhanden Subgruppen von Lektinen selektiv analysieren kann [217], aber die beiden Nachteile hat, dass Saccharide störend wirken und Isolektine ungewünscht ebenfalls detektiert werden können [215].

Weißdorn: Gemäß dem DAB werden Flavonoide, Procyanidine, organische Säuren und Sterole für die Standardisierung und Qualitätskontrolle herangezogen [60]. Der Flavonoidgehalt ist über das Jahr nicht konstant, die Konzentration an Procyanidinen hängt von der Vegetation ab, außerdem sind Verfälschungen mit *Prunus spinosa*, *Robinia pseudoacacia* und *Sorbus aucuparia* bekannt [213]. Standardmäßig wird zur Identifizierung eine HPLC der Flavonoide durchgeführt. Daneben ist die Authentifizierung auch mikroskopisch anhand auffällig rechteckiger Zellen in der äußeren Epidermis möglich [213]. Die Detektion von Procyanidinen erfolgt über TLC. Alternativ kann HPLC zur Bestimmung von Procyanidinmono- und Oligomeren eingesetzt werden [92]. Bezüglich Reinheit und Gehalt legt das Arzneibuch einen Grenzwert von 6% an Verunreinigungen fest. Da die wirkenden Flavonoide nur in Blättern, Blüten und Früchten enthalten sind, darf nur 10% pflanzliches Material aus Zweigen stammen. Der Flavongehalt wird photometrisch bestimmt, für Glykosylflavone steht nur HPLC zur Verfügung [223]. Es wird aber empfohlen, die Procyanidine durch Färbung mit Folin-Reagenz oder n-Butanol/HCL zu quantifizieren [213].

Lefteria: Bei Lefteria als Mischpräparat ist der Inhaltsstoffnachweis besonders schwierig. Bärlauch und Mistel z.B. enthalten beide einen hohen Anteil an wirksamen Lektinen, was eine proteinbasierte Differenzierung schwierig macht. Die vorgestellten vor allem spektroskopischen Analysemethoden für die drei Arzneipflanzen sind mangels Selektivität für die Anwendung bei Lefteria unbefriedigend. Selbst eine moderne Analysemethode wie die HPLC scheidet zur Identitäts- und Reinheitsprüfung sowie zur Gehaltsbestimmung aus. Zwar gibt es etablierte Methoden, welche Flavonoide als Leitsubstanzen nutzen [224], allerdings sind Flavonoide sowohl von Bärlauch als auch von Weißdorn wichtige Inhaltsstoffe. Die vorgestellten Methoden gehen von Präparaten mit nur einem pflanzlichen Inhaltsstoff aus.

Im Hinblick auf die gestiegenen Anforderungen an die Qualität pflanzlicher Arzneimittel aufgrund der in den letzten Jahren stetig gewachsenen Ansprüche der Konsumenten spielt ein geeignetes Analyseverfahren für die Qualitätskontrolle, Sicherheit und die therapeutische Effektivität eine essentielle Rolle [225]. Die traditionelle chinesische Medizin ist mit über 10.000 verschiedenen zur Therapie eingesetzten Pflanzenspezies der weltweit größte Erzeuger von Phytopharmaka [226]. Wegen dieser Vielfalt werden dort vermehrt DNA-basierte Analysen genutzt und auch für die Anwendung der *real-time* PCR zur mengenmäßigen Bestimmung von Arzneipflanzen sind erste Beispiele beschrieben. Die Forschungsgruppe um Xue *et al.* (2006–2009) hat bisher als einzige für acht chinesische Arzneipflanzen *real-time* PCR-basierte Nachweismethoden entwickelt. Tab 3.4 zeigt eine Übersicht der publizierten PCR-Assays. Zunächst wurde 2006 für die tibetanische Arzneipflanze *Swertia mussotii* die *its*-Region als robuster molekularer Marker zur Differenzierung zwischen den teuren *S. mussotii* und 13 verwandten Verfälschungsmitteln etabliert [194]. Der Assay wurde anschließend auf *Euphorbia pekinensis* [162] und *Croton caudatus* [227] übertragen. Im Jahr 2008 folgte eine PCR mit TaqMan-Sonden zur Differenzierung der nahverwandten

Tab. 3.4: Übersicht über bisher publizierte *real-time* PCR-Assays für Arzneipflanzen.

Target	Arzneipflanzenspezies		Ziele	Detektionsformat	Referenz
	system. Name	dtsch. Name			
<i>its</i>	<i>C. foetida</i>	Stinkendes Wanzenkraut	Identifizierung von Substituten	LightCycler-Sonde Schmelztemperatur	[230]
<i>its</i>	<i>C. caudatus</i>	-	Identifizierung von Substituten	EtBr ja/nein-Antwort	[227]
<i>rpl16</i> <i>its</i>	<i>S. mussotii</i>	-	Authentifizierung von Verfälschungen	EtBr ja/nein-Antwort TaqMan-Sonden	[194]
<i>its2</i>	<i>G. macrophylla</i>	Chinesischer Enzian	Gehaltsbestimmung	realtive Quantifizierung mittels 5.8S rRNA-Gen	[229]
<i>its1</i>	<i>E. humifusa</i>	Boden- Wolfsmilch	Differenzierung von Verfälschungen	TaqMan-Sonden ja/nein-Antwort	[228]
<i>its1</i>	<i>E. maculata</i>	Gefleckte Wolfsmilch	Differenzierung von Verfälschungen	TaqMan-Sonden ja/nein-Antwort	[228]
<i>its1</i>	<i>E. pekinensis</i>	Chinesische Wolfsmilch	Authentifizierung von Verfälschungen	EtBr ja/nein-Antwort	[162]
<i>trnL-trnF</i>	<i>D. fortunei</i>	-	Differenzierung von Verfälschungen Gehaltsbestimmung	<i>scorpion</i> -Primer absolute Quantifizierung mit genomischer DNA	[189]

Wolfsmilchgewächse *E. humifusa* und *E. maculata* von weiter entfernt verwandten Verfälschungen auf Basis von Sequenzunterschieden ihrer *its1*-Sequenzen [228]. *Drynaria fortunei* konnte anhand von Sequenzvariationen des Spacers in der *trnL-trnF*-Sequenz mit *scorpion*-Primern von fünf Verfälschungen unterschieden werden. Hier wurde die *real-time* PCR auch zu ihrem eigentlichen Zweck der Quantifizierung verwendet [189]. Ebenfalls mit TaqMan-Sonden und der *its2*-Sequenz wurde am Beispiel von Enzian (*Gentiana macrophylla*) eine relative Quantifizierung verwirklicht [229]. Letztlich konnte für *Cimicifuga foetida* mit LightCycler-Sonden ein qualitativer Assays entwickelt werden, bei dem die Schmelzkurvenanalyse zur Detektion von Verfälschungen verwendet worden ist [230].

Die Beispiele zeigen, dass die *real-time* PCR eine überaus geeignete Methode zur Bestimmung der pflanzlichen Inhaltsstoffe in Mischpräparaten ist. Im Bereich der Lebensmittelkontrolle hat sich die PCR daher längst durchgesetzt. Dies umfasst Methoden zur Detektion von Inhaltsstoffen, aber auch zur Quantifizierung von Allergenen und GMO in Lebensmitteln [122]. So ist es zum Beispiel möglich, Eier, Erdnüsse, Haselnüsse, Mandeln, Milch, Sellerie, Sesam und Soja [231] sowie Gewürze [119] anhand von DNA-Spuren in Lebensmitteln parallel quantitativ zu analysieren. In der PubMed-Datenbank finden sich 144 entsprechende Arbeiten, einen guten Überblick bietet der Review von Poms *et al.* (2004) [232].

Für Lefteria erscheint die *real-time* PCR eine ideale Lösung zu sein. Mit verschiedensten Targets wurde gezeigt, dass die PCR zwischen einzelnen Spezies differenzieren kann und zudem eine speziesspezifische Quantifizierung möglich ist. Dies erfüllt genau die Anforderungen der Aufga-

benstellung dieser Dissertation. Der abschließende Abschnitt des Kapitels erklärt die Methodik der *real-time* PCR mit besonderem Augenmerk auf die relative bzw. absolute Quantifizierung sowie die Detektionsstrategien.

3.6 Quantitative *real-time* PCR

Im Vergleich zur konventionellen PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese, welche eine reine Endpunktbestimmung des PCR-Produkts darstellt, ermöglicht die quantitative *real-time* PCR (qPCR) Aussagen über die Ausgangsmenge (*starting quantity, SQ*) der Template-DNA zu gewinnen. Nach aktuellem Stand der Technik weist die *real-time* PCR, die größte Sensitivität, höchste Reproduzierbarkeit und den breitesten dynamischen Bereich aller nukleinsäurebasierter Methoden auf [233]. Das Prinzip beruht auf dem konventioneller PCR erweitert um die Quantifizierung des generierten PCR-Produkts. Die Besonderheit der *real-time* PCR ist die Zugabe von Fluorophoren, mit welchen der gesamte Amplifikationsprozess mittels Fluoreszenzdetektion in Echtzeit (*real-time*) verfolgt und analysiert werden kann. Die Menge des amplifizierten PCR-Produkts verhält sich dabei proportional zum Fluoreszenzsignal. Anhand der aufgezeichneten Amplifikationskurve erfolgt eine relative oder absolute Quantifizierung der amplifizierten Template-DNA. Eine anschließende Schmelzkurvenanalyse wird genutzt, um das PCR-Produkt über seine Schmelztemperatur, welche eine Funktion aus Produktlänge und Basenzusammensetzung darstellt, zu charakterisieren. Außerdem können unerwünschte, unspezifische Koamplifikate und Primerdimere detektiert werden. Im Unterschied zu semiquantitativen PCR-basierten Analysen mit Hilfe von Densitometrie oder Southern Blotting bei denen Bandenintensitäten verglichen werden, erfordert die *real-time* PCR keine nachträgliche Bearbeitung der Amplifikate, wodurch eine mögliche *carry-over*-Kontaminationsgefahr des PCR-Produkts vermieden wird.

3.6.1 Ablauf der Reaktion

Ein *real-time* PCR-Zyklus besteht wie bei herkömmlicher PCR aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, wobei der zweite und dritte Schritt bei der *real-time* PCR, aufgrund besonders optimierter Reagenzien und sehr kurzer Amplifikate, auch zusammengefasst werden können (*two-step protocol*). Die typische Amplifikation lässt sich in drei Phasen einteilen: Initiale *lag*-Phase, exponentielle Phase und abschließende Plateau-Phase (Abb. 3.5). Nur die exponentielle Phase wird zur exakten Quantifizierung des Amplifikats herangezogen. Als Maß für die Quantifizierung wird die Zyklenzahl bestimmt, ab der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt und sich die PCR schon in der exponentiellen Phase befindet (*threshold cycle, Ct-Wert*). Dazu wird aus dem Hintergrund eine Basislinie (*threshold*) berechnet. Der Schnittpunkt von Amplifikationskurve und Basislinie entspricht dem Ct-Wert und ist charakteristisch für die Ausgangsmenge an Template-DNA in der Probe. Der Ct-Wert ist umso niedriger, je höher

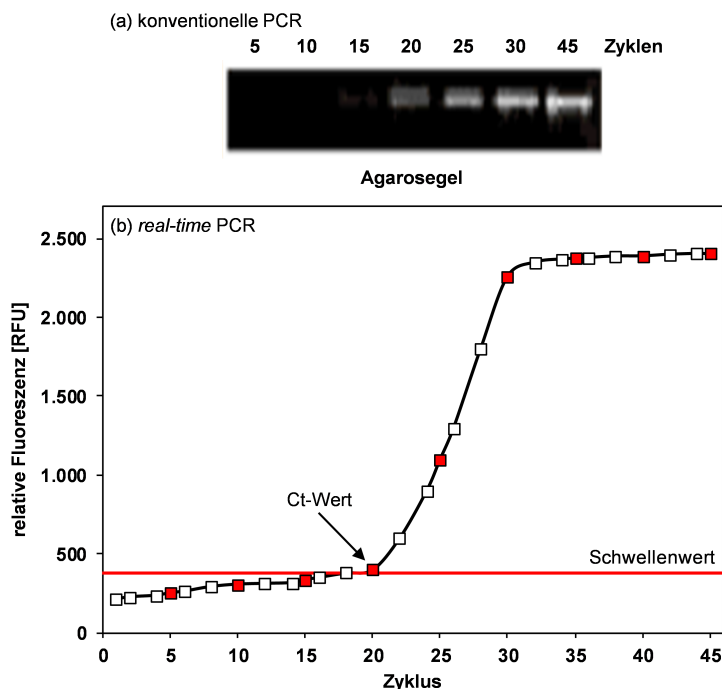


Abb. 3.5: Amplifikationsverläufe von konventioneller und *real-time* PCR. Bei der konventionellen PCR (a) kann von der Bandenintensität kaum auf die Template-Menge zurückgeschlossen werden. Durch die Bestimmung des Ct-Werts ermöglicht dies die qPCR (b) auf anschauliche und sehr genaue Art und Weise.

die Ausgangskonzentration der DNA ist. Ein um einen Zyklus geringerer Ct-Wert entspricht der doppelten Menge an eingesetzter DNA [234]. Das erhaltene Fluoreszenzsignal S lässt sich mathematisch wie folgt beschreiben:

$$S = k \cdot SQ \cdot E^C \quad (3.1)$$

Dabei stellt k den Proportionalitätsfaktor für den beschriebenen funktionellen Zusammenhang von PCR-Produktmenge und Signalintensität dar. Mit der Anzahl an initial vorliegenden Template-Sequenzen SQ , der PCR-Effizienz E und der Zyklenzahl C leitet sich ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und Ausgangsmenge des Templates her. Dabei ist m die Steigung und b der Achsenabschnitt:

$$C = m \cdot \log SQ + b \quad (3.2)$$

$$\text{mit } m = -(\log E)^{-1} \text{ und } b = -(\log E)^{-1} \cdot (\log k + \log S)$$

Nach dieser Umrechnung wird der lineare Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Ausgangsmenge und der Zyklenzahl deutlich. Für eine korrekte Auswertung ist außerdem die Effizienz der PCR ein bestimmender Faktor [234]. Sie hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab und muss daher experimentell ermittelt werden, dazu wurden verschiedene Methoden etabliert, welche im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

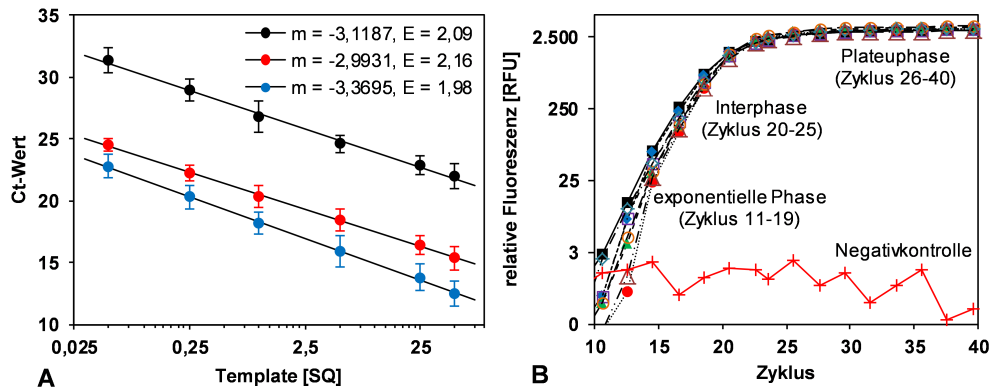


Abb. 3.6: Berechnungsstrategien für die PCR-Effizienz. (A) Berechnung anhand von dekadischen Verdünnungsreihen. (B) Berechnung aus dem absoluten Fluoreszenzanstieg (vgl. [236]).

3.6.2 PCR-Effizienz

In der exponentiellen Phase einer idealen PCR findet in jedem Zyklus eine Verdoppelung des PCR-Produkts statt. Mathematisch gesehen wird dieses mittels einer Exponentialfunktion zur Basis zwei beschrieben. Der Betrag der Basis wird als Effizienz der Amplifikation bezeichnet, eine ideale PCR verläuft daher mit einer Effizienz von zwei. Reale PCR-Amplifikationen weisen allerdings Effizienzen auf, welche kleiner als zwei sind [235].

Zur Bestimmung der Effizienz wird am häufigsten eine Gerade aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt [237]. Die ermittelten Ct-Werte werden gegen den Logarithmus der Template-Konzentration aufgetragen, aus der Steigung m kann die *real-time* PCR-Effizienz bestimmt werden (Abb. 3.6A). Dabei sollte möglichst für jede Probe eine individuelle Verdünnungsreihe verwendet werden. Ist das Probenmaterial nicht ausreichend, kann alternativ eine repräsentative Mischprobe erstellt werden [234]. Die Effizienz E berechnet sich nach folgender Formel:

$$E = 10^{-1/m} \quad (3.3)$$

Für jede Probe einzeln bietet die Methode sehr gut vergleichbare Ergebnisse, ist dafür aber sehr arbeitsintensiv. Eine Mischprobe weist erhebliche Mängel auf, da sie nicht auf probenindividuelle Unterschiede eingeht [234]. Die Methode überschätzt zudem die wahre Effizienz, es können Werte über zwei erhalten werden. Wurden alle Werte mit derselben Methode bestimmt ergibt sich daraus allerdings mathematisch kein Problem.

Die Effizienz lässt sich auch aus dem Fluoreszenzanstieg in der exponentiellen Phase der PCR berechnen (Abb. 3.6B). Die Steigung der exponentiellen Phase wird durch lineare Regression ermittelt, sie entspricht wiederum der PCR-Effizienz [236, 238]. So können zwar sehr einfach probenindividuelle Effizienzen ermittelt werden, allerdings unterliegt die Methode großen Schwankungen, da Anfang und Ende der exponentiellen Phase manuell festgelegt werden müssen. Hierdurch werden die wahren Effizienzen oft unterschätzt. Häufig liegt sie nur bei Werten zwischen 1,3 und 1,6 [234].

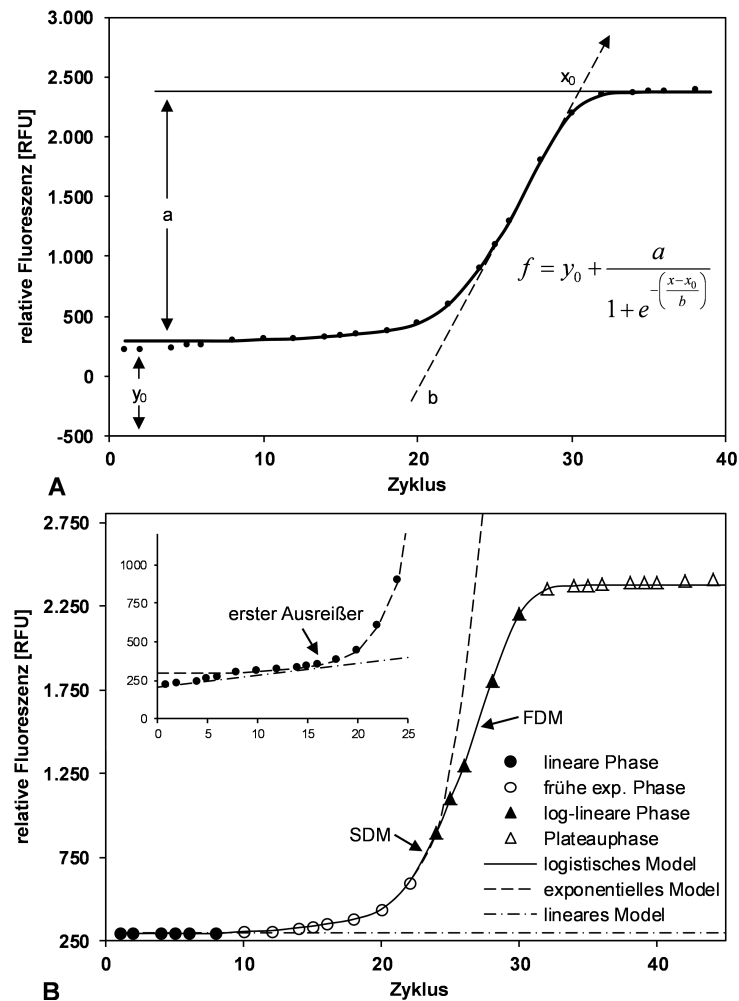


Abb. 3.7: Weitere Berechnungsstrategien für die PCR-Effizienz. (A) Mathematische Berechnung mit y_0 = Hintergrundsignal, a = max. Fluoreszenz - y_0 , x_0 = erstes Maximum (Wendepunkt), b = Steigung in x_0 . (B) Berechnung der *real-time* PCR-Effizienz ausgehend von einem einzigen Reaktionsansatz. Die sigmoide Amplifikationskurve lässt sich mit einem parametrischen logistischen Regressionsmodell insgesamt gut beschreiben. Zwischen Messpunkt sieben und 15 zeigt der Verlauf der Fluoreszenz exponentielles Verhalten und wird mit einem exponentiellen Modell ideal beschrieben. Zur Beschreibung der Grundphase dient ein lineares Modell. Im kleinen Plot sind die ersten 15 Messpunkte dargestellt, um die Bestimmung der exponentiellen Phase zu verdeutlichen (vgl. [239, 240]).

Als dritte Alternative bietet es sich an, die Effizienz anhand mathematischer Algorithmen für jede Probe einzeln zu berechnen. Dabei werden nicht „willkürlich“ einzelne Zyklen ausgesucht, sondern die gesamte Fluoreszenzkurve berücksichtigt. Der PCR-Verlauf wird an ein sigmoidales Modell mit vier Parametern angepasst. Bei sehr hoher Korrelation ($R^2 > 0,99$) kann die Effizienz anhand der Variablen b geschätzt werden (Abb. 3.7A). Hierbei werden die Effizienzen am Wendepunkt der Kurve bestimmt. Wiederrum unterschätzt auch diese Methode die wahre Effizienz zum Teil erheblich [239, 240].

Der neueste Ansatz zur Effizienzbestimmung erfolgt anhand eines exponentiellen Modells der PCR-Kinetik. Zunächst wird die Hintergrundfluoreszenz mittels linearer Regression bestimmt (Abb. 3.7B). Mit einem sog. *standardized-residual*-Algorithmus werden die Messwerte gefunden,

die nicht mehr der linearen Funktion der Hintergrundfluoreszenz folgen. Diese Zyklen stellen den Beginn der exponentiellen Phase dar. Mit einem logistischen Regressionsmodell werden anschließend die Messwerte gesucht, die sich nicht mehr exponentiell verhalten. Dazu werden alle Zyklen betrachtet und das zweite Maximum (*second derivative maximum*, SDM) berechnet [234]. Ab dem SDM verläuft die Zunahme der Fluoreszenz nicht mehr exponentiell. Der letzte Zyklus vor dem SDM bildet mathematisch das Ende des exponentiellen Modells. In die nachfolgende Berechnung werden wieder der Wendepunkt, aber auch das erste Maximum (*first derivative maximum*, FDM) und zehn Zyklen des exponentiellen Modells mit einbezogen. Das Modell zeigt realistische Effizienzen um 1,9 bei geringer Varianz und hoher Genauigkeit [240].

Sind die PCR-Effizienzen der Proben bekannt, kommen mehrere Modelle zur Normalisierung und Quantifizierung der Ergebnisse in Frage. Es unterscheiden sich zwei Quantifizierungsstrategien grundsätzlich voneinander: Relative Quantifizierung und absolute Quantifizierung. Online ist dazu eine gute schematische Orientierungshilfe verfügbar⁴.

3.6.3 Relative Quantifizierung

Für Genexpressionsanalysen mit cDNA als Template kommt vor allem die relative Quantifizierung in Frage. Dabei wird die Genexpression des zu untersuchenden Gens auf ein weiteres nicht reguliertes *housekeeping*-Gen (HKG) als interner Standard bezogen. Varianzen aufgrund unterschiedlicher RNA- bzw. cDNA-Qualität einzelner Proben werden dadurch kompensiert. Bei der relativen Quantifizierung werden keine absoluten Startkopienzahlen erhalten, sondern relative Verhältnisse zu einer Kontrollprobe. Die einfachste Form dieser Normalisierung berücksichtigt Effizienzen nicht [237]. Bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode werden zunächst die Ct-Werte von Zielgen und Referenzgen subtrahiert:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielsequenz}} - \text{Ct}_{\text{Referenz}} \quad (3.4)$$

Nach dieser ersten Normalisierung werden die ΔCt -Werte der Proben und der Kontrolle voneinander abgezogen:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrolle}} \quad (3.5)$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) für das Zielgen zwischen Probe und Kontrolle ergibt sich aus folgender arithmetischen Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \quad (3.6)$$

Das $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Modell geht von idealer Effizienz aus, d.h. Verdoppelung der PCR-Produkte in jedem Zyklus, was nicht der Realität entspricht. Da geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen und Referenz zu enormen Unterschieden der Expressionsrate führen [241], wurde die

⁴www.strategy.gene-quantification.info/

relative Quantifizierung optimiert, um den unterschiedlichen Effizienzen Rechnung zu tragen. Das effizienzkorrigierte relative Quantifizierungsmodell setzt sich aus der Berechnung der Expression des Zielgens geteilt durch die Berechnung der Expression des Referenzgens zusammen [242]:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{Zielsequenz}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{Zielsequenz}}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}{E_{\text{Referenz}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{Referenz}}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})}} \quad (3.7)$$

Da idealerweise das Referenzgen nicht reguliert ist, heben sich die Ct-Werte von Kontrolle und Probe gegenseitig auf. Damit lässt sich das Modell vereinfacht darstellen:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{Zielsequenz}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{Zielsequenz}}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})}}{E_{\text{Referenz}}^0} \quad (3.8)$$

$$= E_{\text{Zielsequenz}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{Zielsequenz}}(\text{Kontrolle} - \text{Probe})} \quad (3.9)$$

Die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung mittels *real-time* PCR stellt bis dato die genaueste Form der relativen Quantifizierung dar [234].

Häufig zur Normalisierung herangezogene Referenzgene sind in der Reihenfolge ihrer Verwendung *gapdh*, die 18S- und 26S-rRNA-Gene, Ubiquitin, Histon-Untereinheiten und β -Actin. Bei jeder Genexpressionsanalyse empfiehlt es sich mehrere HKG zu verwenden und nach dem stabilsten Gen zu screenen. Das Programm BestKeeper erlaubt es, das am besten geeignete, also am wenigsten regulierte Referenzgen aus einem Index von zehn unterschiedlichen Proben zu bestimmen. Es wurde validiert für einen Vergleich von vier HKG [243]. REST (*relative expression software tool*) stellt eine Programmerweiterung dar. Mit REST lassen sich auch Expressionsunterschiede von zwei unterschiedlich großen Gruppen berechnen und statistisch auswerten [244]. Die Gruppen werden als Mittelwerte zusammengefasst und die Expressionsunterschiede der Gruppen sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen gegen das am besten geeignetste HKG normalisiert. Zudem testet REST die Ergebnisse statistisch und gibt Signifikanzlevel an [243].

Noch einen Schritt weiter geht das Programm geNorm⁵, ein VBA-Applet für Microsoft Excel. Das Programm geNorm kann ebenfalls das am besten geeignetste HKG aus einem Set von getesteten Referenzgenen bestimmen. Die zugrundeliegende Quantifizierungsmethode wird qBase genannt [245, 246]. Eine noch genauere Normalisierung wird dabei erreicht, indem ein Index aus mehreren geeigneten HKG gebildet wird. Dazu wird ein individueller Normalisierungsfaktor für jede Probe auf Basis des geometrischen Mittels der Referenzgene gebildet und für die Berechnung der Ratios verwendet [247]. Zunächst werden die Ct-Werte (Mittelwerte aus Triplikaten, $\text{Ct}_{\text{Mittel}}$) in relative Werte W_{R} umgerechnet, $\text{MinCt}_{\text{Mittel}}$ ist der niedrigste aller gemittelten Ct-Werte:

$$W_{\text{R}} = E^{(\text{MinCt}_{\text{Mittel}} - \text{Ct}_{\text{Mittel}})} \quad (3.10)$$

⁵<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>

W_R -Werte aller Referenzgene werden als sog. Index in Matrixform in geNorm importiert. Die Software bewertet die Stabilität der Gene und schließt sukzessive HKG aus dem Index aus, bis dieser die statistisch signifikant beste Normalisierung ermöglicht. Mit dem optimalen Index werden die jeweiligen Normalisierungsfaktoren berechnet und damit eine beliebige Anzahl an Zielgenen normalisiert [248].

3.6.4 Absolute Quantifizierung

Vor allem für Arbeiten mit genomischer DNA ist die absolute Quantifizierung sinnvoll, da hier Referenzsequenzen nur schwierig als solche definiert werden können. Die absolute Quantifizierung erfolgt mittels einer Kalibriergerade, basierend auf einer Verdünnungsreihe von PCR-Produkten, Plasmid-DNA, *in vitro* transkribierter RNA oder synthetischer DNA als Standards [249, 250].

Entsprechende Kalibriergeraden werden analog zur Effizienzbestimmung erstellt. Mittels linearer Regression der Ct-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen, welche gegen den Logarithmus der Kopienzahl jeder Stufe aufgetragen worden sind, werden sie berechnet. Da die Nukleotidzusammensetzung der Standards bekannt ist, lässt sich aus ihrer photometrisch bestimmten Konzentration die Anzahl an Kopien des Standards in jeder Verdünnungsstufe berechnen. Aus dem Vergleich des Ct-Werts einer Probe mit der Kalibriergerade lässt sich direkt die in der Probe enthaltene Anzahl an Kopien der Target-Sequenz ablesen [251]. Für den Vergleich ist es aber eminent wichtig, dass die PCR-Effizienzen von Probe und Standard sehr ähnlich sind. Unterschiede lassen sich zwar mathematisch ausgleichen, dies schadet allerdings der Glaubwürdigkeit der Ergebnisse [252].

Kalibriergeraden sind hochgradig reproduzierbar und erlauben das Generieren von hoch spezifischen, sensitiven und reproduzierbaren Daten. Der dynamische Bereich einer Kalibriergerade kann über zwölf Größenordnungen von $< 10^1$ bis 10^{12} Standardmolekülen reichen [250]. Da die Genauigkeit der absoluten Quantifizierung von der Genauigkeit der Standards abhängig ist, müssen die Standards sorgfältig optimiert und validiert werden. Design, Herstellung, Konzentrationsmessung und Langzeitstabilität sind dabei nicht unproblematisch. Die Stabilität und Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse hängen stark mit der Art des Standards zusammen. Tab. 3.5 gibt eine Übersicht der Vor- und Nachteile der jeweiligen Standards.

Klonierte DNA ist sehr stabil und auch nach langer Lagerung noch ein reproduzierbarer Standard. Im Vergleich zu frisch synthetisierten PCR-Produkten sind Plasmide resistent gegen unspezifischen Verdau und *proofreading*-Aktivität von DNA-Polymerasen während der Amplifikation [250]. Ein Problem aller Kalibriergeraden ist allerdings die hohe Empfindlichkeit der qPCR. Minimale Abweichungen zwischen Ct-Werten resultieren in großen Schwankungen der absoluten Kopienzahlen [253]. Daher muss die Quantifizierung mit externen Standards vorsichtig angegangen werden (z.B. Einsatz vieler biologischer und technischer Replikate) [254].

Tab. 3.5: Vergleich der Quantifizierungsstrategien. Jede Methode hat ihre individuellen Vor- und Nachteile, wobei für Arbeiten mit mRNA eher relative und mit genomischer DNA eher absolute Quantifizierung verwendet wird.

	relative Quantifizierung	absolute Quantifizierung		
		PCR-Produkt	Plasmid-DNA	artifizielle RNA ^a
Vorteile	kein Standard		sehr stabil	bestes Modell für mRNA
	wenig Aufwand kaum Pipettieren	schnell	keine Reamplifikation ^b gutes Modell	
Nachteile	stabile interne Referenz relative Aussage	instabile Reamplifikation Modell für kurze DNA	Klonierungs- und Aufreinigungsaufwand	sehr instabil komplizierte Klonierung RNA-Synthese Reproduzierbarkeit

^a Von einem Plasmid ausgehend *in vitro* transkribierte RNA.

^b Erneute Amplifikation von aus einem Gel aufgereinigter DNA.

Gleichgültig wie gut die absolute Quantifizierung validiert wurde, lohnt sich der Aufwand (z.B. Klonierung, Kultivierung, Aufreinigung und Testung) für viele Anwendungen nicht. Höchstens das Screening nach Mikroorganismen in Lebensmitteln oder die Bestimmung von GMO-Anteilen oder ähnliche Assays mit genomischer DNA als Template verlangen eine solch hohe Genauigkeit. Also in Fällen, welche die Sicherheit von Menschen betreffen. Zudem kann absolute Quantifizierung nötig sein, wenn sich keine stabile Referenzsequenz für eine relative Quantifizierung finden lässt.

3.6.5 Detektionsmethoden

Zur Erzeugung des Fluoreszenzsignals stehen zwei grundsätzlich verschiedene Techniken zu Verfügung: Unspezifische, in die doppelsträngige DNA interkalierende Farbstoffe und sequenzspezifische Sonden [255, 256]. Die bekanntesten Vertreter interkalierender Fluorophore sind DAPI, Ethidiumbromid und SYBR Green I, von denen sich SYBR für den Einsatz in der qPCR seit vielen Jahren etabliert hat [257–259]. Im Gegensatz dazu nutzen Sonden Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) in einem Donor-/Akzeptorsystem. Das Donor-Fluorophor wird durch eine Lichtquelle angeregt und gibt Energie auf ein sich in der Nähe befindendes Akzeptor-Fluorophor weiter. Durch die spezifische Hybridisierung der entsprechenden Sonde an ein DNA-Molekül verändert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, was sich im Fluoreszenzsignal widerspiegelt [259, 260]. Es folgt eine kurze Vorstellung der einzelnen Detektionssysteme (Abb. 3.8).

SYBR Green I: SYBR ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff der sequenzunspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA interkaliert [255]. Durch Konformationsänderung steigert sich die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu ungebundenen Molekülen um mehr als Faktor 1.000. Die Anregung erfolgt mit einem Argonlaser bei 480 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 520 nm. Quenching spielt dabei keine Rolle, da die Reaktionslösung mit Farbstoff gesättigt wird und das Quenching auch proportional zur Menge an Amplifikat ist. Vorteil von SYBR sind die im Vergleich

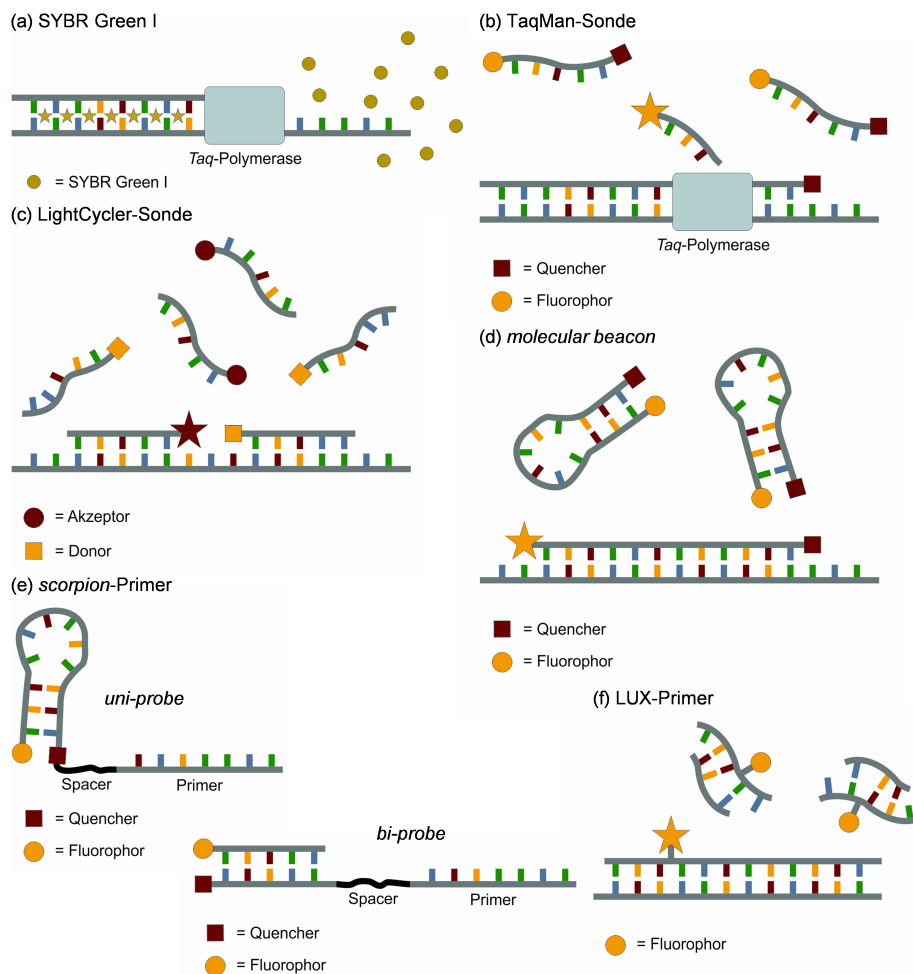


Abb. 3.8: Detektionsformate für die *real-time* PCR. Neben den klassischen drei Detektionsmethoden SYBR (a), TaqMan- (b) und LightCycler-Sonden (c) wurden in den letzten Jahren neuartige Sondenformate wie *molecular beacons* (d), *scorpion*-Primer (*uni-* und *bi-probe*) (e) oder LUX-Primer (f) entwickelt. Sterne symbolisieren Licht emittierende Fluorophore.

zu Sonden weitaus geringeren Kosten und universelle Einsetzbarkeit. Als Nachteil wird oft angeführt, dass Koamplifikate und Primerdimere als dsDNA ebenfalls detektiert werden, allerdings sollten sie für eine korrekte Quantifizierung unabhängig vom Detektionsformat generell vermieden werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte, welche die Reinheit der PCR-Produkte absichert [261, 262]. Die Schmelztemperatur einer dsDNA hängt von ihrer Basenabfolge ab und ist charakteristisch für jedes individuelle PCR-Produkt.

TaqMan-Sonden: Diese Hydrolysesonde enthält einen Reporterfarbstoff und einen Fluoreszenzquencher an den beiden Enden [263, 264]. Sie ist komplementär zu einem 20–30 bp langen Sequenzabschnitt zwischen den beiden Primerbindestellen. Aufgrund der Bindung von Reporter (Donor) und Quencher (Akzeptor) am gleichen Molekül besteht eine räumliche Nähe und das Signal wird gelöscht. Während der Synthese des Gegenstrangs baut die DNA-Polymerase, welche eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität aufweist, die Sonde vom ihrem 5'-Ende her ab. Der Reporter wird freigesetzt und entfernt sich räumlich vom Quencher. Die Fluoreszenz steigt mit jedem PCR-Zyklus an [259].

LightCycler-Sonden: Bei dieser Art von Hybridisierungssonden befinden sich zwei Sonden, welche nebeneinander an die Zielsequenz binden können, in der Reaktionsmischung: Ein Donor und ein Reporter (Akzeptor). Mit Zunahme an PCR-Produkt in jedem Zyklus, können immer mehr Sonden mit dem komplementären Amplifikat hybridisieren und die damit resultierende Nähe von Donor und Akzeptor führt zur vermehrten Freisetzung des Akzeptorfluoreszenzsignals [265]. Das System kann nur in LightCyclern der Firma Roche (Basel, Schweiz) eingesetzt werden und bietet auch die Möglichkeit einer Schmelzkurvenanalyse. Als LoopTag-Sonden steht neuerdings ein vergleichbarer Mechanismus auch für andere PCR-Geräte zur Verfügung.

Molecular beacons: Diese weiterentwickelte TaqMan-Sonde trägt zusätzlich komplementäre Sequenzbereiche am 5'- und 3'-Ende. Die resultierende Haarnadelstruktur (*stem-loop*) bringt Reporter und Quencher in räumliche Nähe und verhindert die Lichtemission sehr effizient. Durch Auflösung des *stem-loops* bei Hybridisierung mit dem PCR-Produkt vergrößert sich ihr Abstand und die Zunahme an Fluoreszenz kann detektiert werden [266].

Scorpion-Primer: *Scorpion*-Primer sind bifunktionelle Moleküle, bei denen ein Primer kovalent an das 3'-Ende der Sonde gekoppelt ist. Die Sonde enthält ebenfalls ein Fluorophor und einen Quencher, welche sich durch komplementäre Hybridisierung nahe kommen. Sind Reporter und Quencher über einen *stem-loop* verbunden, wird von *uni-probe* gesprochen, gibt es keine Verbindung handelt es sich um eine *bi-probe*. In Anwesenheit von PCR-Produkten binden die beiden Sondenteile komplementär an die Amplifikate und erzeugen so das Fluoreszenzsignal [267].

LUX-Primer: Bei LUX (*light upon extension*) wird mit einem am 3'-Ende fluorogenen Primer und einem unmarkierten Primer gearbeitet. Der fluorogenen Primer hat eine kurze Sequenz von sechs bis acht Nukleotiden am 5'-Ende, welche komplementär zum 3'-Ende des anderen Primers ist. Die daraus resultierende Struktur bietet ein optimales Quenching. Bei dem Effekt handelt es sich streng genommen nicht um FRET. Werden die Primer in die entstehende dsDNA eingebaut, nimmt das Signal messbar zu [268].

Fazit: Allen Sondensystemen ist gemeinsam, dass sie aufwendig und teuer sind. Allerdings bieten sie eine unübertreffbar hohe Spezifität und Sensitivität. Bei der Etablierung eines neuen *real-time* PCR-Assays müssen zunächst mit SYBR die notwendigen Grundlagen geschaffen werden. Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Bedingungen zur Primerbindung, der Spezifität der Templates und die Etablierung eines Systems zur Quantifizierung stehen dabei im Mittelpunkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das Vorgehen einer solchen Entwicklung am Beispiel des Phytopharmakons Lefteria.

4 Experimentelle Arbeiten

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten experimentellen Arbeiten wurden mit dem Ziel verfolgt, für das Phytopharmakon Lefteria (für genauere Erläuterungen siehe **3.1**) verschiedene DNA-basierte Nachweismethoden zur Detektion der enthaltenen pflanzlichen Inhaltsstoffe Bärlauch, Mistel und Weißdorn zu entwickeln. Diese Arbeiten umfassen den gesamten Aufbau eines Systems zur Kontrolle von Lefteria-Tabletten und gliedern sich in die Entwicklung und den Vergleich von DNA-Extraktionsmethoden (**4.1**), qualitative PCR-Analysen zur Identifizierung der drei Arzneipflanzen (**4.2**) und ihre absolute Quantifizierung mittels *real-time* PCR (**4.3**). In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Zusätzlich zu diesem Hauptteil an experimentellen Arbeiten wurde eine Bestimmung der Genomgrößen von Bärlauch, Mistel und Weißdorn durchgeführt. Dies dient der Vorbereitung künftiger Sequenzierungen der Pflanzengenome, welche die Spezifität des entwickelten Pflanzenassays bestätigen können. Die Daten wurden zudem auch zur Interpretation von *real-time* PCR-Ergebnissen genutzt. Das Vorgehen und die gewonnenen Ergebnisse sind in Anhang **A.1** dargestellt. Die Etablierung notwendiger Protokolle für Klonierungen und PCR wurde am Beispiel der rekombinanten Herstellung des humanen Wachstumsfaktors VEGF vorgenommen. Dies ist in Anhang **A.2** geschildert. Es wird dabei beispielhaft gezeigt, wie die in der Theorie beschriebenen Normalisierungsstrategien anzuwenden sind. Sämtliche Versuchsbeschreibungen sowie Protokolle zur Durchführung finden sich im Anhang **A.3** bis **A.6** ab Seite 142.

4.1 Verschiedene Methoden zur Extraktion von genomischer DNA

Zur Entwicklung und Etablierung von DNA-basierten Untersuchungsmethoden zum Nachweis der pflanzlichen Inhaltsstoffe des Phytopharmakons Lefteria ist die Isolierung der genomischen DNA notwendig. Für pflanzliche DNA-Extraktion werden aktuell verschiedene sowohl auf Fällung als auch auf Silica-Adsorption basierende Methoden verwendet. Diese zeigen je nach Pflanzenart und Anwendungsgebiet unterschiedlich Vor- und Nachteile. Daraus ergab sich für dieses Kapitel die Zielsetzung, aus der Fülle von Methoden eine für die Extraktion von Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA aus Lefteria-Tabletten geeignete Variante zu finden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

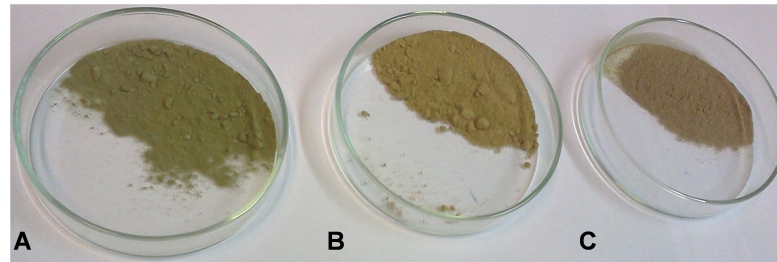


Abb. 4.1: Die pflanzliche Inhaltsstoffe von Lefteria. (A) Bärlauchblätter, (B) Mistelkraut und (C) Weißdornblätter werden zur Herstellung der Tabletten getrocknet, gerebelt und vermahlen.

- Vergleich und Bewertung von konventionellen Fällungs- und Adsorptionsmethoden im Hinblick auf DNA-Ausbeute, -Qualität und Reproduzierbarkeit
- Test verschiedener automatisierbarer Systeme, um eine routinemäßige Qualitätskontrolle von Lefteria zu ermöglichen
- Neuentwicklung einer auf Ionenaustausch basierenden automatischen Methode als Alternative zur Silica-Adsorption
- Untersuchung von spezifischer DNA-Hybridisierung an Magnetpartikel als Ersatz für die PCR-Analytik

Spezifische DNA-Amplifikation ist ein modernes Werkzeug zur Kontrolle pflanzlicher Arzneimittel. Die Grundlage zur Realisierung von DNA-basierten PCR-Assays wird zwangsläufig durch eine ausreichend zuverlässige und robuste Methode zur Gewinnung der pflanzlichen DNA gebildet. Eine DNA-Extraktion als Vorbereitung zur eigentlichen Analyse muss einfach, schnell und effizient sein. Die wichtigsten Faktoren hinsichtlich der Güte nachfolgender PCR-Analysen sind eine hohe Reproduzierbarkeit der Extraktion und die Qualität der DNA [269]. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren aus der Pflanzenmatrix oder den verwendeten Reagenzien muss vermieden werden, da sie die Analyseeffizienz reduziert und damit die Aussagekraft verschlechtert.

Pflanzlicher Inhaltsstoffe wie azide Polysaccharide und diverse Polyphenole sind Störfaktoren der DNA-Extraktion [270–272]. Zudem sind diese Stoffe Inhibitoren für DNA-Polymerasen [273, 274]. Ebenso stören Fette und Salze [275] sowie in diesem Fall möglicherweise weitere Zusatzstoffe aus den Lefteria-Tabletten. Bärlauch, Mistel und Weißdorn liegen als Ausgangsstoffe zur Lefteria-Herstellung in getrockneter und gemahlener Pulverform vor (Abb. 4.1). Prozessiertes Pflanzenmaterial stellt für jede DNA-Extraktion eine besondere Herausforderung dar. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist die DNA durch Scherstress beim mechanischen Zerkleinern oder Hydrolysieren beschädigt worden [275]. Fragmentierte DNA verfälscht die DNA-Mengenbestimmung und verhindert eine korrekte Detektion der PCR-Target-Sequenzen [276].

Um eine effiziente Extraktion von qualitativ hochwertiger DNA sicherzustellen wurden zehn unterschiedliche konventionelle Methoden getestet, verglichen und die beste Methode ausgewählt. Weiteres Ziel war es, mögliche methodenbedingte Unterschiede in der Zusammensetzung von

Tab. 4.1: Beschreibung der DNA-Extraktionsmethoden, die in dieser Arbeit verglichen wurden. Die Eigenschaften wurde aufgrund eigener Erfahrungen bewertet.

Methoden	Beschreibung	Probe [€]	Basis / Format	Eigenschaften
CTAB ^a	selbst herg. Reagenzien	0,3	selektive DNA-Fällung	ökonomisch, weit verbreitet
PVP ^b	selbst herg. Reagenzien	0,2	DNA-Fällung	ökonomisch
Wizard	Reagenzien von Promega	2,24	selektive DNA-Fällung	gute Skalierbarkeit
NucleoSpin Food	für DNA aus Lebensmittel (Macherey-Nagel)	3,31	Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	praktisch
NucleoSpin Plant	für DNA aus Pflanzen (Macherey-Nagel)	3,09	Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	schnell, praktisch
NucleoSpin Soil	für DNA aus Bodenproben (Macherey-Nagel)	4,76	Kugelmühle, Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	aufwendig
PowerPlant	Pflanzen-Kit von Mo Bio	4,02	Kugelmühle, Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	sehr aufwendig
Wizard SV	Kit für breite Anwendung (Promega)	2,78	Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	eher für tierische Zellen
DNeasy	Pflanzen-Kit von Qiagen	3,31	Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	schnell, praktisch, weit verbreitet
QIAamp	DNA aus Stuhlproben (Qiagen)	4,59	Silica-Bindung, <i>spin columns</i>	aufwendig
NucleoMag	<i>bead</i> -Kit für pflanzliche DNA (Macherey-Nagel)	1,75	Silica-Bindung, magnetische Separation	praktisch, halb-automatisch
Wizard Magnetic	KingFisher-Reagenzien von Promega	5,05	Silica-Bindung, magnetische Separation	praktisch, halb-automatisch
Biospring	automatisierte Extraktion von Qiagen	1,41	Silica-Bindung, magnetische Separation	praktisch, halb-automatisch
KingFisher ^c	selbst hergestellte Reagenzien	1,89	Silica-Bindung, magnetische Separation	teure Puffer, halb-automatisch
Amino- <i>beads</i>	positive geladene <i>beads</i> , eigene Puffer	1,04	Kugelmühle, ionische Bindung, magnetisch	simple, schnell, halbautomatisch

^a Cetyltrimethylammoniumbromid, Durchführung entsprechend [277]

^b Polyvinylpyrrolidon, nach [278]

^c Test der *beads* aus den drei vorher aufgelisteten KingFisher-basierten Kits mit eigenen Reagenzien.

aus *Lefteria* gewonnener Misch-DNA¹ aufzuklären. Die Kenntnis über die DNA-Verhältnisse in *Lefteria*-Proben ist essentiell zur Auswertung quantitativer PCR (4.3.5). Es wurden Methoden und Kits ausgewählt, welche in molekularbiologischen Laboren weit verbreitet sind. Es wurde sowohl die Extraktionsleistung aus *Lefteria*-Tabletten als auch aus den einzelnen Pflanzenrohstoffen untersucht. Das *Lefteria*-Pulver für die gesamte Vergleichsstudie wurde aus einem Blister Tabletten entnommen und zwecks Vergleichbarkeit gepoolt [269]. Insgesamt wurden zwei Methoden unter Verwendung selbst hergestellter Puffer und acht kommerzielle Kits getestet. Im Hinblick auf eine routinemäßige Anwendung der in dieser Dissertation entwickelten *Lefteria*-Analyse

¹In der gesamten Arbeit wird DNA-Gemisch, welches aus *Lefteria*-Pulver extrahiert wurde, allgemein nur als *Lefteria*-DNA bezeichnet. Bei *Lefteria*-Pulver selbst handelt es sich um eine trockene Mischung der drei Arzneipflanzen Bärlauch, Mistel und Weißdorn (Tab. 3.1), eine DNA-Mischung (*Lefteria*-DNA) liegt erst vor, nachdem eine DNA-Extraktion durchgeführt worden ist.

Tab. 4.2: Prozeduren für die Aufreinigung von DNA aus *Lefteria* mit Hilfe der Methoden, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Methode	Lyse ^a [μ L]	Pulver [mg]	Lysisbedingungen	Elution ^b [μ L]	Protokoll
CTAB	500	125	15 min bei 55 °C	100	[277]
PVP	300	10	1 h bei RT	100	[278]
Wizard	600	15	15 min bei 37 °C	100	Hersteller
NucleoSpin Food	550	75	30 min bei 65 °C	50	Hersteller
NucleoSpin Plant	400	20	10 min bei 65 °C	50	Hersteller
NucleoSpin Soil	700	50	5 min auf Eis	50	Hersteller
PowerPlant	550	10	5 min auf Eis	50	Hersteller
Wizard SV	250	20	16-18 h bei 55 °C	200	Hersteller
DNeasy	400	50	12 min bei 65 °C	200	Hersteller
QIAamp	1.600	50	1 min bei RT	200	Hersteller
NucleoMag	500	30	30 min bei 56 °C	50	KingFisher ^c
Wizard Magnetic	300	20	30 min bei RT	50	KingFisher
Biospring	300	30	30 min bei RT	50	KingFisher
KingFisher	500	50	-	50	[269]
Amino- <i>beads</i>	500	100	-	50	[279]

^a CTAB- und PCP-Puffer oder im Kit enthaltene Lysispuffer

^b Wasser, TE-Puffer oder ein Elutionspuffer aus dem Kit

^c www.thermoscientific.com/kingfisher/

wurden darüber hinaus fünf automatisierbare Varianten, welche teilweise selbst entwickelt worden sind (4.1.2), getestet und mit der konventionellen Extraktion verglichen. Tab. 4.1 gibt eine Übersicht aller getesteten Methoden und listet zudem eine Schätzung der jeweiligen Kosten sowie spezielle Eigenschaften auf. Die Durchführung erfolgte mit in Tab. 4.2 angegebenen Mengen bzw. Volumina entsprechend den Literatur- oder Herstellervorgaben. Alle Originalprotokolle sind für Extraktionen aus frischem Pflanzenmaterial ausgelegt. Hier verwendete trockene Pulver sind schwer in Suspension zu bringen, daher wurden sämtliche Protokolle an die Eigenheiten der Pflanzenpulver angepasst (Versuche nicht gezeigt, Optimierungen sind A.5.1 zu entnehmen).

Aufgrund der besseren Genauigkeit gegenüber der konventionellen UV/Vis-Spektrometrie bei Konzentrationen unter 100 ng/ μ L wurde die DNA-Ausbeute durch Messung der DNA-Konzentration mittels Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Reine λ -DNA in Konzentrationen zwischen 1 und 1.000 ng/mL diente als Standard. Die Messungen wurden als Triplikate in schwarzen 96-Lochplatten in einem Fluoreszenz-Plattenleser mit Anregungs- und Emissionswellenlängen von 480 und 520 nm durchgeführt.

Die Extraktionsmethoden werden im Folgenden anhand von DNA-Ausbeute und -Qualität sowie Wiederholpräzision bewertet. Quantitative *real-time* PCR macht die Menge an enthaltener Template-DNA in einer Probe bestimmbar (4.3.5), nach Aufklärung der Genomgrößen (siehe A.1.2) ist so zudem die Anzahl an Pflanzenzellen zu ermitteln. Für einen Inhaltsstoffnachweis gemäß europäischer Richtlinien muss aus der gemessenen Template-Menge auch auf die ursprüngliche Pulverzusammensetzung rückgeschlossen werden können (vgl. 3.3). Dadurch kommt der

Wiederholpräzision der DNA-Extraktion eine besondere Bedeutung zu, welche in dieser Form von anderen Vergleichsstudien nicht untersucht worden ist [123, 280–287]. Sämtliche erhaltenen Ergebnisse wurden einer statistischen Datenauswertung mittels Varianzanalyse² (*analysis of variance*, ANOVA) unterzogen, um eine Signifikanz ausweisen zu können.

Zur Ermittlung des Einflusses von DNA-Schädigungen, Verunreinigungen und möglicher PCR-Inhibitoren auf die Qualität der extrahierten DNA, wurde diese mittels *real-time* PCR mit SYBR Green I beurteilt. Konventionelle [281, 283, 284, 288–290], kompetitive [291] und *real-time* PCR [123, 269, 280, 286, 290, 292–297] sind anerkannte Methoden und haben sich schon mehrfach zur Bewertung von Template-Qualität bewährt. Die analysierbare Anzahl an Target-Kopien wurde absolut quantifiziert. Dafür wurde die Generierung von bärlauch-, mistel- bzw. weißdorn-spezifischen Amplikons gegenüber einem entsprechenden Plasmid-Standard analysiert. Die Durchführung der *real-time* PCR erfolgte gemäß der in **A.2** beschriebenen Protokolle. Die Entwicklung, Etablierung und das Validieren des quantitativen pflanzenspezifischen Assays wird ausführlich in Kapitel **4.3** erläutert. Zur Qualitätsbestimmung wurden dementsprechend folgende Targets verwendet: Bärlauch *pi-2*, *trnL-trnF*, Mistel *its1*, *trnS-trnfM*, Weißdorn *its1* und *trnM-atpE*.

4.1.1 DNA-Präzipitation und Silica-basierte Adsorption

Die CTAB-Methode ist die klassische Methode zur Gewinnung genomischer DNA aus frischem Pflanzenmaterial. Sie wurde von Murray *et al.* (1980) [298] und Saghai-Marouf *et al.* (1984) [277] eingeführt und hat sich seither als einfache und preiswerte Extraktionsmethode etabliert [299, 300]. Da Pflanzenmaterial eine vergleichsweise schwierige Matrix zur DNA-Extraktion darstellt und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) inhibierend auf Polymerasen wirkt, wurde die Methode vielfach modifiziert. Es existieren spezielle Protokolle u.a. für diverse australische Pflanzen [301], Bananen [302], Baumwolle [303], Dattelpalmen [304], Erdbeeren [305], Reis [306], Rosen [307] oder Zimmerpflanzen [308] und ebenso wurde die Methode an PCR-Bedürfnisse [309] und für kleine Reaktionsgefäße angepasst [303, 310]. Die von Kim *et al.* (1997) [278] etablierte Methode, bei welcher CTAB durch Polyvinylpyrrolidon (PVP) ersetzt wurde und das Wizard Kit (Promega, Madison, USA) basieren auf ganz ähnlichen Mechanismen zur Fällung von DNA.

CTAB ist eine quartäre kationische Ammoniumverbindung, welche sowohl mit DNA als auch mit störenden Polysacchariden und Proteinen Komplexe bildet. Die komplexierten Polysaccharide und Proteine lassen sich mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform abtrennen. Um die Nukleinsäuren anschließend aus der wässrigen Phase zu präzipitieren muss ihnen die Hydrathülle entzogen werden. Dies gelingt mit Ethanol oder Isopropanol. Ohne Hydrathülle lagern sich die

²Die Varianzanalyse stellt eine Alternative zum *t*-Test dar, die für Vergleiche zwischen mehr als nur zwei Bedingungen geeignet ist. Bei der *one-way*-Variante wird eine unabhängige Variable untersucht, bei der *two-way*-Variante sind es mehrere. Die statistische Bewertung erfolgte mit dem Dunnett-Test (*q*-Werte bei *one-way*) oder dem Bonferroni-Test (*t*-Werte bei *two-way*). Der *p*-Wert gibt das Signifikanzniveau an. Weitere Informationen sind hier erhältlich: www2.hu-berlin.de/psychologie/ingpsycscw/MethWiki/pmwiki.php?n=Guidelines.ANOVA.

langen DNA-Moleküle aneinander, die dadurch unlösliche DNA ist nach Zentrifugation pelletiert und in Wasser löslich. Eine Salzkonzentration von 1,2 M begünstigt dabei die Fällung, indem die Natriumionen die negativen Ladungen der DNA-Moleküle neutralisieren [311]. Das zugegebene Salz kann vor der Resuspendierung durch Waschen des Pellets wieder entfernt werden.

Die Kits von NucleoSpin Food (Macherey-Nagel, Düren) bis QIAamp (Qiagen, Hilden) in Tab. 4.1 bedienen sich alle der Adsorption von DNA an Silikagel, immobilisiert in einer Membran im *spin-column*-Format. Silica-Adsorption ist heute die gängigste Methode zur Aufreinigung von Nukleinsäuren [312]. Sie erfolgt entweder zentrifugations- oder vakuumbasiert. Es handelt sich um eine Variante der Festphasenextraktion, bei der chaotrope Salze Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen destabilisieren [313]. Proteine werden denaturiert und der Verbund von Nukleinsäuren und Wasser wird aufgespalten. Es folgt die Adsorption der an die Silica-Membran. Schwächer gebundene Verunreinigungen werden sequenziell mit Alkohol von der Membran gewaschen. Die anschließende Elution erfolgt mit Tris-Puffern oder Wasser. Vorteile sind gute Reinheit und Standardisierbarkeit, allerdings verbunden mit verhältnismäßig aufwendigen Protokollen und hohem Reagenzienverbrauch.

4.1.1.1 Evaluierung der Extraktionsprotokolle

Literatur- bzw. Herstellerangaben bezüglich der Menge an Ausgangsmaterial schwanken sehr stark (10–300 mg). Mit Rücksicht auf die abgezielte Wiederholpräzision, wurde aus diesem Grund zunächst für jede Methode evaluiert, welche Menge im Bereich von 1 bis 250 mg *Lefteria*-Pulver optimal für das jeweilige Protokoll ist. Am Beispiel von DNeasy (Qiagen) zeigt Abb. 4.2 zum einen den Zusammenhang von Ausgangsmaterial zu extrahierter DNA, zum anderen die DNA-Ausbeute bezogen auf 1 mg Pflanzenpulver. Dabei ist die Wiederholpräzision (Variationskoeffizient, VarK) extra hervorgehoben. Für DNeasy sind 50 mg *Lefteria* der getroffene Kompromiss zwischen einer Gesamtmenge von 14 µg DNA bei einer Ausbeute von 273 ng/mg auf der einen Seite sowie guter Wiederholpräzision (Standardabweichung, $\sigma = 7,98$) auf der anderen. In Bezug auf die Reinheit der DNA gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pulvermengen ($t < 1,4$, $p > 0,05$). Bei Verhältnissen von etwa 2 sind sowohl der Proteinanteil (260/280 nm) als auch die Kohlenhydrat-, Phenol- und Salzverunreinigungen (260/230 nm) vernachlässigbar klein. Anhand identischer Versuchsreihen wurden auch die anderen Methoden optimiert (Daten nicht gezeigt). Die experimentell bestimmten optimalen Ausgangsmengen sind in Tab. 4.2 angegeben. Für die Präzipitationsmethoden sind dies 10–125 mg Pflanzenpulver. Bedingt durch ihre begrenzte Größe, liegt bei *spin columns* die ideale Menge zwischen 20–75 mg. Je nach Fällungseffizienz bzw. Bindungskapazität lassen sich 0,17–5,74 µg DNA aus 1 mg *Lefteria* extrahieren.

Mit den so optimierten Methoden können erfolgreich DNA-Fragmente mit sehr hohem Molekulargewicht (genomische DNA) aus *Lefteria* extrahiert werden (Abb. 4.3). DNA, welche mit PVP und Wizard (Spuren 2, 3) gewonnen wird, scheint in höherem Maße degradiert zu sein, als bei den

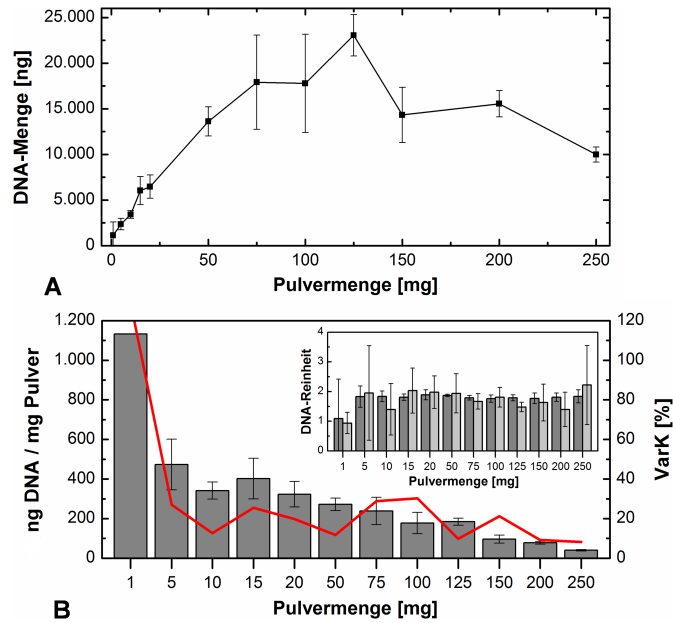


Abb. 4.2: Bestimmung der optimalen Pulvermenge beim DNeasy Kit. (A) Dargestellt sind die absoluten DNA-Mengen und (B) die DNA-Ausbeuten in Abhängigkeit der Pulvermengen zwischen 1 und 250 mg *Lefteria* ($n = 3$). Der rote Graph stellt die Variationskoeffizienten (VarK) dar. Die DNA-Reinheit wird durch die bei Verhältnisse 260/280 nm (grau) und 260/230 nm (hellgrau) verdeutlicht.

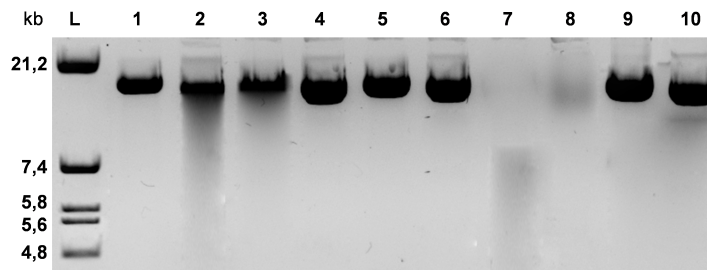


Abb. 4.3: Visualisierung der genomischen DNA aus *Lefteria*-Tabletten. Aufgetragen wurden die Extraktionsmethoden in folgender Reihenfolge: CTAB (Spur 1), PVP (Spur 2), Wizard (Spur 3), NucleoSpin Food (Spur 4), NucleoSpin Plant (Spur 5), NucleoSpin Soil (Spur 6), PowerPlant (Spur 7), Wizard SV (Spur 8), DNeasy (Spur 9) und QIAamp (Spur 10). Es wurde ein 0,5%iges Agarosegel mit EtBr-Färbung und mit *EcoRI* verdaute λ -DNA als Größenstandard (Spur L) verwendet.

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Analysen zum Effekt der verschiedenen Extraktionsmethoden und DNA-Matrizen auf die DNA-Ausbeute und -Qualität.

Effekt	<i>F</i> -Wert (Freiheitsgrad), <i>p</i> -Wert	
	ng DNA/mg Pulver	Kopien/ng DNA
Methode	19.382,91 (9, 500), < 0,0001	270,54 (9, 60), < 0,0001
Matrix	6.267,72 (4, 500), < 0,0001	48,31 (1, 60), < 0,0002
beides zusammen	3.713,32 (36, 500), < 0,0001	12,68 (9, 60), < 0,0003

anderen Methoden. Da DNA aber spektroskopisch messbar ist, wird mit PowerPlant (Mo Bio, Carlsbad, USA) und Wizard SV (Promega) (Spuren 7, 8) anscheinend viel degradierte DNA extrahiert. Von Smith *et al.* (2005) [269] wurde bereits der Einsatz einer Kugelmühle bei diesen Methoden als nachteilig für die DNA-Qualität beschrieben, für NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) (Spur 6) ist dies aber nicht zu bestätigen.

Die statistische Auswertung der Daten aus Abb. 4.4 zeigt, dass die Extraktionsmethode und die Pflanzenmatrix aus welcher die DNA gewonnen wird, einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Ausbeute (ng DNA/mg Pulver) und die -Qualität (Kopien/ng DNA) haben (Tab. 4.3). Der Einfluss der Methode erzeugt die höchsten F -Werte³ (Verhältnis von systematischer zu unsystematischer Varianz). D.h. die im Folgenden beschriebenen Unterschiede sind vor allem auf die Extraktionsmethoden zurückzuführen.

4.1.1.2 DNA-Ausbeute bei den verschiedenen Pflanzenmatrizen

Der erste bewertete Aspekt des Methodenvergleichs ist die DNA-Ausbeute. Es war Ziel herauszufinden, ob Methoden sich für einzelne DNA-„Quellen“ (Lefteria und einzelne Pflanzen) unterschiedlich gut eignen oder ob die Ausbeuteverhältnisse von Methode zu Methode gleich sind. Wenn eine DNA-Spezies von einer Methode bevorzugt gebunden würde, hätte dies womöglich Auswirkung auf die Zusammensetzung von aus Lefteria extrahierter Misch-DNA und ihre Quantifizierung. Daher wurde versucht neben Lefteria auch aus den vier pflanzlichen Rohstoffen mit jeder fällungs- bzw. Silica-basierten Methode DNA zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4 übersichtlich zusammengestellt.

Aus Weißdornfrüchtepulver kann mit keiner Methode nennenswerte Mengen an DNA isoliert werden, d.h. die DNA wurde durch die Prozessierung vollständig degradiert und ist dadurch nicht mehr aufzureinigen. Weißdornblätter dagegen eignen sich jedoch gut zur DNA-Extraktion, wodurch der Inhaltsstoffnachweis trotzdem möglich ist. Das Wizard Kit ist die signifikant effizienteste Methode bei allen vier Matrizen ($t > 48,1$, $p < 0,0001$). Im Vergleich mit allen anderen Methoden wird durch Wizard mindestens fünffach mehr DNA extrahiert. Generell lässt sich mit den drei Präzipitationsmethoden signifikant mehr DNA aus 1 mg Pulver isolieren als mit den *spin-column*-basierten ($t > 57,6$, $p < 0,0001$). Einzige Ausnahme bildet NucleoSpin Food, mit welchem sich gegenüber den anderen *spin columns* deutlich mehr DNA aufreinigen lässt ($t > 7,1$, $p < 0,0001$).

Unter den weiteren Silica-basierten Methoden liefert Wizard SV die größte Menge Bärlauch- und Mistel-DNA, wohingegen mit NucleoSpin Soil und PowerPlant die geringsten Ausbeuten erzielt werden. Bei der Extraktion aus Lefteria und Weißdornblättern sind allgemein keine signifikanten Unterschiede zwischen den *column*-basierten Methoden zu erkennen ($t < 1,4$,

³http://helpdesk.graphpad.com/articles/interpret/ANOVA/two_way.htm

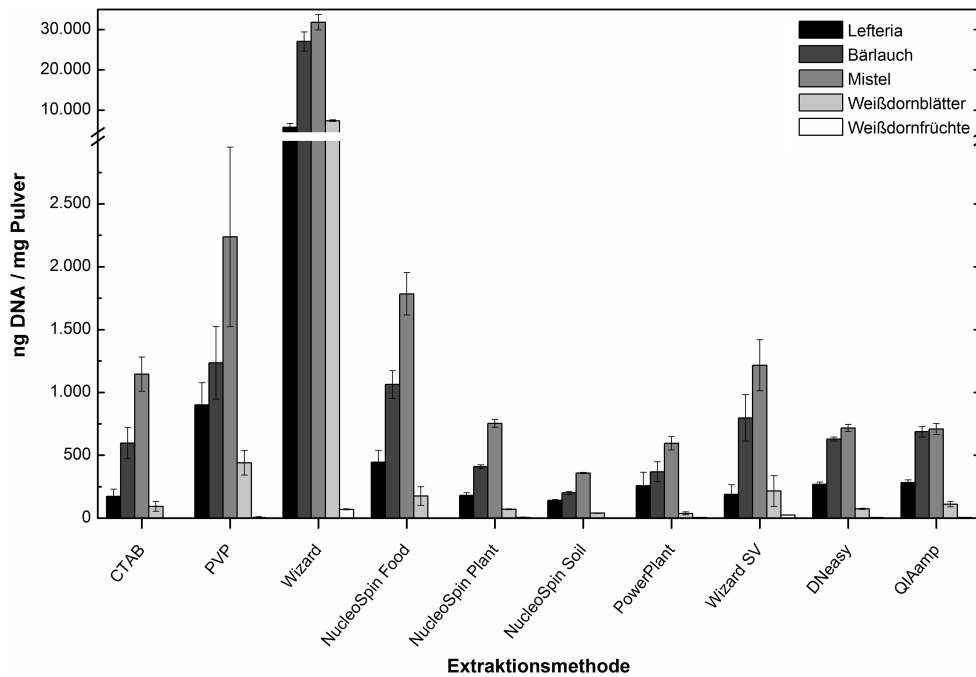


Abb. 4.4: Mit verschiedenen Methoden aus Lefteria- bzw. Pflanzenpulver gewonnen DNA ($n = 3$).

$p > 0,05$). DNeasy und QIAamp (Qiagen) sind sich sichtbar ähnlich. Es ist auch auffällig, dass beide Kits verhältnismäßig weniger Mistel-DNA als die anderen *spin-column*-Methoden liefern ($t > 4,3$, $p < 0,01$). Wahrscheinlich sind in beiden Kits die gleichen *spin columns* enthalten und nur eine leicht variierende Pufferzusammensetzung begründet unterschiedliche Produktnamen.

Beim Vergleich der einzelnen pflanzlichen Matrizen untereinander zeigt sich methodenunabhängig, dass aus Mistel am meisten DNA extrahiert werden kann, gefolgt von Bärlauch, Lefteria und Weißdorn. Dies spiegelt sehr eindrucksvoll und in einem sehr ähnlichen Verhältnis die Menge an DNA pro Zelle (Genomgrößen: Bärlauch = 59,2; Mistel = 153,3; Weißdorn = 2,7 pg) wider (siehe **A.1.2**). Der Unterschied im DNA-Gehalt zwischen Lefteria und Bärlauch bzw. Mistel ist für alle Methoden signifikant, zu Weißdorn besteht Signifikanz nur bei den Verfahren PVP und Wizard ($t > 3,6$, $p < 0,05$). Auffällig ist zudem das stabile Verhältnis von etwa 1 : 2,7 : 4,3 : 0,6 (Lefteria : Bärlauch : Mistel : Weißdorn) zwischen den Matrizen innerhalb einer Methode. Einzig die beiden Kits von Qiagen weichen von dieser Tendenz ab und sind weniger effektiv für die Isolierung von Mistel-DNA (1 : 2,4 : 2,6 : 0,5).

Zusammengefasst kann mit sämtlichen Methoden genomische DNA aus allen Matrizen extrahiert werden, wobei mit dem Wizard Kit insgesamt die höchste Ausbeute erzielt wird. NucleoSpin Food ist unter den Silica-Methoden am effizientesten. Hinsichtlich des Ausbeuteverhältnisses der Matrizen zueinander hat sich gezeigt, dass es (mit Ausnahme von DNeasy und QIAamp) stabil ist, was darauf hindeutet, dass die DNA-Zusammensetzung von Lefteria nicht durch die DNA-Extraktionsmethode beeinflusst wird. Dieser erste Vergleich verdeutlicht methodenbedingt sehr unterschiedliche Ausbeuten, inwieweit die erhaltene DNA aber für PCR-Anwendungen taugt, wird als nächstes geprüft.

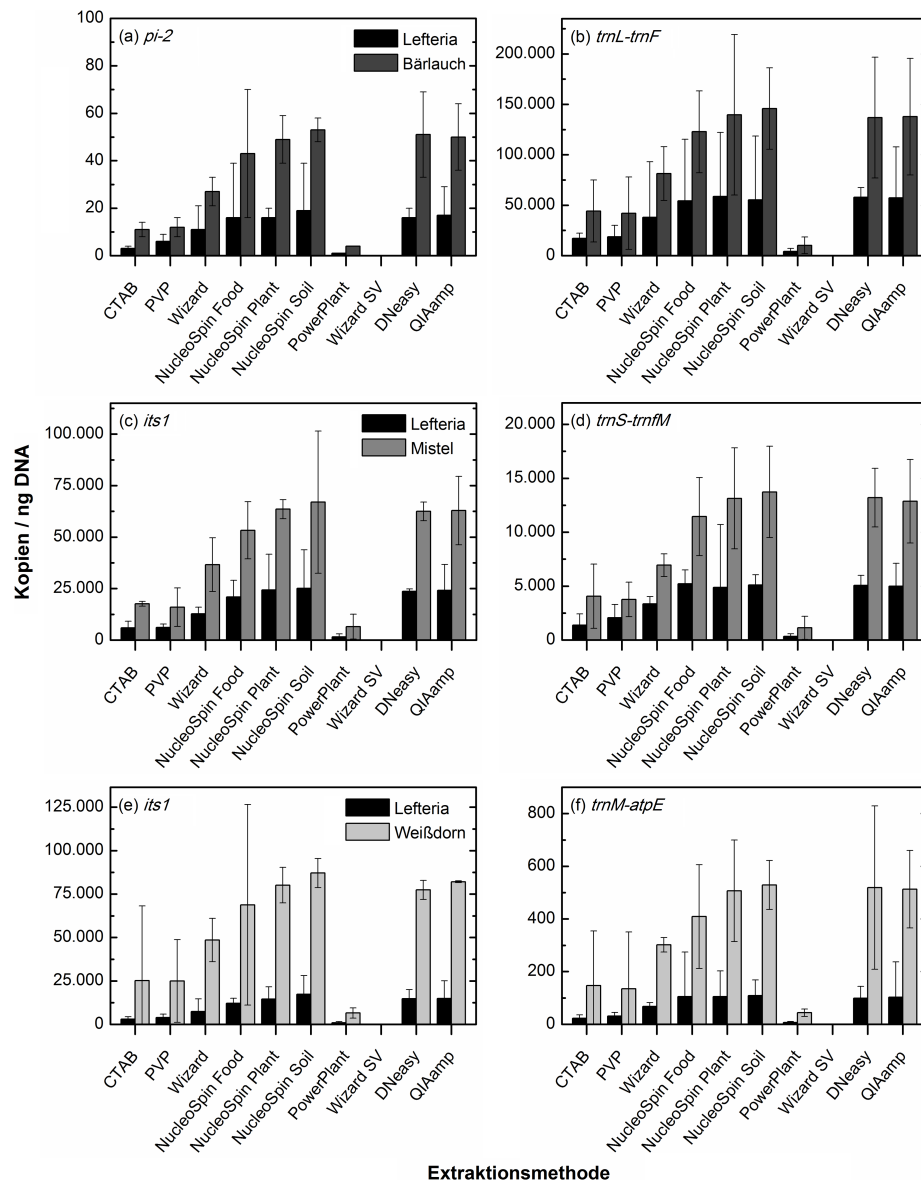


Abb. 4.5: Amplifizierbare Target-Kopien in allen Matrizen nach Extraktion mit sämtlichen Methoden ($n = 4$). Die Qualitätskontrolle erfolgte stets mit 50 ng Template-DNA pro PCR und jeweils den zwei spezifischen Targets für Bärlauch (a, b), Mistel (c, d) und Weißdorn (e, f). Parallel wurde auch die Qualität der Lefteria-Proben kontrolliert.

4.1.1.3 Qualität der genomischen DNA

Die DNA-Qualität als zweiter wichtiger Faktor ist hier das Maß dafür, ob sich eine Methode, mit welcher z.B. hohe DNA-Ausbeuten erzielt werden können, auch wirklich für die angestrebten PCR-Assays eignet. Mittels *real-time* PCR wurden darum die amplifizierbaren Kopien von pflanzenspezifischen Target-Sequenzen in 1 ng extrahierter DNA gemessen. Je mehr Kopien detektiert werden, desto höher ist die DNA-Qualität einzuschätzen.

In dieser Hinsicht sind die Ergebnisse im Vergleich zur DNA-Ausbeute tendenziell umgekehrt. Die amplifizierbare Anzahl an Target-Kopien wurde in Vierfachmessungen absolut quantifiziert. Zur Sicherung der Analysequalität wurden von jeder Probe Triplikate vermessen (Abb. 4.5). Dabei

zeigt sich, dass DNA-Proben isoliert mit NucleoSpin Plant (Macherey-Nagel), NucleoSpin Soil, DNeasy und QIAamp für alle sechs Templates, d.h. auch für alle vier Matrizen stets signifikant die höchsten Amplifikationslevel erreichen ($t > 3,6$, $p < 0,05$). Diese vier Kits liefern DNA mit maximaler Qualität. Das beweist, dass mit diesen DNA-Extraktionen keine störenden PCR-Inhibitoren mit aufgereinigt werden und der Grad an Degradation sehr gering ist. NucleoSpin Soil ist dabei am besten, die Unterschiede zwischen den vier Kits sind aber nicht signifikant ($t < 1,0$, $p > 0,05$). Das ausbeutestärke NucleoSpin Food zeigt eine leicht schlechtere DNA-Qualität, extrahiert aber ebenfalls noch DNA in deutlich höherer Qualität gegenüber den weiteren Methoden ($t > 3,0$, $p < 0,05$). Wie schon Abb. 4.3 vermuten lässt, ist die DNA-Qualität bei PowerPlant und Wizard SV schlecht. Obwohl *spin columns* für genomische DNA eigentlich für sehr lange DNA-Fragmente optimiert sein sollten, sind die in diesen Kits enthaltenen Materialien nicht zum vorgesehenen Zweck zu benutzen.

Die drei fällungsbasierten Methoden unterscheiden sich hier kaum voneinander. Bei der Präzipitation werden degradierte DNA-Fragmente im Gegensatz zu den Silica-Membranen mit isoliert und spektroskopisch quantifiziert [314]. Zudem sind kurze DNA-Fragmente selbst PCR-Inhibitoren. Dies erklärt die Diskrepanz zu den Silica-Methoden.

Abb. 4.5 verdeutlicht darüber hinaus, die bei allen Methoden stabilen Verhältnisse der Kopienzahlen in Lefteria-Proben zu Bärlauch- (1 : 2,7), Mistel (1 : 2,6) und Weißdorn-Proben (1 : 5,6). Diese Unterschiede sind alle signifikant ($t > 3,4$, $p < 0,05$). Abweichungen bezüglich dieser Verhältnisse sind zwischen einzelnen Methoden sehr gering ($\sigma < 0,91$).

Wie diese Bestimmung der DNA-Qualität verdeutlicht, ist ein reiner Vergleich der DNA-Ausbeuten zur Evaluierung der geeignetsten Extraktionsmethode nicht ausreichend, da eine gute DNA-Ausbeute nicht automatisch mit guter -Qualität korreliert. Die hier als am besten bewerteten Methoden haben eine vergleichsweise niedrige, aber dennoch ausreichende Ausbeute, sind aber aufgrund der Qualität eindeutig den anderen Methoden vorzuziehen.

4.1.1.4 Zusammensetzung der DNA-Proben

Zum Punkt DNA-Qualität gehören auch die Mengenverhältnisse in Lefteria-Mischproben. Die Ergebnisse von 4.1.1.2 führen zu dem Schluss, dass die Zusammensetzung von Lefteria-DNA wahrscheinlich nicht durch die DNA-Extraktionsmethode beeinflusst wird. Um diese Vermutung anhand experimenteller Daten zu beweisen, wurde mittels der Kopienzahlen, bestimmt in reinen Pflanzenproben, die Zusammensetzung der DNA der Lefteria-Proben berechnet. Das Vorgehen ist in 4.3.5 genau erläutert.

Die in Abb. 4.6 gezeigten Daten spiegeln jeweils die Mittelwerte beider pflanzenspezifischer Targets wider (siehe Abb. 4.5). Die jeweils erste Säule zeigt die DNA-Zusammensetzung von Lefteria und macht die Methodenunabhängigkeit ganz klar deutlich. Mit Ausnahme von PowerPlant

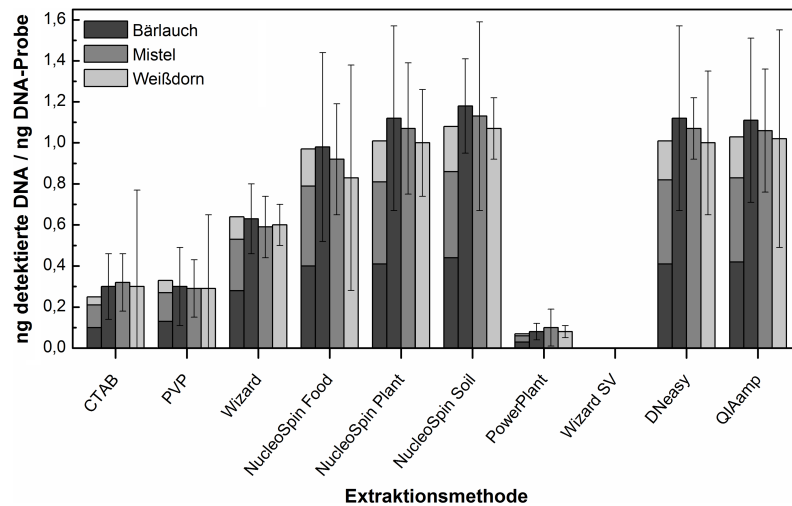


Abb. 4.6: Detektierbare DNA pro 1 ng isolierter DNA im Methodenvergleich. Die DNA-Qualität ist hier dargestellt als die Menge an intakter DNA in 1 ng DNA-Probe ($n = 8$). Die gestapelten ersten Säulen zeigen die DNA-Zusammensetzung der *Lefteria*-Proben. In allen Fällen sind die vier Säulen pro Methode gleich hoch, was bedeutet, dass die Matrix keinen Einfluss auf die Qualität hat.

und Wizard SV hat Bärlauch stets einen Anteil von rund 41%, Mistel von 40% und Weißdorn von 18%. Diesbezügliche Varianzen zwischen einzelnen Methoden sind marginal ($\sigma < 1,23$). Die Unterschiede zwischen einer DNA-Spezies in *Lefteria*- und reiner Pflanzenprobe sind immer signifikant ($q = 6,4$ $p < 0,001$). Die unter 4.1.1.2 beobachtete Auffälligkeit der beiden Kits von Qiagen wirkt sich nicht aus.

Zusammenfassend gilt für alle Methoden, dass die DNA-„Quelle“ keinen Einfluss auf die DNA-Zusammensetzung hat. Die detektierbare Menge DNA ist innerhalb einer Methode für alle Matrizen sehr ähnlich. Bei NucleoSpin Plant, NucleoSpin Soil, DNeasy und QIAamp setzen sich 1 ng eingesetzte *Lefteria*-DNA aus 0,97–1,07 ng DNA zusammen. Es wird damit signifikant mehr DNA detektiert als bei den weiteren fünf Methoden ($t > 2,8$, $p < 0,05$). Dasselbe gilt mit 0,83–1,18 ng für die reinen Pflanzenproben ($t > 3,1$, $p < 0,05$). Sowohl DNA aus *Lefteria* als auch aus den Pflanzen, isoliert mit einer der vier genannten Methoden, hat maximale Qualität und enthält keine PCR-Inhibitoren. Die PCR-Kompatibilität liegt bei 100%. Unter den fällungsbasierten Methoden liefert das Wizard Kit die größte Menge an amplifizierbarer DNA. Rund 62% der damit isolierten DNA sind PCR-kompatibel.

4.1.1.5 Zwischenfazit: Vergleich konventioneller Extraktionsmethoden

Um eine ideale DNA-Extraktion für die *Lefteria*-Analyse zu finden, wurden präzipitations- und *column*-basierte Methoden bezüglich Protokoll und Startmaterial umfangreich optimiert und verglichen. Mit allen Methoden kann DNA im etwa gleichen Verhältnis der Matrizen zueinander isoliert werden. In Bezug auf DNA-Ausbeute sind Fällungsmethoden gegenüber *spin columns* zu bevorzugen. Allerdings korrespondiert die Ausbeute nicht mit der DNA-Qualität. Hier zeigen die

Tab. 4.4: Extraktionsleistung der getesteten Methoden.

Methode	Ausbeute ^a [ng/mg]		Mengenverhältnisse	
	total	amplifizierbar	Matrix ^b	Lefteria ^c
CTAB	173,78 (56,41)	43,83 (11,17)	1 : 3,4 : 6,6 : 0,5	0,41 / 0,42 / 0,16
PVP	900,39 (176,39)	294,88 (78,92)	1 : 2,4 : 2,5 : 0,5	0,41 / 0,42 / 0,17
Wizard	5.737,95 (935,2)	3.637,86 (1.292,19)	1 : 4,7 : 5,5 : 1,3	0,44 / 0,39 / 0,18
NucleoSpin Food	443,78 (95,03)	432,06 (179,15)	1 : 2,4 : 4,0 : 0,4	0,41 / 0,40 / 0,19
NucleoSpin Plant	181,39 (20,42)	183,77 (76,44)	1 : 2,3 : 4,2 : 0,3	0,41 / 0,40 / 0,19
NucleoSpin Soil	140,6 (6,92)	150,71 (56,02)	1 : 2,4 : 2,5 : 0,3	0,41 / 0,39 / 0,2
PowerPlant	258,04 (106,1)	17,34 (5,96)	1 : 2,4 : 2,3 : 0,1	0,42 / 0,40 / 0,18
Wizard SV	189,44 (76,69)	0	1 : 4,2 : 6,4 : 1,1	- / - / -
DNeasy	269,03 (17,14)	271,91 (28,81)	1 : 2,3 : 2,7 : 0,3	0,41 / 0,40 / 0,19
QIAamp	283,16 (20,7)	288,71 (102,62)	1 : 2,4 : 2,5 : 0,4	0,41 / 0,40 / 0,19

^a Menge an isolierter Lefteria-DNA pro Milligramm pulverisierter Tablette (Standardabweichung).

^b Verhältnis der Menge an isolierter DNA aus den einzelnen Pflanzenmatrizen (Lefteria : Bärlauch : Mistel : Weißdorn).

^c Zusammensetzung von 1 ng Lefteria-DNA (Bärlauch / Mistel / Weißdorn) in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode.

Silica-basierten Methoden ihre Stärken. Mit Ausnahme von PowerPlant und Wizard SV bieten alle Kits hohe DNA-Qualität und PCR-Kompatibilität. PowerPlant und Wizard SV sind für alle verwendeten DNA-Matrizen unbrauchbar. Tab. 4.4 stellt die Ergebnisse und insbesondere inwieweit eine DNA-Matrix von einer Methode bevorzugt wird sowie die Zusammensetzung von Lefteria-DNA noch einmal übersichtlich zusammen.

Die höchste Ausbeute (auch an amplifizierbarer DNA) lässt sich mit dem Wizard Kit erzielen, allerdings mit hoher Varianz. Eine für PCR-Anwendungen ausreichende Ausbeute bei höchster Qualität bieten sowohl NucleoSpin Plant, NucleoSpin Soil, DNeasy als auch QIAamp. Größere Unterschiede zwischen diesen Methoden bestehen nicht. Wird zudem die Wiederholpräzision mit betrachtet, vereint das DNeasy Kit die meisten Vorteile auf sich. Mit der Auswahl dieser effizienten Extraktionsmethode für weitere Arbeiten ist der erste wichtige Punkt der Zielsetzung dieses Kapitels erreicht.

Ohne Abweichungen wurde die gleiche Zusammensetzung von Lefteria-DNA für alle Methoden ermittelt. Eine Bevorzugung einer Pflanzen-DNA durch eine Extraktionsmethode wirkt sich nicht auf die Lefteria-DNA-Extraktion aus. Wahrscheinlich sind die verschiedenen DNA-Stränge derart gut vermischt bzw. assembliert, dass sie gemeinsam gefällt bzw. unabhängig vom Säulentyp gemeinsam adsorbiert werden. Für die quantitative PCR (4.3) ist dies von entscheidender Bedeutung, denn damit ist die Inhaltsstoffanalyse vollkommen unabhängig von der DNA-Extraktionsmethode. Dieser zweite Punkt ist eine der wichtigsten Erkenntnisse aus dem Methodenvergleich.

Gerade im Hinblick auf GCP-, GLP- und GMP-konformes Qualitätsmanagement bei einem künftigen routinemäßigen Einsatz, sind automatisierte und somit standardisierbare Methoden attraktiv für die Testung von medizinischen Produkten, wie in diesem Fall Lefteria. Diesen

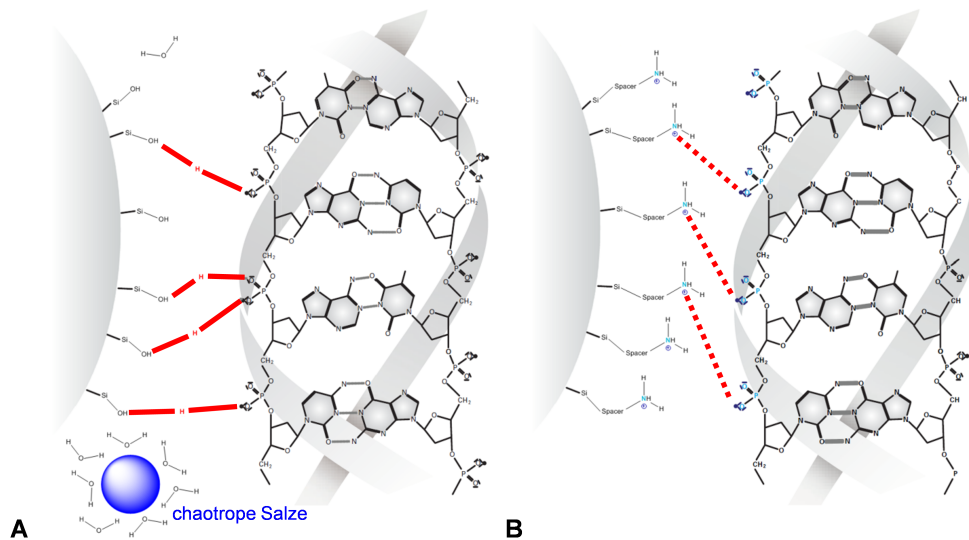


Abb. 4.7: DNA-Interaktion mit verschiedenen Arten von magnetischen Partikeln. (A) In Anwesenheit von chaotropen Salzen wird keine Hydrathülle um die DNA ausgebildet, intermolekulare Wasserstoffbrücken sorgen für eine Adsorption der DNA an die Quarzoberfläche von *Silica-beads*. (B) Die negativ geladenen DNA-Moleküle interagieren mit dem positiv geladenen Rückgrat von Anionenaustauschern auf der Oberfläche, was hier am Beispiel von Amino-modifizierten *Silica-beads* gezeigt ist.

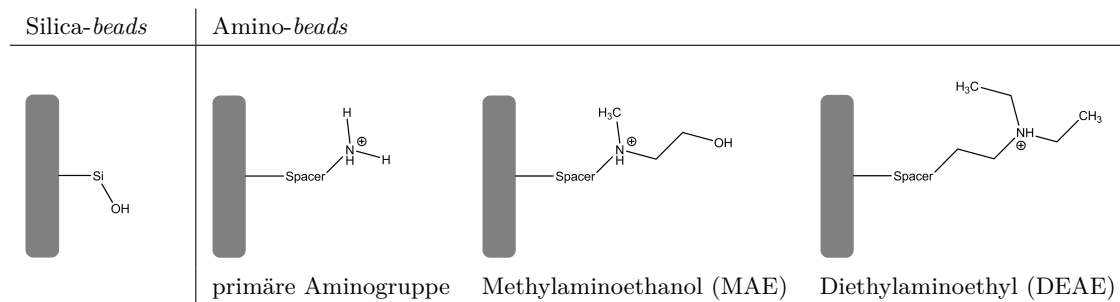
Aspekt berücksichtigend, behandeln die folgenden Abschnitte die Etablierung von Methoden zur automatischen DNA-Extraktion aus Bärlauch, Mistel und Weißdorn mit verschiedenen *magnetic beads* und einem einfachen *liquid-handling*-System [315]. Daran anschließend folgt eine *proof-of-principle*-Studie mit pflanzenspezifisch modifizierten *beads*.

4.1.2 Extraktion pflanzlicher DNA mittels magnetischer Partikel

Für Standardanwendungen zwar oft zu teuer, sind paramagnetische Partikel (*magnetic beads*) zur Miniaturisierung von Laboranwendungen und im Bereich der medizinischen oder molekularen Diagnostik, wo oft sehr viele Proben parallel bearbeitet werden, zunehmend eine interessante Alternative zur konventionellen DNA-Extraktion [316]. Sie haben gegenüber zentrifugationsbasierten Methoden den Vorteil einer erheblichen Zeitersparnis. Magnetische Extraktion ist schneller, weil die DNA direkt an die funktionalisierte Oberfläche der *magnetic beads* bindet und diese dann mittels Magneten von der restlichen Lösung entfernt werden können. Zudem werden nicht zwangsweise Alkohole oder salzhaltige Puffer benötigt, welche als PCR-Inhibitoren gelten. Die Extraktion lässt sich mit den *beads* leicht automatisieren oder für sehr wenig Probenmaterial herunter skalieren [317].

Grundsätzlich stehen zwei Varianten zur Verfügung. Kommerziell erhältliche Kits machen sich adsorptive Wechselwirkungen, ähnlich den *spin-column*-basierten Oberflächen, zunutze. Der DNA wird ihre Hydrathülle entzogen, danach ist eine Wechselwirkung mit der Silica-basierten *bead*-Beschichtung möglich (Abb. 4.7A). Die zweite Möglichkeit sind mit positiv geladenen Gruppen

Tab. 4.5: Übersicht über mögliche Oberflächenmodifizierung, welche für eine DNA-Bindung in Frage kommen können.



beschichtete Partikel (Tab. 4.5), welche als eine Art Ionenaustauschchromatographiematrix fungieren (Abb. 4.7B). Die positive Beschichtung wechselwirkt mit dem negativen Phosphatrückgrat der DNA. Eine Bindung erfolgt bei niedriger Salzkonzentration, die Elution kompetitiv durch Erhöhung der Ionenstärke im Elutionspuffer.

Aktuelle Beispiele für die Verwendung Silica-beschichteter *beads* sind ihre Integration in ein *lab-on-a-chip*-System zur Isolierung von DNA aus *Escherichia coli* [318] oder die Reinigung von markierter DNA für Sequenzierungen [319]. *Beads* verschiedener Hersteller wurden in weiteren mikrofluidischen Systemen verwendet [320–322]. Mit Silica- oder Polyvinylalkohol-basierten *beads* [317] lässt sich kontaminationsfrei genomische DNA aus humanem Blut isolieren [323] und auf der anderen Seite auch spezifisch bakterielle DNA aus Vollblut- [324] oder Gewebeproben [325] extrahieren. Auch für Pflanzen wurden einige Silica-*bead*-basierte Aufreinigungsprotokolle etabliert. In der Lebensmittelüberwachung werden sie zur Extraktion von DNA aus Kartoffelprodukten [269] und einigen Getreidesorten [326] mit anschließendem Test auf GMO erfolgreich eingesetzt. Ähnliche Analysen bezüglich GMO wurden auch für Mais und Sojabohnen verwendet [327, 328]. Der Einsatz von Dynabeads (Invitrogen) wurde für eine pflanzliche Matrix erfolgreich an *Arabidopsis thaliana* evaluiert [329]. Zur Untersuchung von Olivenölen auf Herkunft und Reinheit anhand von Polymorphismen eignen sich *beads*, da sich mit ihnen die DNA von in den Ölen enthaltenen PCR-Inhibitoren separieren lässt [330]. Aus Hafer und Weizen konnte genomische DNA als Template für Klonierungsversuche gewonnen werden [331] und für Hirse wurden modifizierte Silica-*beads* verwendet, um Pilzbefall mit *Claviceps* identifizieren zu können [332].

Mit positiv geladenen Gruppen modifizierte Oberflächen zur DNA-Aufreinigung einzusetzen ist weit weniger verbreitet. Die Idee wurde ursprünglich von Anionenaustauschmembranen abgeleitet, die zur Abtrennung von DNA-Kontaminationen Anwendung finden. Dies ist z.B. bei der Antikörperherstellung Standard [333–337]. Die Umkehrung dieses Prinzips führte zur Entwicklung von Membranen, mit denen sich Plasmid-DNA im großen Maßstab [338], parallelisiert [339] oder mit zweifacher CsCl-Dichtegradientenzentrifugation vergleichbarer Reinheit [340] gewinnen lässt. Adsorptionskinetik und Durchbruchverhalten wurden dafür ebenso untersucht, wie für lineare DNA [341, 342]. Für sämtliche Plasmidpräparationen ab dem Midi-Maßstab werden heute aus-

schließlich Kits mit Anionenaustausch-*columns* verkauft. Rickwood *et al.* (1988) [343] beschrieben erste Anwendungen positivmodifizierter *magnetic beads* anhand Phosphorimidazol- und Amino-modifizierter Polystyrolpartikel, welche unspezifisch DNA binden können. Daneben wurde gezeigt, dass mit Agarose-basierten paramagnetischen Partikeln ebenfalls DNA mit hoher Effizienz aus bakteriellen Zellysaten aufgereinigt werden kann [344]. Als Anionenaustauscher-*beads* entwickelten Zhang *et al.* (2009) [279] Polyglycidylmethacrylat-Mikrosphären mit magnetischem Kern zur Plasmidpräparation aus *E. coli*-Lysaten. Aktuell wurde mit ChargeSwitch (Invitrogen) das erste kommerzielle System dieser Art auf den Markt gebracht. Diese *beads* zeigen in Vergleichsstudien mit Bakterien- [295, 297, 345] bzw. Insekten-DNA [346] eine ähnliche Performance wie einige auch in dieser Arbeit verwendete kommerzielle Kits. Für pflanzliche DNA sind keine Beispiele bekannt.

4.1.3 Extraktion pflanzlicher DNA mittels Silica-beschichteter *beads*

Dieser Abschnitt behandelt die praktischen Arbeiten zum Thema *bead*-basierter DNA-Extraktion zunächst am Beispiel eines repräsentativen Tests dreier für Pflanzen-DNA geeigneter *bead*-Kits von verschiedenen marktführenden Anbietern. Die Verwendung solcher Kits ist im Bereich *bead*-Extraktion Standard [347]. Neben den enthaltenen Pufferlösungen wurden als Optimierungsansatz auch selbst hergestellte Puffer verwendet. Im daran anschließenden Abschnitt wird geschildert, wie eine neue Methode auf Basis von mit primären Aminogruppen beschichteten *beads* entwickelt und evaluiert wurde. Entsprechend den konventionellen Aufreinigungsmethoden (4.1.1) wurde wieder Wert auf DNA-Ausbeute, -Qualität und Wiederholpräzision gelegt, was bestmögliche Reinheit bei geringer Varianz garantieren soll.

4.1.3.1 Vergleich kommerzieller Kits

Der KingFisher (Thermo Scientific, Waltham, USA) ist ein magnetisches *liquid-handling*-System und arbeitet im 96-Lochformat. In der ersten Reihe der Lochplatte werden *magnetic beads* und Pflanzenzellysat zusammengeführt, in weiteren Reihen sind Wasch- und Elutionspuffer vorgelegt. Zur DNA-Separation werden die *beads* durch ein extern angelegtes Magnetfeld festgehalten und samt der DNA von Reihe zu Reihe transportiert. Es wurden die folgenden Kits mit den enthaltenen Puffern und Silica-*beads* getestet: NucleoMag 96 Plant (Macherey-Nagel), Wizard Magnetic 96 DNA (Promega) und BioSpring 96 DNA Plant (Qiagen). Die verwendeten KingFisher-Programme (A.5.1) wurden an die Herstellerangaben angelehnt. Als Pflanzenmatrix wurde *Lefteria*-Pulver verwendet.

Lefteria-Pulver wurde in Lysispuffer mit je 20 μL *bead*-Lösung auf 96-Lochplatten vorgelegt. Nach verschiedenen Waschschrritten erfolgte die Elution in Wasser. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit erfolgte photometrisch in den Elutionsfraktionen. Messungen in den Start- und Waschfraktionen waren aufgrund von zu starker Trübung nicht möglich. Das Verhältnis

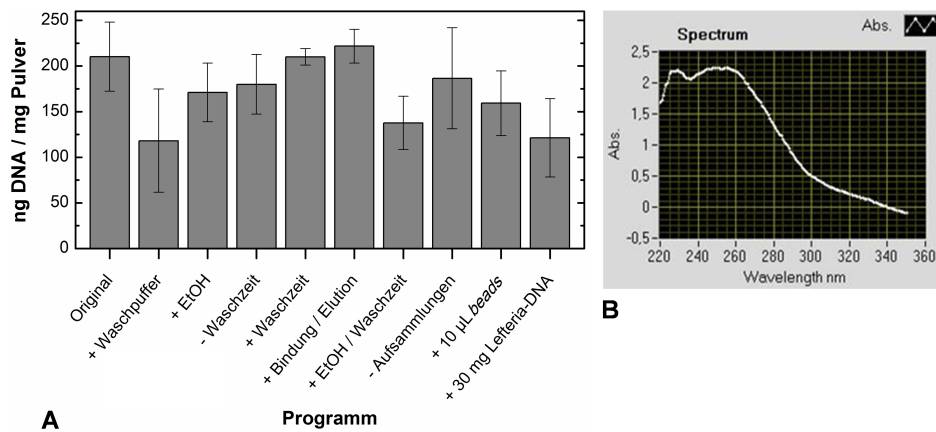


Abb. 4.8: Ergebnisse des NucleoMag 96 Plant Kits. (A) Dargestellt sind die DNA-Ausbeuten bei Verwendung verschiedener Programmvarianten ($n = 3$) sowie (B) das UV/Vis-Spektrum einer aufgereinigten DNA-Probe. Die Programmvarianten sind in **A.5.1** beschrieben.

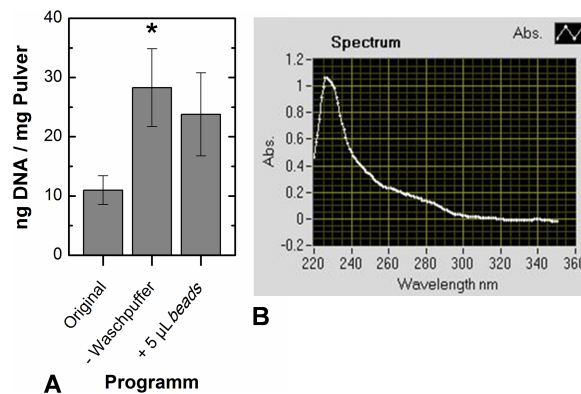


Abb. 4.9: DNA-Extraktion mit dem Wizard Magnetic 96 Kit. (A) Ausbeute für drei verschiedene Variationen des KingFisher-Programms ($n = 3$). (B) UV/Vis-Spektrum zur Reinheitskontrolle der isolierten DNA.

260/280 nm zeigt mit durchschnittlich 1,47 eine deutliche Proteinverunreinigung. Vor allem der hohe Salzgehalt erschwert eine korrekte Quantifizierung der DNA bei 260 nm, das Verhältnis von 260/230 nm liegt bei rund 0,57.

Mit dem NucleoMag 96 Plant Kit wird eine Ausbeute von durchschnittlich 210,17 ng ($\sigma = 29,53$) bezogen auf 1 mg Lefteria-Pulver erzielt (Abb. 4.8). Aufgrund der hohen Varianz und schlechten Reinheit wurden diverse Variationen am Programm vorgenommen. Weder mehr Waschschrte mit Ethanol bzw. Waschpuffer, kürzere oder längere Bindungs-, Wasch- oder Elutionszeiten und Erhöhungen von Lefteria- oder *bead*-Menge führen zu einer signifikanten Steigerung der Ausbeute ($q < 3,0$, $p > 0,05$).

Mit Wizard Magnetic 96 DNA werden nur 10,97 ng ($\sigma = 1,57$) aus 1 mg Lefteria-Pulver isoliert (Abb. 4.9). Mit dem Verzicht auf drei von fünf Waschschrten kann die Ausbeute zumindest verdoppelt werden ($q = 3,7$, $p < 0,05$). Bezüglich der Reinheit bringt dies keine Verbesserung. Eine 25%ige Erhöhung der *bead*-Menge führt zu keiner weiteren Erhöhung der Ausbeute. Die *beads* sind nicht der limitierende Faktor, ihre Bindungskapazität wird nicht ausgeschöpft.

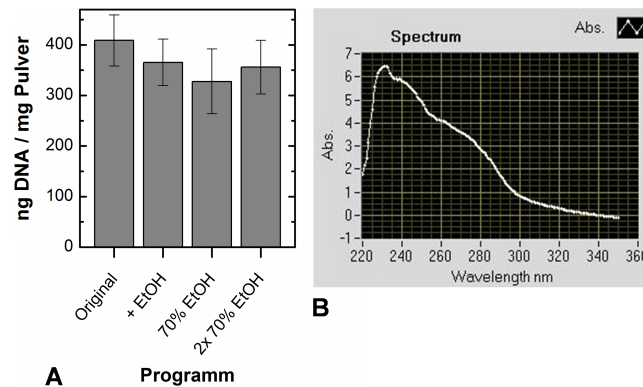


Abb. 4.10: Versuche mit dem BioSpring 96 DNA Plant Kit. (A) DNA-Ausbeute des Originalprogramms von Qiagen verglichen mit drei untersuchten Programmvarianten ($n = 3$). (B) Beispiel eines UV/Vis-Spektrums einer Probe mit dem BioSpring 96 DNA Plant Kit aufgereinigter DNA.

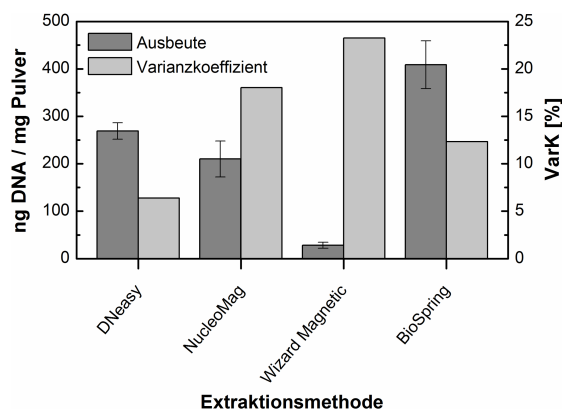


Abb. 4.11: Vergleich der drei kommerziellen *bead*-basierten Kits mit dem klassischen DNeasy Kit. Dargestellt ist die DNA-Ausbeute (grau) sowie die Varianz bei mehrfacher Durchführung in Prozent (hellgrau). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von jeweils drei Extraktionen.

Mit dem BioSpring 96 DNA Plant Kit werden mit 408,79 ng/mg ($\sigma = 50,43$) relativ viel DNA erhalten, allerdings ist die Reinheit der DNA trotz erneuter Optimierungsversuche nur suboptimal (Abb. 4.10). Hier wurde häufigeres Waschen mit Ethanol und, wegen besserer Salzlöslichkeit, der Austausch des 100%igen Ethanols gegen 70%igen, getestet. Signifikante Unterschiede sind jedoch nicht festzustellen ($q < 1,8$, $p > 0,05$).

Die Hauptprobleme der drei *bead*-basierten Aufreinigungskits sind die schwache Reinheit der erhaltenen DNA und die niedrige Wiederholpräzision bei mehrfacher Durchführung. Abb 4.11 zeigt die Ergebnisse zusammengefasst im Vergleich zum DNeasy Kit, der besten konventionellen Methode. Dabei ist BioSpring die ausbeutestärkste Methode für die Extraktion von DNA aus *Listeria*, aber alle *bead*-Kits liefern weit weniger gute Ergebnisse als das konventionelle Kit. Sowohl Pufferlösungen, *beads* als auch Programme der drei Kits wurden darum anschließend untereinander ausgetauscht getestet. Dies hat keinen signifikanten Einfluss ($q < 1,4$, $p > 0,05$). Es ist daher davon auszugehen, dass sich die drei *bead*-Arten stark ähneln. Nur die Wahl der Puffer ist ausschlaggebend (Ergebnisse nicht gezeigt).

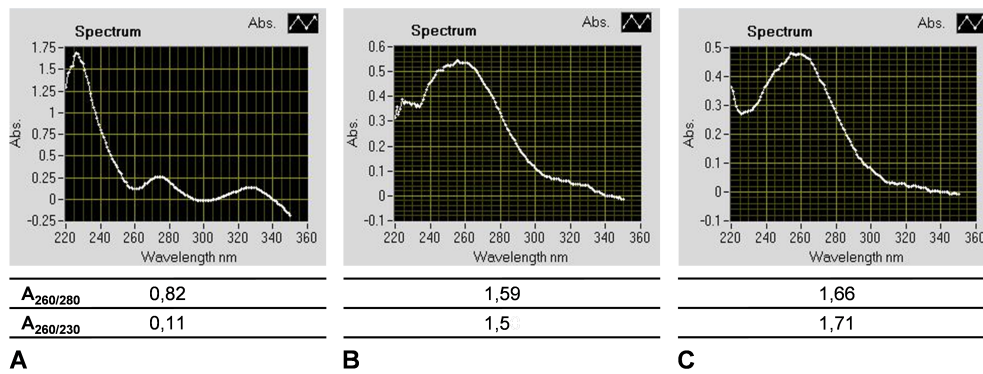


Abb. 4.12: Reinheitsmessungen der DNA isoliert mit den selbst hergestellten Puffern. Dies wurde sowohl mit (A) NucleoMag, (B) MagneSil sowie (C) MagAttract *beads* durchgeführt. Angegeben sind neben den Spektren auch die gängigen Reinheitsfaktoren.

4.1.3.2 Verwendung selbst hergestellter Puffer

Smith *et al.* (2005) [269] haben für Wizard Magnetic eigene Bindungs- und Waschpuffer mit einem entsprechenden Programm für den KingFisher veröffentlicht. Aufgrund der bisher schlechten Performance der untersuchten *bead*-Kits wurde die Eignung dieser Puffer in Kombination mit den *beads* aus den Kits für Lefteria-Pulver untersucht. Da kein Lysisprotokoll beschrieben ist, wurde Lefteria-Pulver und Bindungspuffer mit speziell für Pflanzen geeigneten Lysing Matrix D Tubes (MP Biomedicals, Solon, USA) in einer Kugelmühle homogenisiert. Für jeden Aufreinigungsansatz wurden Lysat, *bead*-Lösung und Bindungspuffer in 96-Lochplatten vorgelegt. Mittels KingFisher wurde die *bead*-gebundene DNA in mehreren Schritten gebunden, gewaschen und letztendlich in Wasser eluiert. Die Zusammensetzung der Puffer sowie Protokoll und Programm sind **A.3.4** und **A.5.1** zu entnehmen.

Spektroskopische Messungen zeigen eine eindeutig verbesserte Reinheit der DNA bei Verwendung dieser Puffer (Abb. 4.12). Mit einer Ausbeute von nur 22,58 ng DNA ($\sigma = 7,97$) pro 1 mg Lefteria-Pulver eignen sich die NucleoMag *beads* (Macherey-Nagel) nur vergleichsweise schlecht ($q > 4,9$, $p < 0,001$). Optimierungsversuche wurden nicht unternommen, da die Spektren der mit den anderen *beads* aufgereinigten DNA saubere Peaks aufweisen. Mit 122,28 ng/mg ($\sigma = 47,25$) bei MagneSil *beads* (Promega) und 124,35 ng/mg ($\sigma = 31,35$) bei MagAttract *beads* (Qiagen) ist die DNA-Ausbeute nahezu identisch gut ($q = 0,1$, $p > 0,05$), die Varianz aber groß. Die selbst hergestellten Puffer in Kombination mit MagneSil bzw. MagAttract aus den kommerziellen Kits stellen die erste erfolgreiche Methode zur Aufreinigung von DNA aus Lefteria mittels KingFisher dar.

4.1.3.3 Zwischenfazit: Silica-*beads*

Sämtliche getestete Silica-*beads* sind mit durch die Hersteller bereitgestellten Puffersystemen trotz Optimierungsversuchen für eine Lefteria-Analyse unbrauchbar. Mit alternativen Puffern können die MagneSil und MagAttract *beads* erfolgreich verwendet werden, um DNA aus Lefteria

zu isolieren. Um zukünftig das Potential der Silica-*beads* für Lefteria komplett ausschöpfen zu können, ist es empfehlenswert weitere Untersuchungen durchzuführen. Mit aufgereinigter DNA als Standard sollte die Bindungskapazität und das Elutionsverhalten näher untersucht werden. Ähnlich den konventionellen Methoden könnte die optimale Ausgangsmenge an Lefteria-Pulver bestimmt werden, um so ein möglichst gutes Kosten-/Nutzenverhältnis zu erreichen. Zudem ist es denkbar, weitere Puffersysteme zu testen. Gerade im Bereich der DNA-Adsorption an Silikagel finden sich diverse Referenzen in der Literatur.

4.1.4 Entwicklung der auf ionischen Wechselwirkungen basierten DNA-Extraktion

Da alle getesteten *bead*-Methoden schwache Wiederholpräzisionen zeigen, automatische DNA-Extraktion aber dennoch realisiert werden soll, wurde eine eigene Methode entwickelt. Dabei wurde auf das Prinzip der ionischen Wechselwirkung gesetzt, welches bisher für pflanzliche DNA-Extraktion noch nicht verwendet wird. Dieser Abschnitt schildert diese vollständige Eigenentwicklung, welche nicht auf dem Vorhandensein von kommerziellen Kits fußt. Es war daher notwendig, zur Vorbereitung umfangreiche Versuchsreihen durchzuführen, ehe pflanzliche DNA mittels Amino-modifizierter *beads* extrahiert werden konnte. Dies wird zunächst erläutert.

Für ionische Wechselwirkungen zwischen DNA und Magnetpartikeln wurden primären Amino-gruppen auf BioMag Maxi Amine Beads von Polysciences (Warrington, USA) gewählt. Das verwendete Puffersystem wurde Zhang *et al.* (2009) [279] entnommen, welche es zur Plasmidpräparation einsetzten. Es basiert auf TE-Puffer (Tris/EDTA). Genaue Pufferzusammensetzungen und das einfach gestaltete Programm für den KingFisher sind **A.3.4** und **A.5.1** zu entnehmen. Da keinerlei entsprechende experimentelle Daten vorlagen, wurde die Methode zunächst mit genomischer DNA aus Kalbsthymus bezüglich der notwendigen Menge an *beads* und der Elutionseigenschaften evaluiert. Kommerziell erhältliche Thymus-DNA war schon in vielen verschiedenen Studien Standard zum Test von DNA-Bindungen [314, 348, 349].

4.1.4.1 Bestimmung einer geeigneten *bead*-Menge

In Anlehnung an die Herstellervorgaben für Silica-*beads* (5–20 μL , Konzentrationen unbekannt) und unter Berücksichtigung der Begrenzungen durch die Größe einer 96-Lochplatte, war das erste Ziel, eine möglichst optimale *bead*-Menge für ein KingFisher-Protokoll finden zu können, welche sowohl ökonomischen Aspekten wie auch guter DNA-Ausbeute gerecht wird. Dabei war davon auszugehen, dass mit steigender *bead*-Menge auch eine größere Menge an DNA erhalten wird. In diesem Zusammenhang wurde zudem versucht, die DNA-Bindungskapazität der *beads* zu bestimmen. Dafür wurde zwischen 0,4 und 22,1 μg Thymus-DNA vorgelegt, an die *beads* adsorbiert und mittels KingFisher wieder eluiert. Die Menge an *beads* wurde mit 5, 10 und 20 μL (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) variiert. Es wurde erwartet, dass mit steigender *bead*-Menge mehr DNA gebunden und eluiert wird.

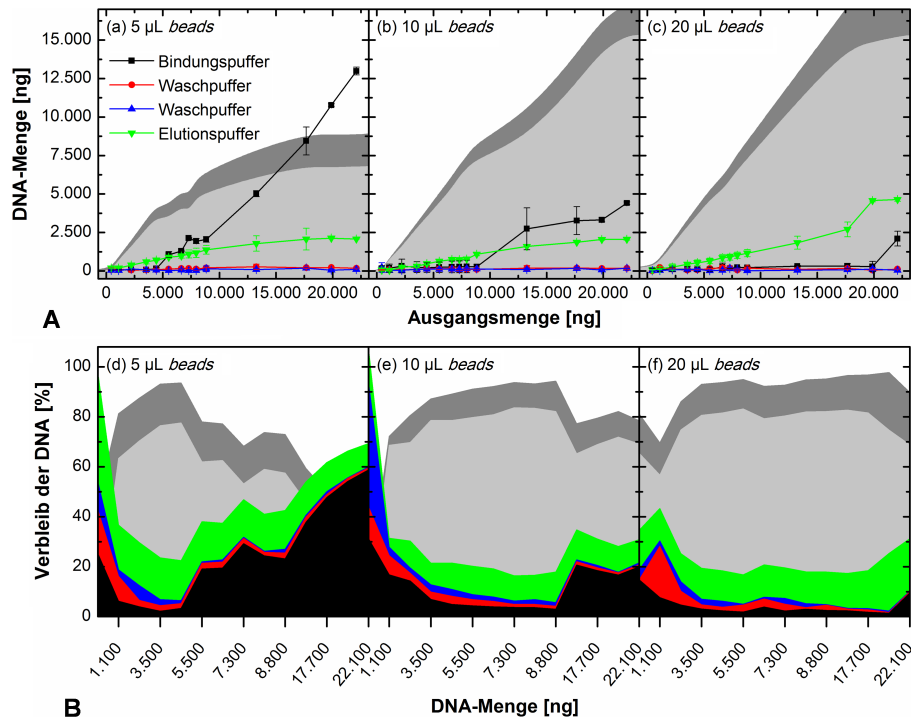


Abb. 4.13: Ergebnisse der Evaluierung der optimalen *bead*-Menge. (A) Spektroskopisch quantifizierte eluierte DNA in Abhängigkeit zur Ausgangsmenge an DNA. Der Aufenthalt der DNA wurde für alle drei verwendeten *bead*-Mengen nach Durchlaufen des KingFisher-Programms im Bindungspuffer, den beiden Waschfraktionen (gleicher Puffer) und Elutionspuffer gemessen ($n = 3$). Die Menge an DNA, welche von den *beads* insgesamt gebunden wird (grau) ist ebenso dargestellt, wie die DNA, welche nicht wieder eluiert werden kann (hellgrau), d.h. verlorene DNA. (B) Die gestapelte farbige Fläche stellt die jeweilige Wiederfindungsrate in Prozent dar, aufgeschlüsselt in die vier möglichen Aufenthaltsorte: Bindungspuffer (schwarz), erste (rot) und zweite Waschfraktion (blau) sowie Elutionspuffer (grün). Unabhängig davon handelt es sich bei der grauen Fläche um den prozentualen Anteil der eingesetzten DNA, welcher gebunden wird. Der nicht wieder eluierte Anteil ist in hellgrau dargestellt.

5 µL *beads*: Der Waschpuffer selbst zeigt keine eluierende Wirkung, in keinem Fall wird in den Waschfraktionen nennenswerte Mengen an DNA detektiert. Mit 5 µL *beads* bleibt bis etwa 5 µg vorgelegter DNA nahezu keine DNA im Bindungspuffer zurück, es ergibt sich eine Bindungskapazität von 1 µg DNA pro 1 µL *bead*-Lösung (Abb. 4.13a). Ab diesem Punkt steigt die Menge an zurückbleibender DNA nahezu linear bis 60% der Ausgangsmenge an. Daneben steigt auch die Menge an gebundener DNA weiter etwas an. Gegen Ende sind 1,8 µg/µL gebunden. Dies lässt sich damit erklären, dass von den mit DNA gesättigten *beads* bei hoher DNA-Konzentration in der Probe weitere DNA mit ausgeschleppt wird. Von 5 µL *beads* eluieren nur maximal 2 µg DNA, also etwa 24% der insgesamt gebundenen DNA. Auch eine Verdoppelung an Elutionspuffer hat keinen positiven Einfluss (Ergebnisse nicht gezeigt). Der hohe Verlust durch nicht eluierte DNA zeigt sich an den Wiederfindungsraten (Abb. 4.13d). Je nach Ausgangsmenge liegen diese zwischen 30–70%. Der verlorene Anteil ist auf den *beads* verblieben. Zwischen 1–5 µg Ausgangsmenge DNA werden zwar 80–95% an die *beads* gebunden, aber nur knapp 20% (180–860 ng) wieder eluiert. Erst mit den „überladenen“ *beads* bei hohen Ausgangsmengen werden 24% eluiert.

10 μL *beads*: Die Versuche sind konsistent zu den Versuchen mit 5 μL *bead*-Lösung. Bis gut 10 μg bleibt kaum DNA zurück. Die Bindungskapazität steigt im weiteren Verlauf auch hier von 1,1 auf 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ an (Abb. 4.13b). Von 10 μL *beads* eluieren ebenfalls nur etwas mehr als 2 μg DNA, was 13% der gesamten gebundenen DNA entspricht, d.h. die Effizienz hat sich halbiert. Die Wiederfindungsrate liegt bei 16–31%, die Verluste sind also etwas höher. Ab einem Punkt von etwa 11 μg Ausgangs-DNA kann nicht mehr die gesamte Menge an DNA von den *beads* gebunden werden. Die Rate an gebundener DNA liegt dann nur noch bei knapp 80% statt über 90% (Abb. 4.13e). Von den *beads* können in diesem Fall maximal 14% der gebundenen DNA eluiert werden.

20 μL *beads*: Bei der Verwendung von 20 μL *beads* zeigt sich, dass bis 21 μg vorgelegter DNA die gesamte DNA von den *beads* gebunden werden kann (Abb. 4.13c). Die Bindungskapazität liegt erneut bei 1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Wie zu erwarten war, ist das Elutionsverhalten dem mit 5 bzw. 10 μL *beads* sehr ähnlich (Abb. 4.13f), maximal können etwa 5 μg DNA (23%) eluiert werden. Damit fällt der Anteil an verlorener DNA etwas geringer aus und die Elution entspricht eher dem Verhalten mit 5 μL *beads*.

Bewertung der *bead*-Mengen: Insgesamt führt eine Verdoppelung der *bead*-Menge auch zur erwarteten Verdoppelung an gebundener DNA, woraus sich eine Bindungskapazität von durchschnittlich 1 μg DNA pro 1 μL *beads* (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ergibt. Entgegen den Erwartungen zeigt sich das Elutionsverhalten als im Wesentlichen unabhängig von der Menge an *beads* und damit von der theoretisch eluierbaren DNA-Menge. Offensichtlich liegt ein limitierender Einfluss durch den Elutionspuffer vor. Das bedeutet im Umkehrschluss, mit zunehmender *bead*-Menge steigt der Anteil an nicht eluierter DNA. Für den verwendeten Maßstab scheinen daher 5 μL der *bead*-Lösung ausreichend zu sein. Neben der Bindungskapazität ist die wichtigste Erkenntnis dieser Versuchsreihe, die nur eingeschränkte Elutionsleistung. Auf Basis dieser Erkenntnis wurden in der Folge verschiedene Ansätze unternommen, durch Variation der Pufferzusammensetzung das Elutionsvermögen erheblich zu steigern.

4.1.4.2 Einfluss von Salzgehalt und pH-Wert auf die Elution

Bei der Ionenaustauschchromatographie spielen mit den Amino-*beads* vergleichbare Wechselwirkungen eine Rolle. Zur Ablösung der gebundenen Analytionen wird dort die Ionenstärke (Salzkonzentration) oder der pH-Wert des Elutionsmittels kontinuierlich oder stufenweise variiert. Die Verdrängung gebundener Analyten vom Ionenaustauschmaterial beruht dabei auf einer allgemeinen Vergrößerung der Ionenkonzentration und der damit steigenden Wahrscheinlichkeit, dass Ionen des Elutionsmittels anstatt des Analyten an das Austauschmaterial adsorbiert sind [350–352]. Dieses Prinzip sollte auch für das Bindungs- und Elutionsverhalten mit Amino-*beads* seine Gültigkeit haben, diese Überlegung wurde experimentell umgesetzt.

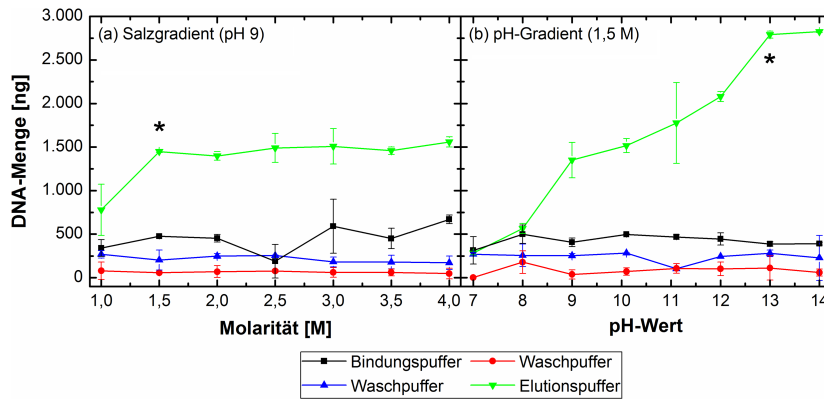


Abb. 4.14: Variation der für die Elution entscheidenden Pufferbestandteile. Der Einfluss der Molarität von NaCl (a) wurde im Bereich von 1 bis 4 M untersucht ($n = 3$). In gleicher Weise wurde mit verschiedenen pH-Werten (b) verfahren.

Um eine vollständige Bindung der DNA zu erhalten, wurden in Anbetracht der Bindungskapazität 5 µg Thymus-DNA zusammen mit 5 µL Amino-beads im Bindungspuffer vorgelegt. Erwartungsgemäß verblieben, damit dann auch nur weniger als 0,5 µg DNA im Bindungspuffer. Der Elutionspuffer besteht laut Originalprotokoll im Wesentlichen aus TE-Puffer mit 1,5 M NaCl (pH 9). Zuerst erfolgte die Elution mit sieben Elutionspuffervarianten, welche sich in ihrem Gehalt an NaCl zwischen 1 und 4 mol/L unterschieden, danach wurde sequenziell der pH-Wert verändert.

Ionenstärke: Abb. 4.14a verdeutlicht, dass im Fall von genomischer DNA und Amino-beads zwischen Molarität (NaCl) und Elutionsvermögen nur ein begrenzter Zusammenhang besteht. Eine Erhöhung der Salzkonzentration von 1 auf 1,5 M (Originalprotokoll) führt zwar zu einer beachtlichen 85%igen Steigerung der DNA-Ausbeute von 0,8 auf 1,5 µg DNA ($q = 4,4$, $p < 0,05$). Weitere Molaritätsänderungen haben aber keinen signifikanten Einfluss ($q < 0,1$, $p > 0,05$). Die Wiederfindungsrate der DNA liegt zwischen 29% (1 M) und 44%, davon 8% im Bindungspuffer und 16–29% eluierte DNA. Von den beads wurden durchschnittlich 86% der vorgelegten DNA gebunden, die Verluste liegen bei 56–71% (Daten nicht gezeigt). Da sich ein hoher Salzgehalt negativ auf DNA-basierte Analysemethoden wie PCR auswirkt [353], sind 1,5 M NaCl ideal für den Elutionspuffer.

pH-Wert: Bei einer Molarität von 1,5 M NaCl konnte eine deutlicher Abhängigkeit von pH-Wert und Elution nachgewiesen werden. Dazu wurden acht Puffer mit pH-Werten zwischen 7 und 14 getestet. Abb. 4.14b zeigt sehr eingängig den großen Einfluss des pH-Werts. Zwischen pH 7 und dem pH-Wert des Originalprotokolls von 9 lassen sich 0,3–1,4 µg DNA eluieren. Durch weitere Erhöhungen des pH-Werts steigt die DNA-Ausbeute bis pH 13 linear auf 2,8 µg DNA an. Es konnte also eine 100%ige Verbesserung erreicht werden. Die Unterschiede sind in jedem Schritt signifikant ($q > 3,9$, $p < 0,05$), mit pH 14 lässt sich keine weitere Steigerung mehr erzielen ($q = 0,2$, $p > 0,05$). Wieder werden etwa 88% der vorgelegten DNA an die beads gebunden, wovon im besten Fall nur noch 29% verloren gehen. Dementsprechend steigt auch die Wiederfindungsrate auf bis zu 71% an.

4.1.4.3 Zwischenfazit: Methodenentwicklung

Die Amino-*beads* haben eine DNA-Bindungskapazität von ca. 1 µg/µL. Im Originalpuffer nach Zhang *et al.* (2009) [279] können aber maximal nur etwa 25% der gebundenen DNA wieder eluiert werden. Bindungs- und Waschpuffer sind für ihren jeweiligen Zweck gut geeignet. Die Ausbeute an aufgereinigter DNA ist stark von der Zusammensetzung des Elutionspuffers abhängig. Damit bestätigte sich die Annahme, dass der zugrundeliegende Elutionsmechanismus dem einer Ionenaustauschchromatographie entspricht. Der Salzgehalt spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle. Die Verdrängung der DNA durch H⁺-Ionen (pH-Wert) dagegen hat großen Einfluss. Folglich liefern pH 13–14 hier die besten Ergebnisse. Daraus resultiert die optimale Zusammensetzung des Elutionspuffers mit 1,5 M NaCl und pH 13.

Unter diesen optimierten Bedingungen ist es jetzt möglich, 56% der an die *beads* gebundenen DNA wieder abzulösen. Durch weitere Verbesserungen der Elutionsstrategie ist es denkbar, die Ausbeute noch weiter erhöhen zu können. Zusätzliche Elutionsschritte wären sinnvoll. Eine Erhöhung der Temperatur könnte ein weiterer Ansatz sein. Schließlich sollte auch das Elutionsverhalten anderer Puffer untersucht werden. Gerade für das Eluieren der DNA von Anionentauschermembranen sind in der Literatur viele unterschiedliche Puffersysteme beschrieben.

Auf der anderen Seite ist eine faire Bewertung der entwickelten Methode kaum möglich, da die Effizienz der zuvor getesteten Silica-basierten Methoden nicht bekannt ist. Diese wurden anhand von *Lefteria*-DNA untersucht, die maximal aufreinigbare DNA-Menge im Pulver ist aber nicht zu bestimmen. Um einen richtigen Methodenvergleich realisieren zu können, wurde im Folgenden die Amino-basierte Methode für *Lefteria*-Pulver angepasst.

4.1.5 Extraktion pflanzlicher DNA mittels Amino-beschichteter *beads*

Das Programm für den KingFisher wurde von den Versuchen mit Thymus-DNA übernommen. Spektroskopische Messungen in Vorarbeiten, die in etwa 4.1.4.1 und 4.1.4.2 entsprachen⁴, hatten ergeben, dass *Lefteria*-DNA aufgereinigt mit Amino-*beads* sehr rein ist (Abb. 4.15A). Gerade die bei Silica-*beads* aufgetretenen problematischen Verunreinigungen durch Phenole und Salze bei 230 nm fallen geringer aus. Wieder sorgt das Pflanzenmaterial für eine starke Trübung von Bindungs- und Waschpuffern, was dort DNA-Quantifizierung unmöglich macht. Der Verbleib der eingesetzten DNA kann daher nicht bilanziert werden. Bei einer erneut durchgeführten Optimierung des pH-Werts des Elutionspuffers stellte sich heraus (Abb. 4.15B), dass bei pH 13 mit 7,6 µg DNA signifikant mehr DNA eluiert wird als bei der Verwendung von Thymus-DNA ($t > 29,4$, $p < 0,0001$). Diese Steigerung um das 2,7-fache lässt den Schluss zu, dass die Amino-*beads* für die Elution pflanzlicher DNA besonders geeignet sind. Dieses unerwartete Ergebnis

⁴Masterarbeit von Claudia Räke, *Real-time* PCR-basierte Genomgrößen- und Polyploidie-Bestimmung von Heilpflanzen (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 35–51

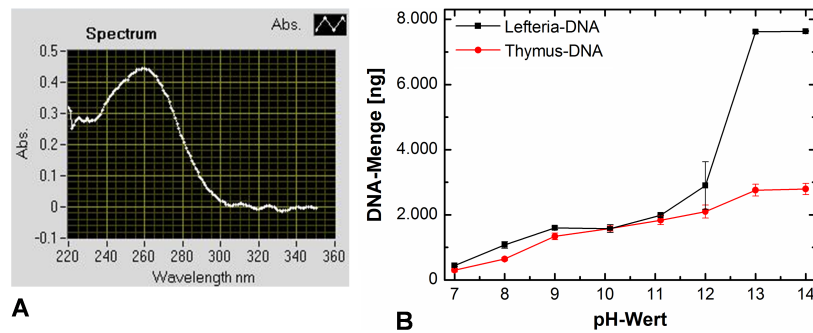


Abb. 4.15: Aufreinigung von Lefteria-DNA mittels der entwickelten Methodik mit Amino-*beads*. (A) Spektroskopische Untersuchung der DNA-Qualität. (B) Vergleich der eluierten Menge von Lefteria- bzw. Standard-DNA in Abhängigkeit vom pH-Wert.

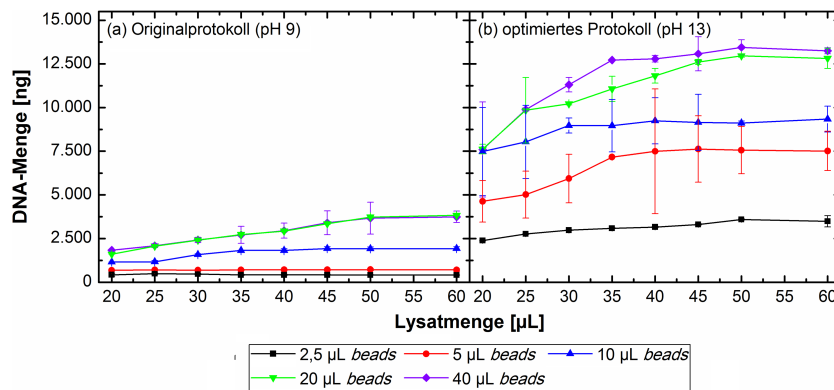


Abb. 4.16: Erhaltene DNA-Mengen bei der Verwendung verschiedener Mengen an Lefteria-Lysat und *beads* ($n = 3$). Die Experimente wurden zum Vergleich bei pH 9 (a) und mit optimierten Bedingungen bei pH 13 (b) durchgeführt.

warf die Frage auf, ob mit einer Erhöhung der Pflanzenzellysat- oder *bead*-Menge noch bessere Ausbeuten erzielt werden können. Als Konsequenz der Vorergebnisse wurde in einen Vergleich zwischen dem Originalprotokoll von Zhang *et al.* (2009) [279] und dem optimierten Elutionspuffer (pH 13) die optimale Kombination aus Zellysat- und *bead*-Menge gesucht.

Zwischen 2,5 und 20 μL Lysat nimmt mit jeder Verdoppelung der *beads* auch die Ausbeute signifikant zu ($t > 4,2$, $p < 0,05$) (Abb. 4.16). Erneut wird ersichtlich, dass durch das optimierte Protokoll die Ausbeute deutlich gesteigert werden kann, hier um das 3,5-fache. Die maximale Menge an extrahierter DNA wird ab 50 μL Lysat erreicht. Ob mit dieser Lysatmenge die *beads* gesättigt sind oder Limitierung durch Sättigung des Elutionspuffer besteht, kann nicht genau festgestellt werden. Dass bei pH 13 mit 40 μL *beads* das Maximum schon ab 35 μL Lysat erreicht wird, spricht eher für eine Sättigung.

Zur Bewertung der optimalen Kombination von Lysat- und *bead*-Menge wurde eine Kosten-/Nutzenabwägung vorgenommen. Dabei wurden für jede mögliche Kombination die DNA-Ausbeute und der Variationskoeffizient betrachtet. Darüber hinaus wurde der Wirkungsgrad η als Verhältnis von eluierter DNA zu maximal gebundener DNA unter Berücksichtigung der Bindungskapazität der *beads* berechnet:

$$\eta [\%] = \frac{\text{eluierte DNA [ng]}}{\text{Bindungskapazität [ng/\mu L]} \cdot \text{bead-Menge [\mu L]}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Abb. 4.17 zeigt eine vorsortierte Auswahl der zielführendsten Kombinationen von Lysat- und *bead*-Menge. Beim Originalprotokoll ist vor allem die sehr gute Wiederholpräzision hervorzuheben. Ausbeute und Wirkungsgrad sind dagegen nicht gut. Mit 10 μL *beads* ist die Ausbeute signifikant schlechter als mit 20 μL ($t = 7,1$, $p < 0,001$). Eine steigende Lysatmenge wirkt sich positiv auf den Wirkungsgrad aus, da die Gesamtmenge an gebundener bzw. eluierter DNA zunimmt. Wegen der besten Wiederholpräzision ist die Kombination 20 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ (Lysatmenge/*beads*) der optimale Kompromiss. Trotzdem kommt ein Wirkungsgrad von etwa 4,5% einer Verschwendung von *beads* gleich.

Bei optimierter Elution ergeben sich ähnliche Verhältnisse, allerdings mit bis zu fünffach verbesserter Ausbeute und Wirkungsgrad. Bis auf 20 $\mu\text{L}/10 \mu\text{L}$ liegt mit 20 μL *beads* die Ausbeute signifikant über der mit 10 μL *beads* ($t = 4,6$, $p < 0,001$), zudem ist die Varianz deutlich geringer, d.h. hohe Wiederholpräzision. Mit einem Wirkungsgrad von 33% und einer DNA-Ausbeute von 295,51 ng pro 1 mg *Lefteria*-Pulver ($\sigma = 10,58 \text{ ng/mg}$) stellt die Kombination 40 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ das optimale Protokoll zur DNA-Extraktion mittels Amino-*beads* dar.

4.1.5.1 Zwischenfazit: Amino-*beads*

Mit Amino-*beads* lässt sich aus einer pflanzlichen Matrix mehr als doppelt so viel DNA gewinnen als die Evaluation mit Thymus-DNA vermuten ließ. Maximal können im 96-Lochplattenmaßstab knapp 8 μg DNA eluiert werden, was einer Ausbeute von etwa 400 ng/mg entspricht. Dies konnte durch Erhöhung des pH-Werts des Elutionspuffers auf pH 13 erreicht werden. Mit dem Einsatz von mehr Zellysat und steigender *bead*-Menge lässt sich ebenfalls die DNA-Ausbeute erhöhen. Da aber eine Verdopplung an *beads* nicht zu einer Verdoppelung an extrahierter DNA führt, wirkt sich dies negativ auf den Wirkungsgrad aus. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren und der Wiederholpräzision ergeben sich mit 20 $\mu\text{L}/20 \mu\text{L}$ (Lysatmenge/*beads*) (Originalprotokoll) bzw. 20 $\mu\text{L}/40 \mu\text{L}$ (optimiertes Protokoll) die ideale Kombinationen für das getestete Puffersystem. Wobei das optimierte Protokoll eine 3,8-fach höhere Ausbeute und einen 7,3-fach besseren Wirkungsgrad bietet.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Amino-modifizierte *magnetic beads* zur Extraktion von *Lefteria*-DNA sehr gut geeignet sind. Zellaufschluss und Aufreinigung sind nur mit geringem Arbeitsaufwand verbunden und weitgehend automatisiert. Dadurch ist die parallele Bearbeitung vieler Proben möglich. Eine Adaption an andere Pflanzen ist ebenfalls leicht möglich, da im Programm des KingFisher weitreichende Variationsmöglichkeiten bestehen. Der Vergleich mit anderen Methoden im kommenden Abschnitt wird verdeutlichen, dass Amino-*beads* auch bei der Extraktion aus Bärlauch, Mistel und Weißdorn konkurrenzfähig sind.

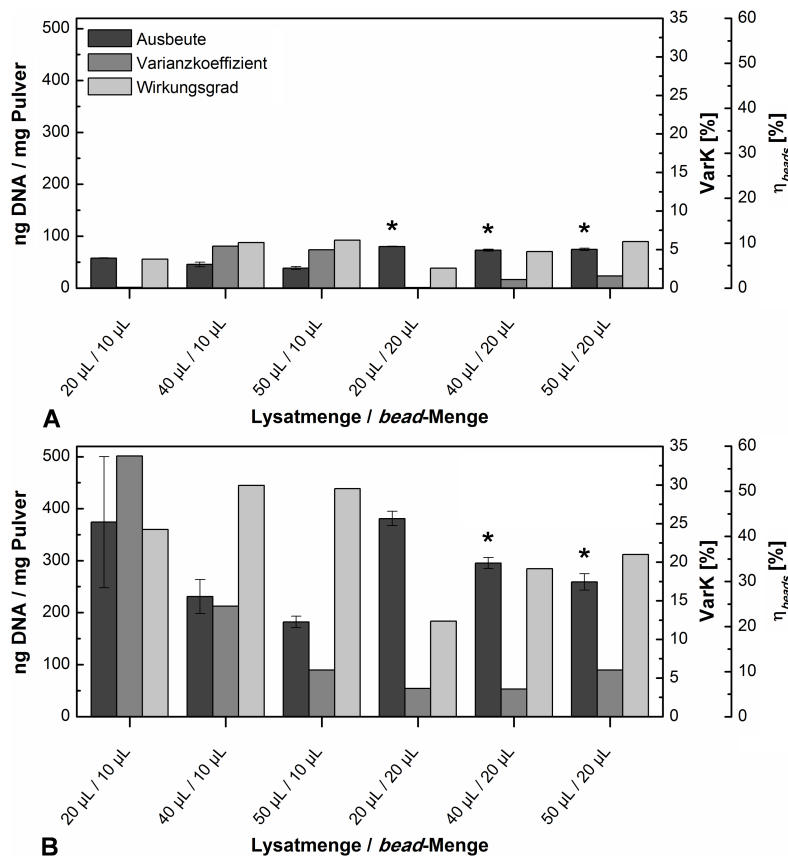


Abb. 4.17: Kosten-/Nutzenabwägung verschiedener Lysat- und *bead*-Mengen. (A) Dargestellt ist dies sowohl für das Originalprotokoll (pH 9) als auch (B) für die erfolgreiche Optimierung (pH 13). Die Verbesserung ist offensichtlich.

4.1.6 Vergleich der *bead*-basierten Extraktionsmethoden

In Anlehnung an 4.1.1 wurden die optimierten *bead*-Protokolle mit *Lefteria*-, Bärlauch-, Mistel- und Weißdornpulver durchgeführt und analog zu den konventionellen Methoden die Ausbeuten bestimmt. Die Qualitätskontrolle der DNA erfolgte wieder mittels qPCR. Für den Vergleich wurden die Amino-*beads* (BioMag), die drei Silica-*beads* mit selbst hergestellten Puffern und, stellvertretend für die konventionellen Methoden, das DNeasy Kit verwendet. Da sowohl von Amino-*beads* als auch von den Silica-*beads* 20 μ L je Ansatz verwendet wurden, besteht Vergleichbarkeit.

Erneut konnte aus Weißdornfrüchtepulver keine DNA isoliert werden (Abb. 4.18). Mit den BioMag (pH 13) wird signifikant mehr DNA aus *Lefteria* erhalten als mit den anderen Methoden ($t > 21,5$, $p < 0,0001$), ausgenommen dem DNeasy Kit zu welchem der Unterschied weitaus geringer ist ($t = 4,3$, $p < 0,01$). In Zahlen ausgedrückt sind das folgende Unterschiede: 13-fach im Bezug auf NucleoMag (Macherey-Nagel), 2,5-fach im Vergleich zu MagneSil (Promega) bzw. MagAttract (Qiagen) sowie 3,5-fach zu BioMag (pH 9). Auch für Bärlauch und Mistel erzielten die BioMag (pH 13) signifikant höhere Ausbeuten gegenüber jeder der anderen Methoden ($t > 5,9$, $p < 0,0001$). Besonders auffällig gegenüber DNeasy und damit generell gegenüber konventionellen Methoden, ist die stark erhöhte Aufreinigungsleistung von BioMag (pH 13) für Weißdorn-DNA.

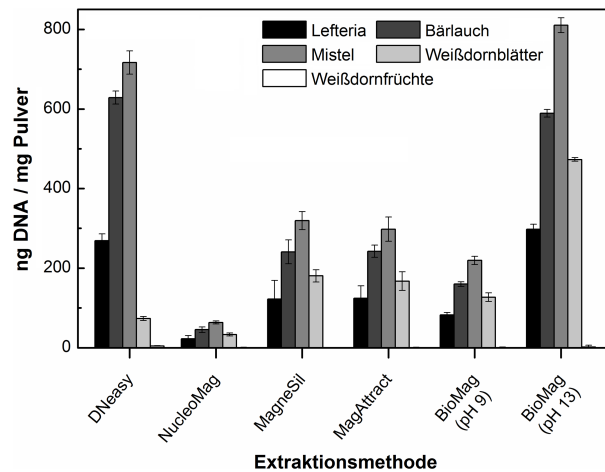


Abb. 4.18: Menge an gewonnener DNA aus Pflanzen- bzw. Lefteria-Pulver aufgereinigt mit verschiedenen *bead*-basierten Methoden ($n = 3$).

Tab. 4.6: DNA-Bindungskapazitäten der verwendeten *magnetic beads*

<i>beads</i>	Material	Beschichtung	Bindungskapazität	Referenz
NucleoMag C	superparamagnetisch	SiO ₂	0,4 µg/µL	Hersteller
MagneSil PMP	paramagnetisch	Silikagel	< 0,5 µg/µL	Hersteller
MagAttract	Eisenoxid	Silikagel	max. 0,15 µg/µL	Hersteller
BioMag Maxi Amine	Eisenoxid	R-NH ₂	1 µg/µL	selbstbestimmt

Selbst mit MagneSil, MagAttract oder BioMag (pH 9) wird für Weißdorn eine signifikant erhöhte Ausbeute gegenüber DNeasy erreicht ($t > 7,9$, $p < 0,0001$). Die *bead*-basierten Methoden zeigen alle sehr ähnliche Ausbeuteverhältnisse der verschiedenen Matrizen zueinander (1 : 2 : 2,6 : 1,5). Diese weichen aber auffällig von dem des DNeasy Kits (1 : 2,3 : 2,7 : 0,3) ab.

Da Adsorption von DNA an Silica-modifizierten Oberflächen eine etablierte Methode ist, ist davon auszugehen, dass bei entsprechenden Kits die Elution herstellerseits optimiert worden ist. Die im Vergleich zu den Amino-*beads* geringere Ausbeute durch die Silica-*beads* lässt sich mit zwei Ursachen erklären. Zum einen zeigt Tab. 4.6, dass die Silica-*beads* eine deutlich geringere Bindungskapazität aufweisen, zum anderen sind hydrophobe Wechselwirkungen gegenüber ionischen viel schwächer [353, 354]. D.h., dass sowohl im Bindungspuffer, als auch in den Waschfraktionen ein größerer Anteil der ungebundenen DNA zurückbleibt. Unter Berücksichtigung von Bindungskapazität und Ausbeute liegt der Wirkungsgrad von MagneSil und MagAttract mit 30–40% etwas über dem Niveau der Amino-*beads* (pH 13).

Mit allen Methoden wird amplifizierbare DNA aus Lefteria, Bärlauch, Mistel und Weißdornblättern erhalten, wenn auch die NucleoMag nur Spuren liefern. Die DNA-Qualität (Menge an Kopien) ist bei allen anderen *bead*-Sorten auf dem gleichen hohen Niveau wie bei DNeasy (Daten nicht gezeigt, vgl. mit DNeasy in Abb. 4.5). Signifikante Unterschiede bestehen nicht ($t < 0,4$, $p > 0,05$). Wieder sind die Level an Amplifikat mit reiner Pflanzen-DNA als Template signifikant höher als bei Lefteria ($t > 3,3$, $p < 0,05$). Es ergeben nahezu die gleichen Verhältnisse von

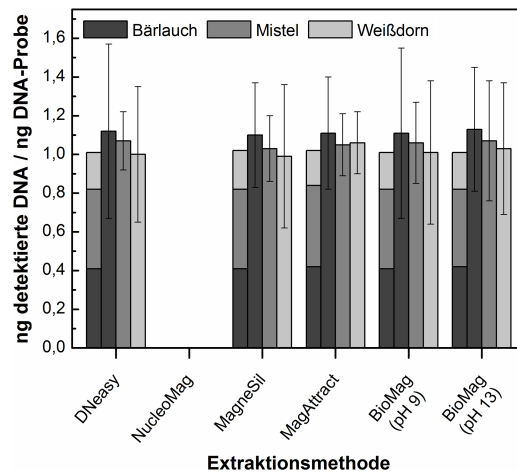


Abb. 4.19: Detektierbare DNA pro Nanogramm isolierter DNA. Die Qualitätskontrolle erfolgte mit 50 ng Template und jeweils mit beiden spezifischen Markern für Bärlauch, Mistel und Weißdorn. Im Vergleich mit 4.1.1.3 und 4.1.1.4 und Abb. 4.5 wurden die Kopienzahlen extra nicht graphisch dargestellt, da sie für alle *bead*-Sorten außer den NucleoMag C Beads quasi identisch mit DNeasy sind, was sich auch in dieser Abbildung widerspiegelt. Die DNA-Qualität ist dargestellt als die Menge an intakter DNA in 1 ng DNA-Probe ($n = 6$).

Lefteria zu Bärlauch von 1 : 2,6, zu Mistel von 1 : 2,6 und zu Weißdorn von 1 : 5,2 wie bei den konventionellen Methoden. Die Menge an amplifizierbarer DNA die mit NucleoMag gewonnen werden konnte, ist dagegen sehr gering und kann in Lefteria-Proben gar nicht detektiert werden (vgl. mit PowerPlant in Abb. 4.5).

Wird aus den Kopienzahlen die absolute Menge DNA in den Proben berechnet, zeigt sich, dass alle mit *beads* isolierten Lefteria-Proben die gleiche DNA-Zusammensetzung aufweisen wie nach Extraktion mit dem DNeasy Kit (Abb. 4.19). Signifikante Unterschiede bestehen weder bei der Lefteria-Zusammensetzung noch bei den einzelnen Pflanzen ($t < 0,2$, $p > 0,05$). In 1 ng Lefteria-DNA sind laut qPCR-Analyse 1,01–1,03 ng DNA enthalten. Bei den reinen Pflanzenproben überschätzt die Methode mit 0,99–1,13 ng ganz leicht die vorgelegte Konzentration. Ob diese Abweichungen durch den PicoGreen-Assay oder die PCR hervorgerufen werden, ist nicht festzustellen. Die Analyse von Lefteria wird davon aber nicht beeinflusst. Bis auf NucleoMag liefern alle *beads* DNA mit maximaler Qualität ohne detektierbare Degradation. Die zuvor festgestellte viel höhere Aufreinigungseffizienz der *bead*-basierten Methoden für Weißdorn-DNA hat keinen Einfluss auf die ermittelte DNA-Zusammensetzung einer Lefteria-Probe. Dies deckt sich mit den Ergebnissen bei den konventionellen Methoden. Als eminent wichtig für die qPCR, wurde hier bestätigt, dass die gemessene Zusammensetzung von Lefteria-DNA nicht von der Extraktionsmethode abhängt.

4.1.6.1 Zwischenfazit: DNA-Ausbeute und -Qualität der *bead*-basierten Methoden

Bei stets verwendeten 20 μ L *bead*-Lösung kann mit den Amino-*beads* (BioMag, pH 13) die höchste Ausbeute an DNA erzielt werden. Sie liegt in etwa auf dem Level des DNeasy Kits. Mit den Silica-*beads* MagneSil und MagAttract wird etwa halb so viel DNA erhalten, bei NucleoMag ist

es nur rund ein Zehntel. Die *Amino-beads* weisen damit zwar eine schwächere Elutionsrate auf, überkompensieren diesen Nachteil gegenüber den *Silica-beads* aber mit einer höheren Bindungskapazität. Die mit NucleoMag extrahierte DNA enthält nur sehr wenig amplifizierbares Template und hat somit eine schlechte Qualität. Die totale Menge und die Qualität an DNA, die von den anderen *bead*-Sorten eluiert wurde, ist auf demselben hohen Level wie bei den als am besten bewerteten konventionellen Methoden. Die Zusammensetzung von 1 ng *Lefteria*-DNA ist mit rund 0,4 / 0,4 / 0,2 ng (Bärlauch / Mistel / Weißdorn) für konventionelle wie für *bead*-basierte Methoden nahezu identisch.

Generell sind KingFisher-Methoden gut geeignet für die Extraktion von pflanzlicher DNA, um DNA mit hoher Qualität mittels einer semiautomatischen Prozedur zu erhalten. Hinsichtlich der Aufgabenstellung der Dissertation sind für automatisierte DNA-Extraktionen *Amino-beads* zu präferieren. Sie bieten eine ökonomische Methode für jede der vier verschiedenen DNA-Matrizen. Die Menge an amplifizierbarer DNA liegt um 100%.

4.1.7 Abschließende Bewertung sämtlicher Extraktionsmethoden

Aufgrund der besonderen Anforderungen an die DNA-Extraktion möglichst reproduzierbar zu arbeiten, um von qPCR-Daten auf die Pulvermenge schließen zu können (4.3.7), kommt der Beurteilung der Wiederholpräzision die Rolle als entscheidendes Auswahlkriterium einer Extraktionsmethode für den Gesamtassay zu. Dies findet anhand von *Lefteria*-Proben, also dem anvisierten Untersuchungsobjekt, mit den jeweils optimierten Protokollen statt. Abb. 4.20 stellt Ausbeuten und Varianzen sämtlicher Methoden gegenüber. Bei DNA-Präzipitationen sind die Variationskoeffizienten mit durchschnittlich 23% ($\sigma = 8,54$) zwischen einzelnen Aufreinigungen generell sehr hoch. Unter den *column*-basierten Methoden zeigen NucleoSpin Plant, NucleoSpin Soil, DNeasy und QIAamp die höchste Wiederholpräzision. Die Varianzen liegen zwischen 5–11%. Eben diese vier Methoden zeichnen sich auch durch die höchste ermittelte DNA-Qualität unter allen konventionellen Methoden aus. Neben schlechter Qualität oder hohem Anteil an PCR-Inhibitoren sind PowerPlant und Wizard SV auch wegen ihrer schwachen Wiederholpräzision ungeeignet. Die DNA-Qualität *bead*-basierter Methoden ist allgemein sehr gut. Mit Ausnahme der *Amino-beads* sind die Varianzen bei den automatisierten Methoden aber ausgesprochen hoch (25–39%) und einzig die *Amino-beads* (pH 13) zeichnen sich durch eine akzeptable DNA-Ausbeute aus.

Unter den konventionellen Methoden erfüllt das DNeasy Kit von Qiagen die Kriterien gute DNA-Qualität und hohe Wiederholpräzision mit am besten und zeichnet sich gegenüber den vergleichbar guten Methoden durch ein einfaches, schnell durchführbares Protokoll aus. Neben DNeasy sind die *Amino-beads* (pH 13) die zweite zu favorisierende Methode. Sie wird interessant, wenn ein routinemäßiger Einsatz eine Automatisierung und Parallelisierung nötig macht. Mit den zwei Methoden stehen Möglichkeiten zur DNA-Extraktion zur Verfügung, welche in Bezug auf Qualität und Reproduzierbarkeit bessere Werte aufweisen, als in vielen ähnlichen Vergleichsstudien erreicht

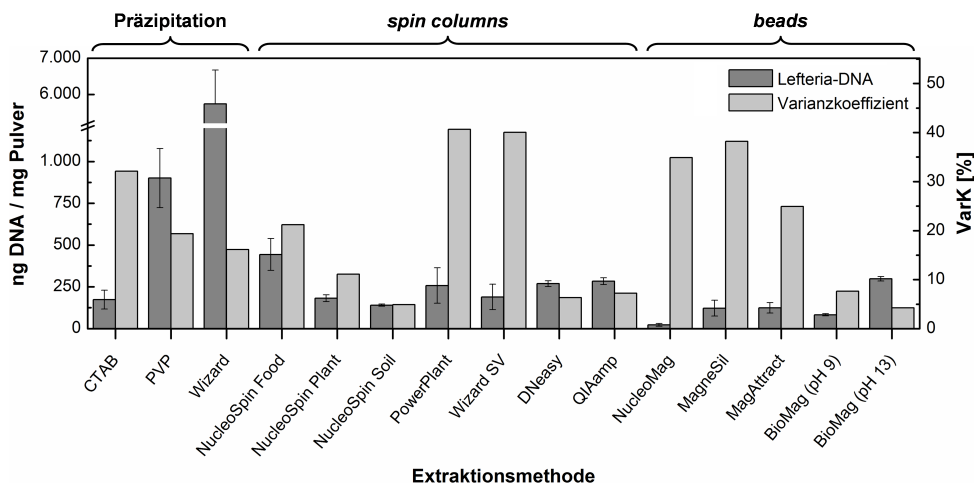


Abb. 4.20: Ausbeute und Wiederholpräzision aller untersuchten Methoden.

werden konnte [123, 280–287]. Weitere Vergleiche, der Test anderer Methoden sowie umfangreiche Optimierungen, sind nach diesen Ergebnissen nicht notwendig. Die DNA-Extraktion kann für die an sie gestellten Anforderungen als optimal angesehen werden. Da für die Entwicklung der PCR-Analysen (4.2 und 4.3) insgesamt nur wenig DNA-Material benötigt wird, wurde für weitere Arbeiten das manuelle DNeasy Kit verwendet. Zunächst wurde aber noch untersucht, ob die DNA der Pflanzen einzeln und voneinander getrennt extrahiert werden kann.

4.1.8 Speziesspezifische DNA-Extraktion

Die Möglichkeit zur Hybridisierung von Nukleinsäuren bildet die Grundlage verschiedenster DNA-basierter Analyseverfahren, wie z.B. Primerbindung für eine PCR oder die spezifische Markierung von DNA mit Nukleinsäuresonden beim Southern Blotting. Die Hybridisierung kann auch zwischen einem auf einer Oberfläche immobilisierten Fängermoleküle und einem sich in Lösung befindlichen Zielmoleküls erfolgen. Dies macht sich vor allem die DNA-Microarray-Technologie zur Untersuchung der Genexpression zu Nutze, kann aber auch zur Aufreinigung von Nukleinsäuren verwendet werden. Oster *et al.* (2001) [317] übertrugen das Prinzip auf *magnetic beads* und realisierten eine sequenzspezifische Separation von bakterieller DNA. Archer *et al.* (2006) [355] konnten grundsätzlich zeigen, dass mit Oligonukleotidsonden, gebunden an Silica-*beads*, humane genomische DNA spezifisch extrahiert werden kann. Parham *et al.* (2007) [316] haben das Prinzip abgewandelt und nutzten Carboxy-modifizierte *beads* als Träger für Oligonukleotide. Sie konnten mit einer 80-mer Fängersonde spezifisch genomische DNA von *Streptococcus agalactiae* extrahieren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde versucht, pflanzenspezifische DNA-Sonden an *magnetic beads* zu koppeln, um damit separat Bärlauch-, Mistel- bzw. Weißdorn-DNA aus *Lecteria* zu extrahieren. Solange die Kapazität der Oligo-modifizierten *beads* nicht erschöpft ist, sollte dies bei vollständiger Spezifität die anschließende amplifikationsbasierte Analyse überflüssig machen. Die reine Menge an aufgereinigter DNA würde genügen, um Aussagen über die Zusammen-

setzung einer Mischprobe zu machen. Jeweils komplementär für die *its1*-Sequenzen der drei Arzneipflanzen wurden 80-mer Oligonukleotide entworfen, welche an ihren 5'-Enden mit einem NH₂-C₆-Aminolinker modifiziert worden sind. Die Pflanzenspezifität dieser *its*-Sequenzen konnte im Rahmen von Primertests für die PCR-Analysen eindeutig gezeigt werden (vgl. **4.3.1** und **4.3.10**). Eine ausreichende Spezifität von 80-meren ist für verschiedene Anwendungen in der Literatur beschrieben [356, 357]. Die drei verwendeten Fängermoleküle weisen die folgenden Sequenzen auf, in Klammern ist jeweils der Bereich angegeben, an dem das Fängermolekül an die *its1*-Sequenz bindet:

Bärlauch <i>its1</i> :	NH ₂ -C ₆ H ₁₂ -TGA CAC GTG GCA TTA ACC ATC GAG AAC AAA CCA GTT TTG CAT GTG CAA TTT AGC TTT CTA GAT GGA AGT CCT TTT GCC GC-3' (24-103)
Mistel <i>its1</i> :	NH ₂ -C ₆ H ₁₂ -TCG GAT GCT AGT AGA ATG CCG ATG GAC ATG TGG ATT GGT TGG ATC ATA CGC AGC GGG GTG CAC GGG GAT CGA CCC CCC CG-3' (1-80)
Weißdorn <i>its1</i> :	NH ₂ -C ₆ H ₁₂ -GGA AGG ATC ATT GTC GAA CCT GCG CAG CAG AAC GAC CCG AGA ACC AGT TTC AAC GCC GGG GCC CCG GCG GGC CTT CGG GC-3' (4-83)

Carboxylgruppen auf *beads* können über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) erfolgreich aktiviert werden. Die Carboxylgruppen reagieren dabei mit EDAC zu hochreaktiven Esterintermediaten, die mit primären Aminen eine Amidbindung eingehen (Abb. 4.21). Die Zugabe von NHS zur Reaktion erhöht die Effizienz der Bindung indem zunächst aktive NHS-Ester gebildet werden, die weniger anfällig gegenüber einer Hydrolyse sind und anschließend mit den Amino-modifizierten Oligonukleotiden reagieren [358]. Im Rahmen ihrer Dissertation konnte Dr. Öznur Kökpınar die beschriebene Immobilisierungsmethode erfolgreich für die Bindung von DNA an Magnetpartikel adaptieren [359]. Auf eine Bildung von NHS-Intermediaten wurde dabei verzichtet und die Immobilisierung als Einschrittreaktion durchgeführt. Das für die Bindung der drei Oligonukleotide an BioMag Maxi Carboxyl Beads (Polysciences) angepasste Protokoll ist in **A.5.1** nachzulesen. Nach der Immobilisierung folgte ein Waschprotokoll (**A.5.1**), um nicht gebundene Fängermoleküle zu entfernen. Die DNA-Extraktionen mit den spezifischen Magnetpartikeln wurden mittels KingFisher automatisiert durchgeführt. Hierzu wurde ein spezielles Programm entwickelt, welches zwei 95 °C-Schritte aufweist, einmal um die Doppelstränge der genomischen DNA aufzulösen und um letztendlich die isolierte DNA wieder von den *beads* zu eluieren. Aufgrund ähnlicher Bindungschemie, wurden Bindungs- und Waschbedingungen einem etablierten Protokoll für das Micromax TSA Labeling Kit (PerkinElmer, Waltham, USA) zur indirekten Markierung von cDNA für DNA-Microarrays entnommen [235] und an den KingFisher angepasst (**A.5.1**).

Zum Test dieser speziellen Aufreinigungsmethode wurden die jeweiligen pflanzenspezifischen Oligonukleotid-Lösungen (1,3 µg/µL) an die Carboxy-*beads* immobilisiert. Der Erfolg der Immobilisierung konnte durch spektrometrische Konzentrationsmessung und Bilanzierung ermittelt

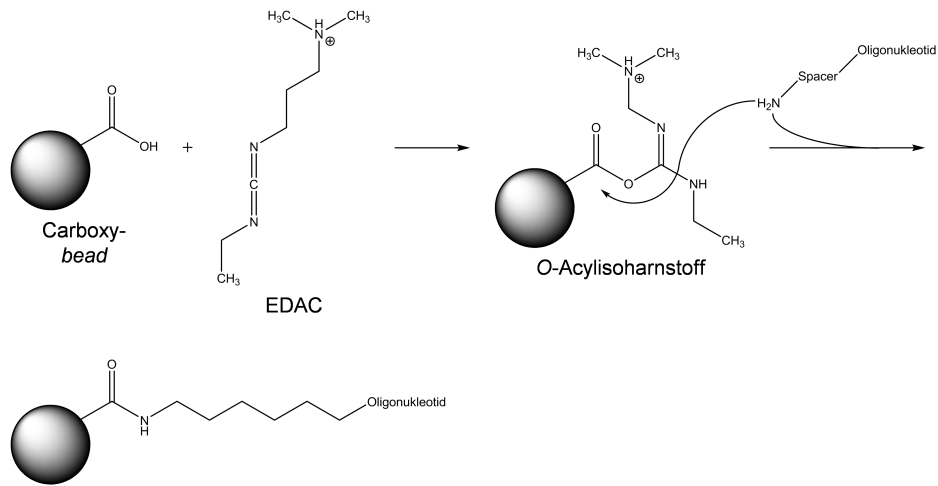


Abb. 4.21: Aktivierung der Carboxygruppe und Bindung des spezifischen Oligonucleotids.

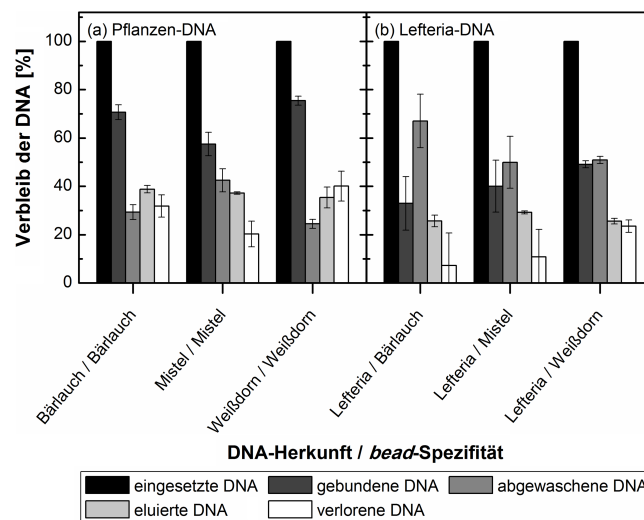


Abb. 4.22: Prozentuale Verteilung der DNA nach Durchlauf des Aufreinigungsprotokolls. Als verlorene DNA wird der Anteil der DNA bezeichnet, welcher nicht mehr von den *beads* abgelöst werden kann. Unter der Abbildung ist jeweils die DNA-Spezies sowie die Pflanze, für welche die *beads* spezifisch sind, angegeben.

werden. Durch Subtraktion der Waschfraktionen von der eingesetzten DNA-Lösung wurde die immobilisierte DNA-Menge berechnet. Die Modifizierung der Oberfläche zeigt sich dabei als eine hoch reproduzierbare Reaktion. Nach Abwaschen nicht gebundener Oligonucleotide sind die *beads* jeweils mit rund 1,2–1,3 nmol/mg belegt (Daten nicht gezeigt).

Die pflanzenspezifisch funktionalisierten Oberflächen der *beads* wurden anschließend mit Proben von jeweils 10 µg zuvor aufgereinigter genomischer Bärlauch-, Mistel-, Weißdorn- und Listeria-DNA versetzt. Die Extraktion erfolgte mit jeweils 20 µL *beads*-Lösung. Zur Auswertung wurden die Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen spektroskopisch analysiert und bilanziert. Die Extraktion aus vorgelegter Pflanzen- bzw. Listeria-DNA deutet auf eine Spezifität der *beads* hin. Es lassen sich zwischen 60–70% der vorgelegten Pflanzen-DNA an die entsprechenden *beads* binden (Abb. 4.22a). Aus den reinen Listeria-Mischproben wird dagegen mit 30–50% der DNA

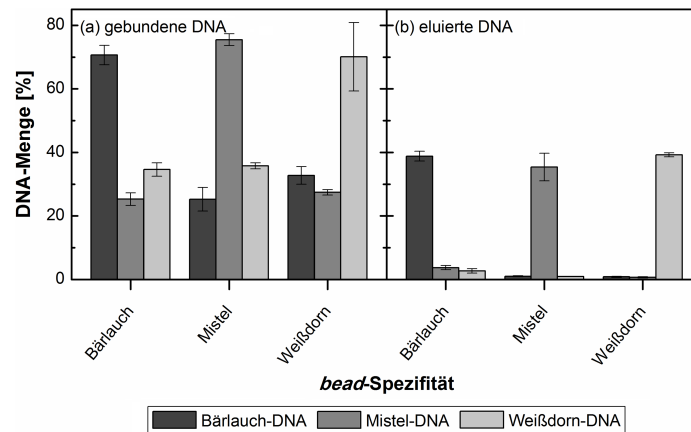


Abb. 4.23: Spezifität der pflanzenspezifischen *beads*.

Tab. 4.7: Charakterisierung der modifizierten Magnetpartikel.

Modifizierung	d_{Oligo}^a [nmol/mg <i>beads</i>]	q_{max}^b [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ <i>beads</i>]	Effizienz ^c [%]
Bärlauch <i>its1</i>	1,19	0,60	38,81
Mistel <i>its1</i>	1,21	0,56	37,21
Weißdorn <i>its1</i>	1,28	0,50	35,38

^a Dichte der immobilisierten Oligonukleotide

^b maximale Bindungskapazität

^c Aufreinigungseffizienz (vorgelegte DNA/eluierte DNA)

signifikant weniger gebunden (Abb. 4.22b), dafür ist der Anteil abgewaschener DNA deutlich erhöht ($t > 4,3$, $p < 0,01$). Etwa 30–40% der vorgelegten DNA kann letztendlich wieder von den *beads* eluiert werden.

Mit der Verwendung von pflanzlicher DNA in Verbindung mit den jeweils nicht dafür vorgesehenen *beads* wurde die Spezifität überprüft. Dabei zeigte sich, dass von 10 μg vorgelegter DNA von den „passenden“ *beads* etwa 70% gebunden werden. Von der „falschen“ DNA werden hingegen nur etwa 25–35% ($q > 6,7$, $p < 0,001$) an die *beads* unspezifisch gebunden (Abb. 4.23a). Noch deutlicher zeigt sich die Spezifität am Elutionsschritt (Abb. 4.23b). Nach Durchlaufen des Waschprotokolls ist nur noch die erwartete DNA-Spezies gebunden und kann eluiert werden.

Durch Variation der *bead*-Menge zwischen 10–100 μL wurde die Bindungskapazität bestimmt (Abb. 4.24). An dem Punkt, an dem die DNA-Menge limitierend wirkt, wird maximale Bindungskapazität von ca. 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ *beads* erreicht. Dies ist in etwa die Hälfte im Vergleich zu den Amino-*beads*. Die beschriebene Charakterisierung war für eine *proof-of-principle*-Studie ausreichend und zeigt, dass sich die modifizierten *beads* zur DNA-Bindung eignen (Tab. 4.7).

Den Abschluss dieses Eignungstests bildete eine *real-time* PCR-Analyse von *Listeria*-DNA nach KingFisher-Aufreinigung mit spezifischen *beads* (Abb. 4.25). Die Verwendung der *its*-Sequenzen als Fängermoleküle schließt diese selbst als PCR-Targets aus. Es wurden daher Bärlauch *trnL-trnF*, Mistel *trnS-trnFM* und Weißdorn *trnM-atpE* als Untersuchungsgrundlage verwendet. Die qPCR

bestätigte die Spezifität der *beads*. In den mit entsprechenden *beads* bearbeiteten Proben ist im Vergleich zur Ausgangsmischung (mit DNeasy aufgereinigt) jeweils die erwartete DNA-Sorte angereichert. 1 ng Lefteria-DNA (erste Säule) hat eine DNA-Zusammensetzung von 0,43 / 0,43 / 0,20 ng (Bärlauch / Mistel / Weißdorn). Nach Durchlaufen der KingFisher-Aufreinigung mit bärlauchspezifischen *beads* hatte sich der DNA-Verhältnis auf 0,65 / 0,21 / 0,20 ng geändert. Mit 0,17 / 0,71 / 0,22 ng und 0,25 / 0,26 / 0,55 ng gilt dies ebenso für Mistel und Weißdorn. Die Steigerungen des jeweiligen Pflanzenanteils sind signifikant ($t > 4,2$, $p < 0,05$).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass mit pflanzenspezifischen Sonden modifizierte *magnetic beads* zur spezifischen DNA-Extraktion dienen können. Es konnte gezeigt werden, dass nach spezifischer Extraktion, ausgehend von Lefteria-DNA, der entsprechende Anteil einer Pflanze erhöht werden kann. Zudem ist die DNA-Ausbeute in „Fremd“-DNA deutlich schwächer als beim Vorliegen von „passender“ DNA. Mit dem aktuellen Protokoll ist eine DNA-Anreicherung möglich. Für die Zielsetzung eine Quantifizierung von Lefteria-DNA ohne *real-time* PCR, ausschließlich über spektroskopische Konzentrationsmessung zu realisieren, muss die Spezifität auf nahezu 100% gesteigert werden. Eine Optimierung des Puffersystems, der Waschstreps und der Oligonukleotide sollte dafür in Zukunft versucht werden. Abschließend ist ein Test der *beads* an Lefteria-Pulver anstatt in reinen DNA-Proben notwendig, um reale Bedingungen zu untersuchen.

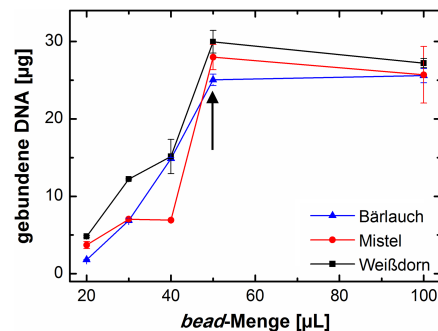


Abb. 4.24: Bestimmung der maximalen Bindungskapazität der modifizierten *bead*-Varianten.

4.1.9 Zusammenfassung: DNA-Extraktion

Im Rahmen des ersten Hauptteils der experimentellen Arbeiten wurden unterschiedliche DNA-Extraktionsmethoden auf ihre Eignung zur Bereitstellung von genomischer DNA aus pflanzlichen Arzneimitteln untersucht. Es wurde festgestellt, dass mit Präzipitationsmethoden die höchsten Ausbeuten an DNA erzielt werden können. Die beliebten und weitverbreiteten *spin columns* sind hinsichtlich dieses Parameters, ebenso wie moderne *magnetic beads* weniger effektiv. Als der kritische Faktor für PCR-Anwendungen stellte sich die DNA-Qualität heraus. Gerade membran- und *bead*-basierte Methoden haben in diesem Bezug klare Vorteile gegenüber einer DNA-Fällung. Präzipitierte DNA ist im Allgemeinen stärker fragmentiert bzw. mit mehr Verunreinigungen versetzt. Darüber hinaus zeigte sich, dass einzelne Methoden besser oder schlechter für die DNA der pflanzlichen Lefteria-Komponenten geeignet sind. Die *real-time* PCR-basierte Charakterisierung der DNA-Probe von Lefteria und der Vergleich mit reinen Pflanzenproben ergaben, dass die in den komplexen Proben ermittelte DNA-Zusammensetzung absolut unabhängig von der Extrakti-

onsmethode ist. Die DNA der drei Pflanzen ist in einer Mischprobe wahrscheinlich miteinander assembliert und wird unabhängig vom Einfluss einer Methode gemeinsam extrahiert. Dies führt dazu, dass die Wahl einer Extraktionsmethode keine Auswirkung auf anschließende Analysen hat. DNA-Extraktion und PCR können damit als zwei unabhängige Schritte des Gesamtassays betrachtet werden.

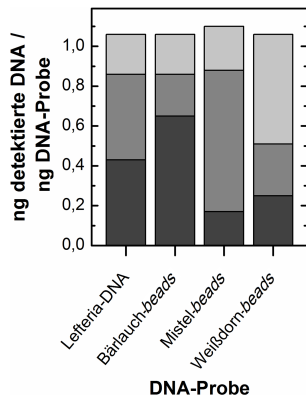


Abb. 4.25: Real-time PCR-Analyse der Spezifität der *beads*.

Die Extraktion genomischer DNA aus pflanzlichem Material mittels Amino-modifizierter *beads* (BioMag) und KingFisher stellt eine so noch nicht publizierte Herangehensweise dar. Für entsprechende *beads* wurden Bindungseigenschaften und Pufferbedingungen evaluiert, unter denen sich pflanzliche DNA mit sehr hoher Reinheit und Qualität, d.h. PCRTauglichkeit aus zu Pulver zermahlene Proben aufreinigen lässt. Das Protokoll wurde derart entwickelt, dass es zur Anwendung sowohl auf pflanzliche als auch auf Mischproben, in diesem Fall Phytopharmaka in Tablettenform, dient. Mit Standard-DNA gewonnene Erkenntnisse bezüglich Bindungsfähigkeit und Elutionseigenschaften konnten an realen

Proben bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass die anvisierte pflanzliche DNA von den Amino-*beads* sogar noch besser als die kommerzielle Standard-DNA wieder eluiert werden kann.

Die letztendliche Auswahl der geeignetsten Methode erfolgte anhand der Reproduzierbarkeit. Diese ist essentiell, um DNA-Mengen mit der korrespondierenden Menge an Pflanzenmaterial zu korrelieren (4.3.7). Das DNeasy Kit und die selbstentwickelte Methode unter Nutzung der Amino-*beads* zeigten sich bei diesem Vergleich als optimale Lösungen für die zu erfüllenden Aufgaben. Zudem ist zukünftig womöglich eine speziesspezifische Extraktion machbar. Für die folgenden PCR-Assays wurde DNA mittels DNeasy bereitgestellt.

4.2 Entwicklung qualitativer Methoden zur Identifizierung der Lefteria-Inhaltsstoffe

Für eine Zulassung als Arzneimittel fordert die Europäische Union effektive und sichere Methoden zum Nachweis der wirksamen Inhaltsstoffe. Für pflanzliche Arzneimittel wird eine umfangreiche qualitative Spezifizierung erwartet. Die denkbaren Spezifizierungskonzepte wurden als Richtlinie CPMP/QWP/2820/00 herausgegeben. Diese Regeln lassen sich auf eine Kernaussage zusammenfassen: Der Identifikationstest muss zwischen unterschiedlichen enthaltenen Pflanzenarten differenzieren können. Um diesem Anspruch zu genügen, wurden in der vorliegenden Arbeit DNA-basierte Analysemethoden zur qualitativen Identifizierung der pflanzlichen Inhaltsstoffe von Lefteria entwickelt. Dafür wurden moderne Varianten der PCR eingesetzt und verglichen,

um eine für die Lefteria-Qualitätskontrolle optimale Methode bereitzustellen. Dieses Vorgehen gliedert sich in die folgenden Unterpunkte:

- Validierung pflanzenspezifischer Target-Sequenzen für einen einfachen PCR-Nachweis und darauf basierende Entwicklung einer Multiplex-PCR
- Erweiterung der Multiplex-PCR um eine Nested-PCR
- Einsatz von *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) als zeitsparende Alternative

4.2.1 Multiplex-PCR

Aufgrund guter Übersichtlichkeit eignet sich eine Multiplex-PCR für den parallelen Nachweis von DNA unterschiedlicher Organismen in einer Mischprobe besonders gut [360–362]. Für Lefteria wurde daher ein Triplex-Assay entwickelt, d.h. es gibt je ein spezifisches Amplikon pro Arzneipflanze. Grundsätzlich besteht eine Multiplex-PCR aus multiplen Primerpaaren in einem einzigen Reaktionsansatz zur Erzeugung von Amplikons unterschiedlicher Länge, welche spezifisch für jeweils eine Target-Sequenz sind. Die Methode wurde 1988 zum schnellen Screening von Deletionen im humanen Genom entwickelt [363] und kann heute sogar hochauflösend zur Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) verwendet werden [364]. Der Hauptgrund für den Einsatz eines multiplen Nachweises sind vor allem die Reagenzien- und Zeitersparnisse, was letztendlich die Kosten reduziert.

In den folgenden Abschnitten werden als Grundlage für alle qualitativen Ansätze, Tests verschiedener Target-Sequenzen erläutert. Danach wird gezeigt, wie daraus ein PCR-Nachweis etabliert werden kann. Zudem wird der einzige wirkliche Nachteil der Multiplex-PCR näher beleuchtet. Statt wie gewöhnlich ein Primerpaar, enthält die Reaktionsmischung viele Primer. Die erhöhte Menge an Primern beim *multiplexing* fördert die Bildung von Primerdimeren und anderen unspezifischen PCR-Produkten, was die Amplifikation der spezifischen Produkte be- bzw. verhindert [365, 366]. Dieser Umstand erfordert eine exakte und umfangreiche Optimierung der PCR-Bedingungen [367].

4.2.1.1 Target-Sequenzen und Primerdesign

Das Finden von Target-Sequenzen als pflanzenspezifische Marker gestaltete sich kompliziert. In der sämtliche bekannte DNA-Sequenzen umfassenden GenBank⁵ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ist für Bärlauch, Mistel und Weißdorn jeweils nur eine begrenzte Auswahl an Sequenzen vorhanden. Abb. 4.26 zeigt die Ergebnisse der Datenbankrecherchen, aufgeschlüsselt in Gen-, mRNA- und Spacer-Sequenzen. In die Suche wurden explizit nur die in Norddeutschland vorkommenden Arten *Allium ursinum* (Bärlauch), *Viscum album* (Mistel),

⁵www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

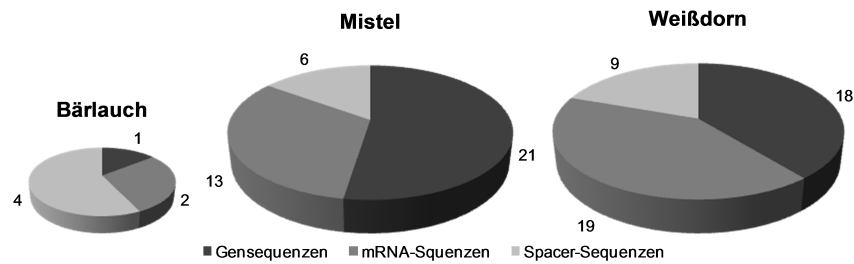


Abb. 4.26: International vorhandener Datenbestand über Nukleotidsequenzen der drei Arzneipflanzen

Crataegus monogyna und *C. laevigata* (Weißdorn) einbezogen. Ein Vergleich mit *A. thaliana* (etwa 300.000 Sequenzen insgesamt, davon ca. 100.000 mRNA-Daten) und *Homo sapiens* (total = 9.600.000, mRNA = 305.000) veranschaulicht die Dimensionen.

Tab. 4.8 listet alle Sequenzen auf, für welche *in silico* Primerpaare entworfen worden sind. Die Auswahl der Targets erfolgte nach folgenden Kriterien: Es wurden möglichst keine mRNA-Sequenzen verwendet, da genomische DNA als Template dient. Somit verhindern die bei Eukaryoten wahrscheinlichen, aber bei mRNA-Daten nicht verzeichneten Introns, eine Berechnung der Amplikonlänge. Diese Kenntnis ist aber für die Detektion essentiell. Es wurden Sequenzabschnitte im Längenbereich von 169 bis 2.841 bp gewählt, um ein möglichst breites Spektrum abzudecken und so eine Triplex-Analyse mit optisch gut voneinander getrennten Gelbanden realisieren zu können. Dies schränkt die Auswahlmöglichkeiten ein, da die meisten Sequenzdaten nur etwa 200 bis 350 bp lang sind. Das Primerdesign wurde mit dem Programm Primer3⁶ durchgeführt. Es wurden gängige Kriterien gewählt, wie sie in Standardwerken der Molekularbiologie angegeben sind [368]. Die *in silico* entworfenen Primer wurden mittels Mfold⁷ auf interne Sekundärstrukturen überprüft und mit BLAST⁸ auf ihre Spezifität gegenüber allen verfügbaren DNA-Sequenzen in der GenBank getestet (siehe **A.4.1**).

Generell ist eine Amplifikation einfacher wenn DNA-Abschnitte häufig im Genom vorkommen. Dies betrifft insbesondere RNA-Gene. In hoher Kopienzahl finden sich die Gene der ribosomalen RNA tandemartig und die Transfer-RNA-Gene verstreut wiederholt im Genom. Die Transkriptionseinheit der rRNA-Gene besteht aus den Genen 18S rRNA, 5.8S rRNA und 26S rRNA. Die Gene sowie die einzelnen Transkriptionseinheiten solcher rRNA-Konstrukte sind durch Spacer-Regionen voneinander getrennt. Da im Laufe der Evolution lebenswichtige Gensequenzen konserviert wurden, zeigen RNA-Gene zwischen unterschiedlichen Spezies kaum Abweichungen [369]. So wurde z.B. auf rRNA-basierender Phylogenetik die Einteilung aller Organismen in ihre Domänen vorgenommen [370]. RNA-Gene schieben daher als Identifikationsmarker aus. Spacer zwischen den Transkriptionseinheiten sind dagegen keinem evolutiven Druck ausgesetzt und unterliegen schneller Mutation. Sie werden deswegen auch als molekulare Marker für eng verwandte Eukaryoten und zur Unterscheidung einzelner Stämme eingesetzt. Für alle drei Pflanzen sind

⁶<http://frodo.wi.mit.edu/>

⁷<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>

⁸<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Tab. 4.8: Potentielle Targets für den Nachweis von Bärlauch, Mistel und Weißdorn auf DNA-Basis.

Spezies	Target-Sequenz	<i>accession number</i> ^a	Abk.	Amplikonlänge [bp]
Bärlauch	Internal Transcribed Spacer 1	AJ412744	<i>its1</i>	318
	Mannose Specific Lectin	U68531	<i>msl</i> ^b	457
	PISTILLATA Protein	DQ005594	<i>pi-2</i>	409
	ZEITLUPE Protein	GQ232755	<i>ztl</i> ^b	864
Mistel				567
	18S rRNA	L24426	<i>18S</i>	1.236
	Album Sucrose Phosphate Synthase	AY331261	<i>asps</i>	2.841
				405
	cml3p Lectin	AY377896	<i>cml3p</i> ^b	811
	Internal Transcribed Spacer 1	EU796892	<i>its1</i>	468
	Lectin Isoform A	AY081149	<i>leA</i>	1.593
	Lectin Isoform B	DQ011864	<i>leB</i>	827
Weißdorn	VCA (Verprolin, Cofilin, Acidic) Protein	AF369961	<i>vca</i>	753
	Chloroplast tRNA-His-tRNA-Lys Intergenic Spacer	AF419259	<i>trnH-trnK</i>	344
	Cmon S18 Self-Incompatibility Protein	AF504290	<i>cmon</i>	231
	Dihydroflavonol 4-Reductase	AY786995	<i>d4r</i>	500
	34-1 LEAFY Protein	EU683954	<i>leafy</i>	405
	Megakaryocyte-Associated Tyrosine Kinase	AF288099	<i>matK</i>	1.126
	Polygalacturonase Inhibitor Protein	AF196879	<i>pgip</i>	570
				433
	Plastidic Glutamine Synthetas	AY162465	<i>pgs</i> ^b	169
	RNA Polymerase B	FJ395650	<i>rpoB</i>	190
Chloroplast tRNA-Leu-tRNA-Phe Intergenic Spacer	AF348541	<i>trnL-trnF</i>	618	

^a Wird eine neue Sequenz in die GenBank aufgenommen, erhält sie einen Zugriffsschlüssel. Diese *accession number* wird nur einmal vergeben und begleitet die Sequenz unverändert.

^b Für einige Targets wurden im Laufe dieser Arbeiten mehrere Primerpaare entworfen und getestet.

einige solcher Spacer-Regionen bekannt. Die *internal transcribed spacer* (*its*) liegen vor und hinter dem 5.8S rRNA-Gen, aber auch die tRNA-Gene werden durch Spacer (*trn*) voneinander getrennt. Aufgrund des begrenzten Bestands an Sequenzen wurden daneben auch einige Gensequenzen zum Primerdesign herangezogen. *Its*- und *trn*-Regionen sind vor allem bei der weitaus sensitiveren *real-time* PCR von großer Bedeutung (4.3.1) und wurden auch für die speziesspezifischen *beads* verwendet (4.1.8).

4.2.1.2 Evaluierung der PCR-Primer

Die genomische DNA für alle Arbeiten zur qualitativen Analyse wurde mit dem DNeasy Kit gewonnen. Zunächst erfolgte die Evaluierung des jeweiligen Amplifikationsbereichs (Temperaturbereich in dem das Amplikon gebildet wird) und der optimalen Annealing-Temperaturen (intensivste Bande ohne Koamplifikate) für sämtliche Primerpaare. Hierfür wurde die entsprechende Pflanzen-DNA als Template in Gradienten-PCR mit Temperaturgradienten von 40–70 °C

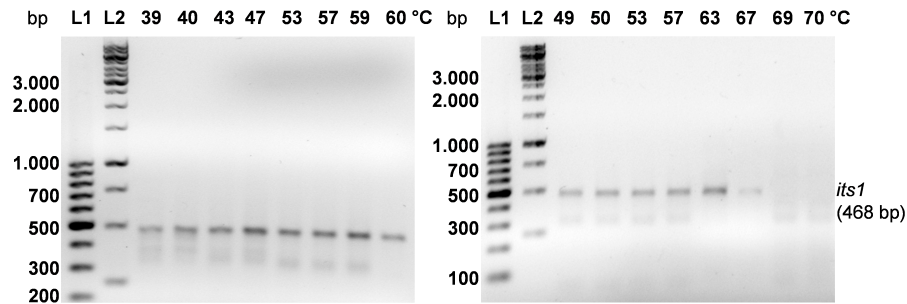


Abb. 4.27: Optimierung der Annealing-Temperatur für die PCR zum Nachweis von Mistel-DNA über das Target *its1*. Gezeigt sind zwei 1,5%ige Agarosegele die einen Temperaturbereich von 40–70 °C abdecken, als Größenstandards wurden ein 100 bp und ein 1 kb Ladder aufgetragen.

verwendet sowie Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse eingesetzt. Abb. 4.27 zeigt als Beispiel den Test bei Mistel *its1* und in Tab. 4.9 sind die ermittelten Temperaturwerte aller Primerpaare zusammengestellt.

Im Beispiel ist eine Produktbildung mit erwarteter Länge über ein großes Temperaturspektrum zu erkennen, allerdings wird nur im Bereich von 60–67 °C kein unspezifisches Koprodukt gebildet. Optimale Amplifikationsbedingungen sind bei 63 °C gegeben. Allgemein wird bei Mistel und Weißdorn mit den meisten Primern kein PCR-Produkt generiert (Tab. 4.9). Mit Mistel *its1* und *trnH-trnK* bzw. Weißdorn *rpoB* und *trnL-trnF* stehen jeweils nur zwei mögliche Targets für den Aufbau des Assays zur Verfügung. Für Bärlauch funktionieren sechs Primerpaare. Mit nicht funktionierenden Primerpaaren wurden noch zwei Strategien untersucht, die Amplifikationsbedingungen zu verbessern:

- Zweistufige PCR (siehe **A.1.3**): In den ersten 20 Zyklen wurde die Annealing-Temperatur auf 50 °C gesetzt, um initial viel Produkt zu generieren, danach wurde 1 µL dieses Ansatzes als Template in einen zweiten Ansatz gegeben und die Temperatur wurde zur Erhöhung der Spezifität für weitere 40 Zyklen auf 58 °C erhöht
- Zusatz von Additiven als PCR-*enhancer* (vgl. **4.2.1.4**): Folgende Additive wurden mit in [371–376] beschriebenen Konzentrationen untersucht: Betain, DMSO und Tween 20

Auch die verwendeten Optimierungen generieren keine signifikanten Mengen an PCR-Produkten (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher wurde der Triplex-Assay aus den vorhandenen Target-Sequenzen entwickelt. Bei Bärlauch wurde die Anzahl an Targets reduziert. Mit Bärlauch *its1*, dem zweiten Primerpaar für *msl* und *pi-2* sind die intensivsten Banden zu beobachten (Daten nicht gezeigt), daher wurden sie ausgewählt. Anschließend wurden die Endpunkte der PCR bestimmt. Nach jeweils fünf Zyklen wurde je Reaktionsansatz eine Probe entnommen, die gesammelten Proben wurden dann auf einem Gel analysiert. Stets ist ab etwa 35 Zyklen keine Zunahme der Bandenintensität mehr zu beobachten, d.h. der stationäre Zustand ist erreicht (Ergebnisse nicht gezeigt).

Abb. 4.28 stellt die Amplifikationen der gewählten sieben Targets aus reiner Pflanzen- bzw. Lefteria-DNA gegenüber. Nach 35 Zyklen können in alle Spuren (1–14) intensive Banden der Am-

Tab. 4.9: Experimentell ermittelte Annealing-Temperaturen aller getesteten Primerpaare. Die Tabelle zeigt parallel die grundsätzliche Funktionalität der Primer.

Spezies	Primerpaar	Arbeitsbereich [°C]	Annealing-Temperatur [°C]
Bärlauch	<i>its1</i>	40–70	57
		47–59	57
	<i>msl</i>	40–70	59
	<i>pi-2</i>	47–59	53
	<i>ztl</i> ^a	47–70	57
Mistel		59–70	63
	<i>18S</i> ^a	50–63	51
	<i>asps</i>	-	-
		50–70	67
	<i>cml3p</i> ^a	50–57	50
	<i>its1</i>	60–67	63
	<i>leA</i>	-	-
	<i>leB</i>	-	-
	<i>vca</i>	-	-
	<i>trnH-trnK</i>	50–57	51
Weißdorn	<i>cmon</i>	-	-
	<i>d4r</i> ^a	50–53	50
	<i>leafy</i>	-	-
	<i>matK</i>	-	-
	<i>pgip</i>	-	-
		-	-
	<i>pgs</i> ^a	63–70	63
	<i>rpoB</i>	40–63	59
	50–57	53	

^a Im angegebenen Temperaturbereich ist nur minimal Produktbildung zu beobachten.

plifikate nachgewiesen werden. Ebenso ist hier gezeigt, dass die Amplifikation auch bei Lefteria gut funktioniert. Die Produkte haben die erwarteten Längen, Koamplifikate sind nicht zu beobachten. Damit bestätigen sich erfolgreiches Primerdesign und optimale Amplifikationsbedingungen.

4.2.1.3 Entwicklung des Multiplex-Assays

Basierend auf den erzielten Ergebnissen wurde der Multiplex-Assay im Triplex-Format aufgebaut. Ziel war es, parallel je ein spezifisches Target pro Pflanze qualitativ nachzuweisen. Zunächst wurde untersucht, welche Kombinationen aus je zwei Primerpaaren (*duplexing*) kompatibel sind. Als Annealing-Temperatur wurde jeweils der Mittelwert der sich überschneidenden Amplifikationsbereiche gewählt. Wie aus Abb. 4.29 ersichtlich wird, werden bei Bärlauch *its1* mit Weißdorn *rpoB* (Spur 3), Bärlauch *msl* mit Mistel *trnH-trnK* (Spur 6), mit Weißdorn *rpoB* und mit *trnL-trnF* (Spuren 7, 8), Bärlauch *pi-2*, Mistel *its1* (Spur 9) sowie bei Mistel *trnH-trnK* mit Weißdorn *rpoB* und *trnL-trnF* (Spuren 15, 16) jeweils beide Banden erwarteter Größe mit hoher Intensität generiert. Mit diesen aussichtsreichsten Kombinationen erfolgte dann die Adaption

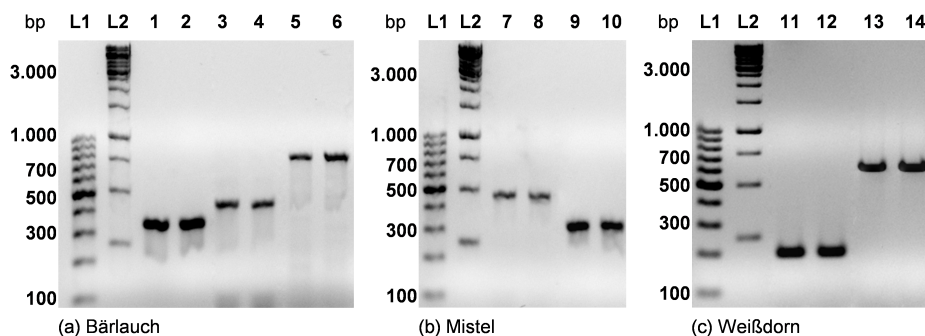


Abb. 4.28: Amplikons der sieben ausgewählten Primerpaare zum Aufbau des Triplex-Assays. Auf 1,5%igen Agarosegelen wurden die PCR mit Bärlauch- (a), Mistel- (b) und Weißdorn-Primern analysiert. Die Reihenfolge der Auftragung ist: Bärlauch *its1* (Spur 1: Bärlauch-DNA; Spur 2: Listeria-DNA), *msl* (Spuren 3, 4) und *pi-2* (Spuren 5, 6), Mistel *its1* (Spur 7: Mistel-DNA; Spur 8: Listeria-DNA), *trnH-trnK* (Spuren 9, 10), Weißdorn *rpoB* (Spuren 11, 12) und in den Spuren 13, 14 *trnL-trnF* mit Weißdorn- bzw. Listeria-DNA.

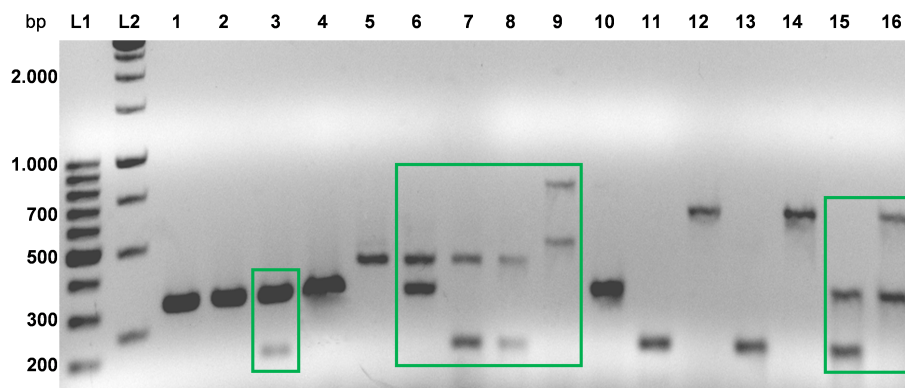


Abb. 4.29: Agarosegel-Analysen verschiedener Primerpaarkonstellationen im Duplex-Ansatz. Gezeigt ist ein 1,5%iges Agarosegel. Aufgetragen sind die PCR-Reaktionen mit Listeria-DNA und jeweils zwei Primerpaaren. Die Auftragung ist wie folgt: Bärlauch *its1* in Kombination mit Mistel *its1* (Spur 1), *trnH-trnK* (Spur 2), Weißdorn *rpoB* (Spur 3) und *trnL-trnF* (Spur 4); Bärlauch *msl* mit Mistel *its1*, *trnH-trnK*, Weißdorn *rpoB* und *trnL-trnF* (Spuren 5–8); Bärlauch *pi-2* mit Mistel *its1*, *trnH-trnK*, Weißdorn *rpoB* und *trnL-trnF* (Spuren 9–12); Mistel *its1* mit Weißdorn *rpoB* und *trnL-trnF* (Spuren 13, 14); Mistel *trnH-trnK* mit Weißdorn *rpoB* und *trnL-trnF* (Spuren 15, 16).

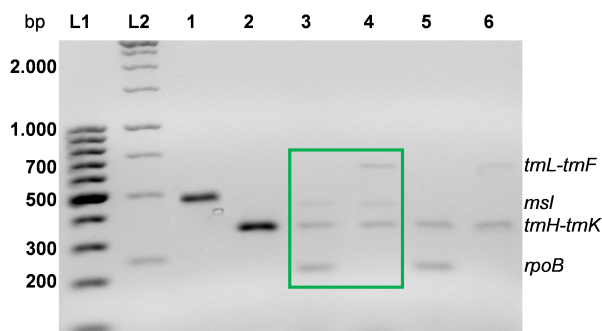


Abb. 4.30: Mögliche Triplex-Assays im Detail. Auf einem 1,5%igen Gel sind folgende Multiplex-Ansätze mit jeweils drei Primerpaaren aufgetragen worden: Bärlauch *its1*, Mistel *its1* und Weißdorn *rpoB* (Spur 1); *its1*, *trnH-trnK* und *rpoB* (Spur 2); *msl*, *trnH-trnK* und *rpoB* (Spur 3); *msl*, *trnH-trnK* und *trnL-trnF* (Spur 4); *pi-2*, *trnH-trnK* und *rpoB* (Spur 5); *pi-2*, *trnH-trnK* und *trnL-trnF* (Spur 6).

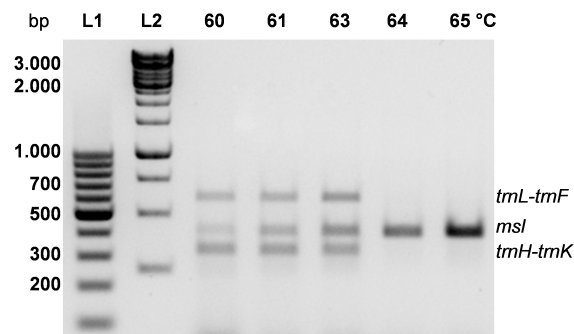


Abb. 4.31: Temperaturoptimierung für den Multiplex-Nachweis für Bärlauch, Mistel und Weißdorn. Gezeigt ist ein 1,5%iges Agarosegel, auf welchem Gradienten-PCR mit, wie auch auf den folgenden Gelbildern, Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF* mit Lefteria-DNA als Template aufgetragen worden sind.

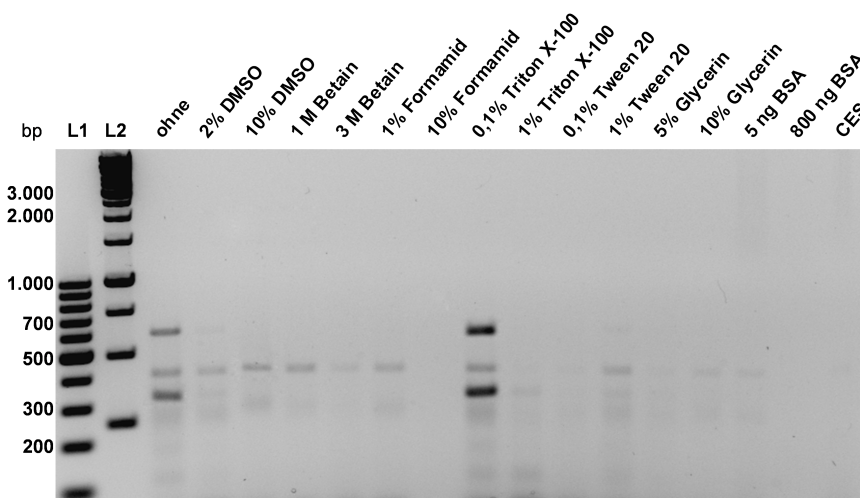


Abb. 4.32: Test verschiedener PCR-*enhancer*. Jeweils wurde Lefteria-DNA in Multiplex-PCR bei optimaler Annealing-Temperatur verwendet. Die eingesetzten Additive sind der Beschriftung über dem Agarosegel zu entnehmen (CES = *combinatorial enhancer solution*) [376].

an den Triplex-Assay. Abb. 4.30 zeigt, dass nur in den beiden Konstellationen Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* mit Weißdorn *rpoB* oder mit Weißdorn *trnL-trnF* (Spuren 3, 4) die Bildung aller drei spezifischen Amplikons gelingt. Die im Vergleich schwachen Bandenintensitäten verdeutlichen die reduzierte Amplifikationseffizienz, bedingt durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit für Interaktionen zwischen den Primern. Bei den vier anderen Spuren konnte nur noch in Spur 6 überhaupt ein zweites PCR-Produkt nachgewiesen werden.

Die angewandten Strategien zur Optimierung der beiden Triplex-Assays werden am Beispiel der Kombination mit Weißdorn *trnL-trnF* im nächsten Abschnitt genauer erläutert. Die Optimierung der anderen möglichen Primerkombination verlief dazu analog.

4.2.1.4 Optimierung der Multiplex-PCR

In Spur 4 (Abb. 4.30) ist die Bande des Bärlauchmarkers *msl* schwächer als die der anderen Pflanzen. Zunächst wurde also versucht die unterschiedliche Intensität der drei Banden zu kom-

pensieren. Dafür wurden verschiedene PCR mit Konzentrationsgradienten der drei Primerpaare durchgeführt. Die als optimalen bestimmten Konzentrationen sind in Tab. 4.10 angegeben. Im Anschluss daran wurde die Annealing-Temperatur der Primerkombination optimiert. Anhand von Abb. 4.31 ist zu erkennen, dass eine Temperatur von 63 °C ideal ist. Ab Temperaturen unter 58 °C (nicht auf dem Gel) bzw. über 64 °C werden nicht mehr alle Produkte gebildet.

Häufig lässt sich die Amplifikationseffizienz und Spezifität einer PCR durch Zugabe von verschiedenen Additiven, sog. PCR-*enhancern*, steigern. Von Betain und DMSO z.B. ist bekannt, dass sie die Agglomeration von Polymerasen unterbinden. Dazu verfügbar sind einige Übersichten über auch in dieser Arbeit verwendete Additive, ihre Eigenschaften und die entsprechende Referenz [371–376]. Alle Additive wurden innerhalb schon postulierter Konzentrationsgrenzen getestet. Wie Abb. 4.32 verdeutlicht, kann eine wesentliche Verbesserung der Produktbildung mit einem Zusatz von 0,1% Triton X-100 erreicht werden. Auffällig ist auch, dass entgegen der Literaturmeinung nahezu alle getesteten *enhancer* zu einer Verschlechterung der PCR-Effizienz geführt haben. Die optimale Konzentration von Triton X-100 wurde mittels eines Gradienten im Bereich von 0,05–2,5% bestimmt. Ideal ist ein Anteil von 0,05% am Reaktionsansatz (Abb. 4.33).

Nach erfolgter Optimierung standen zwei mögliche Triplex-Assays zur Verfügung (mit Weißdorn *rpoB* bzw. *trnL-trnF*). Tab. 4.10 fasst die PCR-Bedingungen kurz zusammen. Der zweite Assay mit Weißdorn *rpoB* wurde entsprechend dem hier beschriebenen etabliert und getestet.

4.2.1.5 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität sagt aus, ob eine Bande tatsächlich auf den untersuchten Analyten zurückgeführt werden kann oder ob das Signal unspezifisch ist. Mittels BLAST-Analyse konnten bioinformatisch zwar keine Kreuzreaktivitäten der Primerpaare mit einer der anderen Pflanzen nachgewiesen werden, allerdings lagen für eine sichere Aussage nicht genug Vergleichssequenzen vor. Die Bestimmung der Spezifität erfolgte daher zusätzlich *in vitro*. In einer Serie von Experimenten wurde die Spezifität der Primerpaare anhand verschiedener DNA-Proben ermittelt. Abb. 4.34 verdeutlicht die Spezifität von Bärlauch *mssl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF*. Nur in Anwesenheit von Lefteria- oder der entsprechenden Pflanzen-DNA sind intensive Banden erkennbar. Bei Anwesenheit „fremder“ DNA kann kein Amplifikat nachgewiesen werden. In den jeweils in Spur 5 applizierten Negativkontrollen⁹ (*no template control*, NTC) können erwartungsgemäß keine Amplifikate detektiert werden. Eine vollkommene Spezifität ist somit auch im Triplex-Ansatz gegeben (Abb. 4.35b).

Bei weiteren Untersuchungen zur Spezifität zeigte sich, dass der Triplex-Assay mit Weißdorn *rpoB* nicht die Voraussetzung als qualitatives Identifikations-Tool der Lefteria-Inhaltsstoffe erfüllt. Neben Weißdorn- konnte auch mit Bärlauch-DNA als Template ein PCR-Produkt generiert

⁹Anstatt einer DNA-Probe durchläuft DNA-freies Wasser sämtliche Analyseschritte, wodurch der Einfluss von DNA-Verunreinigungen detektiert wird.

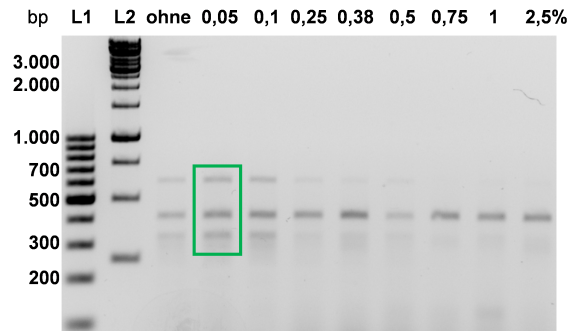


Abb. 4.33: Agarosegel-Analyse der Multiplex-PCR mit einem Gradienten von Triton X-100. Mit einem Anteil von Triton X-100 zwischen 0,05 und 2,5% am Reaktionsansatz wurde nach der optimalen Konzentration des *enhancers* gescreent.

Tab. 4.10: Experimentell ermittelte Reaktionsbedingungen für die zwei möglichen Multiplex-Ansätze.

Triplex-Target	Amplikonlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]	Primerkonz. [nmol/L]	PCR- <i>enhancer</i>
Bärlauch <i>msl</i>	409		400	
Mistel <i>trnH-trnK</i>	344	58	400	5 ng BSA
Weißdorn <i>rpoB</i>	190		400	
Bärlauch <i>msl</i>	409		200	
Mistel <i>trnH-trnK</i>	344	63	400	0,05% Triton X-100
Weißdorn <i>trnL-trnF</i>	618		400	

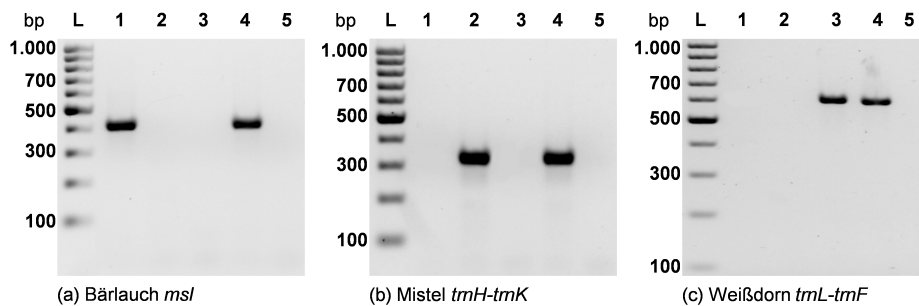


Abb. 4.34: Untersuchung der Spezifität der Target-Sequenzen für Bärlauch (a), Mistel (b) und Weißdorn (c). Auf 1,5%igen Agarosegelen sind jeweils PCR mit Bärlauch- (Spur 1), Mistel- (Spur 2) und Weißdorn-DNA (Spur 3) aufgetragen. Spur 4 stellt jeweils die Positivkontrolle mit *Listeria*-DNA und Spur 5 die Negativkontrolle mit Wasser anstatt DNA (NTC) dar.

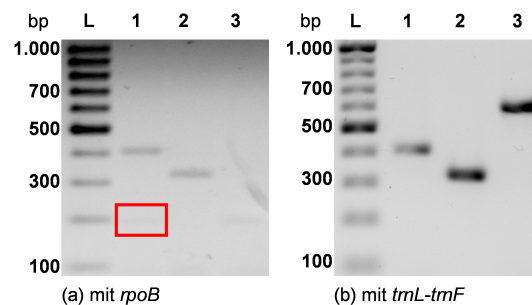


Abb. 4.35: Spezifität im Triplex-Ansatz mit Weißdorn *rpoB* (a) und Weißdorn *trnL-trnF* (b). In den Spuren 1–3 dieser 1,5%igen Gele sind nacheinander PCR mit reiner Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA aufgetragen. Es wurde ein 100 bp Größenstandard für die Zuordnung der Banden verwendet.

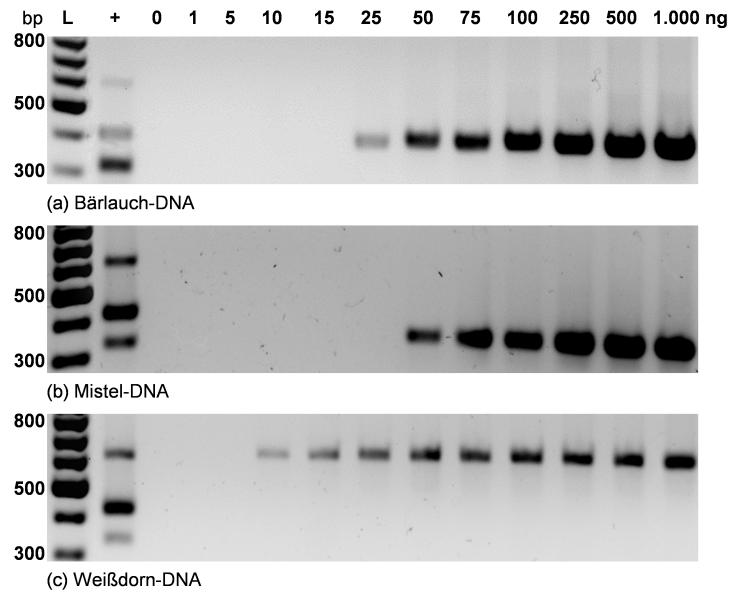


Abb. 4.36: Die resultierenden Amplifikate für verschiedene Verdünnungen reiner Pflanzen-DNA. Die PCR wurden im Triplex-Ansatz mit Weißdorn *trnL-trnF* durchgeführt. Die jeweils erste Bande stellt die Nachweisgrenze für das entsprechende Target dar. Bei der Positivkontrolle (+) handelt es sich um 100 ng *Lefteria*-DNA.

werden (Abb. 4.35a). Die Sequenz des Gens der RNA-Polymerase B ist aller Voraussicht nach derart konserviert, dass sie nicht als pflanzenspezifisches Target dienen kann. Es wurde daher nur noch der Ansatz mit Weißdorn *trnL-trnF* verwendet.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität [377, 378] wurden PCR-Produkte aller Primerpaare, sowohl mit Pflanzen- als auch mit *Lefteria*-DNA als Template durchgeführt, aus Agarosegelen aufgereinigt und sequenziert. BLAST-Analysen zeigten, dass alle Sequenzen zu 100% mit erwarteten Datenbankeinträgen korrespondieren, d.h. es handelt sich um spezifische Amplifikate.

4.2.1.6 Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) für ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Gel liegt bei ca. 50 ng PCR-Produkt pro Bande [379]. Ist weniger DNA vorhanden, kann sie mittels UV-Exposition nicht sichtbar gemacht werden. Zur weiteren Validierung der Assays erfolgte die genaue Bestimmung der Nachweisgrenzen mit dem Ziel, die quantitativ minimale Menge zu ermitteln, welche zu visuell auswertbaren Ergebnissen führt. Abb. 4.36 zeigt die Ergebnisse. Bärlauch-DNA lässt sich ab 25 ng im Ansatz (0,5 ng/ μ L PCR-Mischung (50 μ L)) nachweisen, Mistel und Weißdorn ab 50 ng bzw. 10 ng.

Nachweisgrenzen eines Assays sind vor allem unter realen Bedingungen interessant. Daher wurden zwölfstufige Verdünnungsreihen mit einem Hintergrund von DNA der jeweils anderen beiden Pflanzen (je 33 ng pro Ansatz) beurteilt. Anhand von Abb. 4.37 wird deutlich, dass die Nachweisgrenzen auf ähnlichem Niveau wie in reinen Proben liegen. Die Nachweisgrenzen der drei Targets

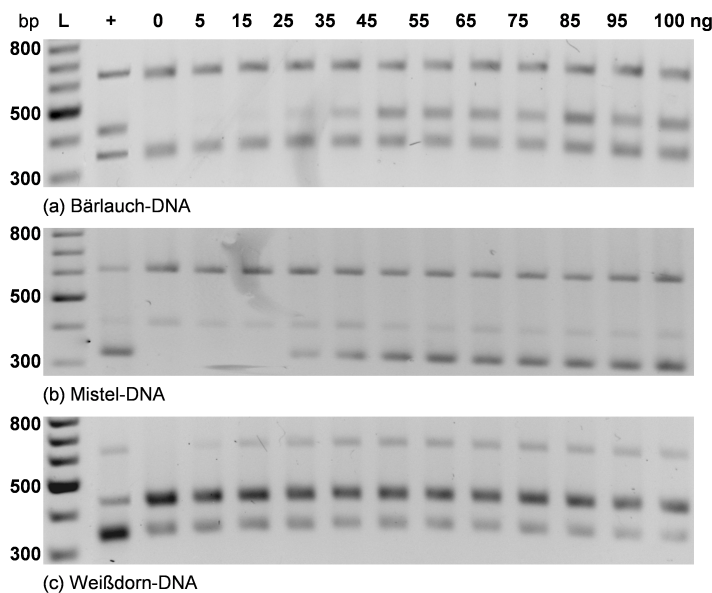


Abb. 4.37: Relative Nachweisgrenzen der Triplex-PCR mit Weißdorn *trnL-trnF* bei reiner Pflanzen-DNA mit Hintergrund von „Fremd“-DNA. Um die mögliche Beeinflussung zu untersuchen, wurde bei Bärlauch-DNA (a) die über dem Gel angegebene Menge als Template vorgelegt und dazu jeweils 33 ng DNA der anderen beiden Pflanzen zugesetzt. Analog wurde mit Mistel- (b) und Weißdorn-DNA (c) verfahren. Bei der Positivkontrolle (+) handelt es sich um 100 ng Lefteria-DNA.

liegen hier bei 15 ng (Bärlauch), 25 ng (Mistel) und 5 ng (Weißdorn). Diese sog. relativen Nachweisgrenzen stellen die analytische Sensitivität des Assays dar [380, 381]. Für den Multiplex-Assay hat das Ergebnis die positive Konsequenz, dass „Fremd“-DNA keinen Einfluss auf die PCR hat.

4.2.1.7 Dynamischer PCR-Bereich

Jede PCR hat einen dynamischen Messbereich und damit das Potential hier mehr als eine ja/nein-Antwort zur Anwesenheit pflanzlicher Inhaltsstoffe zu geben. Der dynamische Bereich jedes Targets, d.h. das Konzentrationsfenster, in dem Konzentrationsunterschiede anhand der Bandenintensität detektiert werden können, wurde mit gegenläufigen Verdünnungsreihen bestimmt. Während die Menge an DNA im Ansatz einer Pflanzenart schrittweise von 0 auf 100 ng ansteigt, sinkt der Anteil der anderen beiden DNA-Typen jeweils von 50 auf 0 ng ab. Diese Art der Probenzusammensetzung soll realistisch anzunehmende Schwankungen der Lefteria-Zusammensetzung simulieren. Abb. 4.38 zeigt, dass der Bärlauchanteil (a) der Probe im Bereich von 14–64 ng semiquantitativ bestimmt werden kann. Bei Mistel ist das bei 24–64 ng und bei Weißdorn zwischen 4 und 44 ng möglich. Die Bandenstärke wurde densitometrisch (semiquantitativ) mit der Software Alpha DigiDoc RT (Alpha Innotech, Santa Clara, USA) ausgewertet.

Gerade die Ergebnisse von Abb. 4.38 verdeutlichen sehr anschaulich, wie gut der entwickelte Assay funktioniert. Der dynamische Bereich ist zwar kleiner als zwei Dekaden, was aufgrund der reinen Endpunktbestimmung bei der konventionellen PCR nicht verwunderlich ist [259], dennoch ist es

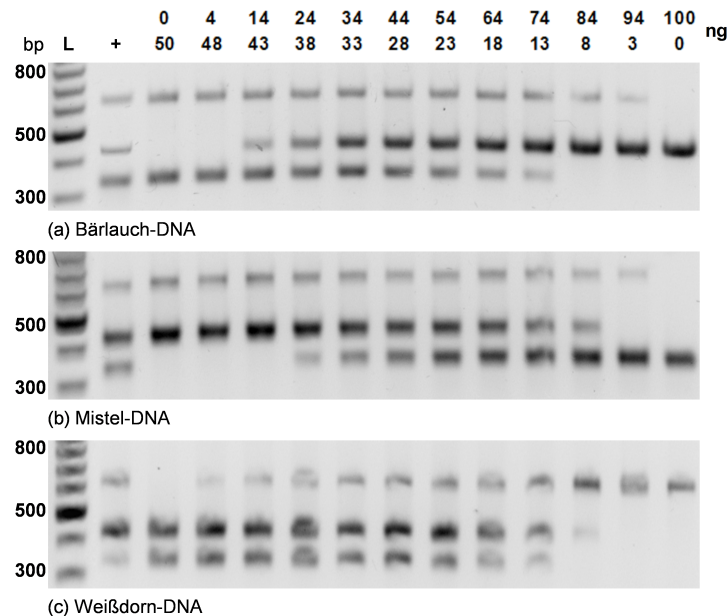


Abb. 4.38: Untersuchung der Triplex-PCR hinsichtlich des dynamischen Messbereichs. Mit Bärlauch-DNA (a) wurde die DNA-Menge zwischen 0 und 100 ng variiert und parallel die Menge der DNA der anderen beiden Pflanzen kontinuierlich von 50 auf 0 ng verringert, so dass stets 100 ng DNA in einem Triplex-PCR-Ansatz vorlagen. Bei der Positivkontrolle (+) handelt es sich um 100 ng *Lefteria*-DNA.

möglich, über eine rein qualitative Aussage hinaus, Abweichungen einer *Lefteria*-Tablette von der Originalzusammensetzung (Tab. 3.1) aufzudecken. Im Vergleich mit einer *Lefteria*-Kontrolle (+) oder besser noch mit einer Standardreihe, bietet der Assay die Möglichkeit, diese Abweichungen zu einem gewissen Grad zu quantifizieren. Ohne weitere Verbesserungen könnte der entwickelte Multiplex-Assay so z.B. in der Tablettenproduktion als ein Kurztest zur Qualitätssicherung verwendet werden.

4.2.1.8 Reproduzierbarkeit und diagnostische Sensitivität

Die Intra-Assay-Variabilität wurde für *Lefteria*-DNA und 1:1 Mischungen von jeweils zwei Pflanzenarten bestimmt, indem jeweils eine Probe zwölfmal mittels Triplex-PCR analysiert wurde. Bei der Auswertung der Elektrophorese mittels Alpha DigiDoc waren jeweils die Banden von 10–12 PCR-Ansätzen identisch. Die sich daraus ergebene Reproduzierbarkeit liegt somit insgesamt bei 94%.

Die wichtigste biologisch-analytische Eigenschaft eines Nachweis-Assays ist die diagnostische Sensitivität [381]. Sie beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass eine korrekte Zusammensetzung von *Lefteria* (kein pflanzlicher Inhaltsstoff fehlt), auch als solche erkannt wird und gibt den Anteil der Proben an, die korrekt positiv analysiert werden (richtig-positiv). Demgegenüber steht die sog. diagnostische Spezifität [381]. Sie gibt in einem Test den Anteil der Proben an, bei denen die Abwesenheit eines Targets korrekt erkannt wird (richtig-negativ).

Tab. 4.11: Sensitivitätsanalyse von Lefteria und Proben, bei denen jeweils ein Pflanzeninhaltsstoff fehlt.

	Lefteria	Bärlauch / Mistel	Bärlauch / Weißdorn	Mistel / Weißdorn
Reproduzierbarkeit	11/12	10/12	12/12	12/12
Sensitivität	13/15 ^a	14/15 ^b	13/15 ^c	11/15 ^d

^a In zwei Fällen fehlte die Bande für Bärlauch *msl*.

^b Einmal waren alle drei Banden vorhanden (wohl Pipettierfehler).

^c Nur die Bande von Weißdorn *trnL-trnF* war vorhanden; alle drei Banden waren sichtbar.

^d Einmal war nur die Bande von Weißdorn *trnL-trnF* zu erkennen; dreimal waren alle drei Banden vorhanden (Pipettierfehler).

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität wurden 15 verschiedene Lefteria- bzw. 1:1 Mischproben mittels Triplex-PCR analysiert. Von 15 korrekt zusammengesetzten Lefteria-Proben wurden auch 13 als solche erkannt. Bei den Mischproben wurde das Fehlen einer der drei Pflanzen zwischen elf und 14 Mal richtig nachgewiesen. Es ergibt sich eine diagnostische Sensitivität von 87% für den entwickelten Triplex-Assay, d.h. die Inhaltsstoffe einer nach Herstellerangaben zusammengesetzten Lefteria-Tablette werden mit 87% Wahrscheinlichkeit identifiziert. Dementsprechend beträgt die Unempfindlichkeit, also die Wahrscheinlichkeit, trotz Anwesenheit aller drei Pflanzen ein negatives Testergebnis zu erhalten 13%. Die diagnostischen Spezifitäten berechnen sich zu 73% (Fehlen von Bärlauch), 87% (Mistel) und 93% (Weißdorn). Aus den Ergebnissen der PCR ergibt sich somit eine diagnostische Effizienz von 85% (51 von 60). Es besteht also eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass erzielte Laborergebnisse richtig sind. Tab. 4.11 fasst die Ergebnisse der Tests auf Reproduzierbarkeit und Sensitivität zusammen. Im Vergleich mit ähnlichen Studien oder chemisch-physikalischen Nachweismethoden, liegen die erhaltenen Werte etwa auf gleichem Niveau [381–383].

4.2.1.9 Zwischenfazit: Multiplex-PCR

Insgesamt 20 Sequenzen wurden hinsichtlich Einsetzbarkeit als pflanzenspezifische Marker untersucht. Mit nur ca. 50% der Primerpaare konnten Amplifikate generiert werden. Auf Basis dieser Erfahrungen ist das Vorhandensein ausreichender Sequenzinformation das entscheidende Kriterium für die erfolgreiche Entwicklung einer DNA-basierten Identifikationsdiagnostik für Pflanzen. Sind, wie im vorliegenden Fall, nur sehr wenige Informationen verfügbar, besteht die Wahrscheinlichkeit, keine geeigneten Target-Sequenzen zu finden. Eine zumindest teilweise Genomsequenzierung ist dann nach Kosten-/Nutzenabwägung einem aufwendigen Primer-Screening vorzuziehen.

Der entwickelte Assay ermöglicht die parallele Detektion aller drei Pflanzen mit Hilfe von Primerpaaren gegen die drei Target-Sequenzen Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF*. Voraussetzung dafür waren umfangreiche Optimierungen bezüglich Annealing-Temperatur, Primerkonzentration sowie PCR-*enhancer*. Es konnte bestätigt werden, dass mehr Primer in einem

Tab. 4.12: Zusammenfassung der analytischen Leistungsfähigkeit der entwickelten Multiplex-PCR.

Spezies	analytische Spezifität	Nachweisgrenze [ng]	Reproduzierbarkeit [%]	diagnostische Sensitivität [%]	diagnostische Spezifität [%]
Bärlauch	+	15–25			73
Mistel	+	25–50	94	87	87
Weißdorn	+	5–10			93

Ansatz PCR-inhibierend wirken [154]. Für zukünftige Etablierungen ähnlicher Anwendungen ist eine entsprechende Prozedur, trotz des nicht unerheblichen Zeitaufwands im Rückblick auf die erreichte Verbesserung zu empfehlen. Auf den Einsatz von *enhancern* kann verzichtet werden.

Mit den Arbeiten zur qualitativen PCR konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis der Lefteria-Inhaltsstoffe durch PCR möglich ist. In begrenztem Maß ist sogar die Detektion von DNA-Konzentrationsunterschieden machbar. Tab. 4.12 stellt die wichtigsten Leistungsmerkmale des entwickelten Assays zusammen. Im Gegensatz zu klassisch verwendeten chromatographischen Identifikationsmethoden, ist es durch PCR möglich, schnell und einfach zwischen den drei Pflanzen zu diskriminieren. Dabei bewähren sich vor allem Spacer-Sequenzen von RNA-Genen als spezifische Targets (vgl. 4.3.10). Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass der Aufbau einer DNA-basierten und parallelen Identifikation pflanzlicher Inhaltsstoffe realisierbar, aber eine sorgfältige Auswahl von Sequenzen und Amplifikationsbedingungen voraussetzt. Protokolle für die einfache PCR lassen sich nicht direkt auf eine Multiplex-PCR übertragen.

Trotz der erreichten guten Sensitivität wurde versucht, durch Einsatz einer *state-of-the-art*-Varianten der PCR die Leistung des Nachweises zu erhöhen. Denn mit einer Wahrscheinlichkeit von rund 80% für eine korrekte Analyse ist eine Aussage des Multiplex-Assays nicht vollkommen sicher oder verlangt eine Vielzahl an Mehrfachmessungen. Im nächsten Abschnitt wird daher geschildert, wie auf Basis des Triplex-Assays eine Weiterentwicklung zu einer Nested-PCR realisiert werden kann. Darüber hinaus wird gezeigt, dass sich die Gelelektrophorese durch ein *lab-on-a-chip*-System ersetzen lässt.

4.2.2 Nested-PCR

Die Nested-PCR ist eine Modifikation der konventionellen PCR und wurde zur Steigerung von Spezifität und Sensitivität entwickelt. Erreicht wird dies, indem zwei PCR ineinander geschachtelt werden. Reaktionsmischung der ersten Amplifikation dient als Template für eine zweite PCR. Dazu wird ein zweites Primerpaar (Nested-Primer) verwendet, das innerhalb der Sequenz des ersten Amplifikats ein verkürztes DNA-Fragment amplifiziert (Abb. 4.39). Das Primerdesign ist vergleichbar mit dem in Anhang A.1.3 beschriebenen. Tab. 4.13 gibt eine Übersicht über die für die Nested-PCR verwendeten Primerpaare. Annealing-Temperaturen und Konzentrationen wurden erneut nach dem gleichen Schema wie in 4.2.1 experimentell evaluiert.

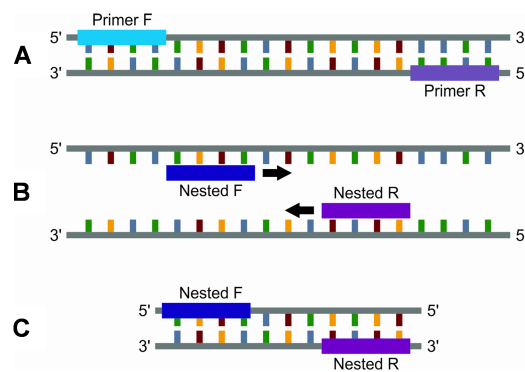


Abb. 4.39: Schematische Darstellung einer Nested-PCR. (A) Zunächst erfolgt eine konventionelle PCR, (B) anschließend wird 1 µL des ersten PCR-Ansatzes in eine zweite Reaktion appliziert. (C) Hier erfolgt die Amplifikation mit den Nested-Primern innerhalb des Amplifikats der ersten Reaktion.

Tab. 4.13: Zusammenfassung der Experimente zur Optimierung der Nested-PCR-Bedingungen.

Triplex-Target	Amplikonlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]	Primerkonz. [nmol/L]	PCR- <i>enhancer</i>
Bärlauch <i>msl</i>	346	62	200	
Mistel <i>trnH-trnK</i>	272	62	200	keine
Weißdorn <i>trnL-trnF</i>	576	62	400	

Für eine Umsetzung des Multiplex-Assays als Nested-PCR sind verschiedene Formate denkbar (Abb. 4.40). Im einfachsten *one-tube*-Fall werden dem PCR-Ansatz alle sechs Primerpaare zugesetzt. Das zweistufige PCR-Protokoll wird für die ersten 20 Zyklen mit 62 °C (optimale Annealing-Temperatur des Triplex-Assays) im Annealing-Schritt durchgeführt, dann wird die Annealing-Temperatur für weitere 20 Zyklen auf 59 °C (ideale Annealing-Temperatur der Nested-Primer) erniedrigt. Für die *one-tube/one-tube*-Nested-PCR diente das Protokoll von McGoldrick *et al.* (1999) [384] als Grundlage. Im ersten Schritt wird zunächst der ursprüngliche Triplex-Assay für 20 bzw. 40 Zyklen durchgeführt. Eine separate zweite PCR wird anschließend mit 1 µL der ersten PCR-Mischung sowie den Nested-Primern durchgeführt. Beim dritten *one-tube/three-tubes*-Format wird nach dem Triplex-Assay je 1 µL Reaktionsmischung auf drei neue PCR-Gefäße aufgeteilt. Parallel erfolgen dann drei einzelne PCR mit den Nested-Primern.

Wie aus Abb. 4.41 hervorgeht, funktioniert ein reiner *one-tube*-Ansatz nicht, nur das Target Bärlauch *msl* wird amplifiziert. Die Probleme werden hier aller Voraussicht nach durch die insgesamt zwölf Primer in einem Reaktionsgefäß hervorgerufen. Die Wahrscheinlichkeit für Primerinteraktionen nimmt proportional mit ihrer Anzahl zu [385]. Die anderen beiden Nested-Formate eignen sich beide sehr gut. Ein Vergleich der Bandenintensitäten (Alpha DigiDoc) beweist auch die deutlich gesteigerte Amplifikationseffizienz zwischen konventioneller Multiplex- und Nested-PCR (Daten nicht gezeigt). Mit der Kombination aus 20 Zyklen im ersten und 40 Zyklen im zweiten Amplifikationsdurchgang wird ein Maximum an PCR-Produkt generiert. Eine weitere Steigerung der Zyklenanzahl bringt keine weitere Verbesserung der PCR-Produktausbeute.

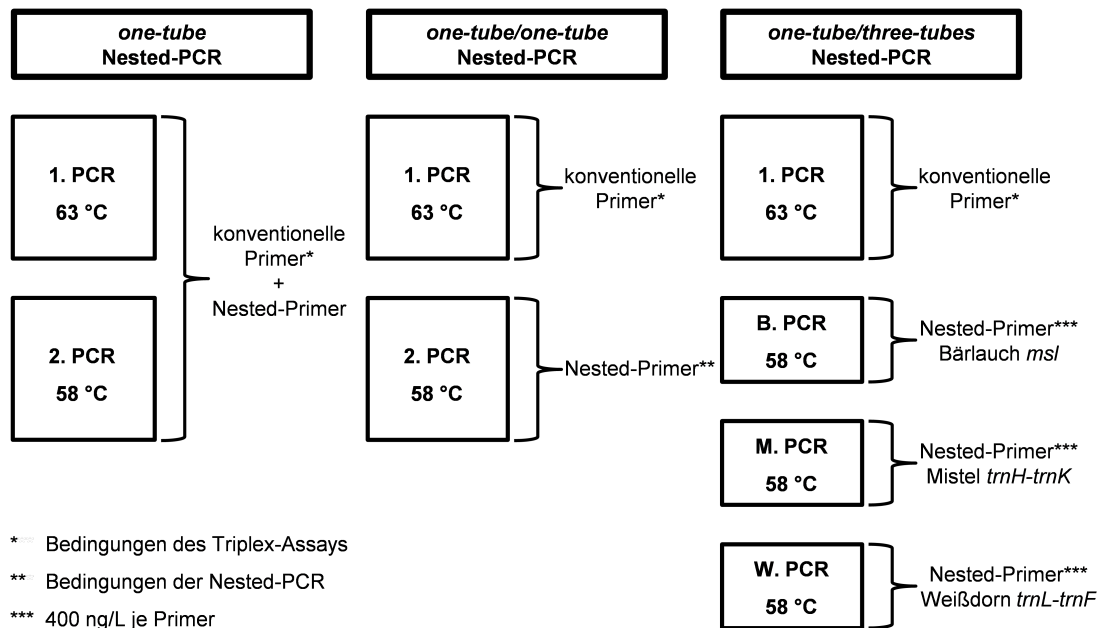


Abb. 4.40: Übersicht über die verwendeten Varianten der Nested-PCR.

Insgesamt ist der *one-tube/one-tube*- dem *one-tube/three-tubes*-Ansatz aufgrund des weiterhin erhaltenen *multiplexings* vorzuziehen, da so der Arbeits- und Zeitaufwand geringer gehalten werden kann. Diese Art des Ansatzes wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

4.2.2.1 Analytische Leistungsmerkmale

Die analytische Spezifität wurde analog zu 4.2.1.5 analysiert. Abb. 4.42 zeigt alle vier *one-tube/one-tube*-Ansätze mit verschiedenen DNA-Proben. Die Nested-PCR ist ebenfalls vollständig spezifisch für die drei Heilpflanzen, da für Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA jeweils nur die erwartete Bande zu sehen ist. Alle drei Targets werden erwartungsgemäß nur aus *Lefteria* (Abb. 4.42d) nachgewiesen. Die gesteigerte Amplifikationseffizienz verhindert allerdings eine semiquantitative Auswertung. Es wurden dafür erneut Proben mit unterschiedlichen Mengen jeweils einer Pflanzen-DNA (0–100 ng) allein sowie vor einem DNA-Hintergrund (je 33 ng der anderen beiden Pflanzen) untersucht. Dabei waren keine Intensitätsunterschiede der Banden detektierbar, d.h. es gibt keinen dynamischen Messbereich (Abb. 4.43). Dies liegt an der hohen Effizienz dieser Nested-PCR, da zum einen insgesamt 60 Zyklen durchlaufen werden und zum anderen nach den 20 initialen Zyklen fast nur noch das ursprüngliche Amplifikat und kaum mehr genomische DNA als Template dient.

Abb. 4.43 verdeutlicht darüber hinaus die hohe Qualität des Nachweises. Ist DNA einer Pflanze in der Probe vorhanden, wird dies als positiv angezeigt, fehlt die DNA, so ist auch der Test negativ. Im Gegensatz zum Triplex-Assay ist dabei auch bei der geringsten getesteten Menge von 1 ng DNA im Ansatz jeweils noch eine Bande zu erkennen. Als ein Ersatz für die Agarose-Gelelektrophorese wurde in diesem Zusammenhang der 2100 Bioanalyser (Agilent, Santa Clara, USA) mit Agilent

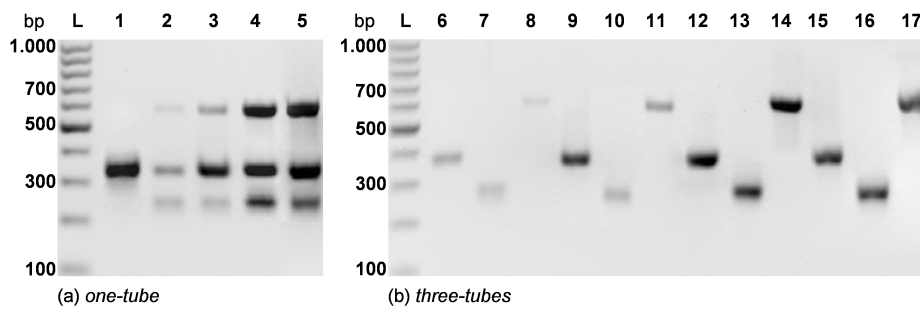


Abb. 4.41: Test verschiedener Formate der Nested-PCR. Die *one-tube*-Ansätze gliedern sich in ein reines *one-tube*- (Spur 1) und vier *one-tube/one-tube*-Formate (a): Erste PCR mit 20 Zyklen, dann zweite PCR mit erneut 20 Zyklen (Spur 2); 40 Zyklen, dann 20 Zyklen (Spur 3); 20 Zyklen und 40 Zyklen (Spur 4); zweimal 40 Zyklen (Spur 5). Bei den *one-tube/three-tubes*-Formaten (b) wurden jeweils nacheinander die PCR der Targets Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF* aufgetragen. Es wurden die gleichen Kombinationen von Zyklen wie zuvor getestet: 20 Zyklen / 20 Zyklen (Spuren 6–8); 40 Zyklen / 20 Zyklen (Spuren 9–11); 20 Zyklen / 40 Zyklen (Spuren 12–14); 40 Zyklen / 40 Zyklen (Spuren 15–17). Die Zuordnung der Targets *msl* (346 bp), *trnH-trnK* (272 bp) und *trnL-trnF* (576 bp) ermöglicht ein 100 bp Größenstandard.

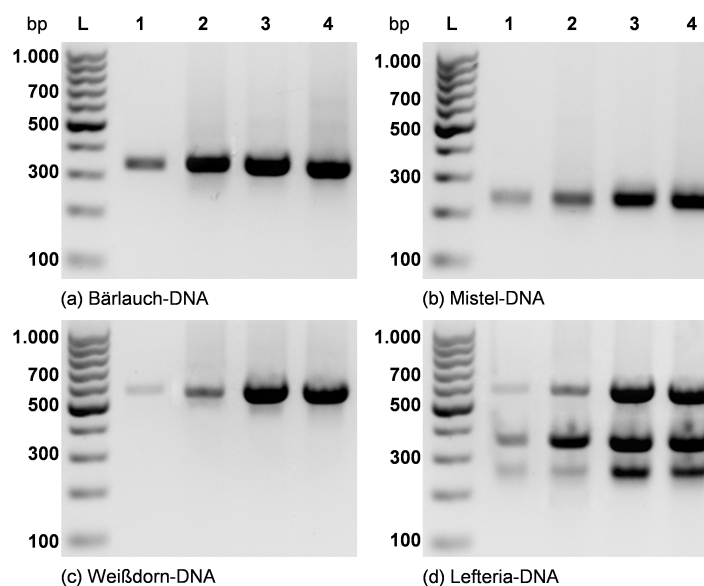


Abb. 4.42: Analytische Spezifität aller Nested-Primerpaare. Auf 1,5%igen Agarosegelen sind jeweils PCR mit folgende Zyklen aufgetragen: 100 bp Ladder (Spur L), 20 Zyklen / 20 Zyklen (Spur 1), 40 Zyklen / 20 Zyklen (Spur 2), 20 Zyklen / 40 Zyklen (Spur 3) und 40 Zyklen / 40 Zyklen (Spur 4). Die Test wurden mit allen vier DNA-Spezies durchgeführt.

DNA 7500 Kit getestet. Bei diesem Gerät wird die Trennung und Analyse der PCR-Produkte kapillarelektrophoretisch auf der Basis von Mikrofluidtechnik als *lab-on-a-chip*-Technologie realisiert. Diese Technik verkürzt die Analysedauer. Die Proben mit „Fremd“-DNA-Hintergrund wurden daraufhin erneut analysiert. Wie aufgrund der Agarosegele zu erwarten, sind keine Unterschiede messbar, d.h. die detektierten relativen Fluoreszenzintensitäten (RFU) sind stets sehr ähnlich, was einen quantitativen Ansatz ausschließt. Abb. 4.44 zeigt beispielhaft die Elektropherogramme der jeweils nur 1 ng DNA enthaltenen Proben und veranschaulicht die ansprechende Art der Detektion.

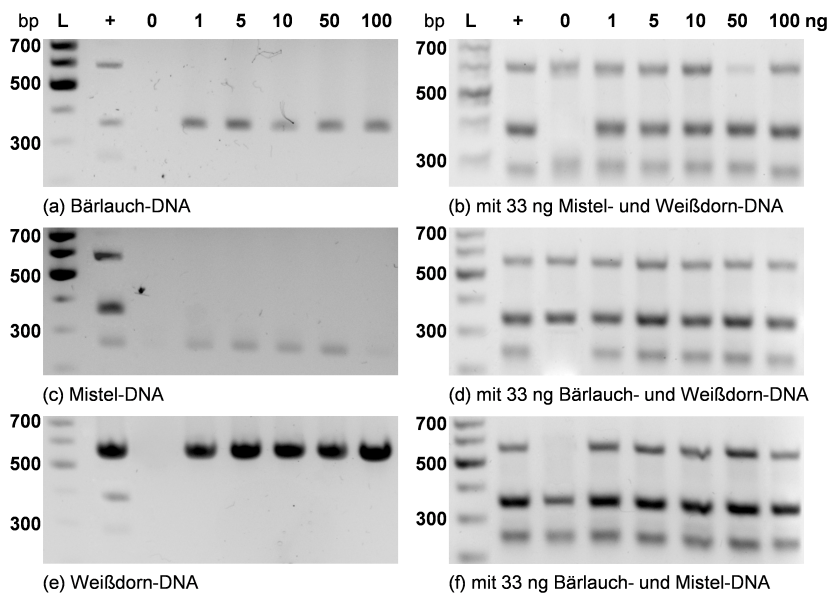


Abb. 4.43: Test verschiedener Konzentrationsstufen der unterschiedlichen DNA-Typen. Die DNA wurde in Verdünnungsstufen jeweils einzeln (a, c und e) und in Anwesenheit von „Fremd“-DNA (b, d und f) mittels *one-tube/one-tube*-Nested-PCR (20 Zyklen / 40 Zyklen) analysiert. Als Positivkontrolle (+) diente 100 ng *Listeria*-DNA.

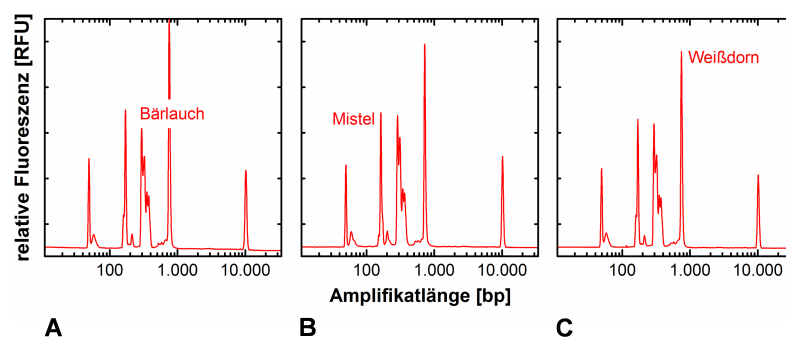


Abb. 4.44: Elektropherogramme von 1 ng DNA-Proben. (A) Die Bärlauch-Proben enthalten zudem jeweils 33 ng Mistel- und Weißdorn-DNA. (B) Bei Mistel und (C) bei Weißdorn sind die Zusammensetzungen entsprechende vertauscht. Der Peaks bei 50 bzw. 10.000 bp werden von den *lower* und *upper markers* des Bioanalyzers verursacht. Die drei mittleren Peaks lassen sich aufgrund der bekannten Amplifikatlängen zuordnen: Mistel *trnH-trnK* (272 bp), Bärlauch *mst* (346 bp), Weißdorn *trnL-trnF* (576 bp).

Da sich Nachweisgrenzen bzw. analytische Sensitivitäten unter 1 ng DNA pro PCR-Ansatz abzeichneten, wurden zu ihrer Bestimmung dekadische Verdünnungsreihen von 10^{-3} – 10^2 ng DNA erstellt und untersucht. Abb. 4.45 zeigt die Analyse der Verdünnungen reiner Pflanzen-DNA. Bei Weißdorn beweist sich der Vorteil des Bioanalyzers, die 0,1 ng Probe ist nur mittels Kapillarelektrophorese detektierbar. Die Versuche mit *Listeria*-DNA sind vollkommen konsistent (Ergebnisse nicht gezeigt). Mittels des entwickelten Nested-PCR-Formats konnten bei gleicher analytischer Spezifität im Vergleich zum konventionellen Multiplex-Assay die analytischen Sensitivitäten auf 0,1 ng (0,002 ng/ μ L PCR-Ansatz) Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA verbessert werden. Dies ist eine Steigerung um etwa das 200-fache.

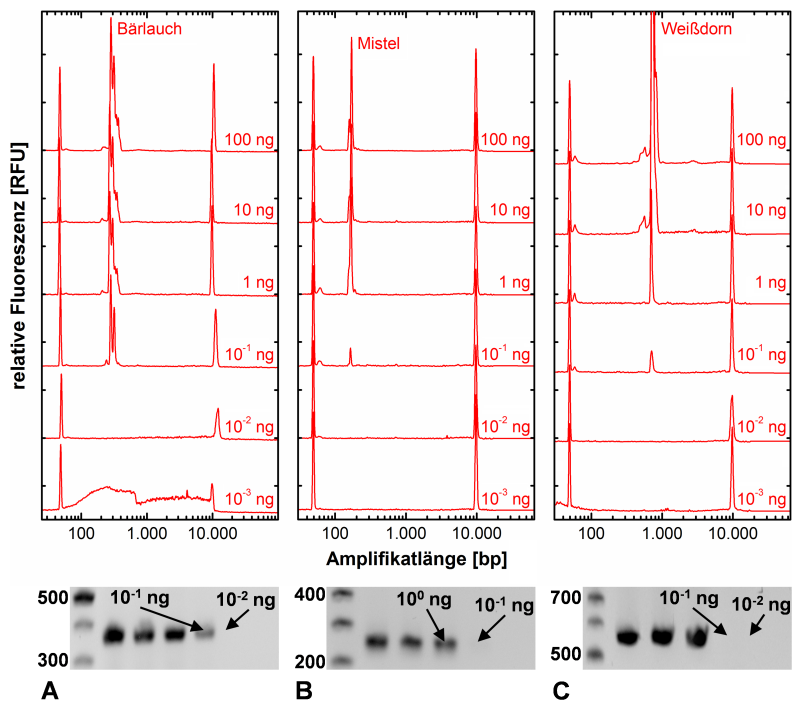


Abb. 4.45: Bestimmung der Nachweisgrenzen der Nested-PCR. (A) Bei Bärlauch liegt die Nachweisgrenze bei 0,01–0,1 ng DNA, dies ist sowohl gelelektrophoretisch als auch mittels Bioanalyser so zu detektieren. (B) Ähnlich verhält es sich für Mistel und (C) für Weißdorn. Wobei sich bei Weißdorn die erhöhte Sensitivität der Kapillarelektrophorese gegenüber der konventionellen Gelanalyse zeigte.

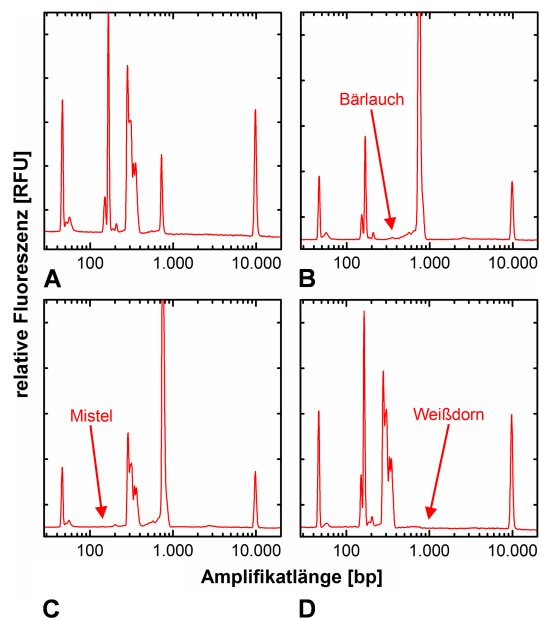


Abb. 4.46: Diagnostische Sensitivität und Spezifität des Nested-PCR-Assays. (A) Gezeigt ist Lefteria-DNA als Referenz und (B–D) jeweils eine Probe bei der ein Pflanzeninhaltsstoff fehlte. Dieses Fehlen wurde mit hoher Sicherheit auch detektiert.

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität wurden 24 Proben Lefteria-DNA isoliert, daneben wurden je 24 im Verhältnis 1:1 zusammengesetzte DNA-Proben aus jeweils zwei Pflanzen hergestellt. An allen Proben wurde das *one-tube/one-tube*-Protokoll durchgeführt

Tab. 4.14: Diagnostische Leistungsfähigkeit der Nested-PCR.

	Lefteria	Bärlauch / Mistel	Bärlauch / Weißdorn	Mistel / Weißdorn
Reproduzierbarkeit	12/12	12/12	12/12	12/12
Sensitivität	24/24	24/24	24/24	24/24

Tab. 4.15: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung des Nested-PCR-Assays hinsichtlich einer qualitativen Analyse von Lefteria-Tabletten.

Spezies	analytische Spezifität	Nachweis- grenze [ng]	Reproduzier- barkeit [%]	diagnostische Sensitivität [%]	diagnostische Spezifität [%]
Bärlauch	+	0,1			100
Mistel	+	1	100	100	100
Weißdorn	+	0,1			100

und die PCR-Ergebnisse mittels Bioanalyser visualisiert (Abb. 4.46). In diesem Zusammenhang wurde analog zu 4.2.1.8 auf Reproduzierbarkeit getestet. Die Reproduzierbarkeit ist optimal. Wie aus Tab. 4.14 ersichtlich wird, konnten auch Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum konventionellen Assay auf 100% erhöht werden. Bei keiner der insgesamt 96 Proben wurde eine Abweichung vom erwarteten Ergebnis beobachtet.

4.2.2.2 Zwischenfazit: Nested-PCR

Nach Optimierung von PCR-Bedingungen und Evaluation des am besten geeigneten Nested-PCR-Formats, steht ein qualitativer Nachweis der Lefteria-Inhaltsstoffe zur Verfügung, der die in Tab. 4.15 zusammengefassten Leistungsmerkmale aufweist. Insgesamt zeigt die Nested-PCR bei gleicher Spezifität gegenüber dem konventionellen *multiplexing* den Vorteil einer um etwa zwei Zehnerpotenzen geringeren Nachweisgrenze. Darüber hinaus liegt die diagnostische Effizienz bei 100%, d.h. es gibt keine fehlerhafte Detektion, sowohl bei originalem Lefteria als auch bei Fehlen eines Inhaltsstoffs. Die Nested-PCR ist ein rein qualitativer Test. Aufgrund ihrer gegenüber konventioneller PCR deutlich gesteigerten Effizienz, wird stets maximale Amplifikatmenge (Inhibierung durch Reagenzienbegrenzung) generiert, sobald die Template-Menge über der Nachweisgrenze liegt.

Obwohl das Multiplex-Format im Vergleich mit Einzelansätzen eine gewisse Zeitersparnis bedeutet, dauert die entwickelte Multiplex- bzw. Nested-PCR-Analyse inklusive analytischer Elektrophorese mindestens vier Stunden. Die vor kurzem neu entwickelte *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) verspricht eine drastisch verkürzte Analysezeit bei hoher Spezifität und Sensitivität [386]. Daher wurde im Folgenden versucht, für die etablierten Targets ein LAMP-Protokoll als eine Art Schnelltest zum Nachweis der Lefteria-Inhaltsstoffe zu entwickeln und nach denselben Kriterien wie zuvor bei den PCR zu bewerten.

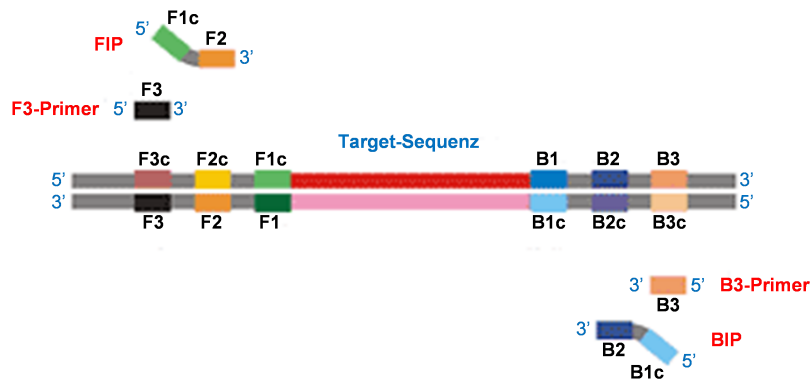


Abb. 4.47: Primerdesign für die LAMP-Reaktion. Zum besseren Verständnis sind die sechs Regionen individuell gefärbt dargestellt, c sind die komplementären Regionen. Die zwei inneren Primer FIP und BIP und die äußeren Primer F3 und B3 sind essentiell für LAMP. FIP und BIP sind Hybride, zusammengesetzt aus F1c und F2 bzw. B1c und B2.

4.2.3 Loop-mediated isothermal amplification

LAMP ist eine erst etwa zehn Jahre alte Technik und geht auf die Arbeiten von Notomi *et al.* (2000) [386] zurück. Der neuartige Ansatz zur Nukleinsäureamplifikation nutzt eine Einschrittreaktion unter isothermen Bedingungen bei Verwendung nur eines einzigen Enzyms. Dies macht den Geräteaufwand minimal. Die Amplifikation dauert 30–60 min und wird bei 58–65 °C durchgeführt. Im Vergleich mit der konventionellen PCR ist die Durchführung von LAMP sehr einfach und schnell [386–388]. Möglich wird dies durch die *Bst*-DNA-Polymerase aus *Geobacillus stearothermophilus*. Sie besitzt keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, wodurch ein enzymatischer anstatt des thermischen Strangaustauschs möglich ist [389].

4.2.3.1 Primerdesign

Charakteristisch für LAMP ist die Nutzung von vier verschiedenen Primern, welche speziell so entworfen sind, sechs individuelle Regionen innerhalb der Target-Sequenz zu binden. Für die Identifizierung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn mit LAMP wurden, basierend auf den gemachten Erfahrungen mit den qualitativen PCR-Analysen, nur Target-Sequenzen verwendet, deren Spezifität schon nachgewiesen worden ist: Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF*.

Das Primerdesign erfolgte mit der Software PrimerExplorer V4¹⁰. Abb. 4.47 zeigt schematisch die sechs Bindestellen (B1–B3 und F1–F3) sowie die vier Primer, die für jede Pflanze entworfen wurden. Der *forward inner primer* (FIP) besteht am 3'-Ende aus der F2-Region, welche komplementär zur F2c-Region (c = komplementär) ist und am 5'-Ende aus der F1c-Region. Innerhalb des Primers sind F2 und F2c durch einen TTTT-Spacer (*loop*-Region) getrennt. Der F3-Primer besteht aus der F3-Region und ist komplementär zur F3c-Region. Dementsprechend besteht

¹⁰<http://primerexplorer.jp/e/>

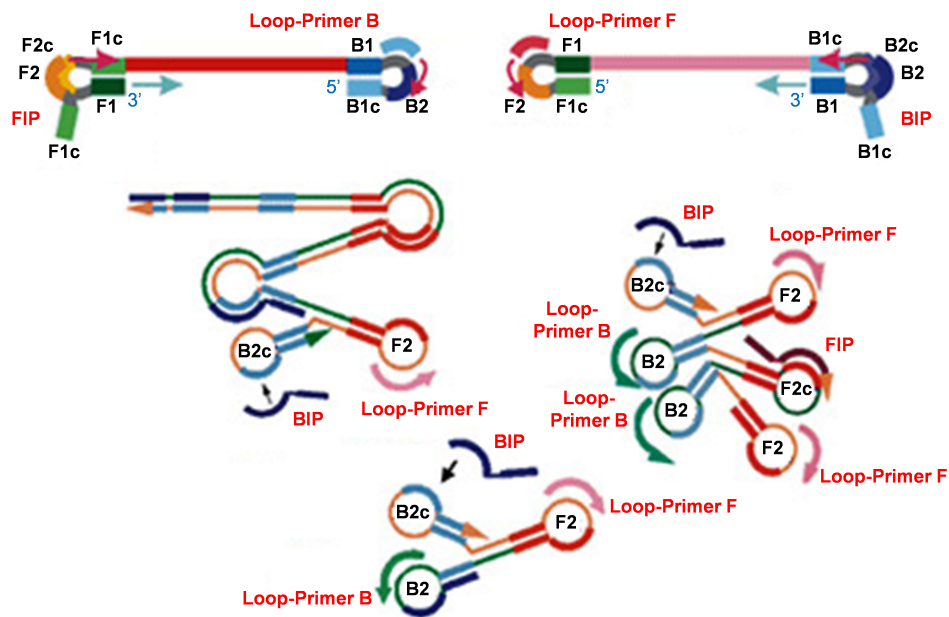


Abb. 4.48: Die *loop*-Primer bestehen aus Sequenzen, die komplementär zur einzelsträngigen *loop*-Region (zwischen F1 (B1) und F2 (B2)) am 5'-Ende der Hantelstruktur sind. Dies erhöht die Anzahl an Startpunkten für die DNA-Synthese mit der LAMP-Methode. Bei der im Beispiel dargestellten Struktur mit sechs *loops* würden ohne die *loop*-Primer vier der *loop*-Regionen nicht verwendet werden.

der *backward inner primer* (BIP) aus den Regionen B2 und B1c und der B3-Primer aus der B3-Region. Neben den üblichen Vorgaben zum Primerdesign hinsichtlich Schmelztemperatur (T_m), GC-Gehalt und Stabilität der Primerenden, wurde (unter Berücksichtigung von „A Guide to LAMP primer designing“¹¹) eine Distanz von 120–180 bp zwischen dem 5'-Ende von F2 und B2 und 0–20 bp zwischen F2 und F3 bzw. B2 und B3 eingehalten. Eine mögliche Bildung von Sekundärstrukturen wurde ebenfalls mit PrimerExplorer ausgeschlossen. Die Sequenzen der entworfenen Primer und Regionen sind A.4.3 zu entnehmen. Ebenso ist jeweils die Lage der Primer auf den Target-Sequenzen aufgelistet.

Zusätzlich zu den zwölf essentiell benötigten Primern wurden sechs *loop*-Primer (je ein *loop*-Primer F und B pro Pflanze) entworfen. Abb. 4.48 demonstriert den Zweck dieser Primer. Die *loop*-Primer bestehen aus Sequenzen, welche komplementär zur einzelsträngigen *loop*-Region zwischen B1 und B2 bzw. F1 und F2 sind. Sie hybridisieren mit dem 5'-Ende der Hantelstruktur, die sich am Ende der ersten Amplifikationsphase bildet und erzeugen so eine höhere Anzahl an Startpunkten für die DNA-Synthese. Beim abgebildeten Beispiel ist ein Amplifikationsprodukt mit sechs *loops* gezeigt. Vier *loops* davon würden nicht genutzt werden, die Anwesenheit der *loop*-Primer macht alle *loops* zu Startpunkten für die LAMP. Dies führt zu einer Beschleunigung der Amplifikation. Bei der Evaluation der Primereigenschaften wurden die in Tab. 4.16 aufgeführten Temperaturen und Primerkonzentrationen bestimmt. Die Visualisierung der LAMP-Reaktionen erfolgte dafür mit Agarose-Gelelektrophorese (Daten nicht gezeigt).

¹¹http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf

Tab. 4.16: Experimentell bestimmte Primer-Eigenschaften für die LAMP-Reaktion. Aufgeführt sind jeweils zuerst die Temperaturen und daneben die Konzentrationen.

Primer	Annealing-Temperatur [°C] / Primerkonzentration [nmol/L]					
	Bärlauch		Mistel		Weißdorn	
F3	60	50	62	100	60	25
B3	61	50	59	100	60	25
FIP	65	200	64	200	63	200
BIP	64	200	64	200	65	200
Loop F	61	100	62	100	62	100
Loop B	61	100	63	100	60	100

4.2.3.2 Ablauf der Amplifikation

Zwischen 59 und 65 °C ist der DNA-Doppelstrang nicht mehr stabil, der FIP kann an den Template-Strang binden und initiiert analog zur PCR die DNA-Synthese. Anschließend bindet der F3-Primer an die F3c-Region und initiiert die Synthese des Komplementärstrangs. Am mit dem FIP gebildeten Strang kommt es wegen der internen Anlagerung von F1 und F1c zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur (*stem-loop*). Das 3'-Ende dieses Strangs dient als Template für die analoge DNA-Synthese, initiiert durch den BIP und den B3-Primer. Der freigesetzte Einzelstrang formt seine charakteristische Hantelstruktur und ist das Starttemplate für die anschließende exponentielle Amplifikationsphase (siehe Abb. 4.49). Der *stem-loop* initiiert an seinem 3'-Ende die Selbstverlängerung der Sequenz und das Annealing eines weiteren internen Primers führt wiederum zur DNA-Synthese, wobei der erste Strang verdrängt wird. Durch Wiederholung des Prozesses schreitet die Amplifikation der DNA voran. Dabei entstehen neben der ursprünglichen Target-Sequenz (F3c bis B3) unterschiedlich lange Amplifikationsprodukte, bestehend aus Multimeren der Target-Sequenz. Unter folgendem Weblink ist eine sehr anschauliche Animation der Reaktion verfügbar, welche das Prinzip verständlicher macht als jede Abbildung: www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html.

Die Detektion erfolgte stets visuell. Die bei LAMP entstehende DNA kann entweder durch Agarose-Gelelektrophorese oder direkt im PCR-Gefäß sichtbar gemacht werden. Schwer lösliches Magnesiumpyrophosphat, was mit Magnesiumionen aus dem Reaktionspuffer als Nebenprodukt bei der Amplifikation entsteht, verursacht eine Trübung der Reaktionslösung. Diese weiße Trübung kann aufgrund der enormen Menge an Amplifikationsprodukt, welches bei der LAMP entsteht, visuell beobachtet werden. Erfolgt eine Trübung der Reaktionslösung, indiziert dies die Anwesenheit des Targets in der Probe. Enthält das Reaktionsgefäß das amplifizierte Produkt, kann die Reaktion auch durch Zugabe von Ethidiumbromid mit einer UV-Lampe zum Leuchten gebracht werden. Alle drei Detektionsmethoden erlauben die qualitative Aussage, welche Pflanze in einer Probe anwesend ist. In der Folge wird beschrieben, wie eine qualitative LAMP für die Lefteria-Inhaltsstoffe etabliert worden ist. Es wurden alle drei Detektionsmethoden getestet und bewertet.

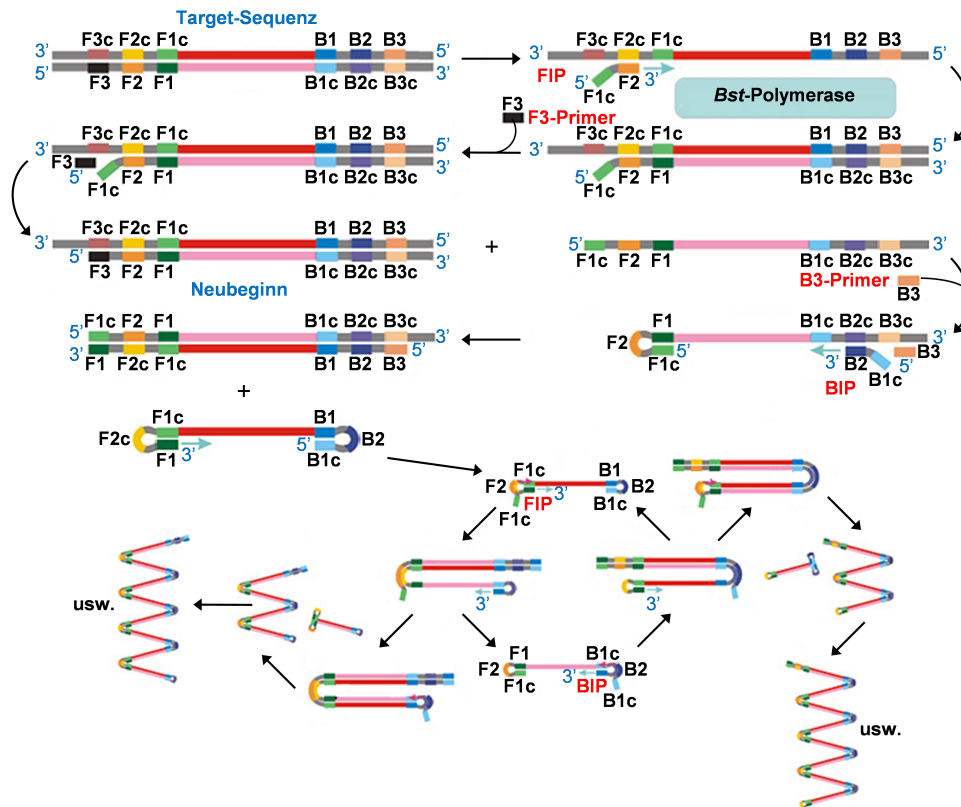


Abb. 4.49: Der Ablauf einer LAMP-Reaktion. Über 58 °C ist der DNA-Doppelstrang nicht mehr vollständig stabil, der FIP kann binden und die *Bst*-Polymerase synthetisiert einen neuen Strang. Der *F3-Primer* bindet an die F3c-Region, es folgt die Freisetzung des FIP-Komplementärstrangs, welcher als Template für die BIP- bzw. in der Folge B3-initiierte DNA-Synthese unter Verdrängung des BIP-Targetstrangs dient. Dieser freigesetzte Einzelstrang ist Startpunkt für die nachfolgende exponentielle Amplifikation.

4.2.3.3 LAMP-Nachweis für Bärlauch, Mistel und Weißdorn

Der LAMP-Assay wurde mit dem Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical, Tokio, Japan) durchgeführt. Für den LAMP-Assay wurde genomische DNA mit dem 2x Reaktionsmix (enthält den Reaktionspuffer, dNTPs und PCR-*enhancer*) und der *Bst*-Polymerase versetzt. Die DNA-Isolate wurden alle mit dem DNeasy Kit aufgereinigt. Alle Reaktionen konnten bei 59–65 °C in einem PCR-Thermocycler durchgeführt werden. Die Inaktivierung der Polymerase erfolgte danach bei 80 °C. Zunächst wurde geprüft, ob eine LAMP-Reaktion grundsätzlich möglich ist und welches Detektionsverfahren sich eignet.

Abb. 4.50 zeigt die Agarose-Gelelektrophorese von LAMP-Reaktionen mit allen drei Primersets, zunächst ohne *loop*-Primer. Die Amplifikationszeit betrug 80 min, um eine vollständige Reaktion zu garantieren. Aus den Spuren 1–3, 4–6 und 7–9 ist ersichtlich, dass LAMP zum Nachweis von Bärlauch, Mistel und Weißdorn sowohl aus reiner Pflanzen- als auch aus *Lefteria*-DNA funktioniert. Dabei sind die ursprüngliche Target-Sequenz und im äquidistanten Abstand ihre Dimere und Trimere noch leicht auszumachen. Mit zunehmender Größe der Amplifikate sind keine diskreten Banden mehr zu erkennen. Insbesondere veranschaulicht die Abbildung aber auch die

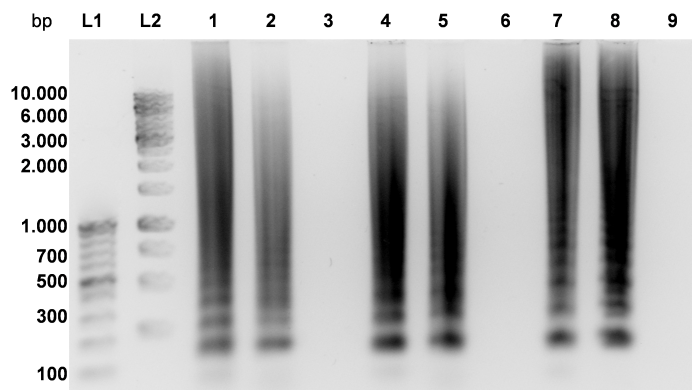


Abb. 4.50: Agarose-Gelelektrophorese zur Visualisierung von LAMP-Ergebnissen. Jeweils wurde die Reaktion in reiner Pflanzen- und Lefteria-DNA durchgeführt, daneben wurden eine NTC verwendet: Bärlauch-LAMP mit Bärlauch- (Spur 1), Lefteria-DNA (Spur 2) und NTC (Spur 3); analog dazu Mistel- (Spuren 4–6) und Weißdorn-LAMP (Spuren 7–9). Das Vorhandensein von großen Mengen an DNA (schwarzer Schmier) ist ein positiver Nachweis, die Abwesenheit, wie bei den NTC-Proben, zeigt einen negativen Test an.

sehr große Menge an DNA, die gebildet worden ist. Die Negativkontrollen sind erwartungsgemäß alle negativ. Die Abbildung verdeutlicht auch sehr eindringlich, dass LAMP nicht für *multiplexing* geeignet ist. Eine Unterscheidung der Amplifikate ist nahezu ausgeschlossen, erst recht in den im Folgenden beschriebenen Detektionsmethoden direkt im Reaktionsgefäß.

Zum Vergleich ist in Abb. 4.51 die visuelle Detektion im Reaktionsgefäß gezeigt. Die reine Trübung ist mit bloßem Auge zwar gut zu erkennen, lässt sich allerdings nur schwer photographisch aufnehmen und eignet sich daher nicht gut zum Dokumentieren von Ergebnissen. Deutlich anschaulicher sind die Ergebnisse nach Zugabe von 0,5 µg/mL Ethidiumbromid und anschließender UV-Exposition. Mit einer UV-Lampe und noch eindeutiger mittels Geldokumentationssystem lässt sich eine erfolgte Amplifikation belegen. Gegenüber der Elektrophorese gibt es einen entscheidenden Vorteil, der Nachweis erfolgt ohne Verzögerung direkt nach Ende der Amplifikation.

Anschließend wurde untersucht, wie viel Reaktionszeit für einen Nachweis nötig ist und inwieweit sich die Amplifikationsdauer durch Verwendung der *loop*-Primer verringert (Abb. 4.52). Überraschend sind die sehr unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen der drei Primersets ohne *loop*-Primer. Bei Bärlauch muss die Reaktion für 70 min (länger als die Herstellerangabe von 60 min), bei Mistel für 30 min und bei Weißdorn für 40 min erfolgen, um einen sicheren positiven Nachweis zu garantieren. Durch den Einsatz der *loop*-Primer lässt sich die Reaktionszeit auf 30 min (Bärlauch) und 20 min (Mistel bzw. Weißdorn) verringern. Das entspricht einer Zeitersparnis von rund 50%. Die Analyse ist damit um Faktor acht schneller als mit der PCR-Methode.

4.2.3.4 Analytische Leistungsmerkmale

In Anlehnung an die PCR-basierten Assays wurde die analytische Spezifität der LAMP überprüft. Mit jedem Primerset wurden LAMP-Reaktionen von Lefteria- und der entsprechenden Pflanzen-

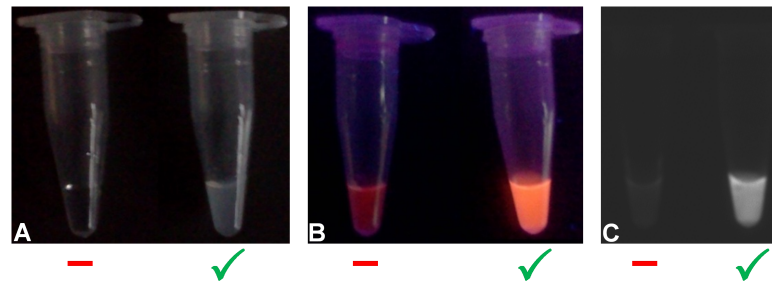


Abb. 4.51: Visualisierungstechniken direkt im Reaktionsgefäß. (A) Magnesiumpyrophosphat, das Nebenprodukt der Amplifikationsreaktion wird proportional zur Menge der amplifizierten DNA gebildet. Da die LAMP-Amplifikation sehr große Mengen an Amplifikaten produziert, kann eine weiße Trübung visuell beobachtet werden. Aufgrund dieser Eigenschaft indiziert die Trübung das Vorhandensein der Target-Sequenz in der Probe, was die Detektion sehr einfach gestaltet. (B) Enthält das Reaktionsgefäß neben den amplifizierten Produkten einen interkalierenden Farbstoff wie Ethidiumbromid, kann es mit einer UV-Lampe illuminiert werden. In Anwesenheit der Target-Sequenz ist die Fluoreszenzintensität sichtbar erhöht. (C) Auch mit einem speziellen UV-Tisch zur Auswertung von Agarosegelen ist eine Visualisierung möglich.

DNA als Positivkontrolle sowie von DNA der anderen beiden Pflanzen einzeln und in Kombination durchgeführt. Trotz der höheren Empfindlichkeit von LAMP gegenüber der PCR [390] zeigt Abb. 4.53, dass die Target-Sequenzen auch hier absolut spezifisch sind. Nur z.B. wenn eine Probe Bärlauch-DNA enthält, ist mit dem Bärlauch-Primerset eine Färbung zu beobachten (Abb. 4.53a), dies gilt in gleicher Weise für die beiden anderen Pflanzen. Die hohe Spezifität der LAMP wird durch die Verwendung von vier Primern mit sechs Zielsequenzen anstatt von nur zwei Primern erreicht [389], was unspezifische Amplifikation nahezu ausschließt und ein weiteres Mal bestätigt, dass die gewählten Targets pflanzenspezifisch sind.

Der dynamische Bereich und die Nachweisgrenzen jedes Primersets wurden mit drei achtfachen dekadischen Verdünnungsreihen von genomischer DNA von Bärlauch, Mistel und Weißdorn ermittelt (Abb. 4.54). Dies wurde hier nur noch vor einem Hintergrund von DNA der jeweils anderen beiden Pflanzen (je 33 ng pro Ansatz) durchgeführt, da sowohl bei der Triplex- als auch bei der Nested-PCR kein Einfluss von „Fremd“-DNA auf die Nachweisgrenzen nachgewiesen werden konnte. Mit Nachweisgrenzen von 0,1 ng DNA (0,002 ng/ μ L im Reaktionsansatz) für Bärlauch und 1 ng für Mistel und Weißdorn liegt die analytische Sensitivität von LAMP auf dem Niveau der Nested-PCR. Sie ist damit der konventionellen PCR deutlich überlegen. Da es sich um reine Endpunktbestimmungen handelt und die LAMP eine besonders hohe Amplifikationseffizienz aufweist [386], können keine dynamischen Messbereiche festgestellt werden, aus denen semiquantitative Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an Template gezogen werden könnten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Erneut wurde zur abschließenden Bewertung die diagnostische Effizienz auch dieser qualitativen Identifikationsmethode überprüft. Analog zur Multiplex- und Nested-PCR wurden in diesem Fall jeweils zwölf verschiedene *Lefteria*- und 1:1 Mischproben von reiner Pflanzen-DNA mittels LAMP

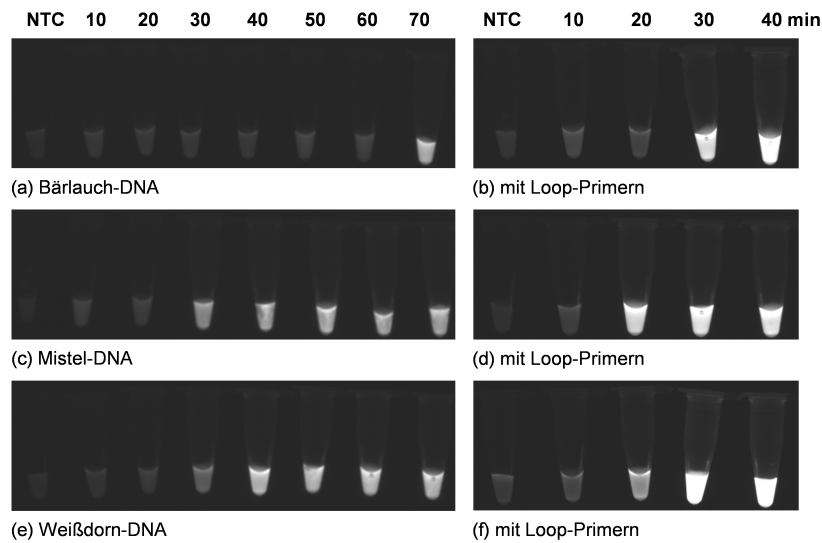


Abb. 4.52: Reaktionszeit der konventionellen LAMP-Amplifikationen. Dargestellt sind jeweils Fotos aufgenommen auf einem UV-Tisch von sieben LAMP-Proben (10–70 min) mit Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA mit entsprechenden FIP, BIP, F3- und B3-Primern (a, c und e). In b, d und f ist die Zeitersparnis durch die Zugabe der *loop*-Primer offensichtlich. Die Zeit, welche zur zum Erreichen des Intensitätsmaximums nötig ist, beträgt nur etwa ein Drittel bis die Hälfte. Mit den *loop*-Primern wird das Ende der Amplifikation innerhalb von 30 min erreicht. Die Negativkontrolle (NTC) enthält Wasser anstatt DNA.

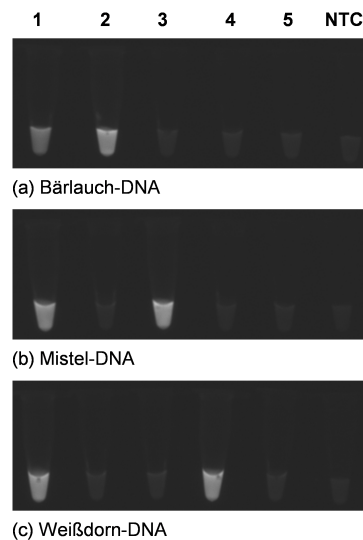


Abb. 4.53: Analytische Spezifität der LAMP. Sie wurde jeweils für die Primersets von Bärlauch *msl* (a), Mistel *trnH-trnK* (b) und Weißdorn *trnL-trnF* (c) untersucht. Die Reaktionsgefäße wurden den beinhaltenen Proben entsprechend wie folgt angeordnet: *Lefteria*-DNA (1), Bärlauch-, Mistel und Weißdorn-DNA (2–4) sowie eine 1:1 Mischung der jeweils nicht dem Primersets entsprechenden beiden Pflanzen-DNA (5). Als Negativkontrolle diente erneut Wasser anstatt DNA.

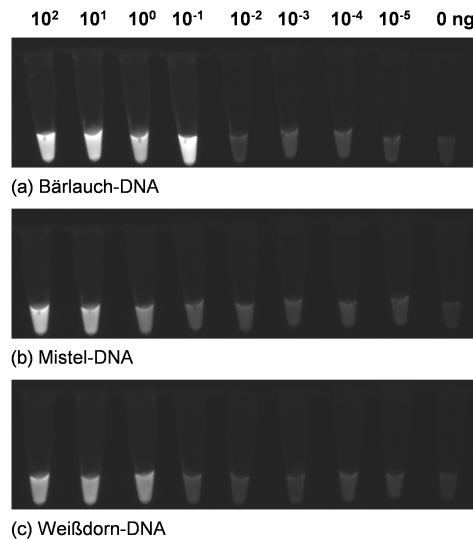


Abb. 4.54: Evaluierung der Nachweisgrenzen der LAMP-Reaktion für Bärlauch, Mistel und Weißdorn. Die jeweils verwendete Menge an Bärlauch- (a), Mistel- (b) und Weißdorn-DNA (c) ist über den abgebildeten Reaktionsgefäßen angegeben. Bei Ausbleiben von Fluoreszenz ist die Nachweisgrenze unterschritten.

untersucht. Da für LAMP keine parallele Analyse, d.h. kein *multiplexing* machbar ist, wurden die insgesamt 48 Proben jeweils in drei unabhängigen Reaktionen mit allen drei Primersets getestet. Die Reproduzierbarkeit wurde in Vierfachmessungen jedes Primersets an einer einzigen *Lefteria*-DNA-Probe untersucht. Tab. 4.17 fasst die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammen. Es konnte eine diagnostische Sensitivität von 100% und eine diagnostische Spezifität von 92% festgestellt werden. Auch für diesen Parameter sind Nested-PCR und LAMP vergleichbar genau. Ebenso ist die Reproduzierbarkeit optimal.

4.2.3.5 Zwischenfazit: *Loop-mediated isothermal amplification*

Sämtliche getestete Methoden zur Visualisierung der Amplifikation sind Endpunktbestimmungen und erlauben nur eine Diskriminierung zwischen positivem oder negativem Nachweis. Die DNA-Menge am Ende der Reaktion erlaubt zwar keine Korrelation mit der Ausgangskonzentration mehr, dafür eignet sich LAMP sehr gut als schneller Identifizierungsnachweis der drei Arzneipflanzen in *Lefteria*-Proben. Die experimentell bestimmten Leistungsmerkmale (Tab. 4.18) sind fast deckungsgleich mit denen der Nested-PCR. LAMP ist hochspezifisch, bietet Nachweisgrenzen jenseits der konventionellen PCR gepaart mit hoher diagnostischer Effizienz.

Der große Vorteil von LAMP gegenüber der PCR ist die einfache Handhabung und schnelle Durchführung. Es werden keinerlei aufwendige Laborgeräte benötigt. Die Proben sind schnell vorbereitet und nach 30 min Reaktionsdauer, z.B. in einem warmen Wasserbad, kann das Ergebnis direkt im Reaktionsgefäß beobachtet werden. Zudem bietet die Zugabe von Ethidiumbromid die Möglichkeit, die Ergebnisse optisch (Rotfärbung bei UV-Exposition) ansprechend zu präsentieren. Die ja/nein-Antwort ist am besten auf dem UV-Tisch auszumachen. Soweit vorhanden, empfiehlt

Tab. 4.17: Reproduzierbarkeit und Sensitivität in Bezug auf die Detektion des Fehlens eines der Lefteria-Inhaltsstoffe.

	Lefteria	Bärlauch / Mistel	Bärlauch / Weißdorn	Mistel / Weißdorn
	4/4			
Reproduzierbarkeit ^a	4/4	-	-	-
	4/4			
Sensitivität	12/12	11/12 ^b	10/12 ^c	12/12

^a Jeweils vier LAMP-Reaktionen mit je einem Primerset und einer Lefteria-Probe. Die „Fehl“-Proben wurden nicht untersucht.

^b In einem Fall war die Mistelprobe negativ.

^c Einmal war die Bärlauchprobe negativ, in einem anderen Fall alle drei Proben positiv.

Tab. 4.18: Zusammenfassung der Charakterisierung der LAMP-Reaktion.

Spezies	analytische Spezifität	Nachweis- grenze [ng]	Reproduzier- barkeit [%]	diagnostisch Sensitivität [%]	diagnostische Spezifität [%]
Bärlauch	+	0,1			92
Mistel	+	1	100	100	83
Weißdorn	+	1			100

sich daher diese Art der Auswertung für weitere Experimente. LAMP hat allerdings auch den einen Nachteil, kein *multiplexing* zu erlauben. Eine Differenzierung zwischen LAMP-Amplifikaten verschiedener Targets, d.h. in diesem Fall pflanzenspezifische Sequenzabschnitte, ist aufgrund der vielen verschieden langen Fragmente unmöglich.

Mit Hilfe eines speziellen Turbidimeter (Eiken Chemical) ist sogar eine Quantifizierung der LAMP-Reaktion möglich, welche schneller als *real-time* PCR funktionieren soll [391–393]. Ganz aktuell wurde ein entsprechendes Handlesegerät entwickelt [394]. Daneben ist ein Fluoreszenzreagenz (Eiken Chemical) kommerziell erhältlich, es enthält Calcein als Fluorophor welches durch Manganionen gequenchet ist. Während der Reaktion entstehende Pyrophosphationen binden Mangan, wodurch mehr und mehr Calcein fluoresziert. Neben einer visuellen Detektion (Grünfärbung) wurde dieses Mittel schon erfolgreich zur Quantifizierung verwendet. Dies ist umso interessanter, da kein Turbidimeter angeschafft werden muss. Die Reaktion wird in einem herkömmlichen *real-time* PCR-Thermocycler analysiert und wie eine normale *real-time* PCR ausgewertet [395]. Es konnten Nachweisgrenzen von wenigen 100 Kopien erreicht werden [396], was nahe der Sensitivität der *real-time* PCR liegt und im Vergleich auch besser als das Turbidimeter funktioniert [397].

Für zukünftige Experimente ist gerade dies eine interessante Option. In weiteren Ansätzen könnten die Bedingungen für eine quantitative LAMP evaluiert werden. Ein Vergleich mit dem *real-time* PCR-Assay (vgl. 4.3) könnte die Vor- und Nachteile beider Methoden weiter herausarbeiten, um so die quantitative Analyse von Lefteria vielleicht durch LAMP zu vereinfachen.

4.2.4 Zusammenfassung: Qualitative Nachweise der Lefteria-Inhaltsstoffe

Mit Hilfe der Primerpaare Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF* gegen die entsprechenden Target-Sequenzen in den drei Pflanzengenomen konnte die generelle Anwendbarkeit von DNA-basierten Methoden zur qualitativen Identitätsprüfung der pflanzlichen Inhaltsstoffe von Lefteria gezeigt werden.

Im Multiplex-Format konnten häufig beschriebene Probleme und Schwierigkeiten bestätigt und durch eine umfangreiche Optimierung der Reaktionsbedingungen gelöst werden. Somit können alle drei Pflanzen Bärlauch, Mistel und Weißdorn spezifisch detektiert werden, wobei Nachweisgrenzen von rund 25 ng genomische DNA erreicht wurden. Der gesamte Triplex-Assay lässt sich innerhalb von ca. 4 h durchführen und führt mit Wahrscheinlichkeiten um 80% zum richtigen Ergebnis.

Durch die Anwendung einer Nested-Multiplex-PCR auf die entwickelte Triplex-PCR konnte ohne erheblichen Mehraufwand die analytische Sensitivität um den Faktor von zwei Zehnerpotenzen (0,1 ng) verbessert werden. Dies führte ohne Verlust von Spezifität zu einer Steigerung der diagnostischen Effizienz auf 100%. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Proben, analysiert mit dieser Methode, stets richtig beurteilt werden.

Unlängst wurde die *loop-mediated isothermal amplification* als hoch spezifische und sensitive Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren entwickelt [386]. Diese Dissertation demonstriert, dass qualitative LAMP in der Lage ist, die pflanzlichen Inhaltsstoffe von Lefteria zu identifizieren. Im Vergleich mit den PCR-basierten Methoden zeichnet sich LAMP durch einen besonders einfachen und schnellen Nachweis aus. Darüber hinaus ist die Spezifität optimal und die Nachweisgrenzen niedrig, da hier ein Primerset seine Fähigkeit zur Bindung an sechs verschiedene Sequenzabschnitte beweisen muss, um zu einem Signal zu führen. Die diagnostische Effizienz ist dabei ähnlich der einer Nested-PCR.

Die Arzneibücher DAB und Ph.Eur. nennen als fortschrittlichste Nachweismethode für den Bereich der Arzneipflanzen den ELISA. Die Charakterisierung der hier entwickelten qualitativen Methoden zeigt dabei, dass die in diesem Kapitel vorgestellten Methoden zur Identifizierung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn über ein bezogen auf das Ausgangsmaterial niedrigeres Detektionslimit als vergleichbare ELISA verfügen [398]. Sie sind zudem in der Lage zwischen den einzelnen drei Pflanzen spezifisch unterscheiden zu können, womit die Analyse des Mischprodukts Lefteria gewährleistet ist und die Limitierung (Nachweis nur einer Pflanze, keine Analyse komplexer Proben) der morphologischen und chemisch-physikalischen Nachweismethoden überwunden wird. Insgesamt zeichnen sich besonders Nested-PCR und LAMP aus, welche je nach Einsatzart (viele Proben parallel oder schnell und einfach) zur Verwendung kommen sollten.

Im Rahmen der bisher dargestellten Ergebnisse wurde noch keine DNA-basierte Quantifizierung erbracht, die entwickelten Endpunktmethode haben dynamische Messbereiche von maximal zwei Dekaden, demgegenüber steht die *real-time* PCR, welche einen vier bis 13 Dekaden breiten dynami-

schen Amplifikationsbereich haben kann [399]. Fluoreszenzmessung anstatt Bandendensitometrie ermöglicht 100-fach höhere Sensitivität als die Endpunktbestimmungen [400] und ist in Hinblick auf Detektionslimit und Genauigkeit jeder anderen molekularbiologische Methode überlegen [401]. Daher wurde nachfolgend eine quantitative PCR-Methode etabliert. Die dazu notwendigen Arbeiten werden im folgenden Kapitel präsentiert. Es wird erläutert, warum eine Quantifizierung absolut erfolgen muss und welche experimentellen Konsequenzen dies hat. Die möglichen Target-Sequenzen werden genauer charakterisiert und ihre Einsetzbarkeit in verschiedenen Detektionsformaten wird demonstriert. Dabei steht stets Lefteria als Anwendungsbeispiel im Vordergrund.

4.3 Entwicklung eines Systems zur absoluten Quantifizierung der Lefteria-Inhaltsstoffe

Dass DNA-basierte Konzepte zum qualitativen Nachweis erfolgreich eingesetzt werden können, wurde umfangreich im vorangegangenen Kapitel diskutiert. Für die Zulassung pflanzlicher Präparate als Arzneimittel wird neben einer qualitativen Spezifizierung aber zusätzlich eine quantitative Analyse der pflanzlichen Inhaltsstoffe erwartet. Nach EU-Richtlinie CPMP/ICH/381/95 muss die quantitative Analyse die Untersuchung der Hauptkomponenten des Arzneimittels umfassen. Dieser Vorgabe folgend war das Ziel, eine *real-time* PCR-basierte Analyse zu entwickeln, die zwischen den drei pflanzlichen Lefteria-Bestandteilen Bärlauch, Mistel und Weißdorn diskriminieren kann. Anhand des Gehalts an DNA der einzelnen Pflanzen soll die Probenzusammensetzung bestimmbar sein. Für die Umsetzung der Aufgabenstellung wurden die folgenden Themen bearbeitet:

- Bioinformatische und experimentelle Validierung von für *real-time* PCR geeigneten spezifischen Targets
- Klonierung und Herstellung von entsprechenden DNA-Standards zur Normalisierung und Quantifizierung
- Aufklärung der DNA-Zusammensetzung von Lefteria-Mischproben und Korrelation mit der Pflanzenpulverzusammensetzung
- Methodvalidierung zum Nachweis der Eignung und zur Sicherung der Analysenqualität des entwickelten analytischen *real-time* PCR-Assays; gemäß ICH-Richtlinie¹² (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) wurden folgende Parameter untersucht und bewertet: Linearität, Nachweisgrenze, Spezifität und Sensitivität

Ähnlich dem Aufbau der qualitativen Analysen wurden zunächst mit einem Screening mögliche Target-Sequenzen hinsichtlich ihrer Spezifität für Bärlauch, Mistel und Weißdorn untersucht. Die Empfindlichkeit der *real-time* PCR ist zwischen 100- bis 10.000-fach höher als die konventioneller

¹²www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002874.pdf

PCR. Durch das spezielle optische Detektionssystem liegt die Nachweisgrenze bei der *real-time* PCR nur bei 2–20 pg PCR-Produkt [249, 402]. Das bedeutet, Primer, welche mit konventioneller PCR als speziesspezifisch erscheinen, können in der *real-time* PCR unspezifische Signal hervorrufen. Für die Spezifität der Primer ergibt sich somit eine besondere Herausforderung. Die Ergebnisse aus 4.2.1 konnten nicht vorbehaltlos übernommen werden. Es wurde verstärkt auf *its*-Sequenzen und *trn*-Spacer als Targets gesetzt, da sie als besonders speziesspezifisch gelten [174].

Im Folgenden wird zunächst die Etablierung geeigneter Target-Sequenzen erklärt. Bioinformatisch wurden aussichtsreiche Sequenzen gesucht und verglichen. Anschließend wurden Plasmidstandards generiert und der eigentlichen qPCR-Assay entwickelt. Es wurde die genaue DNA-Zusammensetzung von *Lefteria* aufgeklärt und der Assay hinsichtlich seiner Analyseleistung untersucht und beurteilt. Abschließend wurde das zunächst verwendete Detektionssystem SYBR Green I auf spezifische TaqMan-Sonden umgestellt. Dies ermöglicht eine *real-time* Multiplex-PCR.

4.3.1 Target-Sequenzen und Primerdesign

Potentielle Target-Sequenzen: Im Gegensatz zu Genexpressionsanalysen ist bei Arbeiten mit genomischer DNA oft keine relative Quantifizierung der Zielsequenzen im Vergleich zu einer nicht regulierten Referenz möglich (siehe Erläuterungen zu den verschiedenen Normalisierungsstrategien am Beispiel VEGF in Anhang A.2.4). Xue *et al.* (2008) [229] nutzten z.B. für eine relative Quantifizierung des Chinesischen Enzians (*G. macrophylla*) 5.8S rRNA als Referenzen. Dies war möglich, da diese rRNA-Sequenz aufgrund der Verwandtschaft zwischen den untersuchten Pflanzen hochgradig konserviert ist. Im Fall von Bärlauch, Mistel und Weißdorn ist in der GenBank keine derart konservierte Sequenz für alle drei Pflanzen zu finden. Für die rRNA-Gene als mögliche Referenz wurde z.B. ein multiples Sequenzalignment durchgeführt, welches maximal 27% Homologie zeigt. Das ist nicht ausreichend zum Design speziesspezifischer Primer. Daher wurde für den quantitativen Assay die absolute Quantifizierung gewählt. Um stets identische Standards bereitstellen und auch über längere Zeit lagern zu können, wurde auf stabile Plasmid-DNA als Standards gesetzt (vgl. 3.6.4). Diese hatte sich auch am Beispiel VEGF (A.2.4) bewährt. Eine Literaturrecherche stärkte die Erkenntnis, dass Spacer-Regionen als speziesspezifische molekulare Marker besonders geeignet sind. Abb. 4.55 zeigt die schon in 4.2.1.1 beschriebene Struktur der Spacer-Sequenzen. Sie sind aufgrund ihrer Häufigkeit im Genom besonders gut nachweisbar. In einem ersten Schritt wurden entsprechende Sequenzdaten der GenBank entnommen und bioinformatisch untersucht. Sämtliche bekannte Spacer-Sequenzen für *Allium*-, *Viscum*- und *Crataegus*-Spezies wurden mit den Programmen MegAlign¹³ und MEGA 3.1¹⁴ Sequenzalignments unterzogen (siehe A.1.3). Analysen auf *maximum parsimony* (MP) der alignierten Sequenzen wurden mit PUAP 4.0¹⁵ durchgeführt, das Einfügen von *gaps*

¹³www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-megalign.aspx

¹⁴www.flu.org.cn/en/download-51.html

¹⁵www.paup.csit.fsu.edu/

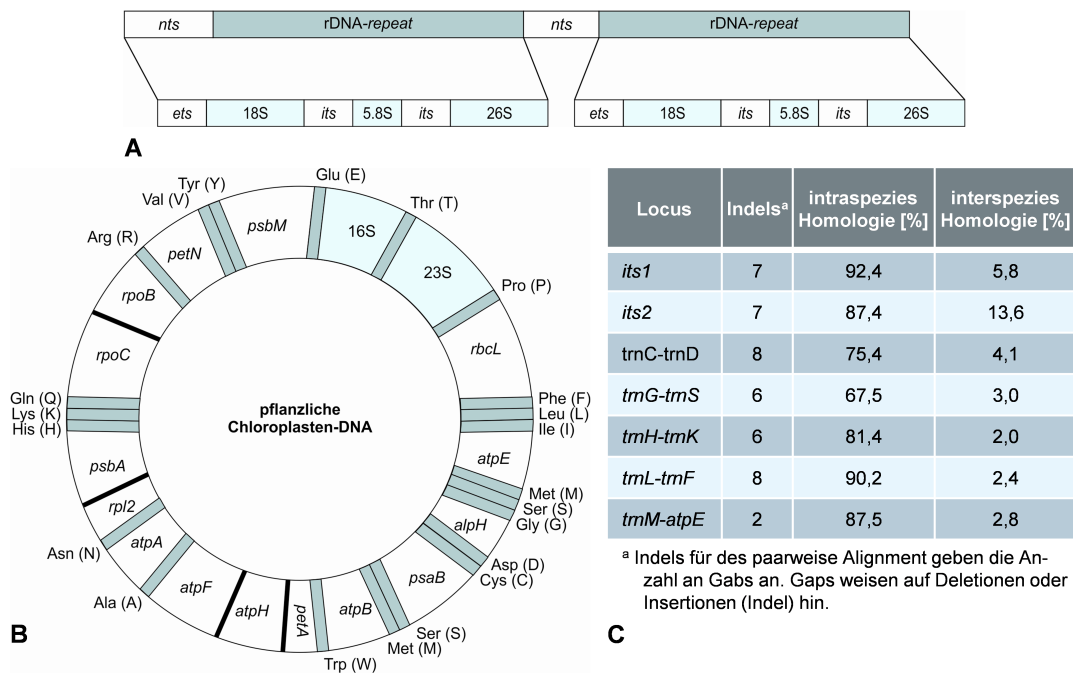


Abb. 4.55: Potentielle Target-Sequenzen sind vor allem die Spacer zwischen RNA-Genen. (A) Aufbau der Transkriptionseinheit von rRNA-Genen (*nts* = nicht-transkribierte Sequenz; *ets* = *external transcribed spacer*). (B) Schematische Karte pflanzlicher Chloroplasten-DNA, welche u.a. viele tRNA-Gene enthält. (C) Zusammenfassung der Sequenzalignments, die Homologie wurde innerhalb einer Pflanzengattung und zwischen den drei Arzneipflanzen bestimmt.

wurde zugelassen, die *branch-and-bound*-Option wurde verwendet und für *bootstrapping*-Analysen wurde die Anzahl an Replikaten auf 1.000 eingestellt. Kurz zusammengefasst zeigte sich, dass innerhalb einer Gattung sehr hohe intraspezifische Sequenzübereinstimmungen bestehen. D.h. eine Unterscheidung über *its1* von z.B. Bärlauch und Zwiebel (2,8% Divergenz) ist wahrscheinlich nicht möglich. Zwischen den Gattungen der drei Lefteria-Pflanzenarten bestehen interspezifisch hohe paarweise Distanzen. Es wurden Varianzen um 90% zwischen den Sequenzdaten der drei Arzneipflanzen festgestellt (Abb. 4.55C). Demzufolge können Spacer-Sequenzen als robuste molekulare Marker für die Unterscheidung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn angesehen werden.

Primerdesign: Entscheidend für eine erfolgreiche *real-time* PCR ist das Primerdesign. Mit den Primern generierte Amplifikate sollen im Idealfall zwischen 75–200 bp lang sein. Wegen der sehr kurzen Elongationszeit in der *real-time* PCR wird nur mit kurzen Amplikons eine hohe Amplifikationseffizienz, einhergehend mit hoher Detektionsempfindlichkeit erzielt [403]. Bei längeren Amplifikaten kommt es signifikant häufiger zu Kettenabbruchreaktionen während der Primer-Elongation durch die DNA-Polymerase. Kurze PCR-Produkte erhöhen somit die Präzision und Sensitivität der Analyse. Die Kürze der Amplifikate ist im Fall von Lefteria von besonderem Vorteil. Wurden beim Primerdesign in 4.2.1.1 noch viele Sequenzen ausgeschlossen, weil ihre GenBank-Einträge nur wenige hundert Basen umfassen und für die konventionelle PCR längere Amplifikate nötig waren, konnten diese kurzen, vor allem Spacer umfassenden, Sequenzen

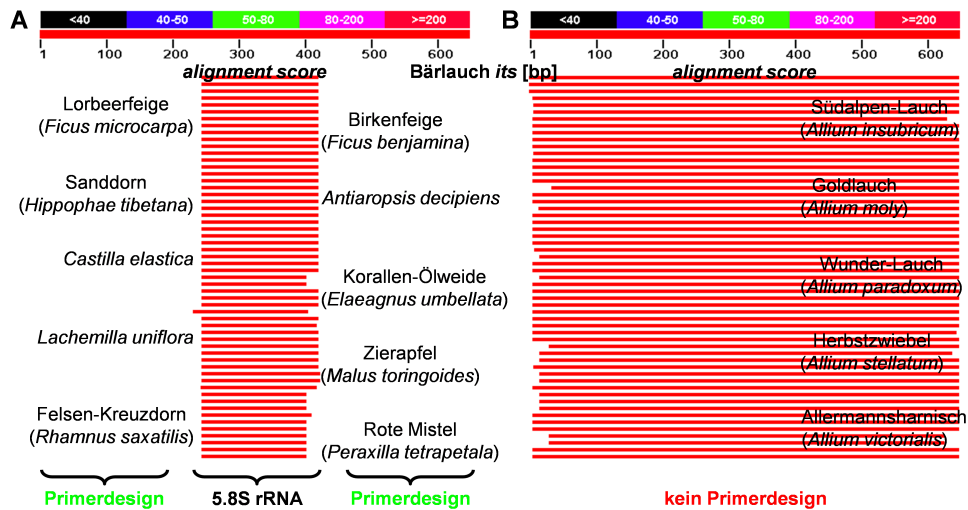


Abb. 4.56: Sequenzalignments nach MegaBLAST. (A) Bärlauch *its1*-5.8S rRNA-*its2* aligns mit den 50 ähnlichsten Sequenzen. Die Suche wurde begrenzt auf die Pflanzenordnungen zu denen Mistel und Weißdorn zählen. Beispielfhaft sind einige Vertreter namentlich erwähnt. (B) Die selbe Sequenz aligns mit 50 Verwandten aus der Gattung *Allieae*.

für die *real-time* PCR herangezogen werden. Abb. 4.56 verdeutlicht das genaue Vorgehen beim Primerdesign am Beispiel von Bärlauch *its* (Acc.-Nr.: AJ412744). Die ribosomalen RNA-Gene bestehen bei allen Eukaryoten aus den 18S und 26S rRNA-Genen stromaufwärts bzw. -abwärts der Spacer-Regionen *its1* und *its2*. Diese werden durch das Gen der 5.8S rRNA getrennt [404]. Jede potentielle Sequenz wurde mittels BLAST *in silico* auf ihre Spezifität untersucht. Da hohe Intraspezies-Homologie der Sequenzen bestehen, wurden Discontiguous MegaBLAST¹⁶ durchgeführt, um nach Homologien mit Sequenzen zu suchen, die von verschiedenen Gattungen stammen. Dabei wurde im Fall von Bärlauch die Gattung *Allieae* (Taxid: 703248) wegen zu großer Sequenzähnlichkeiten ausgeschlossen. Dagegen wurde der MegaBLAST bevorzugt in den Taxa der *Santalales* (Sandholzartige, Ordnung der Misteln, Taxid: 41947) und *Rosales* (Rosenartige, Ordnung von Weißdorn, Taxid: 3744) durchgeführt. Abb. 4.56A zeigt die Spezifität von Bärlauch *its* gegenüber Mistel und Weißdorn. Keine einzige Sequenz mit annähernder Ähnlichkeit ist in der Datenbank vorhanden. Die Sequenz der 5.8S rRNA dagegen ist hochkonserviert. Unter den ersten 50 signifikant ähnlichsten Sequenzen sind nur Pflanzen der Ordnung *Rosales*, d.h. sie sind näher mit *Allieae* verwandt als die Sandholzartigen, ein Grund warum die Suche nach einer Referenzsequenz für eine relative Quantifizierung scheiterte. Die nahe Verwandtschaft der *Allium*-Arten untereinander zeigt sich an den Sequenzen ihre *its*-Regionen (Abb. 4.56B). Primerpaare (grün) wurde im Bereich von 0–200 bp (*its1*) und 450–640 bp (*its2*) entworfen.

Ausgewählte Sequenzen: Tab. 4.19 listet alle Sequenzen auf, die für das Primerdesign verwendet wurden. Insgesamt zeigen 16 Sequenzen hohes Potential, ein spezifisches Target für die jeweilige Pflanze zu sein. Neben den Spacer-Sequenzen, wurden mit Bärlauch *mst* und *pi-2* sowie

¹⁶http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC

Tab. 4.19: Ausgewählte Sequenzabschnitte für die *real-time* PCR-Analysen.

Spezies	Target-Sequenz	<i>accession number</i> ^a	Abk.	Amplikonlänge [bp]
Bärlauch	Internal Transcribed Spacer 1	AJ412744	<i>its1</i>	169
	Internal Transcribed Spacer 2	AJ412744	<i>its2</i>	170
	Mannose Specific Lectin	U68531	<i>msl</i>	198
	PISTILLATA Protein	DQ005594	<i>pi-2</i> ^b	183 191
Mistel	Chloroplast tRNA-Leu-tRNA-Phe Intergenic Spacer	FN550401	<i>trnL-trnF</i>	148
	Internal Transcribed Spacer 1	EU796892	<i>its1</i>	161
	Internal Transcribed Spacer 2	EU796892	<i>its2</i>	115
	Chloroplast tRNA-His-tRNA-Lys Intergenic Spacer	AF419259	<i>trnH-trnK</i> ^b	154 114
Weißdorn	Chloroplast tRNA-Ser-tRNA-Met ^c Intergenic Spacer	AF419260	<i>trnS-trnfM</i>	103
	Internal Transcribed Spacer 1	EF127014	<i>its1</i>	225
	RNA Polymerase B	FJ395650	<i>rpoB</i>	190
	Chloroplast tRNA-Leu-tRNA-Phe Intergenic Spacer	AF348541	<i>trnL-trnF</i> ^b	192 129
	Chloroplast tRNA-Met-ATP Synthase Intergenic Spacer	AJ430533	<i>trnM-atpE</i>	100

^a Wird eine neue Sequenz in die GenBank aufgenommen, erhält sie einen Zugriffsschlüssel. Diese *accession number* wird nur einmal vergeben und begleitet die Sequenz unverändert.

^b Für einige Targets wurden im Laufe der Arbeiten mehrere Primerpaare entworfen und getestet.

^c *N*-Formylmethionin

Weißdorn *rpoB* auch drei Gensequenzen verwendet, die schon für die Multiplex-PCR eingesetzt wurden. Für die ausgewählten Sequenzen wurden Primerpaare mit Amplikonlängen zwischen 100–225 bp nach gängigen Kriterien [368] mit Primer3 entworfen. Wie die nächsten Abschnitte zeigen werden, wurden die Primerpaare und das PCR-Protokoll optimiert. Anschließend wurden die Target-Sequenzen in Plasmidvektoren kloniert, um DNA-Standards zu erhalten. Dafür wurde die für diesen Zweck am besten geeignete Klonierungsmethode bestimmt.

4.3.2 Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen

Die Methode und sämtliche Protokolle zur Durchführung eines Assay auf Basis von *real-time* PCR wurden am Beispiel der rekombinanten VEGF-Produktion etabliert und optimiert (siehe **A.2.4**). Zur Überprüfung der pflanzlichen Zusammensetzung von *Lefteria*-Tabletten wurden die dort gewonnen Kenntnisse weiterentwickelt. Wichtigste Veränderung war die Anpassung der Methode für Arbeiten mit genomischer DNA. Diese wurde stets mit dem als besonders geeignet evaluierten DNeasy Kit extrahiert. Um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren, wurden sämtliche Amplifikationen mit *real-time* PCR mindestens als Triplikate durchgeführt.

Für eine besonders hohe Genauigkeit und Spezifität ist die Optimierung der Annealing-Temperatur und Primerkonzentration für jedes Primerpaar essentiell [259, 405]. Die Detektion wurde wieder mit SYBR Green I realisiert. Dies macht die Assayetablierung günstiger als ein Einsatz von

Tab. 4.20: Experimentell ermittelte Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen.

Spezies	Primerpaar	Annealing- Temperatur [°C]	Primerkonz. [nmol/L]	
			<i>forward</i>	<i>reverse</i>
Bärlauch	<i>its1</i>	54	100	200
	<i>its2</i>	63,1	200	200
	<i>msh</i>	51,1	400	200
	<i>pi-2</i>	49	400	400
		58,9	200	400
	<i>trnL-trnF</i>	68,3	400	400
Mistel	<i>its1</i>	56,1	400	400
	<i>its2</i>	58,9	200	200
		56,1	400	200
	<i>trnH-trnK</i>	58,9	200	400
	<i>trnS-trnFM</i>	55,3	200	100
Weißdorn	<i>its1</i>	63,1	400	400
	<i>rpoB</i>	60,4	400	400
		60,4	400	400
	<i>trnL-trnF</i>	58,9	400	200
	<i>trnM-atpE</i>	55,3	400	400

spezifischen Sonden (vgl. **3.6.5**). Maximale Spezifität hervorgerufen durch die Hybridisierung von TaqMan-Sonden an die Target-Sequenz kann so nicht ganz erreicht werden. Die Sensitivität eines Assays verschlechtert sich allgemein durch die Bildung von Primerdimeren und die Ausbildung von Sekundärstrukturen, verursacht durch eine zu tief gewählte Annealing-Temperatur [259]. Dies fördert auch die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten, welche durch Interkalieren von SYBR ebenfalls ein Fluoreszenzsignal emittieren. Beim TaqMan-Assay wird dies zwar nicht detektiert, dennoch sinkt die Amplifikationseffizienz. Eine zu hohe Temperatur reduziert die Ausbeute an erwartetem PCR-Produkt und verringert die Empfindlichkeit der Analyse. Auch die Primerkonzentration kann limitierend wirken. Die stets maximale Effizienz aller Primerpaare ist zudem die notwendige Voraussetzung für einen Vergleich verschiedener Targets [259].

Die optimalen Annealing-Temperaturen wurden daher mittels mehrfacher *real-time* Gradienten-PCR bestimmt, so wie dies für VEGF schon beschrieben worden ist (vgl. **A.1.4**). Nachfolgende Schmelzkurvenanalysen dienten der Identifizierung von Primerdimeren und Koamplifikaten. Die Primerkonzentration ist dann optimal, wenn die spezifische Amplifikation im Verhältnis zu Primerdimeren maximal ist. Dies wurde mit Positiv- gegen Negativkontrollexperimenten gescreent [259]. Es erfolgte zusätzlich eine genaue Evaluierung von Primerkonzentrationen (in einer Matrix mit 100–400 nM der jeweiligen *forward*- und *reverse*-Primer). Die Reaktionsbedingungen, welche die niedrigsten Ct-Werte generierten und bei denen keine Bildung von unspezifischen Koamplikaten vorkommt, werden als optimale Reaktionsbedingungen definiert.

Insgesamt variierten die Reaktionsbedingungen verschiedener Primerpaare stark, es konnte daher kein universelles Protokoll verwendet werden. Jedes Primerpaar arbeitet bei unterschiedlichen

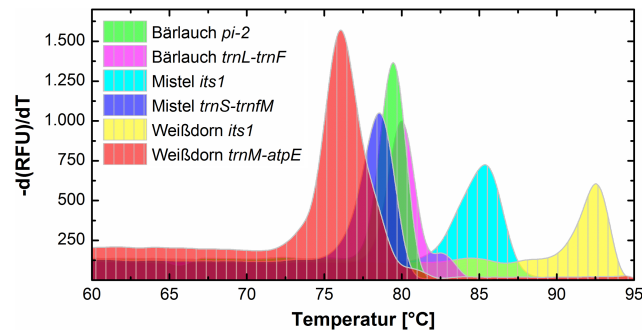


Abb. 4.57: Schmelzkurvenanalysen ausgewählter Target-Sequenzen. Bei keiner der sechs gezeigten Schmelzkurven sind Primerdimere oder Koamplifikate zu erkennen, dies spricht für optimale Amplifikationsbedingungen.

Temperatur- und Konzentrationsbedingungen am besten. Die optimalen Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen für alle möglichen Primerpaare sind in Tab. 4.20 zusammengefasst. Nach erfolgter Optimierung wurden bei keinem der 16 Primerpaare, weder in realen Proben noch in Negativkontrollen, Primerdimere und Koamplifikate erhalten. Die Schmelzkurvenanalysen zeigen stets nur einzelne Peaks, was bedeutet, dass nur spezifisches Produkt gebildet wird (Abb. 4.57). Neben dem standardmäßig genutzten Mastermix von Bio-Rad (Hercules, USA) wurden als weitere Optimierungsansätze diverse PCR-Mastermixe anderer Hersteller sowie verschiedene Zwei-Schritt- und Drei-Schritt-PCR-Protokolle getestet. Erkennbare Unterschiede wurden nicht festgestellt (Ergebnisse nicht gezeigt), daher wurde das Protokoll nach **A.5.2** für alle *real-time* PCR-Experimente verwendet.

Zusammengefasst stehen nach umfassenden Optimierungen alle entworfenen Primerpaare für den Nachweis von Bärlauch, Mistel und Weißdorn bereit. Der nächste Schritt ist die Bereitstellung von Plasmidstandards für die absolute Quantifizierung. Dies wird im Folgenden vorgestellt.

4.3.3 Herstellung von Plasmidstandards

Unter den verschiedenen möglichen DNA-Standards zur absoluten Quantifizierung vereinen Plasmidvektoren die meisten Vorteile auf sich [406]. Der einzige wirkliche Nachteil ist ihre vergleichsweise aufwendige Herstellung durch eine Klonierung. Das Ziel einen Routinetest zu entwickeln, rechtfertigt aber den Aufwand, da mit Plasmiden die besten Ergebnisse erzielt werden [406]. Sämtliche für die Quantifizierung ausgewählten DNA-Abschnitte (Tab. 4.19) wurden daher in Plasmidvektoren kloniert, in *E. coli* vermehrt und aufgereinigt. Zunächst mussten geeignete Primer entworfen und die DNA-Abschnitte mittels PCR dargestellt werden. Anschließend erfolgte die Ligation der PCR-Produkte mit den Plasmiden. Dies wurde hinsichtlich Effizienz und Handhabung am Beispiel Bärlauch *its* im Vergleich verschiedener Methoden evaluiert. Daneben wurden auch mehrere sowohl kommerzielle als auch selbst hergestellte kompetente Zellen getestet. Mit dem geeignetsten Protokoll wurden dann alle weiteren DNA-Abschnitte kloniert, die Vektoren in *E. coli* produziert und aufgereinigt.

Tab. 4.21: Längenangaben zu den Inserts und den klonierten Standards.

Spezies	Target	Sequenzlänge [bp]	
		Insert	Plamid
Bärlauch		651	3.651 ^a
	<i>its</i>	627	3.627 ^b
		627	4.556 ^c
	<i>msh</i>	606	4.535
	<i>pi-2</i>	950	4.879
<i>trnL-trnF</i>	213	4.142	
Mistel	<i>its</i>	621	4.550
	<i>trnH-trnK</i>	482	4.411
	<i>trnS-trnFM</i>	354	4.283
Weißdorn	<i>its</i>	634	4.563
	<i>rpoB</i>	394	4.323
	<i>trnL-trnF</i>	1.028	4.957
	<i>trnM-atpE</i>	184	4.113

^a *sticky ends*: Klonierung in pGEM-5Zf(+) (3 kb)

^b *blunt ends*: Klonierung in pGEM-5Zf(+) (3 kb)

^c TA-Klonierung in pCR2.1 (4 kb)

DNA-Inserts und Primerdesign: Für die Darstellung der Klonierungsinserts wurden spezielle Primerpaare nach gängigen Kriterien mit dem Programm Primer3 entworfen und getestet. Die Länge der Amplifikate (Tab. 4.21) wurde hier aber so gewählt, dass sie möglichst die gesamte in der GenBank hinterlegte Sequenz abdecken, um die Option zu erhalten, damit unterschiedliche *real-time* PCR-Primer nutzen zu können. Für einige Abschnitte z.B. Bärlauch *its1* und *its2* wurde nur ein Standard erstellt, der beide Targets und den dazwischen liegenden Bereich umfasst. Für dieses Beispiel wurde zudem ein Primerpaar für eine directionale Klonierung (*sticky ends*) entworfen.

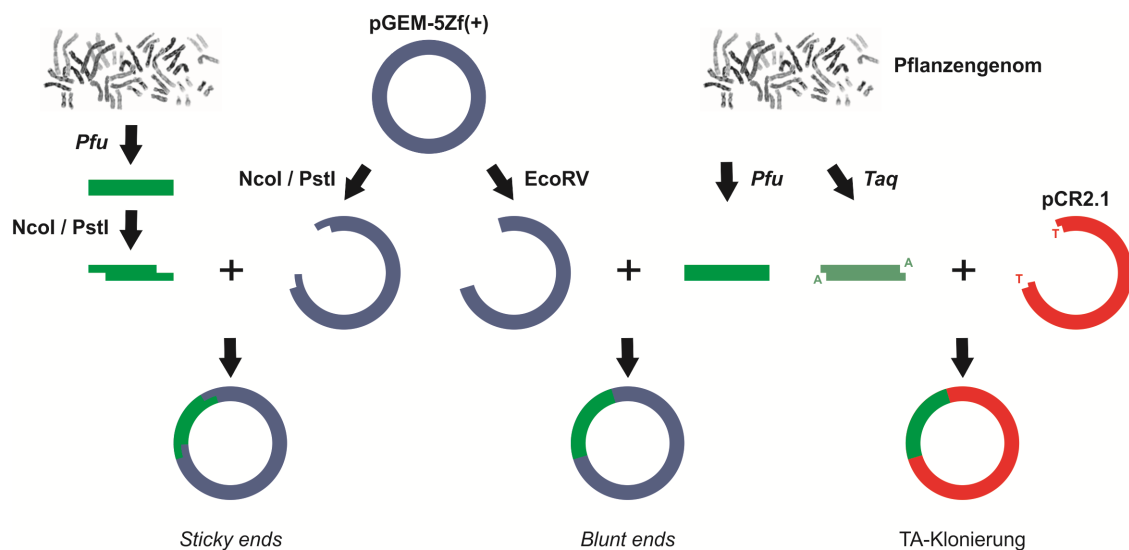


Abb. 4.58: Schematische Darstellung der drei möglichen Klonierungsstrategien zur Generierung von Plasmidstandards. Die *cut ligation* verläuft nach dem selben Muster wie die *blunt-end*-Klonierung.

Hinter das 5'-Ende des sequenzspezifischen Teils der Primer wurden jeweils die Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *PstI* eingeführt. Die 5'-Enden der Restriktionsschnittstellen wurden um weitere sechs Basen erweitert, da Restriktionsenzyme Endonukleasen sind und eine stark verminderte Effizienz an Fragmentenden zeigen. Die hinzugefügten Restriktionsschnittstellen wurden so gewählt, dass sie kein weiteres Mal in der Zielsequenz vorhanden sind, um bei der Prozessierung während der Klonierung nicht die Zielsequenz zu zerschneiden. Die Schnittstellen an *forward*- und *reverse*-Primer sind unterschiedlich, um ein nicht erwünschtes Schließen des Vektors ohne Fragmentaufnahme auszuschließen. Zudem erfolgt so die Klonierung gerichtet, was in diesem Fall aber nicht notwendig ist.

Evaluierung der geeignetsten Klonierungsmethode: Für die Klonierung der Zielsequenzen wurden vier verschiedene Strategien mit Bärlauch *its* als Modellsequenz evaluiert¹⁷, um die effizienteste Methode zur parallelen Generierung vieler DNA-Standardvektoren zu bestimmen:

1. *Sticky ends* (*Pfu*-Polymerase und pGEM-5Zf(+))
2. *Blunt ends* (*Pfu*-Polymerase und pGEM-5Zf(+))
3. *Cut ligation* (*Pfu*-Polymerase und pGEM-5Zf(+))
4. TA-Klonierung (*Taq*-Polymerase und pCR2.1)

Abb. 4.58 gibt einen Überblick über die verwendeten Methoden und die notwendigen Prozessschritte. Um eine sequenzexakte Amplifikation zu garantieren, wurde *Pfu*-Polymerase verwendet. Sie bricht bei Erreichen von fehlerhaften Basenpaarungen die Kettenverlängerung ab und sorgt durch diese Funktion des *proofreadings* dafür, dass keine fehlerhafte DNA synthetisiert wird. Für Methoden 2 und 3 ist die *Pfu*-Polymerase ohnehin essentiell, da sie im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase keine Adenosin-Überhänge an den 3'-Enden eines Amplifikats generiert, was eine „stumpfe“ Ligation unmöglich machen würde. Die *Taq*-Polymerase wiederum hat die Kapazität für das Hinzufügen eines zusätzlichen Adenin-Nukleotids an die 3'-Enden von DNA-Fragmenten. Diese unerwünschte Eigenschaft macht sich die TA-Klonierung zu Nutze. Die Komplementarität zwischen 3'-A-Überhängen der Zielsequenz und einem speziellen linearisierten T-Vektor, welcher zwei 3'-T-Überhänge an den Enden trägt, ermöglicht in Anwesenheit von T4-DNA-Ligase eine direkte Klonierung von *Taq*-amplifizierten PCR-Produkten in den Vektor [407, 408]. Der Plasmidvektor pGEM-5Zf(+) enthält *multiple cloning sites* mit *NcoI*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen, welche einen 5'-Überhang generieren und von Restriktionsendonukleasen vollständig prozessiert werden können. Außerdem ist die Schnittstelle *EcoRV* vorhanden, welche geschnitten keinen Überhang eines Stranges erzeugt. Dieser Vektor wurde für die Methoden 1 bis 3 verwendet. Der spezielle T-Vektor pCR2.1 kam für Methode 4 zum Einsatz. Zunächst konnten sämtliche *its*-Inserts erfolgreich PCR-amplifiziert werden (Abb. 4.59).

¹⁷Masterarbeit von Mariam Suleiman, Etablierung eines quantitativen PCR-Nachweises pflanzlicher Gene (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 47–60

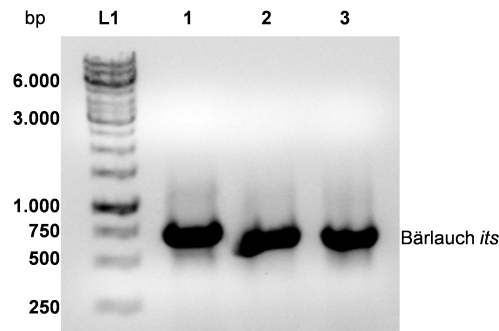


Abb. 4.59: Inserts für den Vergleich der Klonierungsmethoden. Der Reihe nach sind folgende PCR-generierte Inserts aufgetragen: Bärlauch *its* mit Restriktionsschnittstellen (Spur 1), *its* hergestellt mit *Pfu*- (Spur 2) bzw. *Taq*-Polymerase (Spur 3). Alle in diesem Abschnitt gezeigten Gele sind 1,5%ige, die Visualisierung erfolgte stets mit Ethidiumbromid und UV-Exposition und als Größenstandard (Spur L) wurde ein 1 kp Ladder aufgetragen.

Sticky ends: Identisch mit der VEGF-Klonierung wurde zur Realisierung von Methode 1 die zu insertierende *Pfu*-generierte Sequenz NcoI-*its*-PstI und der Vektor mit den passenden Restriktionsenzymen prozessiert und anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Eine Evaluierung verschiedener Bedingungen ergab, dass sich der Tango-Puffer (Thermo Scientific) für den parallelen Verdau mit beiden Restriktionsenzymen eignet. Es folgte die Aufreinigung der geschnittenen Fragmente aus einem Agarosegel. Im molaren Verhältnis von 5:1 wurden Zielsequenz und Vektor (pGEM) mit Hilfe von T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C ligiert. Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen durch Hitzeschock bei 42 °C.

Blunt ends: Für die Klonierung über „stumpfe“ Enden wurde der Klonierungsvektor mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und aus dem Gel aufgereinigt. Nachfolgend wurde der Vektor (pGEM) mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dies ist notwendig, da die Tendenz eines einfach geschnittenen Vektors zur Religation groß ist. Die Effizienz der *blunt-end*-Klonierung ist ansonsten zu gering [235]. Zur Eliminierung der verwendeten Enzyme wurde der Vektor vor der Ligation erneut aufgereinigt. Die Ligation und Transformation mit der *Pfu*-generierten Zielsequenz *its* erfolgte direkt nach dessen Aufreinigung analog zu *sticky ends*.

Cut ligation: Diese Methode fasst die Prozessschritte des Restriktionsverdaus und der Ligation in einem Schritt zusammen. Zudem ist eine Dephosphorylierung des Vektors überflüssig [409]. Der Vektor (pGEM) und die *Pfu*-generierte Zielsequenz wurden durch Zugabe von Ligase und der „stumpf“ schneidenden Restriktionsendonuklease EcoRV direkt in einem Schritt miteinander ligiert. Bei Religationen des Vektors wird die EcoRV-Schnittstelle rekonstruiert, nach Insertion der Zielsequenz ist sie dagegen zerstört und eine erneute Prozessierung des Vektors wird verhindert. Dadurch wird die inhärent niedrige Effektivität der Ligation „stumpfer“ Enden umgangen [235]. Zusätzlich zum Ligationsansatz appliziertes PEG 6000 dient durch seine hygroskopische

Eigenschaft dazu, die lokale Konzentration an Reaktanten zu erhöhen. Zudem wird bedingt durch die Erhöhung der Viskosität die Brownsche Molekularbewegung erniedrigt, damit der Anteil an reaktiven Stößen steigt [235]. Auch bei der Realisierung der *cut ligation* wurde das Insert *its* in einem Massenverhältnis von 5:1 zum Vektor gegeben. Nach Evaluierung wurde 1x Tango-Puffer verwendet, da er Bedingungen generiert, unter denen auch die Ligase aktiv ist. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 4 °C mit anschließender Transformation in XL1-Blue-Zellen.

TA-Klonierung: Die TA-Methode ist die einzige Methode bei der das Insert mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert wurde. Wegen der Generierung von 3'-A-Überhängen wird die weniger akkurate *Taq*-Polymerisation in Kauf genommen. Der Vektor pCR2.1 wurde linearisiert gekauft. Im Verhältnis von 5:1 wurden Insert *its* und Vektor mit T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16 °C ligiert und durch Hitzeschock bei 42 °C in spezielle für TA-Klonierungen vorgesehene *E. coli* One Shot TOP10-Zellen transformiert.

Bewertung der Methoden: Transformierte Zellen aller vier Methoden wurden auf Ampicillinhaltigen Agarplatten über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Transformationseffizienz durch Auszählen der positiv transformierten Kolonien ermittelt. Mittels Blau-Weiß-Selektion konnten positive (weiß) von negativen (blau) Kolonien unterschieden werden. Jeweils mehrere weiße Kolonien wurden gepickt, über Kolonie-PCR analysiert, bzw. im Schüttelkolben vermehrt und nach Plasmidpräparation mittels analytischem Restriktionsverdau untersucht. Sequenzierungen der Plasmidpräparationen dienten zur Bestätigung der gelelektrophoretischen Analysen. Jede Methode war zielführend zur Generierung von Plasmidstandards. Die einzelnen Strategien zeigen aber große Unterschiede. Tab. 4.22 zeigt die Zusammenfassung der Evaluierungsversuche. Bei der TA-Klonierung sind insgesamt sehr viel mehr Kolonien gewachsen als bei den anderen Methoden, also auch sehr viel mehr positive Klone. Am effektivsten ist Klonierung über kohäsive Enden mit einer Ausbeute an positiven Kolonien von 66%. Die anderen drei Methoden erreichen für diesen Parameter nur etwa halb so hohe Werte. Die Methoden unterscheiden sich zudem signifikant hinsichtlich ihres Zeit- und Arbeitsaufwands. Die TA-Klonierung erfordert keinen Restriktionsverdau und ist somit die einfachste aller Methoden. Bei der Klonierung über *sticky ends* müssen sowohl Vektor als auch Amplifikat mittels Restriktionsenzymen verdaut und erneut aufgereinigt werden. Dieser Aufwand ist nur gerechtfertigt, wenn eine bestimmte Orientierung des Inserts im Vektor benötigt wird, z.B. bei der Proteinexpression wie bei VEGF. Die beiden Methoden, welche „stumpfe“ Enden nutzen, unterscheiden sich nur wenig. Bei der *cut ligation* ist der große Nachteil der Religation ausgeschlossen. Zudem muss keine aufwendige Isolierung von Insert- und Vektor-DNA aus dem Agarosegel vorgenommen werden und die Behandlung des Vektors mit Alkalischer Phosphatase entfällt. Der Effizienz- und Zeitgewinn liegt bei rund 20%, die Ausbeute an Kolonien ist dafür zehnfach geringer. Insgesamt kann der Vorteil vieler positiver Klone bei den *sticky ends* die Vorteile von einfacher Durchführung und hoher Gesamtausbeute

Tab. 4.22: Evaluierung der vier Klonierungsstrategien hinsichtlich Anteil positiver Klone und Arbeitsaufwand als Mittelwerte mehrerer Agarplatten.

Methode	positive Kolonien	negative Kolonien	Anteil positive Klone [%]	Arbeitsaufwand
<i>sticky ends</i>	25	13	66	hoch
<i>blunt ends</i>	5	17	23	mittel
<i>cut ligation</i>	1	2	33	mittel
TA-Klonierung	472	784	38	gering

der TA-Klonierung nicht ausgleichen. Die beiden Methoden mit „stumpfen“ Enden haben keine Vorteile gegenüber der TA-Methode. Unter Berücksichtigung der großen Anzahl an benötigten Plasmidklonierungen ist damit eindeutig die TA-Klonierung zu favorisieren. Sämtliche Plasmide wurden mittels dieser Strategie hergestellt. Beim Test verschiedener kompetenter Zellen¹⁸ zeigen die One Shot TOP10-Zellen die beste Performance und wurden im Weiteren ausschließlich verwendet (Ergebnisse nicht gezeigt).

Herstellung der Plasmidstandards: Aus Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn wurde genomische DNA isoliert und als Template für die PCR sämtlicher Abschnitte (Tab. 4.19) eingesetzt¹⁹. Die verwendeten Amplifikationsbedingungen sind **A.5.2** zu entnehmen. Für Bärlauch *pi-2* und Weißdorn *trnL-trnF* wurden kein oder nur sehr wenig PCR-Produkt erhalten. Daher musste die Annealing-Temperatur optimiert werden. Bei einer zu niedrig gewählten Annealing-Temperatur kommt es zu unspezifischen Primerbindungen und in der Folge zu keiner oder unerwünschter Produktbildung. Durch zu hohe Temperaturen wird die Produktbildung verhindert. Aus Abb. 4.60A und 4.60B ist ersichtlich, dass bei 51 bzw. 62 °C die jeweilige Bande mit der größten Intensität und ohne Koamplifikate erhalten wird. Die gezeigten Gele auf Abb. 4.60C bis 4.60E legen nahe, dass nach erfolgter Optimierung die Herstellung aller PCR-Produkte für die Bärlauch- Mistel- und Weißdorn-Targets erfolgreich war. Die unterschiedlichen Produktlängen der Amplifikate sind deutlich zu erkennen. Es handelt sich jeweils um einzelne diskrete Banden. Die Größen der PCR-Produkte stimmen mit den erwarteten theoretischen Produktlängen überein (Tab. 4.21). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte aus Agarosegelen wurden die Inserts mittels TA-Klonierung mit dem Vektor pCR2.1 ligiert. Die Ligationsansätze wurden in One Shot TOP10 transformiert. Jeweils drei durch Kolonie-PCR verifizierte positive Kolonien wurden gepickt, in LB-Medium vermehrt und eine Plasmidpräparation wurde durchgeführt. Die gelelektrophoretische Visualisierung der erhaltenen Plasmidstandards ist auf Abb. 4.61 gezeigt. Die Plasmide wurden über die Restriktionsschnittstelle HindIII linearisiert. Der Klonierungsvektor selbst (Spuren 1, 6 und 10) dient als Referenz. Die isolierten Plasmide unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe vom

¹⁸Masterarbeit von Mariam Suleiman, Etablierung eines quantitativen PCR-Nachweises pflanzlicher Gene (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 45–47

¹⁹Masterarbeit von Mariam Suleiman, Etablierung eines quantitativen PCR-Nachweises pflanzlicher Gene (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 34–44 und 60–75

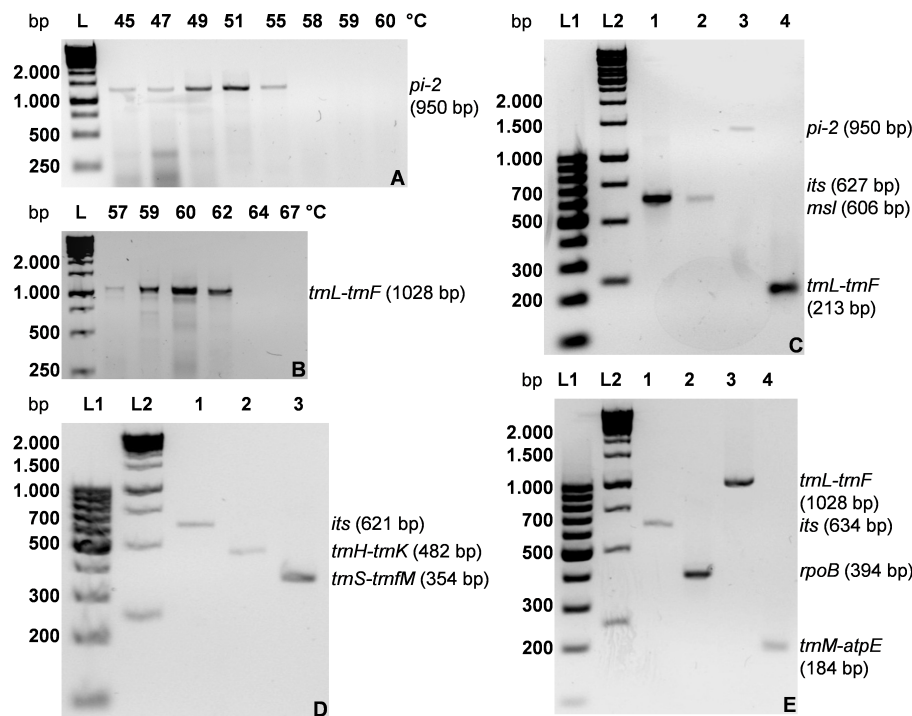


Abb. 4.60: Inserts für die Plasmidstandards auf einem 1,5%igem Agarosegel. (A) Optimierung der Annealing-Temperatur zur Generierung von Bärlauch *pi-2*. Die jeweiligen Temperaturen sind am Gel angegeben. Gleiches gilt für den 1 kb DNA-Ladder als Größenstandard (Spur L). (B) Analog dazu die Optimierung der Annealing-Temperatur für Weißdorn *trnL-trnF*. (C) Sämtliche Bärlauch-Inserts wurden der Reihe nach (Spuren 1–4) aufgetragen: *its*, *msl*, *pi-2* und *trnL-trnF*. Für die Zuordnung der Produktlängen wurde ein 100 bp (Spur L1) und ein 1 kb DNA-Ladder (Spur L2) auf das Gel appliziert. Die Spezifizierung der relevanten Markerbanden kann dem Gelbild entnommen werden. (D) Die Mistel-Inserts *its*, *trnH-trnK* und *trnS-trnfM* (Spuren 1–3) sowie (E) die Weißdorn-Inserts *its*, *rpoB*, *trnL-trnF* und *trnM-atpE* (Spuren 1–4).

Ausgangsvektor, eine Verschiebung der Banden in den höher molekularen Bereich ist leicht auszumachen. Die erhalten Banden unterscheiden sich in ihrer Länge entsprechend den Plasmidgrößen signifikant voneinander. Die erwartete Größenordnung der einzelnen Plasmidstandards spiegelt sich in der Gelanalyse wider (Abb. 4.61A). Der Vektor pCR2.1 enthält *EcoRI*-Schnittstellen sowohl stromabwärts als auch -aufwärts seiner *cloning site*, was einen einfachen analytischen Restriktionsverdau erlaubt, der dazu dient, den Klonierungserfolg zu bestätigen. Die isolierten Vektoren wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut, um das Insert wieder aus dem ringförmigen Vektor zu schneiden. Abb. 4.61B stellt die Ergebnisse dieser Restriktionskontrollen dar. Die Bärlauch-Proben (Spuren 2–5) zeigen alle eine Bande auf identischer Höhe des Originalvektors (Spur 1) bei rund 4 kb. Dazu ist jeweils das Insert mit der erwarteten Größe erkennbar (Tab. 4.21 und Abb. 4.60). Die Gelanalysen bestätigten auch den Klonierungserfolg der Mistel- (Spuren 7–9) und Weißdorn-Standards (Spuren 11–14). In Koinkidenz mit den Ergebnissen aus der Kolonie-PCR und der gelelektrophoretischen Analyse, verifizierte eine Sequenzierung der durch Plasmidpräparationen aufgereinigten Standards abschließend die korrekte Sequenz aller Konstrukte. Somit konnten alle gewünschten Plasmidstandards erfolgreich hergestellt werden.

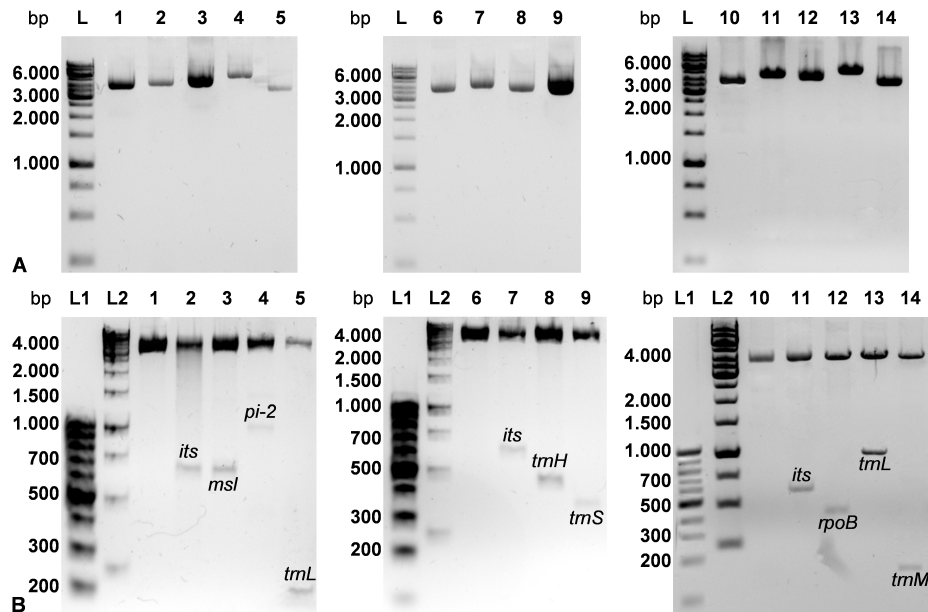


Abb. 4.61: Gelelektrophoretische Analyse der generierten Plasmidstandards. (A) Die linearisierten Plasmide entsprechen in ihrer Größe den Erwartungen (Tab. 4.21). In den Spuren 1, 6 und 10 ist zum Vergleich jeweils pCR2.1 ohne Insert aufgetragen. Die Reihenfolge der weiteren Auftragung entspricht: Bärlauch *its*, *msh*, *pi-2* und *trnL-trnF* (Spuren 2–5); Mistel *its*, *trnH-trnK* und *trnS-trnM* (Spuren 7–9); Weißdorn *its*, *rpoB*, *trnL-trnF* und *trnM-atpE* (Spuren 11–14). (B) Beim analytischen Restriktionsverdau wurden die Inserts wieder aus den Plasmiden herausgeschnitten. Dadurch weisen alle Vektoren wieder die Länge von pCR2.1 (Spuren 1, 6 und 10, ca. 3,9 kb) auf. Des Weiteren sind alle Inserts mit korrekter Länge in den Gelen zu erkennen, womit der Klonierungserfolg bewiesen ist. Die Reihenfolge der Proben entspricht den oberen Gelen.

Etablierung der Plasmidstandards: Die Verwendung von Standards erfolgte analog zur absoluten Quantifizierung beim Beispiel VEGF und erlaubt eine direkte Berechnung von Kopienzahlen aus Ct-Werten (siehe A.2.4). Um einen PCR-Geräteinfluss (bedingt z.B. durch die Raumtemperatur) und einen Einfluss von Inhomogenitäten zwischen einzelnen PCR-Platten und Abdeckfolien auszuschließen, wurden einmalig für jedes Primerpaar drei Verdünnungsreihen der entsprechenden Pflanzen-DNA gemeinsam mit drei Verdünnungsreihen der erstellten DNA-Standards auf einer 96-Lochplatte vermessen. Über Gleichsetzen der Ct-Werte wurde eine Korrelationen von Kopienzahl zu DNA-Menge erhalten. Diese Kalibration gilt anschließend als universell für jedes weitere Experiment (z.B. auch für den Vergleich von Extraktionsmethoden in 4.1.1.3, 4.1.1.4 und 4.1.6). Die ermittelten Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten sind in A.6 einzusehen. In jeder *real-time* PCR diene von da an nur noch eine parallel gemessene Plasmidstandardreihe (vier Verdünnungsstufen) zur Normalisierung. Die damit berechneten Kopienzahlen sind dadurch unabhängig vom aktuellen PCR-Lauf, d.h. vom Geräteinfluss und können direkt über die „universelle“ Kalibration in die korrespondierende DNA-Menge umgerechnet werden. In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, wie die 16 Target-Sequenzen, u.a. mit Hilfe der klonierten Standards, mit dem Ziel evaluiert wurden, letztendlich je Pflanze nur noch ein spezifisches Target für die Analyse von *Lefteria* zu verwenden.

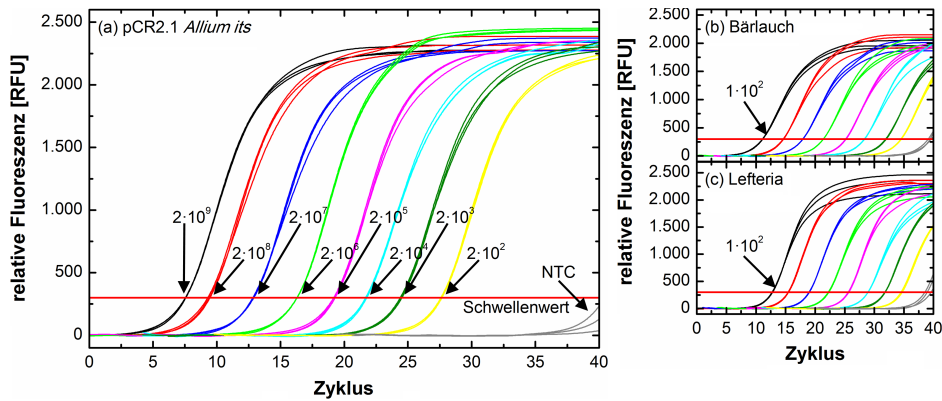


Abb. 4.62: Effizienzbestimmung von Bärlauch *its1*. Dargestellt sind die resultierenden Amplifikationskurven für 1:10 Verdünnungsreihen von Plasmid- (a), Bärlauch- (b) und Lefteria-DNA (c). Es wurden $2 \cdot 10^2$ – $2 \cdot 10^9$ Plasmidkopien bzw. $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^2$ ng pflanzliche DNA (schwarz bis gelb) eingesetzt. Die Negativkontrollen (NTC) sind grau dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der gleiche Abstand der Amplifikationskurven (Triplikate) zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen.

4.3.4 PCR-Effizienzen

Für eine exakte Quantifizierung ist es erforderlich, dass die PCR-Effizienzen unabhängig von der initialen Menge an Template-DNA ist. Zudem ist eine Korrelation von Kopienzahl und Ct-Wert nur dann exakt, wenn die PCR mit Standards sowie mit realen Proben ähnliche Effizienzen aufweisen. Eine mathematische Berücksichtigung von Effizienzunterschieden ist möglich, wird aber allgemein nicht empfohlen [234, 246, 410]. Aus diesen Gründen wurden die Effizienzen aller verwendeten Primerpaare ermittelt, mit derselben Methode wie schon beim VEGF-Beispiel (siehe **A.2.4**).

Unabhängige dekadische Verdünnungsreihen von Plasmid-, Pflanzen- und Lefteria-DNA wurden erstellt und dienten als Template für die *real-time* PCR. Jeweils neun²⁰ Messwerte pro Verdünnungsstufe garantieren eine möglichst hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Exemplarisch sind in Abb. 4.62 die Amplifikationskurven für Bärlauch *its1* dargestellt. Die Variabilitäten zwischen drei Replikaten einer Verdünnungsstufe sind geringfügig. Die Amplifikationskurven liegen fast perfekt übereinander, was für ein gutes experimentelles Setup spricht. Die hohe lineare Korrelation zwischen DNA-Menge und Ct-Werten ist an den äquidistanten Abständen zwischen den Kurven leicht auszumachen. Durch Auftragung der Ct-Werte gegen den Logarithmus der initialen DNA-Menge kann aus der Steigung die Amplifikationseffizienz berechnet werden (Abb. 4.63). Die hohe Linearität beweist gleiche Effizienzen jeder individuellen PCR-Reaktion über einen sehr breiten Bereich initialer Template-Menge. Die leicht unterschiedlichen Steigungen der Geraden weisen im Fall von Bärlauch *its1* auf leicht abweichende Effizienzen für die drei DNA-Quellen hin. Zu Plasmid-DNA besteht eine Abweichung ($< 0,2$), die eine direkte Umrechnung von Ct-Wert unbekannter Proben in Kopienzahl ungenau machen würde. Bei der Berechnung von Kopienzahlen sollten in diesem Fall die Effizienzunterschiede berücksichtigt werden.

²⁰Drei Verdünnungsreihen von denen jeder Verdünnungsstufe dreifach gemessen wurde.

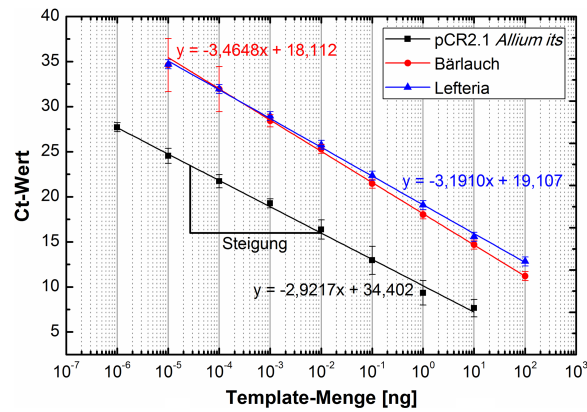


Abb. 4.63: Regressionsanalyse der Ct-Werte der drei Verdünnungsreihen. Auftragung der gemittelten Ct-Werte gegen den Logarithmus der Template-Menge für Messungen mit dem Primerpaar Bärlauch *its1* ($n = 3$).

Entsprechende Experimente wurden für alle Primerpaare jeweils unter Nutzung von Plasmid-DNA und genomischer DNA (stets auch aus *Lefteria*) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die sich aus den Geradensteigungen ergebenden Amplifikationseffizienzen und Korrelationskoeffizienten für jedes Primerpaar sind in Tab. 4.23 angeführt. Es wird ersichtlich, dass bei den meisten Primerpaaren die PCR unabhängig von der DNA-Quelle gleiche Effizienzen aufweisen. Die Geraden haben hohe lineare Korrelationen (R^2) zwischen Ausgangsmenge und Ct-Werten mit R^2 -Koeffizienten zwischen 0,96 und 1, was als Maß für die Güte der generierten Ergebnisse gilt. Ungeachtet unterschiedlicher PCR-Bedingungen, Amplikonlängen und Basenzusammensetzungen liegen alle Effizienzen im engen Bereich um 1,93–2,4. D.h. nahezu maximale Effizienz, also Produktverdoppelung je Zyklus. Dies sind Hinweise auf ein gutes Primerdesign und optimale Amplifikationsbedingungen.

4.3.5 Molekulare Zusammensetzung von *Lefteria*-DNA

Routinemäßig wurden zur Quantifizierung der *Lefteria*-Inhaltsstoffe 50 ng DNA-Proben verwendet. Eine solche Menge ist in der qPCR für genomische DNA üblich [411, 412]. Für die Quantitätskontrolle der Tabletten ist es essentiell, die DNA-Zusammensetzung von originalem *Lefteria*-Pulver zu kennen. Unter Einsatz aller 16 Targets wurde diverse reine Pflanzen- und *Lefteria*-Proben analysiert, die gemessenen Ct-Werte mit Hilfe von Plasmidstandards in Kopienzahlen umgerechnet und über die „universelle“ Kalibration (4.3.3) die zugrundeliegenden DNA-Mengen bestimmt. In Tab. 4.24 sind die ermittelten Zusammensetzungen der Pflanzenproben zusammengestellt. Zur Überprüfung der gesamten Methode wurden hier letztmalig Verdünnungen reiner Pflanzen-DNA mit analysiert. Es bestätigte sich dabei, dass die Effizienz unabhängig vom einzelnen PCR-Experiment ist. Die in Tab. 4.24 gelisteten Steigungen m zeigen nur minimale Abweichungen von den „universellen“ Messungen (vgl. A.6). Die Varianzen zwischen den Ordinatenabschnitten b spiegeln den erwähnten Geräteinfluss zwischen einzelnen PCR-Läufen wider. Durch die Norma-

Tab. 4.23: Aus den Geradensteigungen ermittelte Effizienzen mit Korrelationskoeffizienten. Aufgelistet sind Mittelwerte von Regressionsanalysen mehrerer Verdünnungsreihen.

Spezies	Primerpaar ^a	Plasmid-DNA		Pflanzen-DNA		Lefteria-DNA	
		Effizienz ^b	R ²	Effizienz	R ²	Effizienz	R ²
Bärlauch	<i>its1</i> [*]	2,2	0,9951	1,94	0,9997	2,06	0,999
	<i>its2</i>	2,07	0,9983	2,02	0,9852	2,04	0,9953
	<i>msl</i>	2,04	0,9936	2,08	0,9943	2,04	0,994
	<i>pi-2</i>	2,1	0,9984	2,02	0,994	2,01	0,9909
		2,13	0,9974	2,14	0,9916	2,1	0,9913
	<i>trnL-trnF</i>	2,02	0,9924	2,05	0,976	2,05	1
Mistel	<i>its1</i> [*]	2,28	0,9972	1,93	0,9983	1,93	0,9895
	<i>its2</i> [*]	2,27	0,9978	1,99	0,9972	2,05	0,9961
	<i>trnH-trnK</i> [*]	2,4	0,9899	1,93	0,9986	1,97	0,9986
		2,37	0,9962	1,98	0,9986	1,97	0,988
	<i>trnS-trnfM</i>	2,04	0,9981	2,04	0,9982	2,04	0,9945
Weißdorn	<i>its1</i>	1,98	0,961	1,97	0,9933	1,97	0,9999
	<i>rpoB</i> [*]	2,18	0,9986	1,98	0,9992	2	0,9986
		2,06	0,9990	2,05	0,9844	2,07	0,9997
	<i>trnL-trnF</i> [*]	2,1	0,9954	2,19	0,9974	2,07	0,9945
	<i>trnM-atpE</i>	2,18	0,9891	2,21	0,9942	2,19	0,9849

^a Bei mit * gekennzeichneten Primerpaaren wurden zu große Effizienzunterschiede (< 0,2) zwischen PCR mit Plasmid-DNA und pflanzlichen Proben im Weiteren mathematisch berücksichtigt.

^b Die Effizienz wurde mit $E = 10^{-1/m}$ berechnet. Ein Umrechnung in Prozent ergibt sich mit $100 \cdot (E - 1)$. Eine Steigung m von -3,32 würde somit eine Effizienz von 2 (100%) bedeuten, d.h. eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus, -3,58 eine Effizienz von 1,9 (90%) und -3.11 ist 2,1 (110%).

lisierung mit Plasmid-DNA wird der Einfluss von Achsenabschnitt b vollständig egalisiert. Sie erfüllt damit ihren Zweck. Diese Daten verdeutlichen noch einmal die unbedingte Wichtigkeit eine Normalisierung von *real-time* PCR-Ergebnissen.

In Tab. 4.24 haben die aus den gemessenen Ct-Werten, über Kopienzahlen normalisierten und mittels externer Kalibration berechneten DNA-Mengen die größte Aussagekraft über die hohe Qualität des entwickelten qPCR-Assays. In 50 ng aus Pflanzen bzw. Lefteria extrahierter DNA werden über jedes Target auch rund 50 ng DNA detektiert (Abb. 4.64). Aus Lefteria-DNA lassen sich gemittelt über alle Targets 20,67 ng ($\sigma = 0,16$) Bärlauch-, 19,04 ng ($\sigma = 0,76$) Mistel- und 9,48 ng ($\sigma = 0,17$) Weißdorn-DNA, also insgesamt 49,19 ng ($\sigma = 1,1$) Misch-DNA extrahieren (gestapelte Säule). Die Varianzen zwischen den einzelnen Targets sind dabei derart gering, dass weder bei Pflanzen- noch bei Lefteria-DNA signifikante Unterschiede ($t < 0,3$, $p > 0,05$) zwischen DNA-Mengen, berechnet über verschiedene Target-Sequenzen, bestehen. Das für Lefteria-Tabletten bestimmte DNA-Verhältnis von 1 : 0,92 : 0,46 (Bärlauch : Mistel : Weißdorn) ist zueinander signifikant ($t > 15,6$, $p < 0,0001$) und in jeder denkbaren Target-Kombination nahezu identisch ($t < 0,5$, $p > 0,05$). In Prozent ausgedrückt besteht Lefteria-DNA aus 41% Bärlauch-, 38% Mistel- und 19% Weißdorn-DNA. Dies sind die gleichen Werte, welche auch

Tab. 4.24: Messungen von je vier 50 ng Pflanzenpulver- bzw. *Leferia*-Proben. Aufgeführt sind zunächst die mittels Plasmidstandards und „universeller“ Kalibration bestimmten Kopien und DNA-Mengen. Danach sind die Daten zur Normalisierung mit parallel vermessener Plasmid-DNA aufgeführt. In den beiden letzten Spalten sind die Ergebnisse der Messung von Verdünnungen reiner Pflanzen-DNA gezeigt.

Spezies	Primerpaar	50 ng Pflanzenprobe			50 ng <i>Leferia</i> -Probe			Plasmid-DNA ^d		Pflanzen-DNA ^e	
		Ct-Wert ^a	Kopien ^b	DNA ^c [ng]	Ct-Wert	Kopien	DNA [ng]	Effizienz	R ²	Steigung (<i>m</i>)	Achsenabschnitt (<i>b</i>)
Bärlauch	<i>its1</i>	12,58	$9,9 \cdot 10^7$	50,23	13,77	$4,1 \cdot 10^7$	20,62	2,15	0,989	-3,0103	35
	<i>its2</i>	12,7	$3,1 \cdot 10^7$	50,43	13,97	$1,3 \cdot 10^7$	20,99	1,99	0,9982	-3,3555	37,808
	<i>msl</i>	23,92	$1,2 \cdot 10^4$	50,48	25,13	$4,6 \cdot 10^3$	20,64	2,09	0,9954	-3,1232	36,521
<i>pic-2</i>		24,52	$1,7 \cdot 10^5$	50,49	26,01	$7,3 \cdot 10^4$	20,54	2,11	0,997	-3,0745	40,621
		25,62	$2,5 \cdot 10^3$	50,34	27,06	$8,2 \cdot 10^2$	20,64	2,14	0,9917	-3,0283	35,844
	<i>trnL-trnF</i>	20,92	$3,4 \cdot 10^6$	50,65	21,99	$2,7 \cdot 10^6$	20,56	2,02	0,9994	-3,264	42,975
Mistel	<i>its1</i>	18,04	$3,1 \cdot 10^6$	50,04	19,43	$1,2 \cdot 10^6$	19,02	2,24	0,9881	-2,8527	33,841
	<i>its2</i>	17,69	$1,4 \cdot 10^5$	54,09	18,97	$4,4 \cdot 10^4$	19,95	2,28	0,9959	-2,7987	31,953
	<i>trnH-trnK</i>	18,48	$2,5 \cdot 10^6$	52,83	19,89	$9,2 \cdot 10^5$	19,23	2,38	0,9963	-2,6443	31,687
Weißdorn		17,59	$3,3 \cdot 10^5$	49,74	19,06	$9,4 \cdot 10^4$	17,85	2,36	0,989	-2,6753	32,359
	<i>trnS-trnFM</i>	18,76	$6,4 \cdot 10^5$	50,22	20,11	$2,5 \cdot 10^5$	19,17	2,03	0,9972	-3,2467	37,585
	<i>its1</i>	20,02	$3,9 \cdot 10^6$	50,12	22,53	$7,4 \cdot 10^5$	9,69	1,98	0,9998	-3,3813	42,229
<i>wpOB</i>		18,29	$1,1 \cdot 10^6$	49,77	20,63	$2,1 \cdot 10^5$	9,47	2,18	0,9985	-2,9493	34,287
	<i>trnL-trnF</i>	18,24	$9,4 \cdot 10^5$	49,67	20,62	$1,7 \cdot 10^5$	9,22	2,06	0,9973	-3,1927	37,311
	<i>trnM-atpE</i>	18,81	$3,3 \cdot 10^5$	49,96	20,94	$6,4 \cdot 10^4$	9,57	2,1	0,9989	-3,0968	36,47
		24,73	$3,4 \cdot 10^4$	50,41	26,74	$6,5 \cdot 10^3$	9,47	2,19	0,9868	-2,9343	37,837

^a Mittelwert aus Triplikaten (die Standardabweichung liegt für alle Ct-Werte zwischen 0,09–0,94).

^b Berechnet aus Kalibrationsgeraden erstellt mit 0,01–10 ng Plasmid-DNA.

^c Bestimmt aus den Kopienzahlen der 0,01–10 ng „universellen“ Verdünnungsreihen von Pflanzen-DNA. Ab einem Effizienzunterschied $< 0,20$ wurde dies mathematisch berücksichtigt. Würde es nicht beachtet werden, wäre die maximale Abweichung von den angeführten Werten 5,47 ng (Daten nicht gezeigt).

^d Effizienzen und Korrelationskoeffizienten der zur Normalisierung gemessenen Verdünnungsreihen von 0,01–10 ng Plasmid-DNA.

^e Die DNA wurde stets aus der in der ersten Spalte angegebenen Pflanzenart extrahiert. Steigungen und *y*-Achsenabschnitte der zum Überprüfen des Geräteinflusses parallel gemessenen Verdünnungsreihen von 0,01–10 ng reiner Pflanzen-DNA. Hinsichtlich der Effizienzen (Steigungen) sind die Varianzen zur „universellen“ Kalibration (4.3.3) vernachlässigbar klein. Sämtliche Effizienzen und Geradengleichungen sind in Anhang A.6 zusammengestellt.

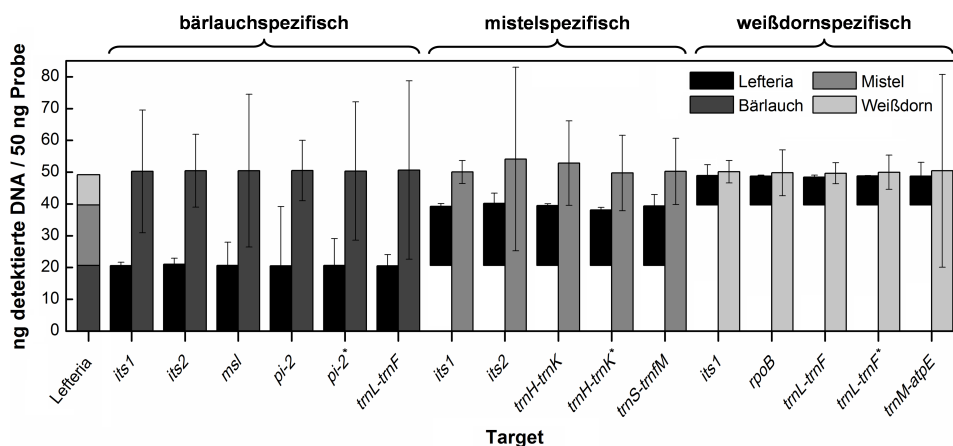


Abb. 4.64: Menge an DNA berechnet aus den detektierten Kopienzahlen für alle 16 Target-Sequenzen. Die gestapelte Säule vorne veranschaulicht die DNA-Zusammensetzung von Lefteria-Tabletten. Die Lefteria-Zusammensetzung spiegelt den Mittelwert aller 16 Targets wider ($n = 4$).

schon bei Vergleich der DNA-Extraktionsmethode mit jeder einzelnen Methode nachgewiesen wurden (4.1.1.4 und 4.1.6). Mit der Ermittlung der DNA-Zusammensetzung von Lefteria ist die wichtigste Grundvoraussetzung für einen quantitativen DNA-basierten Kontrolltest für Lefteria-Tabletten erbracht. Die Bestimmung mit insgesamt 16 verschiedenen Primerpaaren führt zu einem sehr exakten Ergebnis. Das berechnete Verhältnis wurde daher als korrekte DNA-Zusammensetzung von Lefteria festgelegt. Dass prinzipiell alle Targets zur Lefteria-Analyse hervorragend geeignet sind, zeigt zudem, dass bioinformatische Vorarbeiten für den Aufbau einer *real-time* PCR eine wichtige Voraussetzung des experimentellen Designs darstellen.

4.3.6 Target-Kopien in den Pflanzengenomen

Beim Blick auf die ermittelten Kopienzahlen für Pflanzen-DNA in Tab. 4.24 (vierte Spalte) fallen große Unterschiede auf. Zur besseren Einordnung dieser Daten wurden die Verhältnisse von Target-Kopien zu Pflanzengenomen berechnet (Tab. 4.25). Die Genomgrößen entstammen den eigenen zytometrischen Messungen dargestellt in Anhang A.1.2 (Bärlauch: 59,2 pg; Mistel: 153,3 pg; Weißdorn: 2,7 pg). Bei allen drei Spezies sind *its*-Spacer sehr häufig im Genom vorhanden. Das ubiquitäre Vorkommen von rRNA-Genen und den zwischen ihnen liegenden Spacern wurde schon vielfach in der Literatur diskutiert [413–415]. Bei Pflanzen sind Kopienzahlen zwischen 150 und 26.000 normal und korrelieren mit der Genomgröße [416, 417], was sich mit den erhaltenen Daten deckt. Von Dubouzet *et al.* (1999) [418] wurde gezeigt, dass Genome von Mitgliedern der Gattung *Allium* mit mindestens 30.000 *its*-Kopien pro Zelle überdurchschnittlich viele rRNA-Gene enthalten. Da Bärlauch eines der größten Genome unter den Lauchpflanzen hat, erscheint eine Kopienzahl zwischen 37.000–118.000 realistisch. Ohne genaue Zahlen zu nennen, geht eine ähnliche Studie von mehreren tausend *its*-Kopien für *Viscum* aus [419]. Von tRNA-Genen sind ebenfalls vergleichsweise hohe Kopienzahlen beschrieben [420, 421], was zusätzlich die Glaubwürdigkeit

Tab. 4.25: Bestimmung der Target-Sequenzkopien in 1 ng Pflanzen-DNA sowie genomweit gemessen (Genomgröße ist als 2C-Wert in Pikogramm angegeben).

Target	Bärlauch		Target	Mistel		Target	Weißdorn	
	1 ng	59,2 pg		1 ng	153,2 pg		1 ng	2,7 pg
<i>its1</i>	$1,9 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$	<i>its1</i>	$6,2 \cdot 10^4$	$9,6 \cdot 10^3$	<i>its1</i>	$7,8 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^2$
<i>its2</i>	$6,2 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^4$	<i>its2</i>	$3,0 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^2$	<i>rpoB</i>	$2,2 \cdot 10^4$	$5,9 \cdot 10^1$
<i>msh</i>	$2,3 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^1$	<i>trnH-trnK</i>	$5,1 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^3$	<i>trnL-trnF</i>	$1,9 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^1$
<i>pi-2</i>	$3,5 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^2$		$6,7 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^2$		$6,7 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^1$
	$5,1 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^0$	<i>trnS-trnfM</i>	$1,3 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^3$	<i>trnM-atpE</i>	$6,9 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^0$
<i>trnL-trnF</i>	$6,9 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^3$						

erzielten Ergebnisse stützt. Aufgrund der Vielzahl verschiedener tRNA-Gene und unterschiedlicher *codon usage* [422] sind konkrete Werte für Pflanzen aber nicht bekannt. Da eine eukaryotische Zelle allgemein große Mengen von rRNA und tRNA benötigt, sind die entsprechenden Gene aber häufiger im Genom vertreten als alle anderen Gentyten [423]. Dies zeigen sehr deutlich die Kopienzahlen der RNA-Gene im Vergleich mit *msh* und *pi-2* bei Bärlauch. Ebenfalls in hoher Kopienzahl vorhanden ist das Gen für die RNA-Polymerase B, von dem ein hohes Vorkommen schon anderweitig belegt worden ist [424]. Zudem spiegeln die Zahlen anschaulich den großen Genomgrößenunterschied von Weißdorn zu den anderen beiden Pflanzen wider.

Auffällig in Tab. 4.25 sind gewisse Abweichungen. Für Bärlauch *its* und *pi-2*, Mistel *its* und *trnH-trnK* sowie Weißdorn *trnL-trnF* wurden jeweils zwei Primerpaare getestet. Theoretisch sollten mit beiden Primerpaaren ähnliche Kopienzahlen detektiert werden, dies ist bei Bärlauch *its1* und *its2*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF* auch der Fall. Kleine Abweichungen sind durch leicht schwankende Ct-Werte zu begründen, da bei einer PCR-Effizienz um 2 eine Verringerung des Ct-Werts um z.B. 1 schon zu einer Verdoppelung der Kopienzahl führt. Bei Bärlauch *pi-2* und Mistel *its* reicht dies nicht als Erklärung. In diesen Fällen binden Primerpaare unterschiedlich gut die Target-Sequenzen. Da bei der Lefteria-Quantifizierung sowohl artifizielle Plasmid-DNA als auch DNA-Proben mit denselben Primern analysiert werden, haben die festgestellten Abweichungen keinen Einfluss auf die Aussage des entwickelten Assays.

4.3.7 Korrelation von DNA-Menge, Genomgröße und Pulvermenge

Ziel des Vergleichs der DNA-Extraktionsmethoden mit dem Schwerpunkt Wiederholpräzision (4.1.7) war es, eine Korrelation von Pulvermengen mit der detektierten DNA zu ermöglichen. Die Genomgrößenbestimmung (siehe A.1.2) diente u.a. auch einer Korrelation von Zellzahlen und DNA-Mengen. Inwieweit das mit Hilfe der entwickelten *real-time* PCR und damit ermittelter DNA-Mengen realisiert werden kann, wird in diesem Abschnitt beschrieben.

Im Fall der Pflanzenzellen ist die Korrelation unproblematisch, führt aber dazu, dass die wenig greifbaren Größen Kopienzahl und DNA-Menge durch Umrechnung in viel anschaulichere

Tab. 4.26: Berechnete theoretische Anzahl an Pflanzenzellen in Lefteria-Pulver.

Spezies	1 ng DNA		1 mg Pulver	Tablette
	DNA [ng]	Zellen	Zellen	Zellen
Bärlauch	0,41	7	$2,5 \cdot 10^4$	$8,3 \cdot 10^6$
Mistel	0,38	2,5	$9,0 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^6$
Weißdorn	0,19	70	$2,6 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^7$

Tab. 4.27: Die Berechnungsgrundlage für die Korrelation von Pflanzenpulver mit DNA-Mengen sind die Pulver- und DNA-Zusammensetzung von Lefteria und die DNA-Ausbeuten, welche mit den entsprechenden Extraktionsmethoden erzielt werden. Die hier gelisteten Daten entstammen den Versuchen zu den DNA Extraktionsmethoden in Kapitel 4.1. In den ersten Spalten ist die Pulverzusammensetzung von Lefteria sowohl für eine einzelne Tablette als auch für 1 mg Lefteria-Pulver aufgeführt. Daneben steht die DNA-Zusammensetzung einer 50 ng Lefteria-DNA-Probe (4.3.5). In den weiteren Spalten sind die DNA-Ausbeute, die mit den beiden besten Extraktionsmethoden (DNeasy und BioMag (pH 13)) erzielt werden können, zusammengestellt. Je Pflanzenmatrix sind Ausbeute und Standardabweichung aufgelistet. Weißdornfrüchtapulver wird als DNA-frei angesehen und nicht berücksichtigt.

Matrix	Lefteria-Zusammensetzung			DNA-Ausbeute ^c			
	Tablette ^a [mg]	1 mg Pulver [mg]	50 ng DNA ^b [ng]	DNeasy		BioMag (pH 13)	
				η [ng/mg]	σ [ng]	η [ng/mg]	σ [ng]
Lefteria	326	1	49,19	269,03	17,14	297,96	12,76
Bärlauch	70	0,21	20,67	628,43	16,43	589,15	9,31
Mistel	50	0,15	19,04	716,53	29,1	810,44	18,61
Weißdorn	40	0,12	9,48	73,69	5,3	472,98	4,4
DNA-frei	166	0,52					

^a Zusammensetzung laut Hersteller, der DNA-freie Anteil liegt bei 166 mg (vgl. Tab. 3.1), d.h. 0,52 mg auf 1 mg Pulver.

^b Experimentell bestimmt mittels *real-time* PCR (4.3.5) und ist unabhängig von der Extraktionsmethode. 50 ng Lefteria-DNA diente als Template.

^c Die angegebenen DNA-Ausbeuten (η in ng DNA pro mg Pulver) entstammen 4.1.7 (vgl. Abb. 4.20). Zudem ist die jeweilige Standardabweichung (σ) angegeben.

Pflanzenzellen konvertiert werden. Unter Berücksichtigung der selber ermittelten Genomgrößen (Bärlauch: 59,2 pg; Mistel: 153,3 pg; Weißdorn: 2,7 pg) wird 1 ng Lefteria-DNA aus sieben Bärlauch-, drei Mistel- und 70 Weißdornzellen extrahiert. Unter der theoretischen Voraussetzung, dass die DNA vollständig aus Lefteria extrahiert wird (Wizard-Methode: 3638 ng intakte DNA aus 1 mg Lefteria-Pulver, vgl. 4.1.1.5), kann so die Anzahl an Zellen in einer Lefteria-Tablette (326 mg) berechnet werden (Tab. 4.26).

Deutlich komplizierter stellt sich die Situation bei der Korrelation von DNA- und Pulvermenge dar, denn dabei kommt der DNA-Extraktionsmethode eine entscheidende Bedeutung zu. Bei den Methodenvergleichen in 4.1.1 und 4.1.6 hat sich gezeigt, dass klassische und *bead*-basierte Methoden unterschiedlich effizient für DNA aus den verschiedenen Pflanzenmatrizen sind. D.h. die DNA-Ausbeute ist methodenabhängig. Auf der anderen Seite wurde auch festgestellt, dass davon die Zusammensetzung von extrahierter Lefteria-DNA nicht beeinflusst wird, die drei DNA-Sorten in einer

Mischprobe anscheinend im Verbund extrahiert werden. Eine Tablette enthält 40 mg Weißdornpulver (25% Pflanzenanteil), der Weißdornanteil bei Lefteria-DNA ist 19%. Diese Werte spiegeln sich bei den klassischen Methoden mit geringer Weißdorn-DNA-Ausbeute aber nicht wider (etwa 1/10 in Vergleich zu Bärlauch und Mistel). Die *bead*-basierten Methoden zeigen zudem eine davon abweichende Weißdornausbeute. Tab. 4.27 stellt die Diskrepanzen dar. Unter Berücksichtigung der Ausbeute der verwendeten Extraktionsmethode ist es mit Gl. 4.2 möglich aus mittels *real-time* PCR (50 ng Template) bestimmten DNA-Mengen die zugrundeliegende Pulvermenge zu berechnen:

$$\text{Pflanzenanteil } [\text{mg}_{\text{Pflanze}}/\text{mg}_{\text{Lefteria}}] = \frac{\text{DNA } [\text{ng}]}{\eta_{\text{Pflanze}}} \cdot \frac{\eta_{\text{Lefteria}}}{50 \text{ ng}} \quad (4.2)$$

mit η = DNA-Ausbeute

Um die Berechnung zu erklären folgt ein Beispiel, bei dem der Rechenweg am Weißdornanteil für die beiden geeignetsten DNA-Extraktionsmethoden DNeasy und BioMag (pH 13) demonstriert wird. Tab. 4.27 gibt an, dass 50 ng Lefteria-DNA 9,48 ng Weißdorn-DNA enthalten. Die DNA-Ausbeute aus Lefteria-Pulver ist 269,03 ng mit DNeasy bzw. 297,96 ng mit BioMag (pH 13) pro 1 mg Pulver. Die Ausbeute aus Weißdornpulver ist 73,69 ng/mg (DNeasy) und 472,98 ng/mg (BioMag (pH 13)). Eingesetzt in Gl. 4.2 ergibt sich für DNeasy:

$$\text{Weißdornanteil} = \frac{9,48 \text{ ng}}{73,69 \text{ ng/mg}_{\text{Weißdorn}}} \cdot \frac{269,03 \text{ ng/mg}_{\text{Lefteria}}}{50 \text{ ng}} = 0,69 \text{ mg}_{\text{Weißdorn}}/\text{mg}_{\text{Lefteria}}$$

Und ebenso für die *beads* (BioMag (pH 13)):

$$\text{Weißdornanteil} = \frac{9,48 \text{ ng}}{472,98 \text{ ng/mg}_{\text{Weißdorn}}} \cdot \frac{297,96 \text{ ng/mg}_{\text{Lefteria}}}{50 \text{ ng}} = 0,12 \text{ mg}_{\text{Weißdorn}}/\text{mg}_{\text{Lefteria}}$$

Auf gleiche Weise lassen sich auch die anderen Pflanzenanteile bestimmen:

Spezies	[mg/mg] ^a	DNeasy			BioMag (pH 13)			
		$\bar{\chi}$	VarK [%]	Abw. ^b [%]	[mg/mg]	$\bar{\chi}$	VarK [%]	Abw. [%]
Bärlauch	0,17–0,19	0,18	9,01	17,6	0,2 –0,22	0,21	6,06	2,65
Mistel	0,13–0,15	0,14	9,01	6,76	0,13–0,15	0,14	6,06	6,7
Weißdorn	0,65–0,74	0,69	9,01	464,38	0,11–0,12	0,12	6,06	2,62

^a Pflanzenanteil $[\text{mg}_{\text{Pflanze}}/\text{mg}_{\text{Lefteria}}]$, berechnet unter Einbeziehung von σ .

^b Differenz zwischen dem Mittelwert $\bar{\chi}$ und der Originalrezeptur (siehe Tab. 4.27).

Trotz identischer Zusammensetzung der Lefteria-DNA nach der DNA-Extraktion, wird nur unter Berücksichtigung der DNA-Ausbeute mit BioMag (pH 13) die korrekte Pulverzusammensetzung der Lefteria-Mischung erhalten. Bei DNeasy wird die Menge an Weißdornpulver um das 4,6-fache überschätzt. Die *bead*-Extraktion erlaubt es, detektierte DNA-Mengen als Menge an Pflanze auszudrücken, womit der Gesamtassay die durch EU-Richtlinien geforderte Eigenschaft aufweist.

Der wahrscheinliche Grund ist das Adsorptionsmaterial. Die Silica-Membranen sind für pflanzliche DNA so optimiert worden, dass je länger ein DNA-Strang ist, desto mehr Wechselwirkungen, also stärkere Bindungen zum Adsorber erreicht werden. Im Vergleich mit Bärlauch und Mistel, ist die aufgrund der vergleichsweise geringen Genomgröße kürzere Weißdorn-DNA dadurch im Nachteil, d.h. sie wird stärker abgewaschen. Bei den *beads* mit ihrer sehr großen Oberfläche und DNA-Bindungskapazität wirkt sich dieser Nachteil nicht aus, so dass jeder DNA-Sorte gleich gut extrahiert werden kann. Auch bei Extraktionen aus Lefteria wirken sich die Effekte nicht aus, die DNA aller drei Pflanzen ist agglomeriert und wird gemeinsam isoliert. Darum ist die Zusammensetzung von Lefteria-DNA stets gleich. Für einen routinemäßigen Einsatz des Gesamtassay sollten daher die BioMag *beads* verwendet werden. Die DNA-Extraktion ist so GxP-konform standardisierbar (Automatisierung) und die angezielte Quantifizierung auf Pulverebene ist möglich.

4.3.8 Zwischenfazit: Aufbau des *real-time* PCR-Assays

Real-time PCR ist die optimale Methode zur Quantifizierung der pflanzlichen Lefteria-Inhaltsstoffe. Mittels mehrerer Targets konnte zweifelsfrei die DNA-Zusammensetzung von Lefteria aufgeklärt werden. Durch eine Korrelation von DNA-Menge und Pflanzenpulver kann sehr präzise die Originalrezeptur bestimmt werden. Unbekannte Lefteria-Proben können demnach mit der entwickelten qPCR-Methode hinsichtlich des Gehalts ihrer Inhaltsstoffe kontrolliert werden.

Entsprechend den schon erwähnten ICH-Richtlinien werden in den folgenden Abschnitten alle wichtigen Leistungscharakteristika des Assays analysiert. Ein breiter dynamischer Messbereich und sehr niedrige Nachweisgrenzen sind typisch für die *real-time* PCR. Ihre Ermittlung soll zeigen, wie viel DNA für eine Analyse benötigt wird oder inwieweit sie eingeschränkt ist. Besonderes Augenmerk liegt auf der Bestimmung von Spezifität und Sensitivität. Eine hohe Spezifität garantiert die Genauigkeit der Ergebnisse und die Sensitivität gibt Aufschluss darüber, inwieweit Abweichungen von der Lefteria-Zusammensetzung detektiert werden können.

4.3.9 Dynamische Messbereiche und Nachweisgrenzen

Dynamische Messbereiche: Die dynamischen Messbereiche konnten als Maß für die minimal bzw. maximal quantifizierbaren Mengen an Template, durch Erweiterung der Verdünnungsreihen aus den Effizienzversuchen (auf bis zu 13 Verdünnungsstufen) genau eingegrenzt werden. Dies wurde erneut mit Plasmid-DNA und DNA aus Pflanzenpulvern bzw. Lefteria durchgeführt. In Konzentrationen ausgedrückt bewegten sich die untersuchten Verdünnungen zwischen 1 µg bis hinunter auf $1 \cdot 10^{-9}$ ng. Da das Standardbeispiel Bärlauch *its1* schon zur Effizienzberechnung dargestellt wurde, zeigt Abb. 4.65 exemplarisch die dynamischen Bereiche für Bärlauch *its2* mit Plasmid-, Bärlauch- sowie Lefteria-DNA als Template. Der Messbereich reicht bei Plasmid-DNA über neun Dekaden ($2 \cdot 10^1$ – $2 \cdot 10^9$ Kopien). Er ist damit etwas breiter als bei den realen Proben

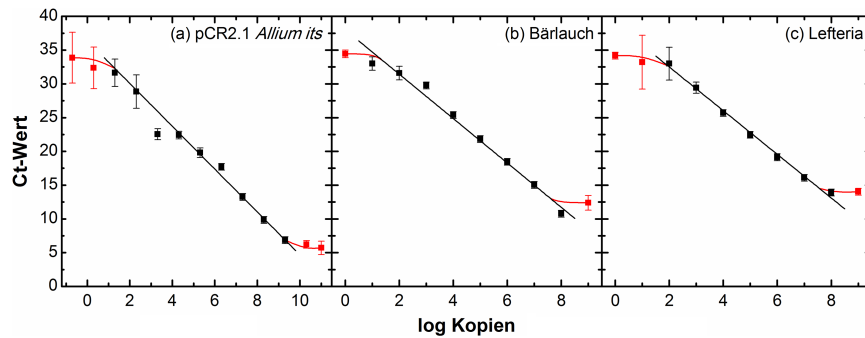


Abb. 4.65: Dynamische Bereiche von Bärlauch *its2*. Dargestellt sind die linearen Messbereiche in Plasmidstandard- (a), Bärlauch- (b) und Lefteria-DNA (c) in schwarz, nicht mehr lineare Bereiche sind rot verdeutlicht. Aufgetragen sind die Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopien (Plasmid-DNA) bzw. der initialen Menge an Template-DNA. ($n = 3$).

(Bärlauch: $1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^8$ Kopien; Lefteria: $1 \cdot 10^1 - 1 \cdot 10^7$ Kopien). Insgesamt ist stets eine Quantifizierung in einem Bereich möglich, dessen Breite wohl von keiner anderen Methode erreicht wird. In Tab. 4.28 sind die dynamischen Bereiche aller Primerpaare zusammengefasst. In allen Fällen wurde in den Negativkontrollen (NTC) erwartungsgemäß keine DNA detektiert. Mit Plasmid-DNA können die Kopienzahlen über neun, teilweise sogar zehn Dekaden korrekt quantifiziert werden. Minimal können jeweils noch ca. 2–200 individuelle Kopien detektiert werden. Bei Verwendung von genomischer DNA ist das Verhältnis von Target zu Gesamt-DNA allgemein ungünstig. Bei mehr als 100 ng DNA im Ansatz (25 μ L), wirkt die DNA inhibierend auf die Reaktion, wodurch die obere Nachweisgrenze eingeschränkt wird. Generell sind aber die dynamischen Bereiche eines Targets bei Pflanzen- und Lefteria-DNA fast identisch. Mit Pflanzen- und Lefteria-DNA sind etwa 1–50 Kopien messbar, d.h. die Methode ist bei pflanzlichen Proben ebenso sensitiv wie bei Plasmid-DNA. In Lefteria lässt sich eine Pflanze genauso gut nachweisen wie in reiner Pflanzen-DNA.

Nachweisgrenzen: Die Nachweisgrenzen der jeweiligen Targets können mathematisch als analytisches Detektionslimit bestimmt werden [380]. Die LOD_{90} -Werte, berechnet mit einer Probit-Regressionsanalyse, sind dabei als Nachweisgrenzen definiert. Es wird dafür die Menge an Template-DNA berechnet, welche mit 90%iger Wahrscheinlichkeit noch detektiert wird. Die Probit-Regression wurde gewählt, da sie eine besonders gute Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Targets ermöglicht. Es werden dazu die LOD_{50} -Werte herangezogen, da bei 50% Detektionswahrscheinlichkeit das Konfidenzintervall einer Probit-Analyse am engsten ist. Überlappen die Konfidenzintervalle der LOD_{50} -Werte zweier Targets, besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ihrer Nachweisgrenzen [381]. Zur Berechnung wurden diejenigen DNA-Mengen, bei welchen der *real-time* PCR-Nachweis positiv ausfällt und die Ct-Werte noch dem linearen Zusammenhang folgen als 1 definiert und negative Ergebnisse als 0. Um genaue Ergebnisse zu erzielen, wurden Verdünnungsstufen von Plasmid-DNA im Bereich der erwarteten Nachweisgrenzen am unteren und oberen Ende der dynamischen Bereiche 16-fach (Pflanzen-DNA: nur untere Nachweisgrenze,

Tab. 4.28: Die dynamischen Messbereiche aller Primerpaare wurden für alle DNA-Typen bestimmt.

Spezies	Primerpaar	Kopienzahl ^a		
		Plasmid-DNA	Pflanzen-DNA ^b	Lefteria-DNA ^c
Bärlauch	<i>its1</i>	204–2,04 · 10 ⁹	20 –2,44 · 10 ⁸	19 –7,38 · 10 ⁷
	<i>its2</i>	20–2,04 · 10 ⁹	12 –1,22 · 10 ⁸	12 –1,26 · 10 ⁷
	<i>mst</i>	205–2,05 · 10 ⁹	0,29–1,94 · 10 ⁴	0,22–1,38 · 10 ⁴
	<i>pi-2</i>	190–1,9 · 10 ¹⁰	5 –3,89 · 10 ⁵	2 –3,50 · 10 ⁵
	<i>trnL-trnF</i>	190–1,9 · 10 ⁹	0,04–5,45 · 10 ³	0,02–2,02 · 10 ³
	<i>trnL-trnF</i>	224–2,24 · 10 ⁹	36 –1,1 · 10 ⁶	7 –5,19 · 10 ⁶
Mistel	<i>its1</i>	204–2,04 · 10 ⁹	5 –6,89 · 10 ⁶	1 –1,21 · 10 ⁶
	<i>its2</i>	2.039–2,04 · 10 ⁹	0,02–2,1 · 10 ⁵	0,17–1,49 · 10 ⁵
	<i>trnH-trnK</i>	210–2,1 · 10 ⁹	47 –6,14 · 10 ⁶	15 –1,86 · 10 ⁶
	<i>trnH-trnK</i>	210–2,1 · 10 ⁹	0,4 –7,51 · 10 ⁵	0,04–8,77 · 10 ⁴
	<i>trnS-trnfM</i>	217–2,17 · 10 ⁹	1 –9,21 · 10 ⁵	0,31–3,43 · 10 ⁵
Weißdorn	<i>its1</i>	2–2,03 · 10 ⁹	12 –1,13 · 10 ⁷	10 –1,15 · 10 ⁷
	<i>rpoB</i>	215–2,15 · 10 ⁹	23 –2,48 · 10 ⁵	3 –3,43 · 10 ⁵
	<i>trnL-trnF</i>	187–1,87 · 10 ⁹	2 –1,77 · 10 ⁵	3 –2,71 · 10 ⁵
	<i>trnL-trnF</i>	187–1,87 · 10 ⁹	1 –7,44 · 10 ⁵	1 –7,81 · 10 ⁴
	<i>trnM-atpE</i>	2–2,26 · 10 ⁹	0,07–3,19 · 10 ⁴	0,01–4,69 · 10 ³

^a Die Kopien der Targets in pflanzlicher DNA wurden mit Plasmid-DNA (Kalibration) bestimmt. Es wurden NTC (Wasser anstatt DNA) mit vermessen, umgerechnet in Kopien enthielten sie stets < 1 Kopie.

^b Die Kopienzahlen entsprechen 1 · 10⁻⁵–1 · 10⁻² ng DNA am unteren Ende und 10–100 ng am oberen.

^c Die Kopien entsprechen zwischen 1 · 10⁻⁵–1 · 10⁻² und 100 ng DNA.

zwölfmal) gemessen. Mit dem Programmpaket SPSS Statistics 20 (IBM Corporation, Armonk, USA) wurden aus dem Verhältnis der Summe positiver Proben zur Gesamtheit an Proben die LOD₅₀- und LOD₉₀-Werte berechnet. Die Präzision der berechneten LOD-Werte liegt bei dieser Methode in einem Konfidenzintervall von 95% ($p < 0,05$), d.h. die berechneten Werte sind mit mindestens 95% Wahrscheinlichkeit richtig. Neben dem analytischen wurde auch das relative Detektionslimit bestimmt [381]. Der relative Wert beschreibt die Leistungsfähigkeit des Assay in Lefteria-Mischproben. Er gibt an, wie viel DNA in Anwesenheit von „Fremd“-DNA vorliegen muss, damit eine Detektion noch möglich ist [381]. Das relative Detektionslimit z.B. bei Bärlauch *its1* wurde aus Verdünnungen von Bärlauch-DNA in Anwesenheit von Mistel- und Weißdorn-DNA in ihren für Lefteria typischen Konzentrationen und Verhältnissen bestimmt. Dabei wurde die Menge an „Fremd“-DNA konstant gehalten. Die Ergebnisse wurden analog zu den analytischen Detektionslimits mit SPSS 20 berechnet. Abb. 4.66 und 4.67 demonstrieren das Vorgehen am Beispiel Bärlauch *its1*. Aus den gemessenen Wahrscheinlichkeiten (Probenanzahl/messbare Proben, schwarze Quadrate) wurden die theoretischen Wahrscheinlichkeiten (rote Linie) bestimmt, aus denen die LOD-Werte ablesbar sind. Die Nachweisgrenzen 248 Kopien und 1,55 · 10⁹ Kopien mit Plasmid-DNA sind rein theoretische Werte. Die reale analytische Nachweisgrenze liegt bei elf Kopien. In Anwesenheit von Mistel und Weißdorn erhöht sie sich nur unwesentlich auf 24 Kopien.

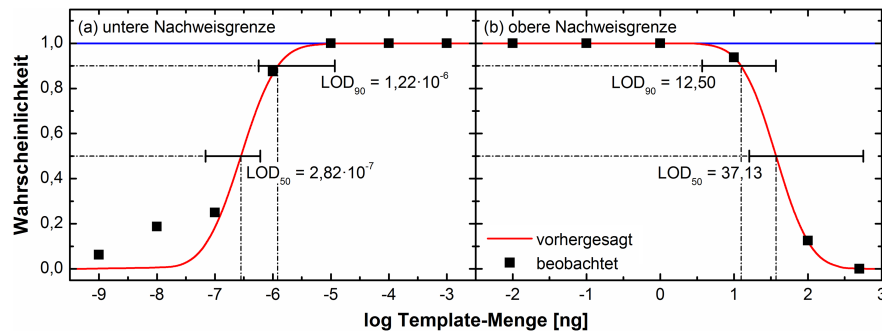


Abb. 4.66: Probit-Regressionsanalysen zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für die Plasmidstandards von Bärlauch *its1*. Gezeigt sind die experimentell bestimmten Wahrscheinlichkeiten, das der qPCR-Nachweis bei einer gewissen DNA-Menge noch positiv ausfällt sowie der daraus berechnete Wahrscheinlichkeitsverlauf. Die Nachweisgrenzen sind definiert als diejenigen DNA-Menge, deren Detektionswahrscheinlichkeit 90% ist. Die unteren Limits liegen bei LOD_{50} von 57,34 Kopien und LOD_{90} von 247,78 Kopien (a). Die oberen Limits sind LOD_{50} von $7,56 \cdot 10^9$ Kopien und LOD_{90} von $1,55 \cdot 10^9$ Kopien. Gezeigt werden jeweils auch die 95%-Konfidenzintervalle in denen die LOD-Werte liegen (b).

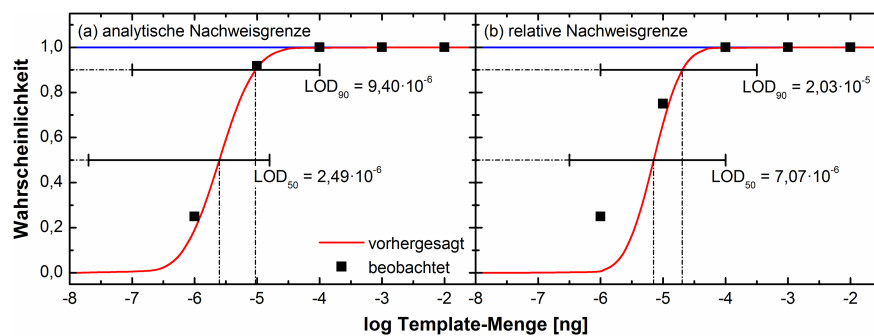


Abb. 4.67: Probit-Regressionsanalysen zur Bestimmung der analytischen und relativen Nachweisgrenzen von Bärlauch *its1*. In Kopien umgerechnet liegen die Nachweisgrenzen für *its1* in Bärlauch bei LOD_{50} von 2,64 Kopien und LOD_{90} von 10,65 Kopien (a). Mit einem Hintergrund der anderen beiden *Lefteria*-Inhaltsstoffe verschieden sich die Nachweisgrenzen auf LOD_{50} von 7,9 Kopien und LOD_{90} von 23,87 Kopien (b).

Bewertung der Detektionslimits: Tab. 4.29 gibt die erzielten Ergebnisse für alle Targets wieder. Die aus der Fülle der Experimente mathematisch bestimmten Detektionslimits spiegeln recht genau die Grenzen der dynamischen Bereiche (vgl. Tab. 4.28) wider, was erneut für die hohe Genauigkeit des entwickelten Assays spricht. Im Allgemeinen liegen die Detektionsgrenzen ein wenig vor dem Ende des jeweiligen dynamischen Bereichs. Die unteren Nachweisgrenzen in Plasmid-DNA sind stets etwa eine Dekade über denen in Pflanzen-DNA. Dies überrascht zunächst, lässt sich aber damit erklären, dass die Verdünnungsstufen bei gleicher Kopienzahl für die Vektoren höher sind und damit vermehrt Pipettierungenauigkeit die Nachweisgrenzen mitbestimmen. Zwischen reiner Pflanzen-DNA und *Lefteria* besteht kein nennenswerter Unterschied ($q < 1,7$, $p > 0,05$), d.h. DNA der jeweils anderen beiden Pflanzen beeinflussen oder stören die Analyse nicht. Die 95%-Konfidenzintervalle der LOD_{50} -Werte der einzelnen Targets für Bärlauch, Mistel bzw. Weißdorn überlappen ausnahmslos, sowohl unter den theoretischen, analytischen und

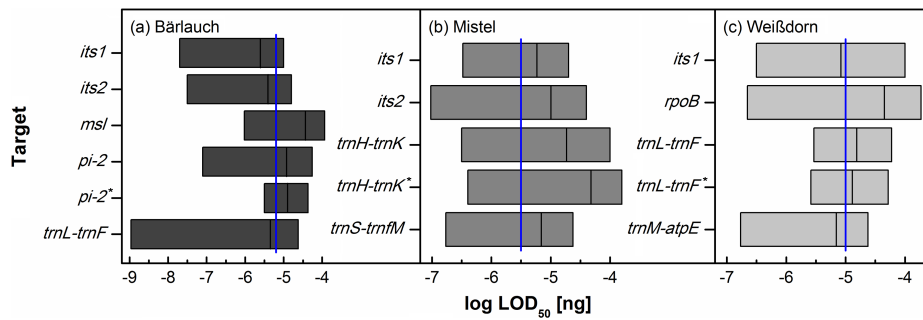


Abb. 4.68: 95%-Konfidenzintervalle der LOD₅₀-Werte für die analytischen Detektionslimits. Gezeigt sind Daten welche mit Bärlauch- (a), Mistel- (b) und Weißdorn-DNA (c) gewonnen wurden. Die blaue Linie verdeutlicht die Überlappung der Nachweisgrenzenbereiche.

relativen Detektionslimits. Damit hat kein Target eine signifikant messbar ($p = 0,05$) niedrigere oder höhere Nachweisgrenze (Abb. 4.68). Auch die Nachweisgrenzen zwischen den drei Spezies sind nicht signifikant unterschiedlich. Zusammenfassend konnten für alle Targets ein breiter linearer Messbereich über viele Dekaden und eine Nachweisgrenze von nur wenigen Kopien bewiesen werden. Es ist damit möglich, Bärlauch-, Mistel- oder Weißdorn-DNA im Bereich um 1–100 fg nachzuweisen, wobei sich Anwesenheit von „Fremd“-DNA nicht störend auf die Analyse auswirkt (einzige Einschränkung: Gesamtmenge < 100 ng DNA). Nachweisgrenzen von nur einigen Femtogramm DNA sind für *real-time* PCR nicht unüblich [425, 426]. Gängige ELISA für DNA-Anwendungen z.B. zeigen zum Vergleich Nachweisgrenzen von nur ca. 1 pg DNA [427]. Die Wahl der qPCR ist hier klar im Vorteil.

4.3.10 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität ist das Maß dafür, ob ein gemessener Ct-Wert tatsächlich auf die untersuchte Pflanze zurückzuführen ist oder ob die Entstehung des Signals unspezifisch erfolgt [381]. In Lefteria-Mischproben könnte ein Signal z.B. erzeugt mit Bärlauch-Primern zum Teil auch durch Amplifikation eines Sequenzabschnitts von Mistel, Weißdorn oder sogar von beiden Pflanzen hervorgerufen werden. Eine korrekte Quantifizierung würde dadurch verhindert. Um echte Signale von unspezifischen abzugrenzen, wurden qPCR mit allen 16 pflanzenspezifischen Primerpaaren und den jeweils anderen Pflanzen als Template durchgeführt.

Bärlauch *msh*, *pi-2*, *trnL-trnF*, Mistel *its1*, *trnS-trnM*, Weißdorn *its1*, *trnL-trnF* und *trnM-atpE* sind vollkommen spezifisch (Tab. 4.30), d.h. mit diesen Primerpaaren in „Fremd“-DNA detektierten Kopienzahlen liegen unterhalb der Nachweisgrenzen (vgl. Tab. 4.29). Aber auch die Amplifikation mit allen weiteren Primerpaaren bewegt sich im Bereich der Nachweisgrenzen. Die dadurch hervorgerufenen Abweichungen bei der Analyse von Mischproben sind minimal. Die Untersuchungen zur Zusammensetzung von Lefteria waren mit allen 16 Primerpaaren frei von unspezifischer Beeinflussung.

Tab. 4.29: Berechnete Detektionslimits für sämtliche Targets. Es sind stets nur die LOD₉₀-Werte angegeben, da sie reale Nachweisgrenzen darstellen. Neben den Kopienzahlen sind ebenfalls Werte für die DNA-Menge aufgeführt. Die ebenfalls berechneten LOD₅₀-Werte dienen nur dem Vergleich in Abb. 4.68, sind hier deswegen zur besseren Übersicht nicht mit gelistet.

Spezies	Primerpaar	theoretisches	analytisches		relatives	
		Detektionslimit	Detektionslimit		Detektionslimit	
		Kopien	DNA [ng]	Kopien	DNA [ng]	Kopien
Bärlauch	<i>its1</i>	247,78–2,55 · 10 ⁹	9,4 · 10 ⁻⁶	10,65	2,03 · 10 ⁻⁵	23,87
	<i>its2</i>	127,26–1,33 · 10 ⁹	1,35 · 10 ⁻⁵	4,67	2,34 · 10 ⁻⁵	8,26
	<i>msl</i>	270,23–1,06 · 10 ⁹	3,26 · 10 ⁻⁴	0,1	4,8 · 10 ⁻⁴	0,15
	<i>pi-2</i>	153,28–1,69 · 10 ¹⁰	1,8 · 10 ⁻⁴	0,48	3,2 · 10 ⁻⁴	0,88
	<i>trnL-trnF</i>	085,97–1,79 · 10 ⁹	6,63 · 10 ⁻⁵	0,01	7,19 · 10 ⁻⁵	0,01
Mistel	<i>its1</i>	140,6 –9,52 · 10 ⁹	4,59 · 10 ⁻⁵	1,54	6,52 · 10 ⁻⁵	2,24
	<i>its2</i>	944,14–3,43 · 10 ⁹	1,15 · 10 ⁻⁴	0,02	4,01 · 10 ⁻⁴	0,11
	<i>trnH-trnK</i>	336,62–3,14 · 10 ⁹	2,25 · 10 ⁻⁴	5,92	4,8 · 10 ⁻⁴	13,34
	<i>trnS-trnfM</i>	275,23–2,08 · 10 ⁹	4,38 · 10 ⁻⁴	0,14	2,93 · 10 ⁻⁴	0,08
Weißdorn	<i>its1</i>	7,35–7,87 · 10 ⁹	2,21 · 10 ⁻⁵	1,62	7,19 · 10 ⁻⁵	5,34
	<i>rpoB</i>	565,03–2,72 · 10 ⁹	3,68 · 10 ⁻⁴	6,11	3,65 · 10 ⁻⁴	6,06
	<i>trnL-trnF</i>	247,22–1,33 · 10 ⁹	1,11 · 10 ⁻⁴	1,64	7,08 · 10 ⁻⁴	10,66
	<i>trnM-atpE</i>	201,59–4,6 · 10 ⁹	9,88 · 10 ⁻⁵	0,74	4,8 · 10 ⁻⁴	3,51
		7,76–4,15 · 10 ⁹	5,63 · 10 ⁻⁵	0,03	1,13 · 10 ⁻⁴	0,07

4.3.11 Zwischenfazit: Auswahl der geeignetsten Targets

Für eine einfache und schnell durchzuführende Quantifizierung der Lefteria-Pflanzen können nicht immer alle 16 Targets gleichzeitig untersucht werden. Die ständige Testung so vieler Primerpaare wäre zu aufwendig und ist auch gar nicht notwendig, da alle Targets für eine korrekte DNA-Quantifizierung taugen. Daher wurde die Anzahl an Primerpaaren reduziert.

Zum Vergleich der Targets wurden Effizienzen, Nachweisgrenzen und Spezifität evaluiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Nachweisgrenzen im mittleren Femtogrammbereich verbunden mit dynamischen Bereichen, welche breit genug sind, um mögliche Schwankungen in der Lefteria-Zusammensetzung detektieren zu können, für kein Target eine Einschränkung der Detektion darstellen. Mittels Probit-Regressionsanalysen wurde zudem festgestellt, dass zwischen den Nachweisgrenzen der einzelnen Primerpaare keine signifikanten Unterschiede bestehen. Für eine engere Auswahl wurden daher vornehmlich die Kriterien Effizienz und Spezifität herangezogen. Auch wenn alle Targets prinzipiell spezifisch sind, erfüllen nur acht die Spezifitätsbedingungen vollständig. Als weiteres Auswahlkriterium wurde berücksichtigt, ob die Effizienzen bei der PCR mit Plasmidstandard und pflanzlicher DNA ähnlich sind. Es verbleiben noch fünf mögliche Kandidaten: Bärlauch *pi-2*, *trnL-trnF*, Mistel *trnS-trnfM*, Weißdorn *its1* und *trnM-atpE*. Da zwischen diesen fünf Targets keine messbaren Unterschiede bestehen, wurde entschieden, den Assay mit je zwei Targets pro Pflanze aufzusetzen. Dies macht den Assay weniger abhängig

Tab. 4.30: Spezifität der Target-Sequenzen. Angegeben sind jeweils die Mengen falsch detektierter genomischer DNA bei Vorlage von 50 ng Template. Zusätzlich ist die falsch detektierte DNA in Negativkontrollen der Tabelle zu entnehmen.

Spezies	Primerpaar	Bärlauch-DNA	Mistel-DNA	Weißdorn-DNA	NTC ^d	Spezifität ^e
		DNA [ng] ^a	DNA [ng] ^b	DNA [ng] ^c	DNA [ng]	
Bärlauch	<i>its1</i>		$1,18 \cdot 10^{-5}$	$1,05 \cdot 10^{-7}$	$1,11 \cdot 10^{-6}$	- / +
	<i>its2</i>		$1,34 \cdot 10^{-3}$	$9,16 \cdot 10^{-9}$	$8,32 \cdot 10^{-7}$	- / +
	<i>msl</i>		$4,49 \cdot 10^{-3}$	$3,11 \cdot 10^{-7}$	$3,74 \cdot 10^{-5}$	+ / +
	<i>pi-2</i>		$5,6 \cdot 10^{-1}$	$6,84 \cdot 10^{-7}$	$6,2 \cdot 10^{-4}$	- / +
	<i>trnL-trnF</i>		$4,25 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-6}$	$1,65 \cdot 10^{-5}$	+ / +
Mistel	<i>its1</i>	$4,79 \cdot 10^{-4}$		$1,67 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	+ / +
	<i>its2</i>	$1,97 \cdot 10^{-3}$		$4,4 \cdot 10^{-3}$	$2,95 \cdot 10^{-3}$	- / -
	<i>trnH-trnK</i>	$4,71 \cdot 10^{-3}$		$7,06 \cdot 10^{-8}$	$1,82 \cdot 10^{-5}$	- / +
		$4,58 \cdot 10^{-4}$		$1,99 \cdot 10^{-3}$	$9,56 \cdot 10^{-4}$	- / -
	<i>trnS-trnfM</i>	$1,06 \cdot 10^{-3}$		$4,86 \cdot 10^{-5}$	$4,16 \cdot 10^{-4}$	+ / +
Weißdorn	<i>its1</i>	$2,53 \cdot 10^{-3}$	$6,69 \cdot 10^{-4}$		$9,96 \cdot 10^{-4}$	+ / +
	<i>rpoB</i>	$2,07 \cdot 10^{-3}$	$3,93 \cdot 10^{-3}$		$2,85 \cdot 10^{-3}$	- / -
		$1,3 \cdot 10^{-1}$	$6,74 \cdot 10^{-4}$		$9,40 \cdot 10^{-3}$	- / -
	<i>trnL-trnF</i>	$5,02 \cdot 10^{-3}$	$5,27 \cdot 10^{-3}$		$5,14 \cdot 10^{-3}$	+ / +
	<i>trnM-atpE</i>	$9,34 \cdot 10^{-2}$	$7,27 \cdot 10^{-3}$		$1,32 \cdot 10^{-2}$	+ / +

^a Entspricht 0,02–45,66 Kopien auf 50 ng DNA ($3,4 \cdot 10^4$ – $9,9 \cdot 10^7$ Kopien).

^b Hier zwischen 0,02 und 383,77 Kopien in den Proben enthalten.

^c Umgerechnet sind dies $5,26 \cdot 10^{-5}$ bis 1,87 Kopien.

^d NTC = *no template control*; ebenfalls umgerechnet in Kopienzahlen.

^e Primerpaare gelten als spezifisch, wenn die detektierte „Fremd“-DNA bzw. die Kopien unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen Targets liegen (vgl. Tab. 4.29): - = nicht vollkommen spezifisch; + = spezifisch; in der Reihenfolge: Bärlauch / Mistel / Weißdorn.

von einer einzigen Sequenz und soll überdies einer erhöhten Genauigkeit dienen. Als zweites Mistel-Primerpaar wurde Mistel *its1* gewählt, da es das einzige weitere mistelspezifische ist.

An diesem Punkt ist das Setup des quantitativen Analysesystems abgeschlossen. Die entwickelte Methodik arbeitet bei optimalen PCR-Bedingungen, hat sehr niedrige Nachweisgrenzen und ist hochspezifisch. In der Folge wurde der Assay durch Bestimmung des wichtigsten Kriteriums einer bioanalytischen Untersuchung, der diagnostischen Sensitivität, validiert.

4.3.12 Analyse von DNA-Gemischen

Zunächst sollte sich der entwickelte Assay unter möglichst realen Bedingungen zur Aufklärung von Probenzusammensetzungen bewähren. Es wurde überprüft, ob verschieden zusammengesetzte DNA-Proben mit den sechs Primerpaaren erwartungsgemäß analysiert werden können. PCR und Auswertung erfolgten wie zuvor mittels parallel analysierten DNA-Standards. 50 ng DNA-Mischung diente jeweils als Probenmaterial, die Zusammensetzung der einzelnen Proben ist der Beschriftung der Abszissenachse in Abb. 4.69 zu entnehmen.

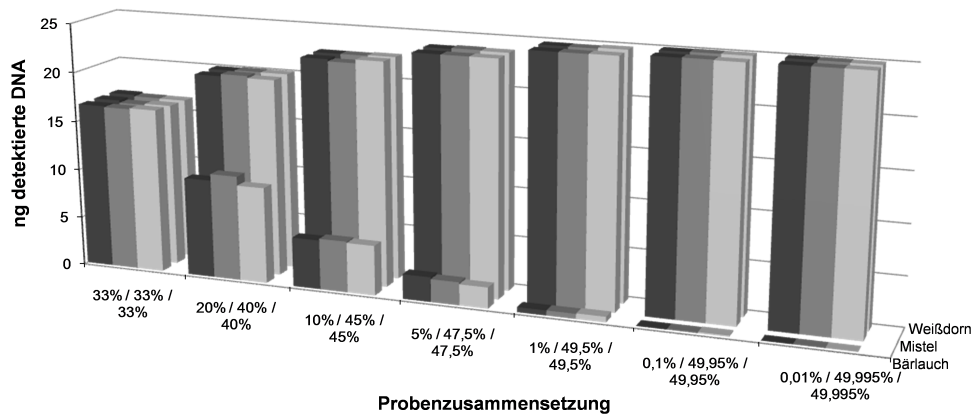


Abb. 4.69: Erwartungswerte und detektierte DNA-Mengen in verschiedenen zusammengesetzten 50 ng DNA-Proben. Die abnehmenden DNA-Konzentrationen von, hier im dargestellten Fall, Bärlauch-DNA sind in der vordersten Reihe aufgetragen. Erwartungswerte sind dunkelgrau, das erste spezifische Primerpaar (*pi-2*) grau und das zweite Primerpaar (*trnL-trnF*) hellgrau gefärbt. Die Ergebnisse für die Variation der anderen beiden DNA-Spezies sind nahezu identisch und werden daher hier nicht gezeigt. Die entsprechenden Abbildungen sind aber **A.6** zu entnehmen. Die prozentuale Probenzusammensetzung schlüsselt sich wie folgt auf: Bärlauch- / Mistel- / Weißdornanteil.

Die Ergebnisse sind dargestellt als DNA-Mengen, normalisiert mit Plasmidstandards und „universeller“ Kalibrationsgeraden. Sowohl bei abnehmendem Bärlauch-, Mistel- oder Weißdornanteil kann die Zusammensetzung richtig detektiert werden. In keiner einzigen Probe weichen Erwartungs- (dunkelgrau) und Messwerte (1. Primerpaar: grau; 2. Primerpaar: hellgrau) signifikant voneinander ab ($t < 1,5$, $p > 0,05$). Vor dem Hintergrund der jeweils anderen beiden DNA-Arten, sind die Unterschiede bei der Abnahme des Anteils der dritten DNA-Sorte von 33% über 20%, 10%, 5% auf 1% jeweils signifikant messbar ($t > 3,7$, $p < 0,01$), ebenso die Zunahme von 33% auf 47,5% ($t > 3,1$, $p < 0,01$). Bei Anteilen kleiner 1% sind Unterschiede zwar in Zahlen messbar, aber nicht mehr signifikant ($t < 0,8$, $p > 0,05$).

Diese Testserie zeigt sehr klar, dass realistisch zu erwartende Abweichungen der Lefteria-Zusammensetzung, wie sie hier simuliert wurden, sehr zuverlässig entdeckt werden können. Im für Lefteria wichtigen Konzentrationsbereich von 1–100 ng Template-DNA erkennt das Analysesystem souverän Schwankungen ab 4% und quantifiziert diese sehr genau.

4.3.13 Diagnostische Sensitivität der *real-time* PCR

Die Begriffe Detektionslimit und analytische Spezifität dienen zur Beschreibung technischer Eigenschaften des PCR-Assays. Der Begriff der diagnostischen Sensitivität bezieht sich dagegen auf die Analyse von realen Proben, d.h. in diesem Fall Mischproben und ist abhängig von der Summe aus molekularer Zusammensetzung und technischer Leistungsfähigkeit [381].

Die diagnostische Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, eine abweichende Zusammensetzung einer Lefteria-Tablette auch als solche zu erkennen (richtig-positiv). So gibt sie in diesem Fall

Tab. 4.31: Probenzusammensetzungen zum Test auf diagnostische Sensitivität. Die zwölf resultierenden Proben wurden alle mit dem ausgewählten Satz von sechs Primerpaaren untersucht. Es ist jeweils nur die DNA-Menge der durch Zugabe abweichenden DNA-Spezies aufgeführt. Die anderen beiden Sorten entsprechen weiterhin dem Original (zweite Spalte). Die dargestellten Zahlen sind die Erwartungswerte für die PCR-Untersuchung.

Spezies	DNA-Menge [ng]				
	Original ^a	0,1%	1%	5%	10%
Bärlauch	20,67	20,69	20,87	21,7	22,73
Mistel	19,04	19,06	19,23	20	20,95
Weißdorn	9,48	9,49	9,58	9,96	10,43

^a Wurde ermittelt in 4.3.5. Daneben ist der Grad der Abweichung angegeben.

den Anteil der Proben an, welche korrekt quantifiziert werden konnten. Daneben existiert noch der Begriff der diagnostischen Spezifität. Dieser gibt den Anteil der korrekt als nicht abweichend erkannten Proben an (richtig-negativ) [381]. Wird z.B. eine Probe unter zehn untersuchten fälschlicherweise als nicht korrekt zusammengesetzt detektiert, obwohl sie der Originalrezeptur entspricht, weist der Test eine diagnostische Spezifität von 90% auf [381].

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Abweichungen der DNA-Zusammensetzung wurden zu 50 ng Lefteria-DNA-Proben verschiedene Mengen an Bärlauch-, Mistel- oder Weißdorn-DNA zugesetzt. Die herbeigeführten Abweichungen der Originalzusammensetzung und die daraus resultierenden DNA-Mengen sind Tab. 4.31 zu entnehmen.

Aufgrund der Ergebnisse aus 4.3.12 wurde erwartet, dass Veränderungen in der Lefteria-Zusammensetzung genau detektierbar sind. Wie aus Abb. 4.70 ersichtlich wird, kann diese Annahme bestätigt werden. Abweichungen ab 5% sind deutlich auszumachen. Der optische Eindruck deckt sich mit der statistischen Beurteilung. Abweichungen von 0,1–1% von der Originalzusammensetzung sind nicht signifikant messbar ($q < 1,7$, $p > 0,05$), ab 5% sind die Unterschiede signifikant ($q > 4,1$, $p < 0,01$). Gut ist auch zu erkennen, dass die Menge an DNA der jeweils anderen Pflanzen, von welchen der DNA-Anteil nicht erhöht wurde, stabil bleibt.

Nachdem sichergestellt war, dass Abweichungen wie es erwartet wurde zu detektieren sind, wurden zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität zwölf Proben jeder Abweichungsstufe dreifach gemessen. Weicht der Mittelwert daraus nicht vom Erwartungswert, aber von der Originalzusammensetzung signifikant ($p < 0,05$) ab, gilt der Messwert als korrekt quantifiziert. Der Anteil an richtig detektierten Proben an der Gesamtheit alle Proben ist, als Prozentwert ausgedrückt, die diagnostische Sensitivität.

Der Unterschied der DNA-Menge zwischen Original und 1% Abweichung ist für keinen Inhaltsstoff groß genug für eine sichere Detektion. Noch geringere Unterschiede sind gar nicht messbar. Die *real-time* PCR kann mit hoher Sicherheit Abweichungen von der Originalrezeptur von Lefteria-Tabletten ab 5% messen (Tab. 4.32 und Abb. 4.71). Die Sensitivität dafür liegt bei 75–88%. Bei

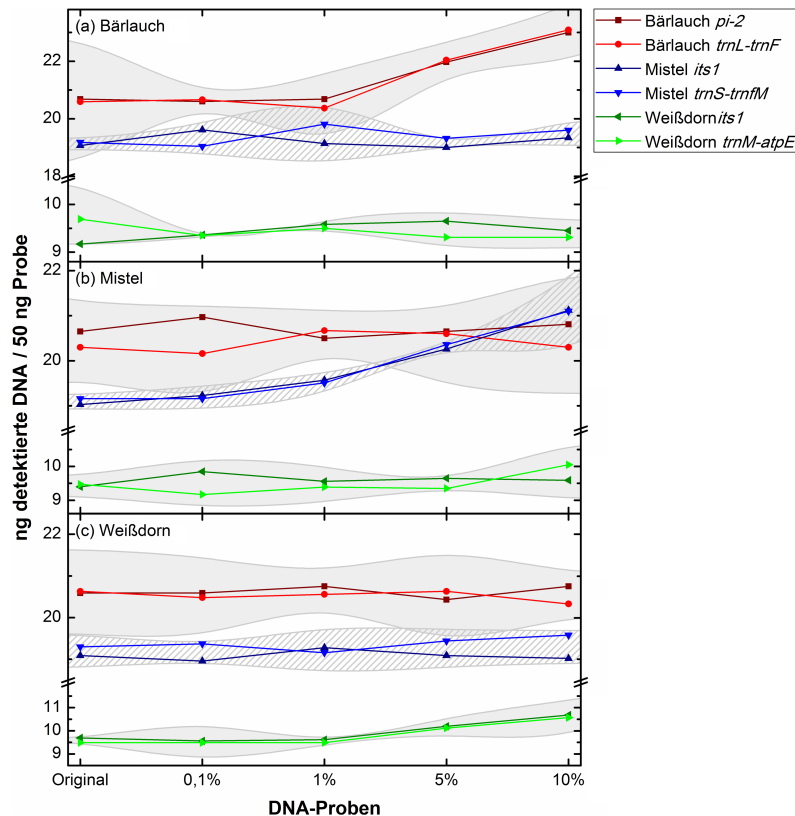


Abb. 4.70: Messung der zwölf *spiking*-Proben im Vergleich zu originalen *Lefteria*-Proben. Die abgebildeten Punkte symbolisieren Mittelwerte von Dreifachmessungen der in Tab. 4.31 definierten Proben. In grau bzw. schraffiert sind die Varianzkorridore gezeigt. Diese wurden aus den Standardabweichungen der Messungen beider Primerpaare einer Pflanze berechnet und spiegeln den Bereich wieder, in dem sämtliche Messwerte liegen.

10% Abweichung steigt die Sensitivität auf 92%. Eine vergleichbar hohe Sensitivität ist für qPCR nicht unüblich und wurde auch schon in vielen anderen Arbeiten erreicht [381, 425, 428, 429].

Zur Bestimmung von Reproduzierbarkeit und diagnostischer Spezifität wurde eine *Lefteria*-DNA-Probe zwölfmal und zwölf individuelle *Lefteria*-Probe auf signifikante Abweichungen zwischen einzelnen Messungen bzw. Proben untersucht. Es wurde eine Reproduzierbarkeit von 92% (11/12) sowie eine diagnostische Spezifität von 83% (10/12) festgestellt. Das bedeutet, Messabweichungen bei Wiederholungsmessungen sind vernachlässigbar klein.

4.3.14 Diagnostische Sensitivität des Gesamtassays

Die *real-time* PCR steht in dieser Dissertation nicht alleine. Sie bildet als Gesamtassay viel mehr eine Einheit mit der DNA-Extraktionsmethode. Die diagnostische Sensitivität der PCR ist in hohem Maße von der Qualität der DNA abhängig, weshalb eine PCR auch einschließlich Probenvorbereitung etabliert werden sollte [428]. Häufig ist zwar die *real-time* PCR hochgradig sensitiv, allerdings kann dies durch ein wenig präzises Extraktionsverfahren für die DNA verwischt werden. Zur Überprüfung des Gesamtassays wurden daher in Anlehnung an die Originalrezeptur

Tab. 4.32: Diagnostische Sensitivitäten der *real-time* PCR zur Analyse von Lefteria. Der Tabelle sind die zugesetzte DNA-Spezies und die verwendeten Primerpaare zu entnehmen. Es ist die Anzahl an korrekt detektierter Proben im Bezug auf Gesamtprobenzahl und die über jeweils beide Primerpaare gemittelte Sensitivität angegeben. In der Tabelle sind die Sensitivitäten mit „Sen.“ abgekürzt.

Abweichung	Bärlauch			Mistel			Weißdorn		
	<i>pi-2</i>	<i>trnL-trnF</i>	Sen.	<i>its1</i>	<i>trnS-trnfM</i>	Sen.	<i>its1</i>	<i>trnM-atpE</i>	Sen.
0,1%	0/12	2/12	8%	0/12	0/12	0%	2/12	0/12	8%
1%	4/12	5/12	38%	4/12	1/12	21%	0/12	1/12	4%
5%	7/12	11/12	75%	10/12	11/12	88%	9/12	9/12	75%
10%	11/12	11/12	92%	11/12	11/12	92%	11/12	11/12	92%

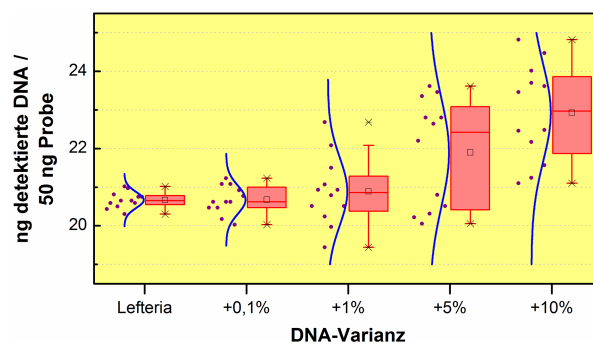


Abb. 4.71: Box-Whisker-Plot der ermittelten Mengen an Bärlauch-DNA für Lefteria und die vier mit Bärlauch-DNA angereicherten Proben. Bei den jeweils zwölf Proben handelt es sich um Mittelwerte der Triplikatmessungen beider bärlauchspezifischer Primerpaare. Der Plot vermittelt einen Eindruck über die Verteilung der Messwerte und verdeutlicht, dass 5% bzw. 10% mehr Bärlauch-DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit detektiert werden können.

Tab. 4.33: Pulvermischungen unter Angabe der jeweiligen Abweichungen von der Originalrezeptur.

Abweichung	abweich. Pflanze	Bärlauch [mg]	Mistel [mg]	Weißdorn [mg]	DNA-frei ^a [mg]
Original		700	500	400	1660
	Bärlauch	707	500	400	1653
+1%	Mistel	700	505	400	1655
	Weißdorn	700	500	404	1656
	Bärlauch	665	500	400	1695
-5%	Mistel	700	475	400	1685
	Weißdorn	700	500	380	1680
	Bärlauch	770	500	400	1590
+10%	Mistel	700	550	400	1610
	Weißdorn	700	500	440	1620
	Bärlauch	560	500	400	1800
-20%	Mistel	700	400	400	1760
	Weißdorn	700	500	320	1740

^a Zum Erreichen der korrekten Verhältnisse einer Lefteria-Tablette wurde entsprechend Tabelle 3.1 aufgefüllt. Weißdornfrüchtepulver gilt hier als DNA-frei.

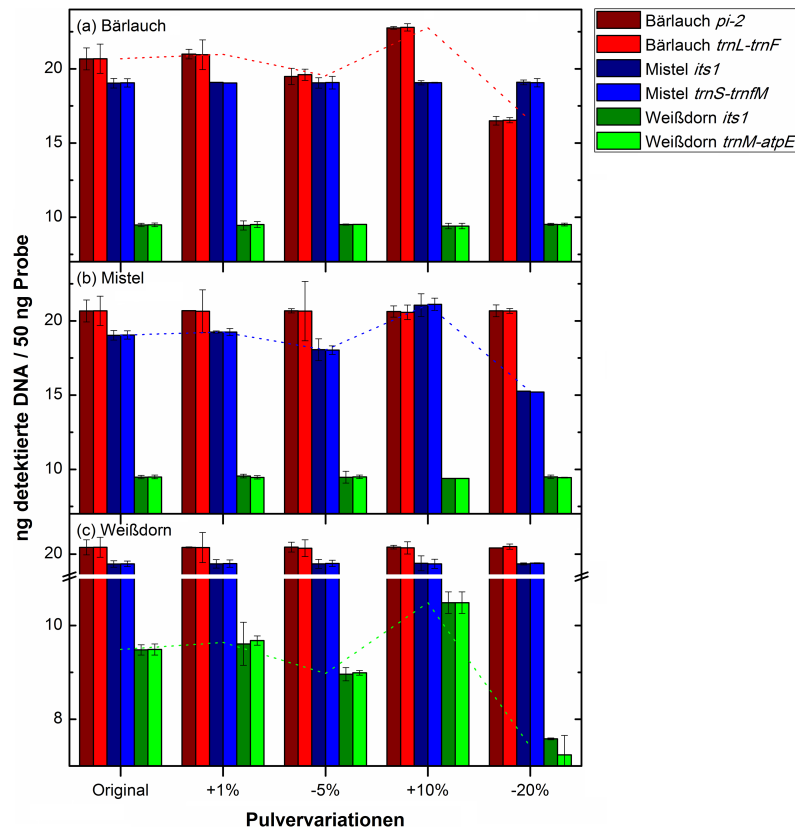


Abb. 4.72: Messungen der zwölf DNA-Proben extrahiert aus den in Tab. 4.33 zusammengefassten Pulverproben im Vergleich zu original Lefteria-DNA-Proben.

von Lefteria die in Tab. 4.33 aufgelisteten Pulvermischungen mit Abweichungen zwischen 1 und 20% erstellt. Es wurde alternierend ein Fehlen bzw. ein Mehr an Pflanzenmaterial simuliert. Anschließend wurden aus diesen Mischungen jeweils drei DNA-Extraktionen mit den BioMag *beads* (pH 13) durchgeführt. DNA-Proben wurden dreifach mit *real-time* PCR vermessen.

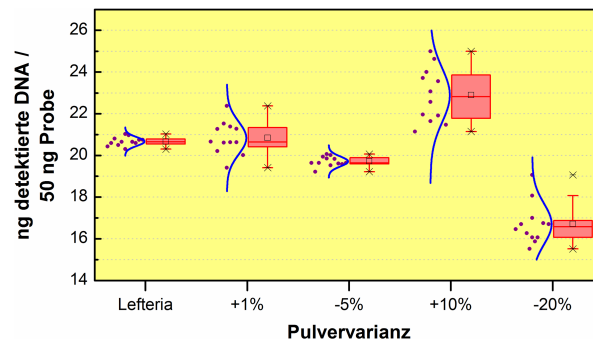
Wie aus Abb. 4.72 hervorgeht, sind wieder Abweichungen ab 5% signifikant messbar ($q > 3,9$, $p < 0,01$). Die Ermittlung der diagnostischen Sensitivität erfolgte analog zu 4.3.13. Es wurde festgestellt, dass sich mittels der in dieser Dissertation entwickelten und optimierten DNA-Extraktion mit anschließender *real-time* PCR 5%ige Abweichungen in der Pulverzusammensetzung einer Lefteria-Tablette mit einer Wahrscheinlichkeit von rund 77% detektieren lassen (Tab. 4.34 und Abb. 4.73). Variationen von 10% bzw. 20% können mit Sensitivitäten von mehr als 90% sehr sicher festgestellt werden. Reproduzierbarkeit und diagnostische Spezifität mit jeweils 83% (10/12) auf dem gleichen Niveau wie bei der individuellen Betrachtung des *real-time* Assays.

4.3.15 Zwischenfazit: Analytische Leistungsmerkmale

Mittels *real-time* PCR lässt sich die DNA-Zusammensetzung von Mischproben aus Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA aufklären. Die *real-time* PCR ist in der Lage, Abweichungen der DNA-Zusammensetzung ab 5% sicher zu detektieren. Dabei handelt es sich umgerechnet um

Tab. 4.34: Diagnostische Sensitivität des Gesamtassays. Die aufgelisteten Daten sind aufgeschlüsselt nach prozentualen Abweichungen und untersuchten Targets.

Abweichung	Bärlauch			Mistel			Weißdorn		
	<i>pi-2</i>	<i>trnL-trnF</i>	Sen.	<i>its1</i>	<i>trnS-trnfM</i>	Sen.	<i>its1</i>	<i>trnM-atpE</i>	Sen.
+1%	3/12	2/12	21%	0/12	4/12	17%	4/12	3/12	29%
-5%	9/12	11/12	83%	10/12	8/12	75%	9/12	9/12	75%
+10%	11/12	11/12	92%	11/12	11/12	92%	11/12	10/12	88%
-20%	11/12	10/12	88%	12/12	11/12	96%	11/12	11/12	92%

**Abb. 4.73:** Box-Whisker-Plot der Bärlauch-DNA-Werte für den Test des Gesamtassays. Der Box-Plot verdeutlicht, dass im Vergleich mit 4.3.13 sogar geringere Varianzen innerhalb einer Prozentstufe bestehen.

Variationen von lediglich 0,5–1 ng DNA. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant. Besonders interessant sind die unter Punkt 4.5.14 präsentierten Ergebnisse, mit denen gezeigt werden konnte, dass 5%ige Abweichungen der Pulverzusammensetzungen sich als 5%ige Abweichungen auf die ermittelten DNA-Zusammensetzungen auswirken und somit zuverlässig festgestellt werden können. Dies bestätigt den Erfolg der umfangreichen Optimierungsarbeiten. Die aufwendige Suche und die Entwicklung einer geeigneten DNA-Extraktionsmethode haben sich bewährt. Die für den Gesamtassay ausgewählte Extraktionsmethode ist derart genau und reproduzierbar, dass sich die Pulverzusammensetzung direkt auf das DNA-Verhältnis übertragen lässt und sich die DNA-Extraktion nicht durch Ungenauigkeit auf die Qualität des Gesamtassays auswirkt.

4.3.16 Vorstellung des fertig entwickelten Gesamtassay

Das Hauptziel dieser Dissertation war es, eine DNA-basierte Nachweismethode für die pflanzlichen Inhaltsstoffe des Phytopharmakons Lefteria zu entwickeln, zu optimieren und hinsichtlich der analytischen Leistungsfähigkeit zu testen. Durch europäische Richtlinien zur Zulassungen pflanzlicher Arzneimittel ist vorgegeben, dass sowohl eine qualitative Identifizierung der wirksamen Inhaltsstoffe, als auch ihre quantitative Charakterisierung erwartet wird.

Unter Berücksichtigung der allgemein anerkannten Empfehlungen zur korrekten Durchführung und Auswertung von publizierbaren *real-time* PCR-Experimenten [430], kristallisierte sich aus der Gesamtheit der erhaltenen Ergebnisse das folgende experimentelle Setup für eine routinemäßige

Qualitätskontrolle von Lefteria-Tabletten heraus. Die Einhaltung des vorgestellten Protokolls garantiert eine hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der generierten Daten. Dies sind die genauen Anforderungen für eine statistisch sichere Analyse:

- Aus einer Packung bzw. Produktionscharge werden drei Tabletten als Probe entnommen (drei biologische Replikate)
- Von jeder der drei Tabletten-Proben wird dreifach DNA extrahiert (drei technische Replikate); als DNA-Extraktionsmethode werden Amino-*beads* (BioMag) in einem magnetischen *liquid-handling*-System verwendet; die Elution der DNA erfolgt mit dem optimierten Elutionsprotokoll bei pH 13
- Es folgt der Test zur Identifizierung der drei Arzneipflanzen mit Nested-Multiplex-PCR und Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF* als Primerpaare; als Probe dient jeweils eine DNA-Extraktion pro Tablette; die Auswertung wird kapillarelektrophoretisch durchgeführt; fehlt ein Inhaltsstoff, endet die Untersuchung hier und der Produktionsprozess der vorliegenden Tablettencharge muss überprüft werden
- Sind alle drei Pflanzen vorhanden, folgt der quantitative Test; alle neun DNA-Proben werden dreifach mit den Primerpaaren Bärlauch *pi-2*, *trnL-trnF*, Mistel *its1*, *trnS-trnfM*, Weißdorn *its1* und *trnM-atpE* untersucht; zur Normalisierung dienen Plasmidstandards (vier Verdünnungsstufen pro Primerpaar, Dublikate) und für jedes Target werden NTC (Dublikate) zur Kontrolle auf Kontaminationen vermessen; werden Abweichungen festgestellt, sollte die Produktion hinsichtlich Herstellungsprozess und Rohstoffqualität geprüft werden; Abb. 4.74 zeigt die vorgeschlagenen Prozedur samt Probenanordnung für die *real-time* PCR

Im Verlauf der praktischen Arbeiten kristallisierte sich neben dem Gesamtassay zudem eine Art Schnelltest heraus, der z.B. als einfache Kontrolle direkt während des Produktionsablaufs dienen könnte:

- Zweifache DNA-Extraktion aus einer repräsentativen Anzahl an Proben mittels DNeasy Kit
- LAMP mit dem Primersets für Bärlauch *msl*, Mistel *trnH-trnK* und Weißdorn *trnL-trnF*; Auswertung durch Zugabe von Ethidiumbromid direkt im Reaktionsgefäß

4.3.17 *Real-time* Multiplex-PCR

Trotz des vorgestellten und fertig entwickelten Assays gibt es immer Verbesserungsmöglichkeiten. Um Anzahl an Proben und damit Pipettierfehler zu minimieren, hat sich bereits bei der qualitativen PCR ein Multiplex-Ansatz bewährt. Dieser Abschnitt schildert eine *proof-of-principle*-Studie mit dem Ziel, das *multiplexing* auch auf die *real-time* PCR anzuwenden.

Neben SYBR Green I sind TaqMan-Sonden die am häufigsten verwendete Detektionsmethode in der quantitativen *real-time* PCR [431]. Das Verfahren geht auf die von Holland *et al.* (1991)

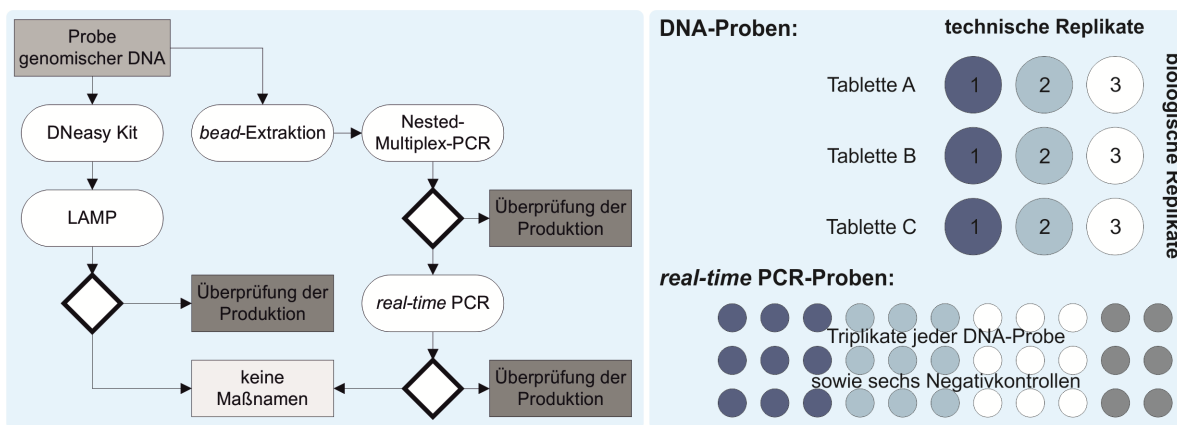


Abb. 4.74: Fließdiagramm des entwickelten Gesamtassays zur Kontrolle von Listeria-Tabletten auf der linken Seite und Probenschema für die *real-time* PCR für je eins der sechs Primerpaare.

[432] entdeckte 5'-Exonukleaseaktivität bestimmter DNA-Polymerasen zurück. Mit den von Lee *et al.* (1993) [433] entwickelten fluorogenen Sonden war es dann möglich, den Abbau dieser Sonden in Echtzeit während der PCR zu detektieren. Dabei wird neben *forward*- und *reverse*-Primer ein drittes Oligonukleotid (TaqMan-Sonde) eingesetzt, das ein Fluorophor und einen Quencher trägt. Die Anregung der Sonde bewirkt, durch einen resonanten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) auf den Quencher, eine Unterdrückung der Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes (siehe 3.6.5). Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase werden während jedes Amplifikationszyklus Sonden hydrolysiert und der FRET durch räumliche Trennung von Reporter und Quencher aufgehoben. Je mehr PCR-Produkt gebildet wird, desto stärker die Fluoreszenz. Ausgehend von der Ausgangsmenge an Ziel-Target entsteht eine kontinuierliche Zunahme von Reportermolekülen die vom *real-time* PCR-Gerät gemessen werden [434]. Vorteile der TaqMan-Sonden sind, dass auch bei suboptimalem Primerdesign das Signal spezifisch ist, da unspezifische Nebenprodukte kein Signal verursachen. PCR-Sonden erhöhen die Effizienz und die Sensitivität der *real-time* PCR und steigern die Spezifität. Die Verfügbarkeit verschiedener Reporterfarbstoffe zur Markierung fluorogener Sonden erlaubt darüber hinaus eine gleichzeitige Detektion verschiedener Sequenzen in einer einzigen Reaktion (Multiplex-PCR).

Der quantitative Nachweis von Bärlauch, Mistel und Weißdorn wurde SYBR-basiert entwickelt. Nach erfolgreicher Validierung des Assays, war es sinnvoll für die sechs ausgewählten Targets Bärlauch *pi-2*, *trnL-trnF*, Mistel *its1*, *trnS-trnfM*, Weißdorn *its1* und *trnM-atpE* spezifische TaqMan-Sonden zu entwerfen. Die Software des Thermocyclers ist über einen mathematischen Algorithmus in der Lage, die Anteile der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe aus dem komplexen Analysespektrum zu berechnen [434]. Dies erlaubt einen quantitativen Multiplex-Nachweis der drei pflanzlichen Inhaltsstoffe von Listeria. Die Multiplex-PCR erspart Zeit- und Arbeitsaufwand, durch weniger Pipettierschritte werden Ungenauigkeiten vermindert und ein komfortables Screening von Listeria-Tabletten ist möglich. Im Folgenden wird das *proof of principle* inklusive einer ersten Charakterisierung der analytischen Leistungsfähigkeit der TaqMan-Sonden beschrieben.

Tab. 4.35: Optimale Annealing-Temperaturen der TaqMan-Sonden.

Spezies	Primerpaar	Fluorophor	Singleplex-Assay		Multiplex-Assay	
			Temperaturbereich [°C]	Annealing-Temperatur [°C]	Temperaturbereich [°C]	Annealing-Temperatur [°C]
Bärlauch	<i>pi-2</i>	JOE	52–61	59	54–60	59
	<i>trnL-trnF</i>	6-FAM	52–65	57	52–60	58
Mistel	<i>its1</i>	TAMRA	51–62	56	52–61	59
	<i>trnS-trnfM</i>	HEX	51–61	60	53–61	59
Weißdorn	<i>its1</i>	Texas Red	58–65	61	57–60	59
	<i>trnM-atpE</i>	Cy5	50–54	53	53–53	53

Sondendesign: Überlappen die Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe, bringt dies einen gewissen Fehler in die Bestimmung der Anteile der einzelnen Fluorophore. Je größer die spektrale Überlappung, desto größer der Fehler. Werden also mehrere Sonden im selben Reaktionsgefäß eingesetzt, so ist eine umso genauere Quantifizierung möglich, je weiter die verwendeten Reporterfarbstoffe in ihrem Emissionsmaximum voneinander entfernt liegen [434]. Dementsprechend wurden Fluoreszenzfarbstoffe und Quencher so ausgewählt, dass sich die Emissionsspektren möglichst wenig überschneiden. Der vorhandene *real-time* PCR-Cycler hat fünf Messkanäle und erlaubt somit eine parallele Detektion von fünf Targets. Daher wurde entschieden, zwei unabhängige Multiplex-Ansätze zu testen. Das Design der Sonden erfolgte nach Herstellervorgaben mit dem Programm Primer3. Als Primer wurden dieselben Primer verwendet, welche sich für die SYBR-basierte PCR bewährt hatten. Die Sequenzen der TaqMan Sonden samt Angabe über Fluorophor und Quencher finden sich in **A.4.6**.

Evaluierung der PCR-Parameter: Für die *real-time* Multiplex-PCR wurde mit dem iQ Multiplex Powermix (Bio-Rad) eine spezielle Kombination aus DNA-Polymerase und Puffersystem verwendet, welche sich besonders für die parallele Detektion mehrerer Targets eignen soll. Da die enthaltene DNA-Polymerase bereits bei Temperaturen ab etwa 50 °C eine signifikante Aktivität besitzt [435], wurden Annealing- und Verlängerungsreaktion zu einem Schritt zusammengefasst. Für Amplikons kleiner als 1 kb genügt in der Regel bereits dieser einminütige kombinierte Schritt [436]. In verschiedenen dreifachen Kombinationen wurden die Multiplex-Eigenschaften der sechs Sonden bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen untersucht. Dazu wurden jeweils Gradienten-PCR zwischen 51 und 65 °C durchgeführt. Die Temperaturbereiche, in denen mit den jeweiligen Sonden eine Amplifikation möglich ist, sind in Tab. 4.35 aufgelistet. Daraus ergeben sich nur für die Kombinationen 6-FAM, HEX und Cy5 sowie JOE, TAMRA und Texas Red übereinstimmende Annealing-Temperaturen. Für beide Kombinationen wurden mit erneuten Gradienten-PCR und engeren Temperaturintervallen die optimalen Annealing-Temperaturen bestimmt. Anschließend wurde die optimale Konzentration für jede Sonde in den gängigen Grenzen zwischen 50 und 300 nM bestimmt [437]. Ein niedrigerer Ct-Wert deutet auf maximale

Tab. 4.36: Optimale Konzentrationen der TaqMan-Sonden. Die angeführten Ct-Werte sind Mittelwerte aus Dreifachmessungen.

Spezies	Primerpaar	Fluorophor	Sondenkonzentration [nM] / Ct-Wert ^a			
			50	100	200	300
Bärlauch	<i>pi-2</i>	JOE	25,84 (0,44)	26,54 (0,54)	26,75 (1,08)	29,41 (2,88)
	<i>trnL-trnF</i>	6-FAM	41 (1,41)	39,47 (1,32)	39,47 (1,32)	37,12 (0,89)
Mistel	<i>its1</i>	TAMRA	18,2 (0,03)	18,31 (0,04)	18,07 (0,7)	19,56 (1,17)
	<i>trnS-trnfM</i>	HEX	24,21 (0,04)	22,42 (0,62)	23,47 (1,93)	21,12 (0,1)
Weißdorn	<i>its1</i>	Texas Red	25,71 (4,07)	25,98 (2,74)	25,11 (1,94)	20,39 (3,28)
	<i>trnM-atpE</i>	Cy5	37,3 (1,75)	35,01 (0,52)	34,62 (0,52)	33,43 (0,59)

PCR-Effizienz hin und wurde in Tab. 4.36 jeweils grün dargestellt. Die zugehörigen Sondenkonzentrationen wurden für alle weiteren Experimente eingesetzt. Mit den in Tab. 4.35 und 4.36 aufgeführten PCR-Parametern ist das Protokoll erfolgreich etabliert (**A.5.2**). Eine parallele Amplifikation von drei Targets ist möglich. Abb. 4.75 zeigt die zugehörigen Amplifikationskurven im Multiplex-Ansatz. Ein Vergleich zwischen dem SYBR- und dem TaqMan-Assay zeigte, dass kaum Unterschiede zwischen beiden Detektionsmethoden bestehen (Daten nicht gezeigt). Aus einem Lefteria-Isolat wurden DNA-Proben mit jedem Primerpaar, einmal mit SYBR Green I und einmal mit der TaqMan-Sonde analysiert. Die resultierenden Ct-Werte sind sehr ähnlich. Beide PCR-Varianten arbeiten also mit vergleichbarer Effizienz.

Leistungsmerkmale: Mit den vorhandenen Verdünnungsreihen, wurde ähnlich wie mit SYBR auch die TaqMan-PCR charakterisiert. Für beide Multiplex-Ansätze wurden Verdünnungen von Plasmid-, Pflanzen- und Lefteria-DNA und parallel 50 ng Lefteria-Proben vermessen. Aus den gewonnenen Daten konnten PCR-Effizienz, die dynamischen Messbereiche, Spezifität und Reproduzierbarkeit bestimmt werden. Sie liegen allesamt auf dem gleichen Level wie beim Singleplex-Ansatz. Daneben dienten die Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA und reiner Pflanzen-DNA als Kalibration für die Auswertung der Lefteria-Proben. Effizienz und Messbereich liegen auf dem Niveau des SYBR-Assays, d.h. eine in der Literatur häufig beschriebene höhere analytische Sensitivität der TaqMan-Sonden [438] konnte nicht bestätigt werden. Dies spricht aber weniger gegen die TaqMan-Sonden, sondern bestätigt die gute Optimierung des SYBR-Assays. Beide Assays bewegen sich mit ein- bis zweistelligen Kopienzahlen am unteren Ende ihrer dynamischen Messbereiche am von der Literatur beschriebenen absoluten Detektionslimit einer *real-time* PCR. Sie sind damit weitaus sensitiver als vom Arzneibuch vorgeschlagene Methoden zur Untersuchung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn [439]. Beide Assays sind pflanzenspezifisch und liefern repro-

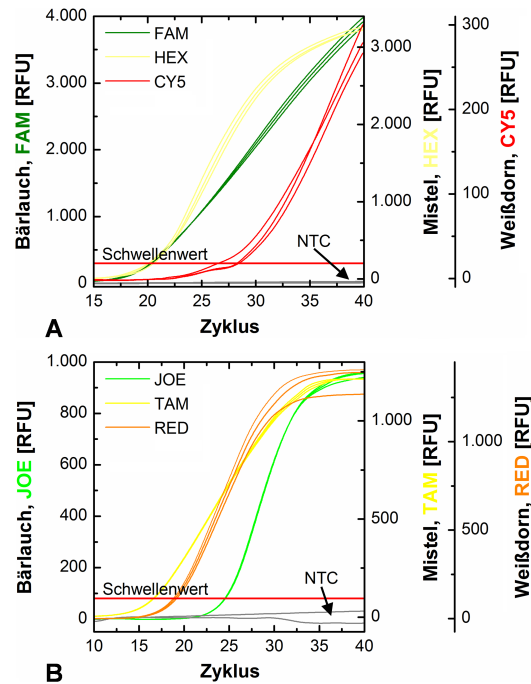


Abb. 4.75: Amplifikationskurven der sechs Hybridisierungssonden. Die PCR wurde mit den entsprechenden Primern und *Lefteria*-DNA durchgeführt.

duzierbare Ergebnisse. Mittels TaqMan-Sonden wurde ein DNA-Verhältnis von 1 : 0,93 : 0,5 in *Lefteria*-Proben festgestellt, auch hier besteht kein signifikanter Unterschied zum SYBR-System ($t < 0,7$, $p > 0,05$).

4.3.18 Zwischenfazit: *Real-time* Multiplex-PCR

Nach der umfangreichen Untersuchung verschiedener Targets mit SYBR-Detektion, konnten die geeignetsten Targets erfolgreich an TaqMan-basierte *real-time* Multiplex-PCR adaptiert werden. Sowohl SYBR- als auch TaqMan-Assay zeigen vergleichbare Leistungsmerkmale, wobei die TaqMan-Sonden den großen Vorteil aufweisen, die drei *Lefteria*-Inhaltsstoffe parallel in einem Ansatz analysieren zu können. Trotzdem waren beide Assays uneingeschränkt in der Lage die DNA-Zusammensetzung von *Lefteria* korrekt zu bestimmen. Für eine routinemäßige Qualitätskontrolle von *Lefteria*-Tabletten ist eine Multiplex-PCR sowohl mit den Fluorophoren 6-FAM, HEX und Cy5 als auch JOE, TAMRA und Texas Red zu empfehlen. Ausblickend sollten unbedingt weitere Proben mittels Multiplex-Ansatz gemessen werden, um die vorgestellten Daten auf eine viel breitere Basis zu stellen. Ähnlich wie für den SYBR-Assay sollten Versuchsreihen durchgeführt werden, um die Detektionslimits im Multiplex-Ansatz sowie die diagnostische Effizienz, d.h. Sensitivität und Spezifität zu bestimmen. Erst dann ist ein vollständiger Vergleich mit dem SYBR-Assay legitim. Das hier durchgeführte *proof of principle* deutet aber stark in die Richtung, dass ein *real-time* Multiplex-PCR zur sicheren Detektion von Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn-DNA in *Lefteria* realisierbar ist.

4.3.19 Zusammenfassung: *Real-time* PCR

Mit Hilfe der *real-time* PCR und spezifischen Primerpaaren für Bärlauch, Mistel und Weißdorn konnte die generelle Anwendbarkeit quantitativer PCR zur Analyse von pflanzlichen Arzneimitteln, sowohl im Einzelansatz als auch im Multiplex-Format gezeigt werden.

Im Einzelansatz wird jedes Target in einer einzelnen Reaktion analysiert. Als Detektionsformat wurde SYBR Green I verwendet. Insgesamt konnte die analytische Spezifität von 16 Target-Sequenzen bestätigt werden. Dem voraus ging eine bioinformatische Untersuchung möglicher Sequenzabschnitte. Es konnten alle drei pflanzlichen Inhaltsstoffe unabhängig voneinander in Lefteria detektiert werden, wobei die Targets Bärlauch *pi-2*, *trnL-trnF*, Mistel *its1*, *trnS-trnfM*, Weißdorn *its1* und *trnM-atpE* am besten geeignet sind. Nach Evaluierung der optimalen PCR-Bedingungen und Bestimmung der PCR-Effizienzen erfolgte die Bewertung der einzelnen Targets hinsichtlich ihrer dynamischen Messbereiche, Detektionslimits und Spezifität. Mittels der entwickelten Methode kann die DNA der drei Arzneipflanzen über einen sehr breiten Bereich von einigen Femtogramm bis etwa 100 ng hochspezifisch nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung erfolgte absolut, d.h. für jedes Target wurde durch Klonierung ein DNA-Plasmid hergestellt, welches die Target-Sequenz enthält. Verdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl dienten zur Erstellung der Kalibration. Aus dem Vergleich verschiedener Klonierungsmethoden ging TA-Klonierung als geeignetste Methode zur Generierung von Standards hervor.

Aus Ct-Daten können mit Hilfe der Plasmidstandards Kopienzahlen und DNA-Mengen berechnet werden. Als DNA-Zusammensetzung von Lefteria wurde ein Verhältnis von 1 : 0,92 : 0,46 (Bärlauch : Mistel : Weißdorn) ermittelt. Mittels zwölfmaligen Messungen einer DNA-Proben sowie Messungen von zwölf individuellen Lefteria-Proben wurde die hohe Messgenauigkeit der entwickelten Methode bewiesen. Mit einer anschließenden Untersuchung der diagnostischen Leistungsfähigkeit konnte gezeigt werden, dass die *real-time* PCR für Abweichungen von der originalen Zusammensetzung ab 5% eine hohe Sensitivität aufweist. Diese Sensitivität wurde für den Gesamtassay inklusive DNA-Extraktion bestätigt. D.h. für eine 326 mg Tablette Lefteria sind Abweichung von 2–3 mg Pflanzenpulver detektierbar. Insgesamt sind die analytischen Leistungsmerkmale typische für qPCR-Anwendungen [381, 425, 428, 429] und anderen Methoden häufig überlegen [398, 440]. Abschließend wurde aus der Gesamtheit der experimentellen Daten ein Ablaufprotokoll erstellt (4.3.16), mit dem der in dieser Dissertation entwickelte Assay routinemäßig zur Qualitätskontrolle von Lefteria verwendet werden kann.

Darüber hinaus war es auch im Multiplex-Format möglich, parallele Analysen der drei Pflanzen gemeinsam in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Erste Tests von zwei möglichen TaqMan-Sondenkombinationen deuten auf vergleichbar gute Leistungsmerkmale wie beim Singleplex-Assay mit SYBR hin. Weitere Experimente in diese Richtung sollten folgen, um den vorgeschlagenen Assay (4.3.16) noch zu verbessern.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden DNA-basierten Nachweismethoden für die Qualitätskontrolle von pflanzlichen Arzneimitteln entwickelt. Die experimentellen Arbeiten wurden am Beispiel des Phytopharmakons Lefteria (Naturprodukte Dr. Pandalis) durchgeführt, welches sich aus den Arzneipflanzen Bärlauch, Mistel und Weißdorn zusammensetzt. Aus der Aufgabenstellung ergaben sich drei definierte Ziele:

- Etablierung einer Methode zur Extraktion von genomischer DNA aus Lefteria-Tabletten, die hohe DNA-Qualität und gute Reproduzierbarkeit bietet
- Aufbau von PCR-Methoden zum qualitativen Nachweis der drei pflanzlichen Inhaltsstoffe
- Entwicklung eines quantitativen Inhaltsstoffnachweises auf Basis von *real-time* PCR

Die in dieser Arbeit entwickelte Analytik ermöglicht eine Kontrolle und Untersuchung von Lefteria gemäß europäischer Richtlinien. Insgesamt wurden dazu 15 verschiedene Möglichkeiten zur Isolierung von DNA aus pflanzlichen Matrizen getestet und verglichen. Die Verwendung von Amino- bzw. pflanzenspezifisch modifizierten Magnetpartikeln stellen dabei in diesem Zusammenhang neue Ansätze dar. Entsprechende Protokolle mussten daher erst entwickelt und geprüft werden. Auf Grundlage der extrahierten DNA aus Lefteria bzw. den pflanzlichen Inhaltsstoffen Bärlauch, Mistel und Weißdorn konnte eine generelle Anwendbarkeit der PCR zur Identifizierung der drei Pflanzen in fertig verarbeiteten Tabletten nachgewiesen werden. Mit Multiplex- und Nested-PCR sowie LAMP wurde der Identifizierungsassay anhand drei hochmoderner PCR-Varianten erfolgreich umgesetzt. Darüber hinaus wurde erreicht, mittels *real-time* PCR die Zusammensetzung von aus Lefteria extrahierter Misch-DNA aufzuklären. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte eine Strategie entwickelt werden, die es ermöglicht, aus Resultaten der *real-time* PCR die ursprüngliche Pulverzusammensetzung der Lefteria-Tablette, aus der die analysierte Probe entnommen wurde, korrekt zu quantifizieren.

DNA-Extraktion: Durch die Arbeiten zur DNA-Extraktion wurde festgestellt, dass DNA-Präzipitation, Silica-Adsorption sowie ionische Wechselwirkungen mit Amino-modifizierten Magnetpartikeln grundsätzlich dazu geeignet sind, genomische DNA von Bärlauch, Mistel und Weißdorn aus Lefteria-Tabletten zu isolieren. Durch Fällung der DNA können die höchsten Ausbeuten an DNA erzielt werden. Die Ausbeuten der weiteren Strategien sind deutlich geringer, aber

Tab. 5.1: Repräsentative Auswahl wichtiger untersuchter Extraktionsmethoden jeder verwendeten Extraktionsart.

	CTAB-Methode	Qiagen DNeasy Plant Mini Kit	Silica- <i>beads</i> mit eigenen Puffern ^a	Amino- <i>beads</i> mit eigenem Protokoll
Art der Extraktion	Präzipitation	Silica-Membran	Silica-Partikel	Amino-Gruppen
DNA-Ausbeute	174 ng	269 ng	123 ng	298 ng
PCR-Kompatibilität ^b	25%	~ 100%	~ 100%	~ 100%
Reproduzierbarkeit ^c	32%	6%	32%	4%

^a Werte gelten für die Magnetpartikel MagneSil und MagAttract. NucleoMag C sind ungeeignet.

^b Die Prozente verdeutlichen den Anteil der durch PCR detektierbaren eingesetzten DNA-Menge.

^c Aufgeführt sind die entsprechenden Variationskoeffizienten als prozentuale Fehler. Ein niedriger Wert bedeutet eine hohe Reproduzierbarkeit bzw. Wiederholpräzision.

zumeist für PCR-Anwendungen ausreichend. Darüber hinaus wurde die Qualität der DNA als kritischer Faktor ermittelt. Höchste DNA-Qualität und das Fehlen von PCR-Inhibitoren konnte für die meisten Methoden die Silica-Membranen (4.1.1) nutzen sowie für alle auf Basis von Silica (4.1.3) und Amino-modifizierten Magnetpartikeln (4.1.5) nachgewiesen werden. Eine Auswahl und Zusammenfassung der wichtigsten Extraktionsmethoden und Ergebnisse bietet Tab. 5.1. Im Hinblick auf die Zielsetzung der *real-time* PCR war die Wiederholpräzision einer DNA-Extraktion ein zusätzlicher wichtiger Auswahlfaktor für den Gesamtassay. Insgesamt lieferte das DNeasy Kit der Firma Qiagen für die Probengewinnung im Labormaßstab die besten Ergebnisse. Das selbstentwickelte Protokoll für die Amino-modifizierten Magnetpartikel BioMag von Polysciences bietet eine vergleichbar gute Leistung in Verbindung mit hochgradiger Automatisier- und Parallelisierbarkeit und ist daher optimal für den Einsatz in einer routinemäßigen Qualitätskontrolle vieler *Lefteria*-Proben geeignet (4.1.7).

Qualitative Analyse: Mittels der aufgebauten Multiplex-PCR (4.2.1) können die drei pflanzlichen Inhaltsstoffe Bärlauch, Mistel und Weißdorn in einer *Lefteria*-Probe parallel und spezifisch identifiziert werden. Es wurde gezeigt, welche Schritte zur Entwicklung eines entsprechenden Protokolls notwendig sind und wie die analytische Leistungsfähigkeit bewertet werden kann. Mit einer Wahrscheinlichkeit für die Korrektheit der Analyse von über 80% liegt diese Art der Analyse zwar schon etwa auf dem Niveau vergleichbarer Anwendungen, durch die Erweiterung um eine entsprechende Nested-PCR (4.2.2) konnte die Analysekorrektheit aber auf 100% gesteigert werden. Zudem bietet die Nested-PCR den Vorteil eines niedrigeren Detektionslimits, was sie insgesamt zu einer optimal geeigneten Realisierung der Zielsetzung macht. Darüber hinaus konnte durch Verwendung von LAMP (4.2.3) ein Schnelltest verwirklicht werden. Trotz des Fehlens von Multiplex-Eigenschaften konnte bei gleich bleibender Analysequalität die Analysedauer um den Faktor acht verringert werden. In Tab. 5.2 sind die für die qualitative Analyse gemessenen Spezifitäten und Sensitivitäten dargestellt.

Tab. 5.2: Parameter zur Bewertung der analytischen Leistungsfähigkeit der drei qualitativen Methoden.

	Multiplex-PCR	Nested-PCR	LAMP
analytische Spezifität	+	+	+
Nachweisgrenze ^a	25 ng	1 ng	1 ng
diagnostische Sensitivität ^b	87%	100%	100%
diagnostische Spezifität ^c	84%	100%	92%

^a Minimal zur Identifizierung im PCR-Ansatz nötige DNA-Menge eines Inhaltsstoffs.

^b Anteil an korrekt analysierten *Lefteria*-Probe ohne Fehlen eines Inhaltsstoffs.

^c Anteil an korrekt analysierten *Lefteria*-Probe bei Fehlen eines der Inhaltsstoffe.

Quantitative Analyse: Die Anwendbarkeit der *real-time* PCR zur quantitativen Analyse von pflanzlichen Arzneimitteln wurde durch Etablierung eines Assays am Beispiel von *Lefteria* bestätigt. Schon bei der Suche nach geeigneten pflanzenspezifischen Target-Sequenzen für die qualitative PCR wurde die eingeschränkte Verfügbarkeit von Sequenzdaten in der GenBank als entscheidende Limitierung für die Realisierung eines PCR-basierten Assays ausgemacht. Aufgrund ihrer deutlich höheren Sensitivität, ist diese Problematik beim Aufbau des *real-time* PCR-Assays besonders groß. Nur durch bioinformatische Vorarbeiten und umfangreiche experimentelle Arbeiten konnte die notwendige Spezifität einiger weniger Sequenzen nachgewiesen werden (4.3.10). Auf Basis von Plasmid-DNA wurde für diese spezifischen Target-Sequenzen ein System zur absoluten Quantifizierung von *real-time* PCR-Daten entwickelt und erfolgreich getestet. Die so umgesetzte *real-time* PCR ermöglicht es, die DNA-Zusammensetzung von *Lefteria*-Proben zu bestimmen (4.3.5) und dadurch Abweichungen von der Originalrezeptur aufzuklären. In Kombination mit der hohen Reproduzierbarkeit der optimierten DNA-Extraktion, erlaubt die Genauigkeit der entwickelten *real-time* PCR Rückschlüsse aus der DNA-Menge auf die korrespondierende Menge an Pflanzenmaterial zu ziehen (4.3.7). Dies stellt in der PCR-basierten Arzneimittelkontrolle eine Neuheit dar. Des Weiteren wurde der *real-time* PCR-Assay (4.3.13) sowie der Gesamtassay inklusive DNA-Extraktion (4.3.14) mit statistischen Methoden charakterisiert. Es wurden breite dynamische Messbereiche und Detektionslimits für DNA im Femtogrammbereich festgestellt. Zudem konnte eine Analysekorrektheit von deutlich über 90% nachgewiesen werden. Die wichtigsten ermittelten Analyseparameter sind in Tab. 5.3 zusammengestellt. Letztendlich konnte für den *real-time* PCR-Ansatz eine parallele Detektion der drei pflanzlichen Inhaltsstoffe gemeinsam in einer Probe mittels TaqMan-Sonden verwirklicht werden (4.3.17). Erste Ergebnisse zeigen hier, dass der Nachweis im Multiplex-Format ebenso gut funktioniert wie bei einzelnen Ansätzen.

Ausblick: In Zukunft wäre eine weitere Optimierung und Testung der Amino-modifizierten Magnetpartikel an weiteren Pflanzen sowie Zellen anderer Spezies sinnvoll, um sie als allgemein zur DNA-Extraktion anwendbare Methode zu etablieren. Des Weiteren sollte im Bereich DNA-Extraktion der pflanzenspezifische Ansatz (4.1.8) weiter verfolgt werden. Bei bisher noch nicht erreichter vollständiger Spezifität der modifizierten *beads* würde diese Methode eine anschließende

Tab. 5.3: Zusammenfassung der analytischen Leistungsfähigkeit des entwickelten *real-time* PCR-Assays aufgeschlüsselt nach Pflanzenart. Die Angaben beziehen sich auf *Lefteria*-DNA.

	Bärlauch	Mistel	Weißdorn
analytische Spezifität	+	+	+
dynamischer PCR-Bereich ^a	7–2 · 10 ³ Kopien	1–3 · 10 ⁵ Kopien	4–1 · 10 ⁷ Kopien
Nachweisgrenze ^b	14 Kopien	2 Kopien	5 Kopien
diagnostische Sensitivität ^c	92%	92%	92%
diagnostische Spezifität ^d	83%	83%	83%

^a Linearer Messbereich angegeben als Mittelwerte beider spezifischer Targets je Pflanzenart in Kopien pro PCR-Ansatz.

^b Mittels Probit-Regression bestimmte Nachweisgrenzen.

^c Anteil an korrekt detektierter 10%iger Abweichung einer Pflanze von der Originalrezeptur. Bei 5% Abweichung werden Werte von 75–88% erreicht.

^d Anteil an richtig analysierten korrekt zusammengesetzten *Lefteria*-Proben.

PCR-Analytik überflüssig machen, da ein Messen der DNA-Ausbeute so direkt Rückschlüsse auf die DNA-Zusammensetzung einer Probe erlauben würde. Auf der anderen Seite bieten die PCR-Assays an zwei wichtigen Punkten weiteres Entwicklungspotenzial. Zum einen wäre es denkbar, für die LAMP eine in einigen Publikationen schon beschriebene Quantifizierung aufzubauen. Mit Design und Test von Primern sind dafür die aufwändigsten Vorarbeiten schon bearbeitet. Zum anderen ist es für einen zukünftigen routinemäßigen Einsatz der *real-time* PCR angebracht, den Multiplex-Ansatz ebenso umfangreich wie den Einzelansatz zu etablieren. Im Allgemeinen bieten TaqMan-Sonden gegenüber SYBR Green I eine höhere Spezifität und Sensitivität. Für alle drei Schwerpunkte dieser Arbeit wünschenswert wäre eine weitergehende Sequenzierung der drei Arzneipflanzen Bärlauch, Mistel und Weißdorn. Mit entsprechenden Sequenzdaten könnten pflanzenspezifische Fängeroligonukleotide zur DNA-Extraktion designt werden und die Spezifität sämtlicher PCR-Targets bewiesen werden.

A Anhang

A.1 Polyploidie und Genomgrößenbestimmung

Nachdem im ersten experimentellen Kapitel die wichtigsten Methoden eingeführt worden sind, beschäftigt sich das folgende Kapitel mit der Bestimmung der Genomgröße der drei Lefteria-Inhaltsstoffe Bärlauch, Mistel und Weißdorn. Die Kenntnis der Genomgrößen dient zwei Zwecken, zum einen ist ihre Bestimmung die wichtigste Vorarbeit für eine mögliche Sequenzierung der Arzneipflanzen, um die Spezifität der entwickelten PCR-Methoden (4.2 und 4.3) beweisen zu können. Die bioinformatische Assemblierung der sequenzierten Genomabschnitte erfordert genaue Angaben bezüglich der Ploidien [441]. Die Genomgröße dient zur Konzeption der Sequenzierprojekte [442] und zur Abschätzung der entstehenden Kosten. Zum anderen können bei bekannter Genomgröße *real-time* PCR-Daten sehr anschaulich in Zellzahlen umgerechnet werden (4.3.7). Diese stellt eine deutlich greifbarere Größe dar, als die etwas abstrakte Kopienzahl.

Inzwischen sind etwa 1.800 bakterielle sowie ungefähr 900 eukaryotische Genome vollständig sequenziert. Bei Spezies mit verhältnismäßig kleinen Genomen (Mikroorganismen: 1–100 Mb; Säugetiere: ~1 Gb) ist eine vorherige Genomgrößenbestimmung aufgrund moderner Sequenzierungstechnologie unnötig geworden. Vielmehr dient die Sequenzierung selbst als Methode zur Bestimmung der Genomgröße, denn neben der Planung von Sequenzierprojekten [442] ist die Verfügbarkeit von Daten über Ploidie und Genomgröße entscheidend für Forschungsgebiete wie evolutionäre Biologie und Taxonomie [443]. Bei Pflanzen allerdings stellt sich die Situation vollkommen anders dar. Gut zehn Jahre nach der Sequenzierung des Modellorganismus *A. thaliana* sind nur fünf weitere Genome aufgeklärt worden: *Guillardia theta* (Alge), *Oryza sativa* (Reis), *Physcomitrella patens* (Blasenmützenmoos), *Vitis vinifera* (Wein) und *Zea mays* (Mais). Zum einen fehlt bei Pflanzen eine zentrale Motivation, wie die erhofften Wissenssprünge durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms, zum anderen sind pflanzliche Genome mit einer durchschnittlichen Größe von 6 Gb vergleichsweise riesig und komplex, was die Sequenzierung aufwendig und teuer macht [441, 444]. Bei Pflanzen werden daher weiterhin klassische Methoden zur Genomgrößenbestimmung verwendet.

Bei einem haploiden Satz enthält die Zelle jedes Chromosom einmal, bei einem diploiden Satz zweimal. Als Polyploidie wird das Vorhandensein von mehr als zwei Chromosomensätzen in einer Zelle bezeichnet. Polyploidie tritt vor allem bei höheren Pflanzen auf und ist daher auch bei

Tab. A.1: Übersicht bisher experimentell bestimmter und veröffentlichter Genomgrößen für die drei Arzneipflanzen.

Spezies	Chromosomen	Ploidiegrad	Genom (2C) [pg]	Herkunft	Methode ^a	Standard	Referenz
<i>Allium ursinum</i>	14	2	60,55	Waidhofen, Österreich	Feulgen PI	Zwiebel	[445]
	14	2	62,08	Gewächshaus, Halle (Saale)	DAPI	Zwiebel	[446]
	14	2	63	<i>Allium</i> -Sammlung ^b	EtBr Mitracyclin	Winterzwiebel	[447]
	14	2	63	Britische Inseln	Feulgen	Zwiebel	[448]
	14	2	63,57	<i>Allium</i> -Sammlung	Feulgen	Winterzwiebel	[449]
	14	2	63,7	Niederlande	PI	Ackerlauch	[450]
	14	2	71,39	Derbyshire, England, UK	Feulgen	Ackerlauch	[451]
<i>Viscum album</i>	20	2	107,7	Botanischer Garten, Wien, AT	Feulgen	Ackerlauch	[452]
	20	2	153,5	Université Curie, Paris, FR	basenunspec. Farbstoff	Weizen	[453]
	20	2	182,97	Hohenheim, Stuttgart	Feulgen DAPI	Zwiebel	[454]
	20	2	205,8	Botanische Tuinen, Wageningen, NL	PI	Blutblume	[455]
<i>Crataegus laevigata</i>	68	4	3,17	Ogród Botaniczny, Bydgoszcz, PL	PI	Mais	[456]
	32–68	2–4	1,99	Alabama, USA	PI	Erbse	[457]
	34–68	2–4	2,32	Ontario, CA Alabama, USA	PI	Erbse	[457]
	32	2	2,7	Jardí Botànic, Barcelona, ES	PI	Erbse	[458]
	34	2–4	2,26	Washington, USA	PI	Erbse	[457]
<i>Crataegus monogyna</i>	34–51	2–3	1,82	Oregon, USA	PI	Erbse	[457]

^a Entweder Feulgen-Densitometrie oder Zytometrie unter Angabe der Färbemethode für Zellkerne.

^b Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben

Bärlauch-, Mistel- und Weißdorn möglich. Die Kenntnis der Polyploidie ist Voraussetzung für eine korrekte Angabe von Genomgröße als 1C- oder 2C-Wert. Die Genomgröße selbst ist die Masse des reduzierten nichtreplizierten haploiden Chromosomensatzes und wurde traditionell als 1C-Wert ($C = constant$) in absoluten Einheiten (Pikogramm oder Basenpaare) angegeben. Dabei entspricht 1 pg durchschnittlich $0,978 \cdot 10^9$ bp (mittlere Masse der vier Nukleinbasen unter Berücksichtigung ihrer statistischen Verteilung) [459]. In der Literatur hat es sich durchgesetzt, die Genomgröße als 2C-Wert anzugeben. Zur Bestimmung von Genomgrößen von Pflanzen stehen heute zwei etablierte Methoden zur Verfügung: Feulgen-Densitometrie [460–464] und Zytometrie. Eine weitere, aber bisher nicht für Pflanzengenome genutzte Methode stellt die *real-time* PCR dar. Wilhelm *et al.* (2003) [465] evaluierten die neue Methode als schnelle, präzise und zuverlässige Alternative.

Die Genomgrößen von Bärlauch, Mistel und Weißdorn wurden bereits mehrfach bestimmt. Aus der Literatur bekannte Werte sind erstaunlich divergent. Dies liegt zum einen an den verschiedenen nicht standardisierten Messmethoden und -parametern, auch unterschiedliche Fluorochrome und Vergleichsstandards beeinflussen die Ergebnisse. Zum anderen wurde in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen, dass verschiedene Phänotypen [447, 466, 467] oder unterschiedliche geographische Verbreitung einer Spezies zu Variationen ihrer Genomgröße führen [468, 469]. Unter z.B. nicht idealen Umweltbedingungen haben Arten mit großen Genomen aufgrund längerer Zellzyklen einen Nachteil und passen sich daher an [470]. Tab. A.1 gibt einen Überblick aller vorliegender Daten und erklärt anhand der großen Varianzen, dass es notwendig war, eigene Messungen durchzuführen. Hierfür wurden explizit einheimische Proben gesammelt. Die Bärlauchproben (*Allium ursinum*) stammen aus der Eilenriede in Hannover. Weißbeerige Misteln (*Viscum album*) wurden im Welfen- und Prinzensgarten rund um das Hauptgebäude der Leibniz Universität Hannover gefunden. Die Proben des Zweigriffeligen Weißdorns (*Crataegus laevigata*) wurden im Weißdornweg in Hannover-Döhren gesammelt. Neben der Genomgrößenbestimmung durch Zytometrie, dient diese Versuchsreihe dazu, eine bisher nicht durchgeführte Genomgrößenbestimmung einer Pflanze durch *real-time* PCR zu realisieren. Beide Methoden werden hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile bewertet.

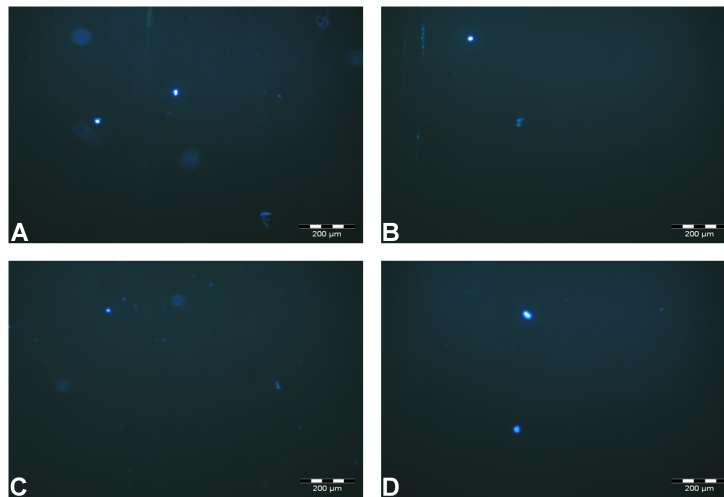
A.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung

Zytometrie ist für die Genomgrößenbestimmung derzeit Methode der Wahl, weil sie günstig, schnell und zuverlässig ist [471]. Die Methode wurde ursprünglich zur Charakterisierung des menschlichen Genoms entwickelt [472] und durch die Arbeiten von Doležal und Grailhuber [471, 473, 474] für den Einsatz an Pflanzen adaptiert. Bei der Zytometrie werden nicht die einzelnen Zellen als Ganzes, sondern extrahierte und angefärbte Zellkerne untersucht. Im Zytometer passieren die Zellkerne perlenschnurartig einen Laser und werden einzeln, als sog. *events* detektiert. Die Auswertung von Daten erfolgt mit der Software WinMDI 2.9¹. Sie korrigiert detektionsbedingte Fehler [475, 476], verursacht durch die Fluorophore, die in mehrere Detektionskanäle emittieren. Diese falsch-positiven Signale werden kompensiert. Da ein linearer Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Fluoreszenz besteht, kann die Genomgrößen unter Verwendung von Standards mit bekanntem DNA-Gehalt berechnet werden. Vor jeder Messung und Berechnung der Genomgröße steht die Probenvorbereitung. Sie dauert nur wenige Minuten und erfordert lediglich wenige Milligramm Pflanzengewebe. Die dafür erforderlichen Protokolle sind von Doležal *et al.* (2007) [471] übersichtlich zusammengefasst worden. Pflanzliches Blattgewebe wird mit einer scharfen Rasierklinge in einem Extraktionspuffer zerkleinert. Die Schnitte führen zu Verletzungen von Zellwänden und -membranen, wodurch die Zellkerne freigesetzt werden. Das restliche Pflanzenmaterial wurde über ein Zellsieb mit 40 µm Porengröße abgetrennt, anschließend wird der Farbstoff zugegeben. Entsprechend diesen Vorgaben wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

¹<http://en.bio-soft.net/other/WinMDI.html>

Tab. A.2: Puffer zur Extraktion von Zellkernen mit den jeweiligen Eigenschaften (Zusammensetzung: siehe A.3.4)

Puffer	Eigenschaft	Referenz
Galbraith	Inhibierung von Nukleasen, erleichterte Kernfreisetzung	[477]
LB01	Schutz der Chromatinproteine, erleichterte Kernfreisetzung	[478]
Otto	erleichterte Kernfreisetzung	[479, 480]
Tris.MgCl ₂	Stabilisierung der Chromatinstruktur, erleichterte Kernfreisetzung	[481]

**Abb. A.1:** Zellkernisolierung aus Bärlauchblättern. Verwendet wurden (A) Galbraith-, (B) LB01-, (C) Otto- und (D) Tris.MgCl₂-Puffer. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

Vergleich verschiedener Puffer zur Isolierung von Zellkernen: Für die Isolierung pflanzlicher Zellkerne sind vier Extraktionspuffer entwickelt worden. Die Effektivität der verschiedenen Puffer hängt stark mit der zu untersuchenden Pflanzenart zusammen. Keiner der Puffer funktioniert mit jeder Pflanze am besten, sowohl die Gewebeart als auch die Anwesenheit bestimmter zytosolischer Bestandteile beeinflussen die Extraktion [482]. Allen Puffern ist gemeinsam, dass ihr pH-Wert im Bereich des pH-Werts des Zytosol gehalten wird und dass sie Detergentien wie Triton X-100 oder Tween 20 enthalten, welche die Freisetzung der Zellkerne unterstützen. Reduzierende Substanzen wie Mercaptoethanol dienen dazu, das Chromatin zu schützen [483]. Die Eigenschaften der verschiedenen Puffer sind in Tab. A.2 zusammengefasst. Aufgrund der Erfahrungen von Loureiro *et al.* (2006) [482] mit einem umfangreichen Puffervergleich, wurden alle Extraktionspuffer an Bärlauch, Mistel und Weißdorn getestet, um so den am besten geeigneten Puffer zu evaluieren. Die Beurteilung der Extraktionsqualität erfolgte morphologisch unter dem Mikroskop, da sich auf diese Weise Ausbeute und physiologischer Zustand der Zellkerne gut bewerten lassen. Als Proben dienten etwa 2 cm² große Blattstücke von Bärlauch, Mistel und Weißdorn, welche in 1 mL Extraktionspuffer mittels Rasierklinge zerkleinert wurden. Die Extraktionen wurden mit für jeden Puffer eigenen Protokollen durchgeführt (A.5.5). Die Zellkerne wurden anschließend durch Zugabe von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI ist neben Propidiumiodid (PI) der gängigste Farbstoff und hat gegenüber PI den Vorteil in der Zytometrie Histogramme mit sehr

Tab. A.3: Extraktionsleistung der vier Extraktionspuffer in Bezug auf die drei Arzneipflanzen.

Puffer	Qualität ^a	Zellkernausbeute [Kerne/mL]		
		Bärlauch	Mistel	Weißdorn
Galbraith	teilweise Verunreinigungen	300 ± 25	250 ± 20	275 ± 25
LB01	gut	250 ± 30	250 ± 10	0
Otto	auch zerstörte Zellen	250 ± 20	0	0
Tris.MgCl ₂	gut	300 ± 20	1.000 ± 75	150 ± 15

^a Morphologische Beurteilung einer Probe hinsichtlich deformierter oder zerstörter Zellkerne sowie Verunreinigungen

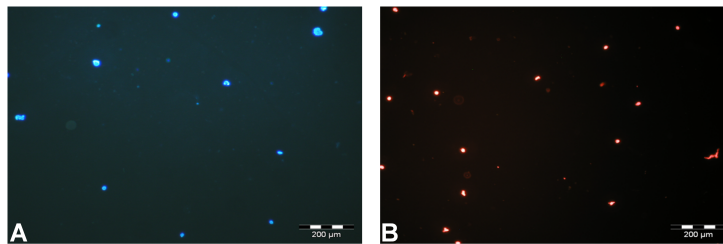
hoher Auflösung zu generieren [471] und nicht in doppelsträngige RNA zu interkalieren, was einen Einsatz von RNase unnötig macht und damit die Zellkerne schont. Abb. A.1 zeigt beispielhaft die Zellkernextraktionen aus Bärlauchblättern. Anhand der Form der Zellkerne wurde ihre Intaktheit beurteilt, ihre Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Neubauerkammer. Für Bärlauch sind zwischen den Puffern fast keine Unterschiede festzustellen (Tab. A.3). Mit dem Galbraith- und dem Tris.MgCl₂-Puffer können etwa 300 intakte Zellkerne pro 1 mL isoliert werden. Bei LB01- und Otto-Puffer liegt die Konzentration mit ungefähr 250 Kernen/mL etwas tiefer. Bei Mistel- und Weißdornblättern hat die Wahl des Extraktionspuffers größeren Einfluss. Mit LB01- (nur bei Weißdorn) und Otto-Puffer können keine Zellkerne extrahiert werden. Die Ergebnisse mit dem Galbraith- und dem LB01-Puffer (bei Mistel) sind mit dem Bärlauchextraktionen vergleichbar. Der Tris.MgCl₂-Puffer liefert die höchste Ausbeute an Zellkernen, mit ca. 1.000 Kernen/mL bei Mistel und 150 Kernen/mL bei Weißdorn. Die Qualität der Zellkerne ist bei allen Puffern ähnlich. Sie zeigen keine Größenunterschiede und sind rund und nicht deformiert. Der Tris.MgCl₂-Puffer bietet insgesamt die beste Ausbeute. Mit mindestens 150 Kernen/mL ist die Menge ausreichend für eine zytometrische Messung [471]. Er ist zudem günstig und einfach herzustellen und z.B. im Vergleich mit dem Otto-Puffer leicht zu handhaben. Daher wurde für alle weiteren Arbeiten das Protokoll für den Tris.MgCl₂-Puffer übernommen. Weitere Versuche zur Optimierung der Zellkernausbeute durch Variation der Menge an Ausgangsmaterial oder die Etablierung von Sedimentations- bzw. Zentrifugationsschritten zur Aufkonzentrierung der Zellkerne² ergaben keine signifikante Verbesserung (Ergebnisse nicht gezeigt).

Auswahl des geeignetsten Farbstoffs: Hauptsächlich vier Farbstoffe werden für die Genomgrößenbestimmung bei Pflanzen verwendet. Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: Die in doppelsträngige DNA interkalierende Fluorochrome Ethidiumbromid (EtBr) und PI und Farbstoffe mit Spezifität für ein Basenpaar, wie DAPI und Mithramycin (MI). Tab. A.4 listet zur besseren Übersicht die Spezifitäten der verschiedenen Farbstoffe auf. Genomgrößen, ermittelt mit verschiedenen Farbstoffen, zeigen signifikante Unterschiede (90–140% im Vergleich mit der

²Masterarbeit von Claudia Räke, *Real-time* PCR-basierte Genomgrößen- und Polyploidie-Bestimmung von Heilpflanzen (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 58–66

Tab. A.4: Farbstoffe zum Färben von Zellkernen für die Durchflusszytometrie und ihre Spezifität bezüglich der DNA-Interkalation.

Farbstoff	Spezifität	Anregung [nm]	Emission [nm]	Referenz
Ethidiumbromid (EtBr)	keine	523	603	[483]
Propidiumiodid (PI)	keine	523	617	[484]
SYBR Green I	keine	494	521	[485]
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	AT-reiche Regionen	359	461	[484]
Mithramycin (MI)	GC-reiche Regionen	440	575	[484]

**Abb. A.2:** Mikroskopische Untersuchungen zur Zellkernfärbung. Mittels Tris.MgCl₂-Puffer isolierte Zellkerne aus Bärlauchblättern, (A) gefärbt mit DAPI und (B) zum Vergleich mit PI.

PI-Färbung). Die Ursachen dafür sind sowohl unterschiedliche AT/GC-Verhältnisse als auch speziesspezifisch variierende Bindungseigenschaften der Fluorochrome mit der DNA. Selbst wenn Probe und Standard vergleichbare AT/GC-Verhältnisse aufweisen, treten Genomgrößenunterschiede, ermittelt mit DAPI oder MI, auf. Die Verwendung von PI ist daher grundsätzlich empfehlenswert, aber nicht immer erfolgreich [484]. Aus diesem Grund wurden verschiedene Farbstoffe an den drei Pflanzen getestet. Die isolierten Zellkerne wurden mit den Farbstoffen entsprechend **A.5.5** angefärbt und für 5 min auf Eis inkubiert. Wie Abb. A.2 verdeutlicht, sind DAPI und PI beide vergleichbar gut geeignet, um Bärlauchzellkerne anzufärben. Die anderen Farbstoffe sind weniger gut geeignet. PI eignet sich ebenfalls um die DNA in Mistel- und Weißdornzellkernen erfolgreich zu markieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Etablierung des Zytometrieprotokolls: Prinzipiell kann mit allen Extraktionspuffern sowie mit DAPI und PI die Isolierung und Färbung von Bärlauch-, Mistel- und Weißdornzellkernen erfolgreich durchgeführt werden. Die besten Ergebnisse liefert das Extraktionsprotokoll unter Verwendung des Tris.MgCl₂-Puffers. Aufgrund der basenunabhängigen Bindungseigenschaften wurde im Folgenden nur noch PI als Farbstoff verwendet. Der Einfluss von Extraktionspuffer und Farbstoff wurde anschließend am Zytometer untersucht³, dabei zeigte sich eine komplette Übereinstimmung mit den mikroskopischen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Mikroskopie zur Anpassung der Genomgrößenbestimmung an eine Pflanze als schnelle und effektive Voruntersuchung ist daher allgemein zu empfehlen.

³Masterarbeit von Claudia Räke, *Real-time* PCR-basierte Genomgrößen- und Polyploidie-Bestimmung von Heilpflanzen (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 72–77

A.1.2 Bestimmung der Genomgrößen von Bärlauch, Mistel und Weißdorn

Mit dem Ziel die Genomgrößen von einheimischen Bärlauch-, Mistel- und Weißdornpflanzen zu bestimmen, wurden Zellkerne mit Tris.MgCl₂ isoliert und mittels PI gefärbt. Von den Zellkernsuspensionen wurden 2.000–5.000 Zellkernen zytometrisch analysiert. Um trotz geringer Konzentration an Kernen ausreichend Daten zu erhalten, wurde die Durchflussrate auf *slow* eingestellt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm WinMDI als Anzahl von Kernen (*events*) gegen die relative Fluoreszenzintensität dargestellt. Dadurch sind spezifische Peaks erkennbar. Die Zellen befinden sich zumeist in der G1-Phase des Zellzyklus, die Chromosomen liegen doppelt vor, der DNA-Gehalt ist 2C. Dieser größte Teil der Zellen erzeugt den ersten G1-Peak. In der G2-Phase hat jedes Chromosom zwei Chromatiden, der DNA-Gehalt ist 4C. Nur sehr wenige Zellen stehen kurz vor der Teilung, daher ist dieser zweite Peak deutlich kleiner. Die Interpretation der Daten benötigte für jede Pflanze einen Referenzstandard (Pflanze mit bekannter Genomgröße, siehe Tab. A.5). Damit der Zusammenhang zwischen Probe und Referenz linear ist, dürfen ihre Genomgrößen nicht mehr als Faktor vier voneinander abweichen [471]. Aufgrund vorhandener Werte (vgl. Tab. A.1) bietet sich daher für Bärlauch und Mistel der Lauch mit 45,3 pg DNA als Referenz an. Apfel ist ein Verwandter des Weißdorns und wurde daher als Standard ausgewählt. Die Referenzpflanzen wurden auf gleiche Weise vorbereitet wie die Arzneipflanzen. Bei der Messung der Referenz wurde der G1-Peak (2C-Wert) auf 1/10 der linearen Abszisse durch Veränderung der Photomultipliersensitivität (PMT-*gain*) eingestellt. Mit diesen Einstellungen wurden dann die Proben untersucht. Sechsfach durchgeführte Messungen wurden gemittelt. Die gemessene relative Intensität der Fluoreszenz eines Peaks hängt direkt mit dem DNA-Gehalt der dazugehörigen Zellkerne zusammen. Die Genomgröße berechnet sich darum wie folgt:

$$\text{Genomgröße}_{\text{Probe}} = \text{Genomgröße}_{\text{Referenz}} \cdot \frac{\text{G1-Intensität}_{\text{Probe}}}{\text{G1-Intensität}_{\text{Referenz}}} \quad (\text{A.1})$$

VarK als Maß für die Güte der Analyse berechnet sich aus der Standardabweichung des Peaks und dem Mittelwert der Intensität:

$$\text{VarK} [\%] = \frac{\sigma_{\text{Intensität}}}{\bar{m}_{\text{Intensität}}} \quad (\text{A.2})$$

mit σ = Standardabweichung und \bar{m} = Mittelwert

Abb. A.3a zeigt die Histogramme von Porree- und Bärlauchzellkernen. Mit Gl. A.1 ergibt sich aus den relativen Intensitäten die Genomgröße. Analog dazu wurden die Genomgrößen von Mistel (Abb. A.3b) und Weißdorn (Abb. A.3c) berechnet. Alle Ergebnisse sind in Tab. A.6 zusammengefasst. Alle drei Pflanzen sind diploid, darin stimmen alle Quellen überein (vgl. Tab A.1). Auch die Genomgrößen konnten erfolgreich experimentell bestimmt werden. Bärlauch fügt sich mit 59,2 pg in die Liste publizierter Werte ein. Sämtliche bekannte Bärlauchdaten stammen aber auch von

Tab. A.5: Gängige DNA-Referenzstandards für die Bestimmung der Genomgröße in absoluten Einheiten. In dieser Arbeit wurden Lauch (Bärlauch und Mistel) und Apfel (Weißdorn) eingesetzt.

Spezies	dtsh. Name	Genom (SC) [pg]	Referenz
<i>Malus domestica</i>	Apfel	2,7	[450, 482, 486]
<i>Zea mays</i>	Mais	5,43	[487]
<i>Pisum sativum</i>	Erbse	9,09	[488]
<i>Allium cepa</i>	Zwiebel	34,89	[488]
<i>Allium porrum</i>	Lauch	45,3	[487]

Bärlauchpflanzen aus Mitteleuropa. Bei Weißdorn stimmt die ermittelte Genomgröße ebenfalls mit den Literaturwerten überein, hier gibt es grundsätzlich nur ganz geringe Schwankungen. Bei der Mistel schwanken die Werte aus unterschiedlichen Quellen enorm. Mit 153,3 pg liegt der selbstgemessene Wert für die einheimische Mistel etwa in der Mitte. Dies erscheint realistisch. Allgemein zeigen die Ergebnisse, dass das etablierte Extraktions- und Messverfahren glaubwürdige und zuverlässige Daten liefert, womit auch die Genomgröße der Mistel als abgesichert angesehen werden kann.

A.1.3 Real-time PCR-basierte Bestimmung der Genomgrößen

Neben der Etablierung eines Protokolls mit dem eine zytometrische Bestimmung der Genomgrößen von Bärlauch, Mistel und Weißdorn erfolgreich durchgeführt werden kann, war es Ziel dieser Arbeit, den neuartigen Ansatz *real-time* PCR zu diesem Zweck einzusetzen, erstmals auf pflanzliche Genome zu übertragen. Hierbei war interessant herauszufinden, inwieweit diese moderne Messtechnik Vorteile gegenüber der konventionellen Methode hat. Wilhelm *et al.* (2003) [465] beschrieben diese neue Vorgehensweise zuerst. Sie konnten nachweisen, dass sich so die Genomgrößen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Xiphophorus maculatus* und *Homo sapiens* exakt quantifizieren lassen. Einige weitere Studien wurden in der Folgezeit veröffentlicht, in denen die neue Methode auf andere Spezies übertragen worden ist. Gao *et al.* (2006) [489] z.B. bestimmten die Genomgrößen der Fliegenarten *Musca domestica* und *Drosophila melanogaster* zur Vorarbeit für Sequenzierungen. Ebenfalls zur Vorbereitung eines Sequenzierprojekts und weil zytometrische Messungen kein eindeutiges Ergebnis lieferten, bestimmten Jeyaprakash *et al.* (2009) [490] die Genomgröße der Milbe (*Metaseiulus occidentalis*). Tab. A.7 gibt eine Übersicht bisher publizierter Genomgrößen gemessen mit *real-time* PCR. Im Vergleich zur großen Vielfalt an zytometrischen Studien ist die Anzahl hier momentan gering.

Gemäß Wilhelm *et al.* (2003) [465] ist für die Bestimmung des 1C-Werts die absolute Quantifizierung eines *single-copy*-Gens⁴ notwendig. Dafür werden DNA-Oligonukleotiden (Standards) mit bekannter Konzentration, welche die Sequenz des *single-copy*-Gens enthalten, benötigt. Dieser Standard wird mittels konventioneller PCR, unter Verwendung eines „äußeren“ Primerpaares

⁴Als *single-copy*-Gen bezeichnet man Gene, die nur in einer einzigen Kopie im gesamten Genom vorkommen.

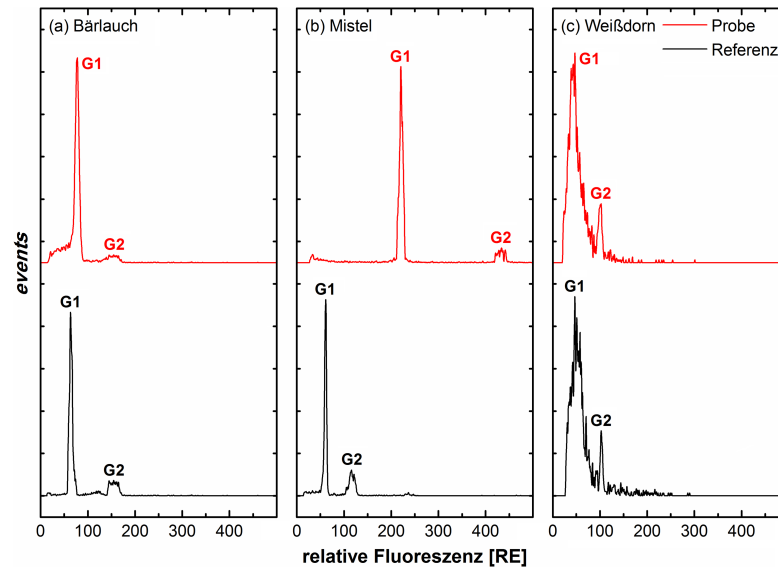


Abb. A.3: DNA-Histogramme von Messungen der Bärlauch-, Mistel- und Weißdornzellkerne. Bei der Durchflusszytometrie wurden Referenzpflanzen mit vermessen: Lauch für Bärlauch und Mistel sowie Apfel für Weißdorn. Entscheidend für die Genomgrößenberechnung sind die Intensitäten der G1-Peaks (Peakpositionen) in relativen Fluoreszenzeinheiten.

Tab. A.6: Durchflusszytometrisch bestimmte Genomgrößen einheimischer Proben der drei in *Lecteria* enthaltenen Arzneipflanzen. Als Literaturwert ist der Mittelwert alle bekannten 2C-Werte angegeben (vgl. Tab. A.1).

Spezies	dtsh. Name	Ploidie-grad	gemessene Genomgröße			VarK [%]	Literatur (2C) [pg]
			1C [Gb]	1C [pg]	2C [pg]		
<i>Allium ursinum</i>	Bärlauch	2	28,95	29,60	59,20	8,36	61,85
<i>Viscum album</i>	Mistel	2	74,96	76,65	153,30	2,77	138,28
<i>Crataegus laevigata</i>	Weißdorn	2	1,32	1,35	2,70	14,14	2,36

Tab. A.7: Übersicht über alle bisher publizierten *real-time* PCR-basierten Daten mit Angabe des Ziels der jeweiligen Studie.

Spezies	dtsh. Name	Ziel	gemessene Genomgröße			Referenz
			1C [Mb]	1C [pg]	2C [pg]	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Backhefe	Etablierung	12,1	0,01	0,02	[465]
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Saugwurm	Sequenzierung	75,95	0,08	0,16	[491]
<i>Psoroptes ovis</i>	Milbe	Sequenzierung	86	0,09	0,18	[492]
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	Milbe	Sequenzierung	89	0,09	0,18	[490]
<i>Sarcoptes scabiei</i>	Grabmilbe	Sequenzierung	96	0,1	0,2	[492]
<i>Drosophila melanogaster</i>	Taufliege	Sequenzierung	184	0,19	0,38	[489]
<i>Dermatophagoides</i>	Staubmilbe	Sequenzierung	184,5	0,19	0,38	[492]
<i>Musca domestica</i>	Stubenfliege	Sequenzierung	295	0,3	0,6	[489]
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Kärpfling	Etablierung	550	0,56	1,12	[465]
<i>Homo sapiens</i>	Mensch	Etablierung	2.900	2,97	5,93	[465]

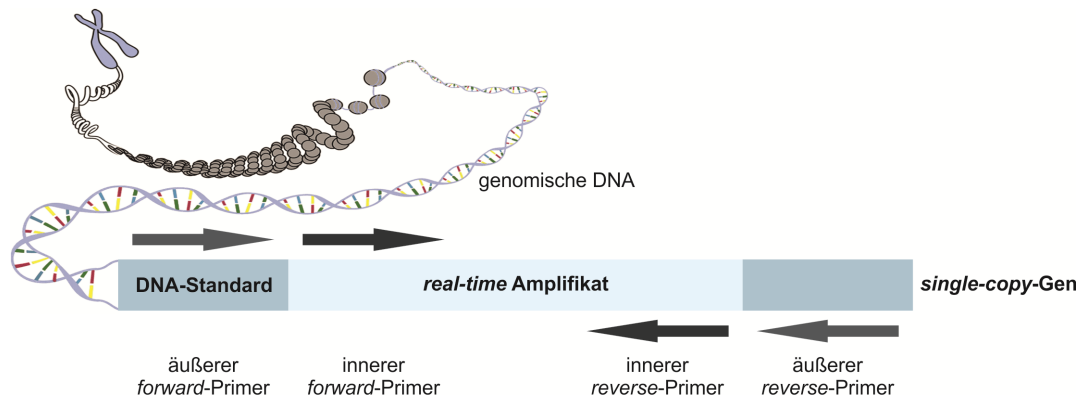


Abb. A.4: Positionen der Primer zur Generierung von Standards und für die *real-time* PCR. Mit den äußeren Primer und konventioneller PCR wird ein Amplifikat erzeugt welches, als Standard zur Bestimmung von Kopienzahlen bei einer *real-time* PCR mit den inneren Primern dienen kann (vgl. mit pGEM-3Z VEGF in A.2.4).

generiert und aufgereinigt (Abb. A.4). Template dafür ist die genomische DNA der zu untersuchenden Spezies. PCR-Produkt (Standard) und *single-copy*-Gen im Genom besitzen somit die gleiche Sequenz, innerhalb welcher die Bindestellen für ein „inneres“ Primerpaar liegen. Mit diesen Primern wird die *real-time* PCR durchgeführt. Ähnlich wie auch unter A.2.4 werden Standards in einer Verdünnungsreihe sowie die Proben in einem PCR-Lauf gemeinsam vermessen. Da die Länge des Standards bekannt ist, kann mit Hilfe seiner spektroskopisch bestimmten Konzentration die Kopien pro 1 μL berechnet werden. Die Kopien berechnen sich wie in A.2.4 beschrieben mit Gl. A.4. Mit bekannten Kopien/ μL und den gemessenen Ct-Werten der Verdünnungsreihe wird eine Kalibrationsgerade erstellt. Daraus kann direkt vom gemessenen Ct-Wert einer Probe die sich in der Probe befindliche Anzahl (vor der PCR) an *single-copy*-Genkopien abgelesen werden. Da ein *single-copy*-Gen nur einmal im Genom vorkommt, ergibt sich folgende Umrechnung von Kopien in Genomgröße:

$$\text{Genomgröße (1C) [pg]} = \frac{\text{eingesetzte DNA-Menge [pg]}}{\text{detektierte Kopienzahl}_{\text{single-copy-Gen}}} \quad (\text{A.3})$$

Entscheidend für den Erfolg dieser Methode ist das Vorhandensein von *single-copy*-Gensequenzen. Umfassende Sequenzinformationen sind in der Regel nur von Organismen verfügbar, von denen bereits große Teile ihre Genome sequenziert und damit auch die Genomgrößen bekannt sind. Gerade bei höheren Pflanzen sind kaum Sequenzdaten vorhanden, daher ist es wenig verwunderlich, dass bisher keine Studien für höhere Pflanzen durchgeführt worden sind.

Single-copy-Gene, Primerdesign und Primertests: In der Literatur sind einige pflanzliche *single-copy*-Gene bestätigt. Tab. A.8 listet die für diese Arbeit verwendeten Gene mit den entsprechenden Referenzen auf. Für keines der Gene sind Nukleotidsequenzen für Bärlauch, Mistel und Weißdorn in der GenBank verfügbar. Dies erschwert das Design von geeigneten Primerpaaren erheblich und machte verschiedene Herangehensweisen notwendig. Die Chalconsynthase (*chs*) ist

Tab. A.8: Für die Genomgrößenbestimmung von Bärlauch, Mistel und Weißdorn ausgewählte *single-copy*-Gene.

<i>single-copy</i> -Gen	Abk.	Funktion	Referenz
Chalconsynthase	<i>chs</i>	Biosynthese von Flavonoiden	[493]
Ferredoxin I	<i>fdx</i>	Elektronenüberträger	[494]
Lichtsammel-Chlorophyll-a/b-Bindeprotein	<i>a/b-bp</i>	Membranbindung von Chlorophyll	[495]
High-Mobility-Group-Protein I-Y	<i>hmg-I/Y</i>	körper eigener Alarmstoff	[496]
Plastocyanin	<i>pc</i>	Elektronentransport	[497]
Protein des Photosystem II	<i>psbS</i>	Protonenbindung	[498]

das Schlüsselenzym des Flavonoid-Glycosidase-Wegs. Ferredoxin I (*fdx*) ist an der Eisenreduktion während der Photosynthese beteiligt [499]. Die Gene beider Proteine sind als Vertreter pflanzlicher *single-copy*-Gene beschrieben [494, 500, 501]. Zunächst wurde mittels Taxonomy Browser⁵ eine taxonomische Einordnung der drei Arzneipflanzen vorgenommen, dadurch wurden Sequenzdaten beider Gene von möglichst nahen Verwandten von Bärlauch (*Allium cepa* und *Zea mays*), Mistel (*Saintpaulia pendula* und *Spinacia oleracea*) und Weißdorn (*Malus domestica* und *Pyrus pyrifolia*) gefunden und *äußere* Primerpaare designt. Bioinformatische Vorarbeiten sind keine Garantie, dass die Primer auch mit DNA-Proben der drei Arzneipflanzen funktionieren. Mit steigender Entfernung der Verwandtschaft und damit höherer Mutationsrate zwischen den Sequenzen, sinkt die Wahrscheinlichkeit, noch komplementäre Primer zu erhalten. Daher wurde zusätzlich eine weitere Strategie verfolgt. Für die *single-copy*-Gene *a/b-bp*, *hmg-I/Y* und *psbS* wurden Gensequenzen von je 20 Verwandten der Arzneipflanzen ausgewählt. Dieser Pool aus 60 Sequenzen wurde mit dem Programmen MegAlign und MEGA 3.1 verglichen und aligniert (vgl. 4.3.1). Aus der alignierten Matrix wurde mit ClustalX⁶ die Konsensussequenz (Parameter: relative Häufigkeit einer Nukleobase) generiert, die jeweils beiden am stärksten konservierten Bereiche sollten als Primerbindestellen sein (Abb. A.5). Für den dritten Satz an Primern wurden mit den beschriebenen Primern für die Gene *chs* und *fdx* generierte Amplifikate sequenziert. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden aligniert und waren Vorlage für weitere Primer. Die Primerparameter wurden analog zu den Erläuterungen unter A.2.4 gewählt, alle Primer sind in A.4.7 angegeben. Tab. A.9 fasst die Experimente zur Evaluierung der Primerpaare zusammen. Mit jedem Paar (sowohl „innere“ als auch „äußere“ Primerpaare) wurde als Test Gradienten-PCR durchgeführt, dabei diente mittels CTAB-Methode isolierte DNA frischer Pflanzenproben als Template. Es wurde eine zweistufige PCR verwendet, da die Pflanzengenome sehr groß sind und dadurch das Verhältnis von Target (ein einziges pro Genom) zur Gesamtmenge an eingesetzter DNA sehr ungünstig liegt. Zunächst wurde eine PCR für 20 Zyklen durchgeführt, aus dieser wurde eine 10 µL Probe entnommen, welche in einer zweiten PCR mit denselben Primern als Template für weiter 40 Zyklen diente. Über diesen Zwischenschritt wird das Verhältnis zugunsten der *single-copy*-Genamplifikate

⁵www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi

⁶www.clustal.org/clustal2/

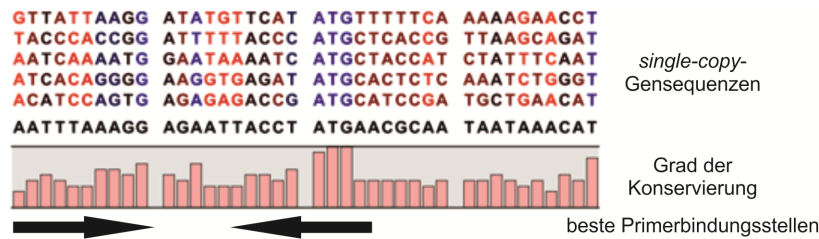


Abb. A.5: Beispielhafte Darstellung eines multiplen Sequenzalignments zum Auffinden besonders konservierter Bereiche innerhalb einer *single-copy*-Gensequenz. Sequenzen ist zur besseren Übersicht stark verkürzt dargestellt.

Tab. A.9: Funktionalität der *single-copy*-Primerpaare für DNA der drei Arzneipflanzen. Aufgelistet sind neben Spezifität auch die erwarteten Amplifikatlängen.

Target	Spez. ^a	Länge ^b [bp]	Bärlauch		Mistel		Weißdorn	
			außen	innen	außen	innen	außen	innen
<i>chs</i>	B	444 / 118	-	+	+	-	-	+
	M	488 / 107	-	-	-	-	-	+
	W	367 / 120	+	+	-	-	+	+
	B, M, W^c	488 / 161	-	-	+	+	-	-
<i>fdx</i>	B	411 / 140	-	-	-	-	-	-
	M	390 / 115	-	+	+	-	-	-
	W	300 / 103	-	+	-	+	-	+
	B, M, W ^c	390 / 232	-	-	+	-	-	-
<i>a/b-bp</i>	B, M, W	221 / 127	-	+	-	-	-	-
	B, M, W ^c	374 / 114	-	+	-	-	-	-
<i>hmg-I/Y</i>	B, M, W	586 / 178	-	-	-	-	-	-
<i>pc</i>	B, M, W	254 / 148	-	-	-	-	-	-
<i>psbS</i>	B, M, W	526 / 150	+	+	+	-	-	-

^a Die Spezifität (Spez.) gibt in diesem Fall an, für welche Pflanze die Primer spezifisch sein sollen: B = Bärlauch; M = Mistel; W = Weißdorn. Die letztendlich zur Genomgrößenbestimmung verwendeten Primer sind grün hervorgehoben.

^b Angegeben ist jeweils die Länge des PCR-Produkts (Standard, außen) und die Länge des Amplifikats der *real-time* PCR (innen), dessen Sequenz auch innerhalb des Standards liegt.

^c Primer auf Basis von Sequenzierung designt (dritter Primersatz).

erhöht (vgl. 4.2.1.2). Die Auswertung erfolgte mit Agarosegelelektrophorese (Ergebnisse nicht gezeigt). Nur wenige Primerpaare erfüllen ihre Funktion (grünes Plus), d.h. sowohl mit dem „inneren“ als auch mit dem „äußeren“ Primerpaar wird ein Amplifikat mit erwarteter Größe generiert. Für Bärlauch standen mit *chs* (mit den eigentlich für Weißdorn-DNA designten Primern) und *psbS* zwei mögliche Targets zur Verfügung, bei Mistel (*chs*) und Weißdorn (*chs*) jeweils nur eins. Scheinbar eignet sich besonders das Gen für die Chalconsynthase für das hier angewendete Primerdesign. Die Genomgrößen wurden daher für jede der drei Pflanzen mit *chs* als Target bestimmt. Der genaue Grund dafür, dass viele Primer nicht funktionierten ist nicht bekannt, wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel von nicht ausreichend guten Amplifikationsbedingungen und für eine Hybridisierung zu stark abweichende Basenabfolgen.

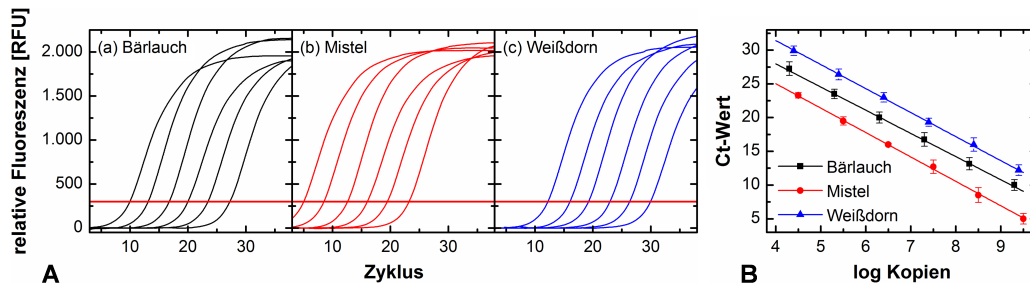


Abb. A.6: Kalibration über das *chs*-Gen. (A) Gemessen werden die Ct-Werte von Verdünnungsstufen der mit den „äußeren“ Primern generierten *chs*-Standards. (B) Diese Ct-Werte werden dann gegen den Logarithmus ihrer spektroskopisch bestimmten Kopienzahlen aufgetragen. Durch lineare Regression werden die Kalibrationsgeraden erhalten: Bärlauch: $y = -3,436x + 41,71$; Mistel: $y = -3,619x + 39,5$; Weißdorn: $y = -3,56x + 45,66$.

Genomgrößenbestimmung: Zur Bestimmung der Genomgrößen wurden jeweils mehrere Pflanzenproben parallel mit einer Verdünnungsreihe aufgereinigten DNA-Standards mittels *real-time* PCR vermessen. Es wurde das in A.2.4 am Beispiel von VEGF etablierte Protokoll verwendet und analog zu dort beschriebenen Versuchen (vgl. Abb. A.5) Kalibrationsgeraden erstellt und die *chs*-Kopienzahlen in 1 ng Pflanzen-DNA berechnet. Um nicht weitere Verdünnungsreihen von pflanzlicher DNA messen zu müssen, wurden die PCR-Effizienzen mit der Methode zur Berechnung aus einem einzigen Reaktionsansatz heraus (vgl. Abb. 3.7) bestimmt. Sämtliche Effizienzen lagen bei 2,01–2,13, d.h. eine korrekte Korrelation von Standardkopien und Proben ist gegeben (Ergebnisse nicht gezeigt). Abb. A.6 zeigt die Kalibration und in Tab. A.10 sind die *real-time* PCR-basiert ermittelten Genomgrößen der drei Arzneipflanzen zusammengestellt. Für Bärlauch und Mistel wurden mit 68,34 bzw. 201,2 ng auch mittels *real-time* PCR glaubwürdige 2C-Werte erhalten. Bei Weißdorn ist die berechnete Genomgröße allerdings um Faktor 650 kleiner als der zytometrisch ermittelte Wert. Da sich *chs* für Bärlauch und Mistel als *single-copy*-Gen bestätigt hat, muss davon ausgegangen werden, dass die Primer im Fall von Weißdorn nicht vollständig spezifisch sind und dadurch deutlich zu viele Kopien falsch detektiert werden.

Bewertung der *real-time* PCR: Für Bärlauch und Mistel konnten mittels *real-time* PCR jeweils Genomgrößen bestimmt werden, welche durch die zytometrischen Daten gestützt werden. Trotz dieses Erfolgs eignet sich die Methode nur eingeschränkt für Arbeiten mit Pflanzengenomen. Das Hauptproblem ist das Primerdesign, es sind nicht genug Daten vorhanden, um mit Sicherheit Primer entwickeln zu können. Häufigster Grund für die Verwendung der *real-time* PCR zur Genomgrößenbestimmung war bisher die Vorbereitung von Sequenzierungen (Tab. A.7). Hier offenbart sich der Knackpunkt bei der Anwendung mit Pflanzen. Von Pflanzen welche weitgehend sequenziert sind, also ausreichend Sequenzdaten für ein erfolgreiches Primerdesign zur Verfügung stehen, sind die Genomgrößen schon bekannt. Im Vergleich zur etablierten Zytometriemethode ist das in dieser Arbeit durchgeführte Screening nach geeigneten Primern sehr aufwendig, daneben ist die Methode hier nicht weiter aufgeführten Schwankungen bei der *real-time* Amplifikation

Tab. A.10: Mittels *real-time* PCR selbst bestimmte Genomgrößen.

Spezies	dtsh. Name	Target	eingesetzte DNA [ng]	Kopien	gem. Genomgröße	
					PCR	Zytometrie
<i>Allium ursinum</i>	Bärlauch	<i>chs</i>	10	146	68,34	59,2
<i>Viscum album</i>	Mistel	<i>chs</i>	10	50	201,2	153,3
<i>Crataegus laevigata</i>	Weißdorn	<i>chs</i>	10	240.094	0,004	2,7

ausgesetzt, welche durch die großen Pflanzengenome verursacht werden. D.h. in der Konsequenz, dass die ermittelten Werte ohne Referenzdaten nicht ausreichend vertrauensvoll sind. Daher ist es nicht zu empfehlen, die *real-time* PCR-Methode auf Pflanzen mit unbekanntem Genomgrößen anzuwenden.

A.1.4 Zusammenfassung: Genomgrößenbestimmung

Für die Durchflusszytometrie wurde ein Protokoll etabliert, mit welchem sich zuverlässig pflanzliche Genomgrößen bestimmen lassen. So konnten für die einheimischen Vertreter von Bärlauch, Mistel und Weißdorn 2C-Genomgrößen von 59,2, 153,3 und 2,7 pg DNA ermittelt. Dies entspricht publizierten Daten anderer Forschergruppen (Tab. A.1). Im Vergleich dazu stellte sich die *real-time* PCR sehr arbeits- und zeitintensiv dar. Ein weiterer Nachteil ist die Notwendigkeit von Informationen bezüglich der DNA-Sequenz. Dennoch war es mit beiden Methoden möglich, die Genomgrößen zu bestimmen. Eine genauere Bewertung soll in diesem Rahmen nicht erfolgen, die gewünschten Daten wurden erhalten, die bessere Methode wurde benannt und im Fokus dieser Dissertation liegen die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebene Entwicklung von qualitativen und quantitativen Inhaltsstoffnachweisen der drei Arzneipflanzen in *Lefteria*.

A.2 Etablierung molekularbiologischer Methodenprotokolle

In diesem Teil des Anhangs werden molekularbiologische Methoden vorgestellt, die zur Umsetzung DNA-basierter Nachweise von Bärlauch, Mistel und Weißdorn in Lefteria-Tabletten essentiell sind. Anhand eines Beispiels aus dem biotechnologischen Labor wird die Durchführung der wichtigsten Techniken demonstriert. Als Demonstrationsbeispiel dient die Klonierung eines humanen Wachstumsfaktors in einen Expressionsvektor zur rekombinanten Proteinproduktion in *E. coli*. Dafür werden sowohl Klonierungs- als auch PCR-Techniken angewendet. Darüber hinaus nimmt quantitative *real-time* PCR eine zentrale Rolle in diesem Abschnitt ein. Mit ihr erfolgt die Bestimmung der Transkriptionsaktivität einzelner Klone zur Selektion eines möglichst gut produzierenden Stamms. Es werden daran verschiedene Strategien zur Quantifizierung von Nukleinsäuren erklärt, die auch beim Lefteria-Assay Anwendung finden.

A.2.1 *Vascular endothelial growth factor*

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ist ein humaner Wachstumsfaktor, der die Teilung und Migration von Endothelzellen stimuliert. Der Begriff VEGF beschreibt eine Proteinfamilie, die sieben verschiedene Varianten des Proteins umfasst: VEGF-A bis VEGF-F sowie PGF (*placental growth factor*) [502]. Die Varianten unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion. VEGF-A ist ein Regulator der Angiogenese, d.h. der Bildung neuer Blutgefäße. Da VEGF-A ebenfalls die Gefäßneubildung von Tumoren fördert, gilt sein Gehalt als messbarer Indikator bei der Tumorfrüherkennung [503]. VEGF₁₆₅ ist die häufigste Splicingvariante des Gens, das für VEGF-A kodiert. Das aus 165 Aminosäuren bestehende Proteinmonomer ist 22,3 kDa groß [504], führt an seinem *N*-terminalen Ende ein 26 Aminosäuren großes Signalpeptid und besteht aus zwei Domänen: Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) und Heparin-Bindungsdomäne (HBD).

Die praktischen Arbeiten VEGF betreffend wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Miriam Lübbecke durchgeführt. Im Rahmen ihrer Dissertation wurde VEGF als Modellprotein zum Aufbau und zur Optimierung verschiedener Proteinassays benötigt, welche z.B. als Screening-Methoden zur Tumorfrüherkennung interessant sind [505]. Die dabei gewonnenen Erfahrungen konnten in der vorliegenden Arbeit vor allem zur Umsetzung einer pflanzenspezifischen Quantifizierung eingesetzt werden.

A.2.2 pET-Vektorsystem

Ausgangspunkt für die Herstellung von VEGF₁₆₅ war der Vektor pRRL.PPT.SF.VEGF165.pre⁷ zur Expression des humanen Wachstumsfaktors in einer CHO-Suspensionszelllinie [506]. Die Gensequenz wurde in ein bakterielles Plasmid kloniert, um die Kultivierung durch *E. coli* einfacher zu gestalten und größere Mengen an Protein produzieren zu können.

⁷Klonierung durch die Arbeitsgruppe von Axel Schambach an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)

Als Expressionssystem wurde das pET-System (*plasmid expression by T7-RNA-polymerase*) von Merck (Darmstadt) gewählt. Durch die Verwendung des viralen T7-Promoters wird eine hohe Transkriptionseffizienz erreicht, was eine starke Überexpression des Zielproteins ermöglicht (Abb. A.7). Die pET-Vektoren müssen dafür in spezielle, kommerziell erhältliche *E. coli*-Stämme transformiert werden, bei denen das sogenannte λ DE3-Lysogen ins Genom integriert worden ist. Dieses genetische Element besteht aus dem Gen für die virale T7-RNA-Polymerase unter Repression des *lac*-Operators. pET-Vektoren sind so konstruiert, dass ein kloniertes Zielgen ebenfalls durch ein *lac*-Operon kontrolliert wird. Im *E. coli*-Genom ist das *lacI*-Gen vorhanden, welches für die Produktion des *lac*-Repressors verantwortlich ist. Dieser bindet an die *lac*-Operonregionen und verhindert die Expression des nachgeschalteten Gens der T7-Polymerase sowie des Zielgens. Zudem ist ohne die Expression der T7-Polymerase keine mRNA-Transkription des Zielgens möglich, da *E. coli*-eigene Polymerase nicht an den T7-Promoter binden können. Durch die *lac*-Kontrolle beider Gene wird die Produktion des Zielproteins sowohl direkt als auch indirekt höchst effektiv inhibiert. Da aber eine mRNA-Bildung durch den *lac*-Repressor nie vollständig ausgeschlossen werden kann, enthalten die *E. coli* (DE3)-Stämme zusätzlich ein Plasmid, welches das Gen für das T7-Lysozym trägt. Dieses Protein inaktiviert T7-Polymerasen. Wird entsprechenden Suspensionskulturen der Induktor IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zugesetzt, bindet dieser an den *lac*-Repressor und legt damit die Operatorregionen frei und verhindert zudem durch Bindung des T7-Lysozyms die Inaktivierung der T7-Polymerase. Die Produktion des Zielproteins erfolgt dann ungehindert. Ein solcher Mechanismus zur Repression dient dazu, die Proteinproduktion zeitlich zu steuern und erst ab gewisser Zelldichte zu starten.

Nach der Wahl von pET als geeignetes Vektorsystem wurden verschiedene Klonierungsstrategien entwickelt und umgesetzt. Die beiden folgenden Abschnitte beschreiben die Vorgehensweise sowie die anschließende Herstellung und Aufreinigung von VEGF.

A.2.3 Klonierungsstrategien

Ziel war es VEGF ohne und mit Affinitäts-Tag (hier S-Tag) zu produzieren. Der S-Tag ist ein 15 Aminosäuren langes Peptid mit hoher Affinität zum S-Protein. Merck bietet dazu ein spezielles Kit zur Aufreinigung S-getaggtter Proteine an [507]. Sämtliche Klonierungsschritte wurden über kohäsive Enden (*sticky ends*) durchgeführt und sind in Abb. A.8 detailliert geschildert. Zur Stabilisierung der VEGF-Sequenz erfolgte zunächst eine Subklonierung der aus dem vorhandenen Vektor mittels PCR gewonnenen Sequenz in den Vektor pGEM-5Zf(+). Dieser wird von Bakterienzelle in hoher Kopienzahl produziert (*high copy*) und eignet sich besonders für eine Vervielfältigung der so stabilisierten Sequenz. Durch die *multiple cloning sites* (MCS) des Vektors stehen dann Möglichkeiten zur Umklonierung in den Expressionsvektor pET-29a(+) zur Verfügung. Abb. A.8 zeigt zudem die Schritte zur Klonierung des Vektors pGEM-3Z VEGF, welcher als Plasmidstandard zur absoluten Quantifizierung der mRNA von VEGF erzeugt wurde (A.1.4).

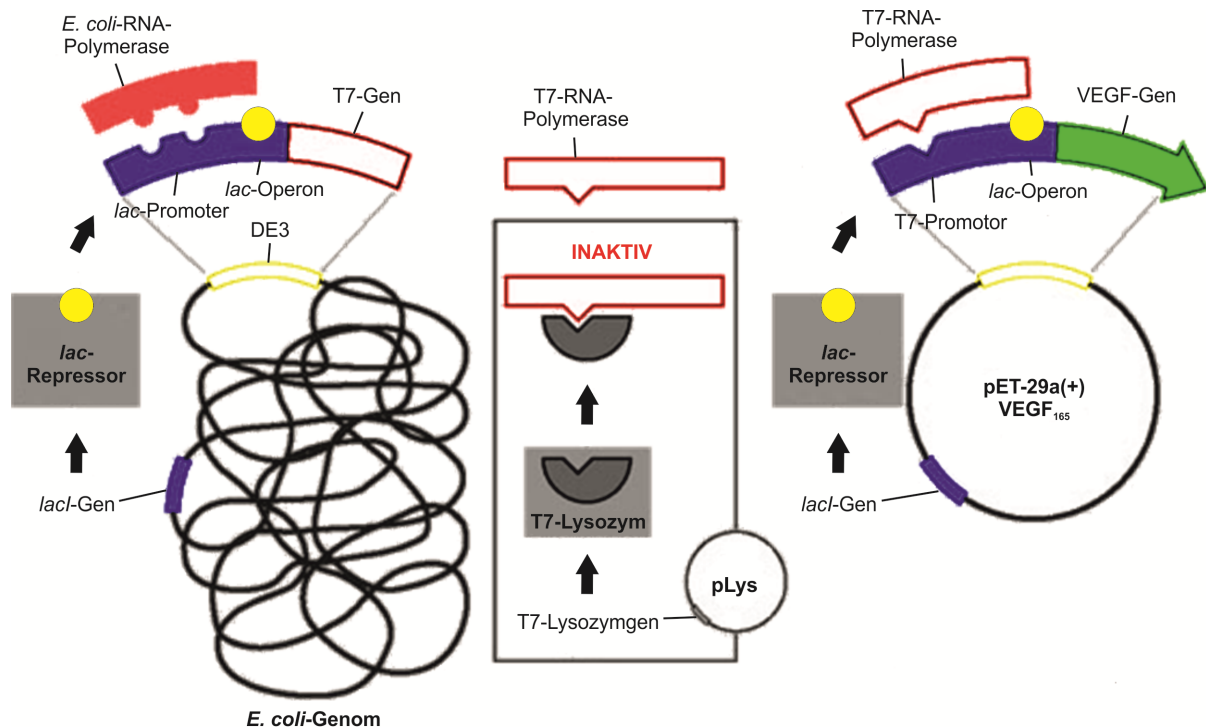


Abb. A.7: Schematische Darstellung der genetischen Kontrollmechanismen des pET-Systems (Quelle: Merck KGaA).

Zur Generierung des ersten Klonierungsinserts wurde ein Primerpaar designt, welches an die Enden der VEGF-Sequenz hybridisiert. Durch Anfügen der Restriktionsschnittstellen NdeI und PstI an die 5'-Enden der Primer wurde die Möglichkeit einer direktionalen Klonierung geschaffen. Zusätzlich wurden die Primer um sechs Basen stromaufwärts der Schnittstellen verlängert, da viele Restriktionsendonukleasen terminal lokalisierte Zielsequenzen nicht prozessieren können [235]. Nach erfolgreicher PCR und Agarosegelelektrophorese wurde die Bande des Inserts aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Um passende Ligationsstellen zu generieren, wurden Insert und Vektor mittels Restriktionsdoppelverdau mit NdeI und PstI verdaut, im Agarosegel von Bruchstücken getrennt und erneut aufgereinigt. Die Ligation von Klonierungsinsert und linearisiertem Plasmid erfolgte im molekularen Verhältnis von 5:1 unter Verwendung von T4-DNA-Ligase bei 16 °C. Die ligierten Plasmide wurden per Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* JM109-Zellen transformiert. pGEM-Vektoren vermitteln eine Resistenz gegenüber Ampicillin, weshalb die Zellen auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert wurden. Mittels Blau-Weiß-Selektion konnten positive Kolonien identifiziert, nachfolgend mittels Kolonie-PCR verifiziert, in Schüttelkolben vermehrt und durch Plasmidpräparation aufgereinigt werden.

Der Vektor pET-29a(+) enthält die gewünschte S-Tag-Sequenz und im Bereich seiner MCS zum pGEM-Vektor passende Restriktionsschnittstellen. Die VEGF-Sequenz konnte mit den Restriktionsenzymen NotI und NdeI bzw. NotI und SacI analog zur vorhergehenden Klonierung in den pET-Vektor kloniert werden, was zwei unterschiedliche Expressionsvektoren zur Konsequenz hat. Mit NotI und NdeI wurde ein Vektor generiert, welcher nur das Zielgen unter Kontrolle

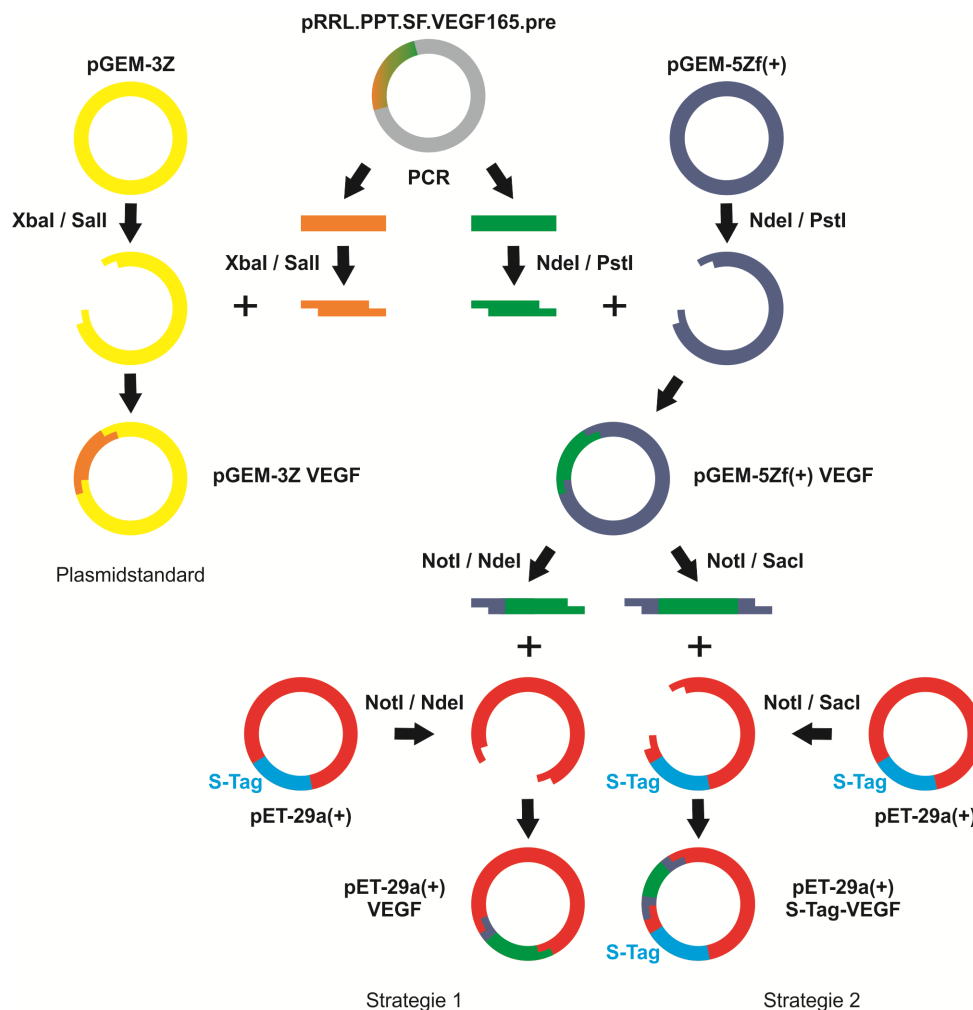


Abb. A.8: Klonierungsstrategien zur Erzeugung der Plasmide zur VEGF-Produktion. Auf der linken Seite ist zudem gezeigt, wie pGEM-3Z mit einem VEGF-Insert zu einem Plasmidstandard für die absolute Quantifizierung mittels *real-time* PCR modifiziert worden ist (A.1.4). Die rechte Seite zeigt, dass für beide Strategien zur rekombinante Proteinproduktion jeweils zwei Schritte über kohäsive Enden unternommen wurden. Die dazu notwendigen Restriktionsschnittstellen wurden über die 5'-Enden der PCR-Primer an das Insert angefügt und dieses mit pGEM-5Zf(+) ligiert. Aus diesem Vektor wurde VEGF auf zwei verschiedene Weisen herausgeschnitten, so dass in pET-29a(+) zwei verschiedene VEGF-Konstrukte realisiert werden konnten.

des T7-Promoters aufweist. Durch die Verwendung von SacI anstatt NdeI wurde aus dem pET-Vektor die Sequenz für den S-Tag nicht entfernt und VEGF derart in den Vektor ligiert, dass es sich stromaufwärts des S-Tags befindet (Abb. A.9). Startcodon, S-Tag, *cleavage site* und das VEGF-Gen mit seinem Stoppcodon bilden einen gemeinsamen offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF) und werden zu einer mRNA transkribiert, welche in das getaggte Fusionsprotein translatiert wird (Tab. A.11).

Beide pET-Varianten wurden in *E. coli* JM109 unter Beachtung ihrer Kanamycinresistenz vermehrt, der Klonierungserfolg wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Abb. A.10A zeigt den einfachen Restriktionsverdau der ursprünglichen pGEM- und pET-Vektoren

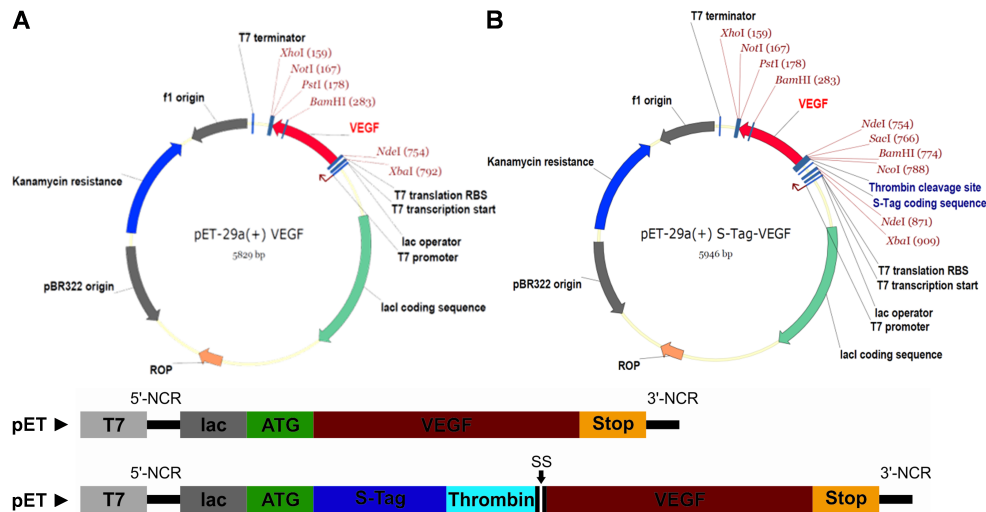


Abb. A.9: Vektorkarten der beiden VEGF-Produktionsvektoren. (A) pET-29a(+) VEGF. (B) pET-29a(+) S-Tag-VEGF. Darunter sind vergrößert dargestellt die Konstrukte, welche zur Expression von VEGF dienen (NCR = *non coding region*; SS = *cleavage site*).

sowie der VEGF-enthaltenen Varianten. Die Vektoren wurden jeweils mit NdeI linearisiert. Aus den VEGF-Vektoren wurde die VEGF-Sequenz wieder herausgeschnitten (mit NdeI und PstI bei pGEM-5Zf(+)) bzw. XbaI und NotI bei pET-29a(+)). Die „leeren“ pGEM- (3.000 bp, Spuren 1 und 3) und pET-Vektoren (5.371 bp, Spuren 4, 6, 7 und 9) weisen ihre Originalgröße auf, die VEGF-Vektoren sind um die Länge des VEGF-Gens von 576 bp größer (Spuren 2, 5 und 8). Zudem sind die wieder herausgeschnittenen VEGF-Inserts selbst zu erkennen. Der Restriktionsverdau beweist die erfolgreiche Klonierung beider Proteinvarianten. Eine Sequenzierung der Vektoren bestätigte die Ergebnisse und erlaubte es, Vektorkarten (Abb. A.9) mit Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, Carlsbad, USA) zu erstellen. Sämtliche Sequenzen sind **A.4.8** zu entnehmen.

A.2.4 Stammselektion

Bei diesen Experimenten lag das Augenmerk zum einen auf der Auswahl eines gut produzierenden Stamms, zum anderen auf der Etablierung und dem Vergleich der im theoretischen Teil vorgestellten relativen und absoluten Quantifizierungsstrategien. Aus JM109-Zellen mittels Plasmidpräparation gewonnene pET-Vektoren wurden dazu in *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS-Zellen transformiert. Rosetta-Zellen sind zur Produktion humaner Proteine besonders geeignet, da sie ein Chloramphenicolresistenz-vermittelndes Plasmid für die Produktion seltener tRNA enthalten. Eine durchgeführte *codon-usage*-Analyse hatte ergeben, dass mehrere benötigte tRNA in *E. coli* ohne Zusatzplasmid nicht ausreichend gebildet werden. Die Proteinproduktion wurde zunächst im Schüttelkolben in LB-Medium mit *E. coli* pET-29a(+) VEGF etabliert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 RE (relative Einheit) wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Zwei von einer chloramphenicol- und kanamycinhaltigen Agarplatte gepickte und mittels Kolonie-PCR verifiziert positive Klone wurden parallel kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben

Tab. A.11: Eigenschaften der VEGF-Proteine und der zugehörigen Produktionsstämme.

Zielprotein	Größe [kDa]	Plasmid	Stamm	Resistenz	Expression
VEGF	22,51	pET-29a(+)	Rosetta 2(DE3)pLysS	Chloramphenicol / Kanamycin	intrazellulär (<i>inclusion bodies</i>)
S-Tag-VEGF	26,78	pET-29a(+)	Rosetta 2(DE3)pLysS	Chloramphenicol / Kanamycin	intrazellulär (<i>inclusion bodies</i>)

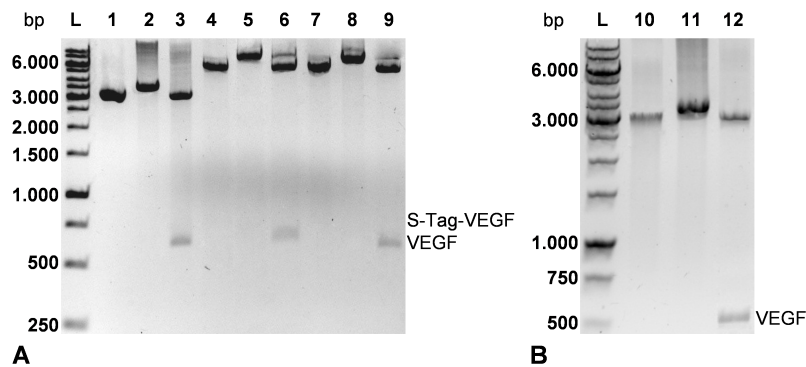


Abb. A.10: Gelelektrophoretische Analyse der generierten VEGF-Plasmide nach Linearisierung auf einem 1%igen Agarosegel. (A) In den Spuren 1–3 sind die pGEM-5Zf(+)-Vektoren aufgetragen: Unverändert, mit VEGF, VEGF herausgeschnitten. Genauso wurde mit pET-29a(+) VEGF (Spuren 4–6) und pET29a(+) S-Tag-VEGF (Spuren 7–9) verfahren. (B) Auch für den *real-time* PCR-Standard pGEM-3Z VEGF konnte der Klonierungserfolg nachgewiesen werden (Spuren 10–12).

entnommen und aus den abzentrifugierten Zellpellets die RNA isoliert. Durch Reverse Transkription wurden identische Mengen jedes RNA-Isolats in cDNA umgeschrieben (jeweils dreifach) und mittels *real-time* RT PCR analysiert.

Zum Vergleich der Transkriptionseffizienz zweier Klone wurde ein Protokoll für die quantitative PCR entwickelt. Dazu wurde ein kontaminationsfreier DNA-Arbeitsplatz gemäß der Beschreibung in A.5.2 aufgebaut. Dies dient der Absicherung aller *real-time* PCR-Experimenten, da die Methode aufgrund ihrer enormen Sensitivität einem hohen Kontaminationsrisiko unterliegt [235]. Auf das komplizierte Design von kontaminationsunanfälligen Primern an Exon/Exon-Grenzen [242] konnte somit stets verzichtet werden. Für VEGF und vier weitere *housekeeping*-Gene (HKG) wurden sequenzspezifische Primer entworfen. 20 bp kurze Primer erhöhen die Präzision und Sensitivität der *real-time* PCR [235]. Die Amplifikate sind zwischen 150 und 250 bp lang, um eine hohe PCR-Effizienz sowie eine hohe Detektionssensitivität zu erzielen. Zudem verhindern kurze Amplifikate signifikant Abbruchsreaktionen während der PCR. Das Primerdesign wurde mit dem Programm Primer3 unter Berücksichtigung dieser Vorgaben und gängiger Kriterien [368] *in silico* durchgeführt. Die Primer wurden mittels Mfold und BLAST überprüft. Die Sequenzen sind A.4.8 zu entnehmen. Ebenfalls im Anhang sind alle Angaben über die verwendeten Protokolle zur Reversen Transkription und zur *real-time* RT-PCR sowie eine Beschreibung der verwendeten Geräte und Reagenzien vorhanden (A.3.1 und A.5.2). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green I

eingesetzt, da eine sondenbasierte Detektion aufgrund hoher Anschaffungskosten nur für eine routinemäßig häufig durchzuführende Analyse sinnvoll ist. Sämtliche PCR im Zusammenhang mit VEGF wurden als Triplikate durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Abb. A.11 verdeutlicht die Ermittlung von Ct-Werten durch die Software des Thermocyclers anhand realer experimenteller Daten. Die Festlegung des Schwellenwertes für die Ct-Werte erfolgt aus einer logarithmischen Auftragung der Amplifikationskurven, aus welcher der Beginn der exponentiellen Phase bestimmt wird.

Zuerst erfolgte die Evaluierung der optimalen Annealing-Temperatur für alle Primerpaare durch Gradienten-PCR. Die Temperatur, bei welcher, ohne Bildung unspezifischer Koamplifikate, der niedrigste Ct-Wert erhalten wird, ist als optimal anzusehen. Tiefe Temperaturen und ein niedriger Ct-Wert garantieren eine möglichst hohe Sensitivität. Dies führt gegenläufig oft zu einer verstärkten Bildung unspezifischer Koamplifikate, da nicht perfekt basengepaarte Hybridisierungen wahrscheinlicher werden (Abb. A.12). Mögliche Koamplifikate, welche unter allen Umständen vermieden werden müssen, da sie die Quantität einer mRNA verfälschen, wurden jeweils durch der Amplifikationsphase nachfolgende Schmelzkurvenanalysen identifiziert. Tab. A.12 zeigt die Ergebnisse dieser Tests.

Wie unter **3.6.2** beschrieben, kommt der PCR-Effizienz bei der Datenauswertung eine große Bedeutung zu. Die Effizienz einer PCR-Reaktion kann mit unterschiedlichen Methoden erfasst werden [508, 509], wobei das Erstellen einer Standardkurve die gängigste ist [237]. Um die verschiedenen Effizienzen der verwendeten Primerpaare zu ermitteln, wurde von beiden Klonen cDNA von Zellen 1 h nach Induktion (t_1) herangezogen. Daraus wurden 1:10 Verdünnungsreihen erstellt. Die einzelnen Verdünnungen dienten als Template für die PCR. Exemplarisch sind die Amplifikationskurven für das VEGF-Primerpaar und cDNA von Klon 1 in Abb. A.13a gezeigt. Der äquidistante Abstand zwischen den einzelnen Kurven ist gut auszumachen. Die Replikate der jeweiligen Amplifikationen zeigen nur geringe Variabilität und ihre Amplifikationskurven liegen fast komplett übereinander. Aus der Auftragung der Ct-Werte gegen den Logarithmus der Konzentration kann mit Hilfe von Gl. 3.3 aus der Geradensteigung die PCR-Effizienz ermittelt werden. Der Korrelationskoeffizient ist das Maß für ihre Güte. In Abb. A.13b ist dies für die VEGF-Primer und beide Klone gezeigt. Die Korrelation ist mit über 0,99 sehr hoch und bestätigt die Qualität der Analyse. Die ermittelten Geradensteigungen und Korrelationseffizienten für jedes Primerpaar sind in Tab. A.13 aufgeführt. Die Effizienzwerte liegen bei zwei, dies entspricht einer Produktverdoppelung in jedem Zyklus und ist ein Indikator für ein gutes Primerdesign sowie optimale Amplifikationsbedingungen.

Gemäß den MIQE-Richtlinien⁸ für eine korrekte Standardisierung von qPCR-Ergebnissen, soll eine dreifache Reverse Transkription Variabilitäten dieses kritischen Schrittes ausgleichen [430].

⁸Sie enthalten die minimalen Anforderungen an das Design von *real-time* PCR-Experimenten und sind unter www.miqe.gene-quantification.info/ einzusehen.

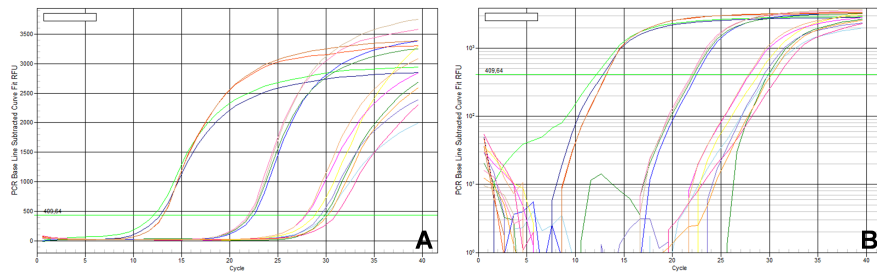


Abb. A.11: Ermittlung des Ct-Werts. Der Schwellenwert der Fluoreszenz (grüne Linie) stellt den Beginn der exponentiellen Phase einer PCR dar. Er wird aus einem Wendepunkt der Amplifikationskurve in der logarithmischen Auftragung bestimmt. (A) Die relative Fluoreszenz (RFU) ist aufgetragen gegen die Zyklenzahl und (B) mit logarithmischer Skalierung der RFU. Der Ct-Wert einer Amplifikationsreaktion ist der Schnittpunkt von Amplifikationskurve und Schwellenwert. Die Graphen wurden direkt der grafischen Oberfläche der PCR-Software entnommen.

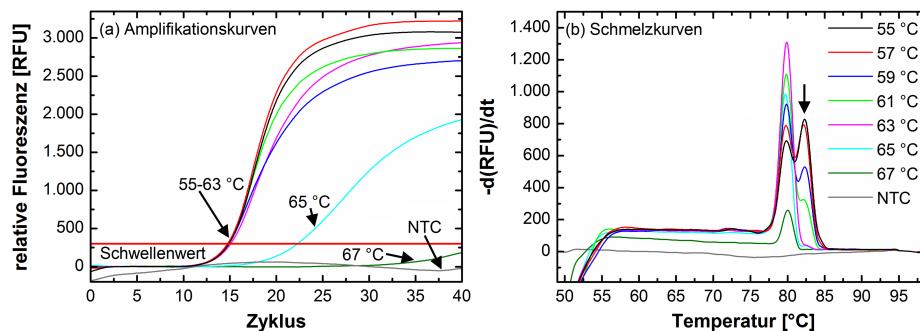


Abb. A.12: Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur des VEGF-Primerpaars. Aus den Amplifikationskurven (a) wird ersichtlich, dass Temperaturen zwischen 55 und 63 °C geeignet sind. Die Schultern in den Schmelzkurven (b) identifizieren ein unerwünschtes Koamplifikat (durch einen Pfeil gekennzeichnet), erst ab einer Temperatur von 63 °C (purpurne Kurve) wird nur noch ein einzelner Peak erhalten, dies ist in diesem Fall die optimale Temperatur. Ohne Koamplifikat würde der niedrigste Ct-Wert zwischen 55 und 63 °C die Annealing-Temperatur definieren.

Tab. A.12: Ausgewählte Genabschnitte für VEGF und die vier HKG. Die aufgeführten optimalen Annealing-Temperaturen wurden jeweils experimentell bestimmt.

Target	Amplifikatlänge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
<i>vegf</i>	226	63
<i>gapdh</i> ^a	185	63
<i>gst</i> ^b	112	63
<i>lacA</i> ^c	124	62
<i>rpoA</i> ^d	473	60

^a Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

^b Glutathion-S-Transferase

^c β -Galactosid-Transacetylase

^d RNA-Polymerase α -Untereinheit

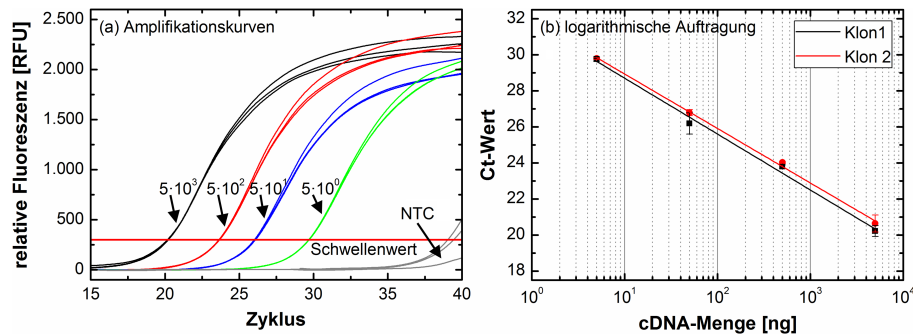


Abb. A.13: Bestimmung der Effizienzen mit Hilfe von Verdünnungsreihen. Amplifikationskurven für eine 1:10 Verdünnungsreihe der t_1 -Probe von Klon 1 (a), gut zu erkennen sind die fast gleichen Abstände der einzelnen Verdünnungsstufen (als Triplikate). Die logarithmische Auftragung der ermittelten Ct-Werte gegen die Menge an cDNA im PCR-Ansatz für beide Klone (b), dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ($n = 3$). Aus der Steigung m lässt sich direkt die PCR-Effizienz E berechnen.

Um den Einfluss der RNA-Isolierung zu untersuchen, wurden zunächst von der Probe t_1 von Klon 1 drei unabhängige RNA-Isolierungen, davon jeweils drei cDNA-Synthesen und eine dreifache qPCR-Analyse der neun Proben durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Vergleich der gemittelten Ct-Werte (Variationskoeffizient (VarK) $< 1,08\%$) zeigte, dass für kein Primerpaar zwischen den drei RNA-Isolierungen signifikante Unterschiede bestehen ($q < 1,7$, $p > 0,05$). Diese hohe Reproduzierbarkeit verdeutlicht die Qualität sowohl der Nukleinsäureisolierung als auch der PCR-Analytik. Für alle weiteren Proben wurde eine biologische Probe nur noch durch eine RNA-Isolation repräsentiert. Da genomische DNA aufgrund ihrer molekularen Struktur weitaus stabiler ist als RNA, folgt hieraus als Konsequenz für spätere Arbeiten mit pflanzlicher DNA, dass von gleichbleibender DNA-Qualität zwischen einzelnen Isolaten ausgegangen werden kann. Die erwähnte statistische Datenauswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA, siehe auch Kapitel 4.1).

Nach der erfolgreichen Bestimmung der optimalen Annealing-Temperaturen, der Effizienzen und dem Ausschluss von RNA-bedingten Einflüssen, erfolgte die Analyse sämtlicher cDNA-Proben (Abb. A.14a zeigt exemplarisch die Amplifikationskurven für das VEGF-Primerpaar). Neben den Proben aus den Schüttelkolbenkultivierungen beider Klone zum Zeitpunkt der Induktion (t_0) und verschiedener Stunden später (t_1 , t_2 , t_3 , t_4 , t_6 , t_8 und t_{20}), stammte eine weitere Probe aus einer Kultivierung eines unveränderten Rosetta 2-Stamms. Pro Kultivierungszeitpunkt wurden drei cDNA-Ansätze einer RNA-Isolierung jeweils als Triplikat mittels *real-time* PCR mit allen Primerpaaren analysiert und Mittelwerte gebildet. Der Transkriptionsstatus von VEGF wurde sowohl mit Hilfe mehrerer HKG relativ, als auch mittels Kalibrationsgerade des dafür entsprechend Abb. A.8 klonierten Plasmids pGEM-3Z VEGF absolut quantifiziert. Eine weitere Absicherung der Analysequalität wurde durch die Verwendung von *no-RT controls*⁹ aller RNA-Proben und

⁹Eine RNA-Probe durchläuft sämtliche Analyseschritte, bei der Reversen Transkription wird auf die Zugabe von Reverser Transkriptase verzichtet, wodurch der Einfluss von chromosomaler und Resten nicht degraderter DNA auf die qPCR messbar wird.

Tab. A.13: Zusammengefasst sind die ermittelten PCR-Effizienzen für alle Targets. Die Daten stammen allesamt aus Versuchen mit t_1 -Probe, zudem wurde auch die Effizienz der PCR mit dem Plasmidstandard untersucht (Abb. A.8). Ebenfalls sind als Qualitätsangabe die Korrelationskoeffizienten angegeben.

Target	Effizienz			Korrelationskoeffizient		
	Klon 1	Klon 2	pGEM-3Z VEGF ^a	Klon 1	Klon 2	pGEM-3Z VEGF
<i>vegf</i>	2,1	2,14	2,16	0,9942	0,9984	0,971
<i>gapdh</i>	2,05	2,1		0,9941	0,9998	
<i>gst</i>	2,1	2,03		0,9966	0,9996	
<i>lacA</i>	2,02	2,08		0,9999	0,9997	
<i>rpoA</i>	1,75	1,79		0,9856	0,9823	

^a Wurde mit dem Zweck Standard-DNA kloniert. Die Effizienz wurde mit drei Verdünnungsreihen zwischen 0,01 und 100 ng Plasmid-DNA ($2,8 \cdot 10^6$ – $2,8 \cdot 10^{10}$ Kopien) bestimmt.

*no template controls*¹⁰ (NTC) gewährleistet. Sowohl *no-RT controls* als auch NTC hatten stets Ct-Werte von 38–46, was Template-Kopien im maximal einstelligen Bereich entspricht. Dies belegt zwar trotz DNAase I-Verdau und RNA-Degradierung nach erfolgter cDNA-Synthese die Anwesenheit von Kontaminationen. Im Vergleich mit echten Proben sind die Mengen aber derart gering, dass sie unterhalb von Variabilitäten liegen, welche sich durch Pipettieren ergeben [235] und damit die Ergebnisse in keinster Weise verfälschen.

Relative Quantifizierung: Für qPCR-basierte Genexpressionsstudien ist die relative Quantifizierung über HKG als Normalisierungsstandards besonders geeignet und weit verbreitet. HKG zeichnen sich durch ein allgemein hohes und stabiles Transkriptionsniveau aus, welches von Umweltbedingungen kaum beeinflusst wird [510]. Als Vertreter der HKG wurden für diese Demonstrationsstudie *gapdh* [511], *gst* [512], *lacA* [513] und *rpoA* [514] ausgewählt. Die Variationskoeffizienten der Ct-Werte, bestimmt aus allen gemessenen Proben, sind bei allen HKG gering ($\text{VarK} < 3,71\%$), was sie zu guten Referenzgenen macht ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode oder effizienzkorrigiertes relatives Quantifizierungsmodell). Die Verwendung mehrerer HKG verbessert die Normalisierung, indem der Einfluss der HKG unter Berücksichtigung ihrer Stabilität unterschiedlich stark gewichtet wird. Der frei verfügbare Algorithmus geNorm¹¹ wurde verwendet, um die Stabilität der Referenzgene über die Kultivierungsdauer zu bewerten [247]. Dieses Programm geNorm erfordert die Transformation der Ct-Werte (Mittelwerte von Triplikaten) in relative Quantitäten durch die komparative Ct-Methode ($\Delta\Delta\text{Ct}$) mit Gl. 3.10. Die resultierende Datenmatrix aus noch nicht normalisierten Referenzgenquantitätswerten aller Probenzeitpunkte wurde dann in geNorm geladen. Das Programm geNorm berechnet durchschnittliche Variationen der relativen Quantitäten paarweise [515] und gibt M-Werte als Maß für die Stabilität der Genexpression jedes Referenzgens aus. Ein M-Wert von unter 1,5 identifiziert ein stabiles Gene [516]. Anschließend

¹⁰Anstatt einer cDNA-Probe durchläuft DNA-freies Wasser sämtliche PCR-Schritte, wodurch der Einfluss von „Fremd“-DNA-Verunreinigungen detektiert wird.

¹¹<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>

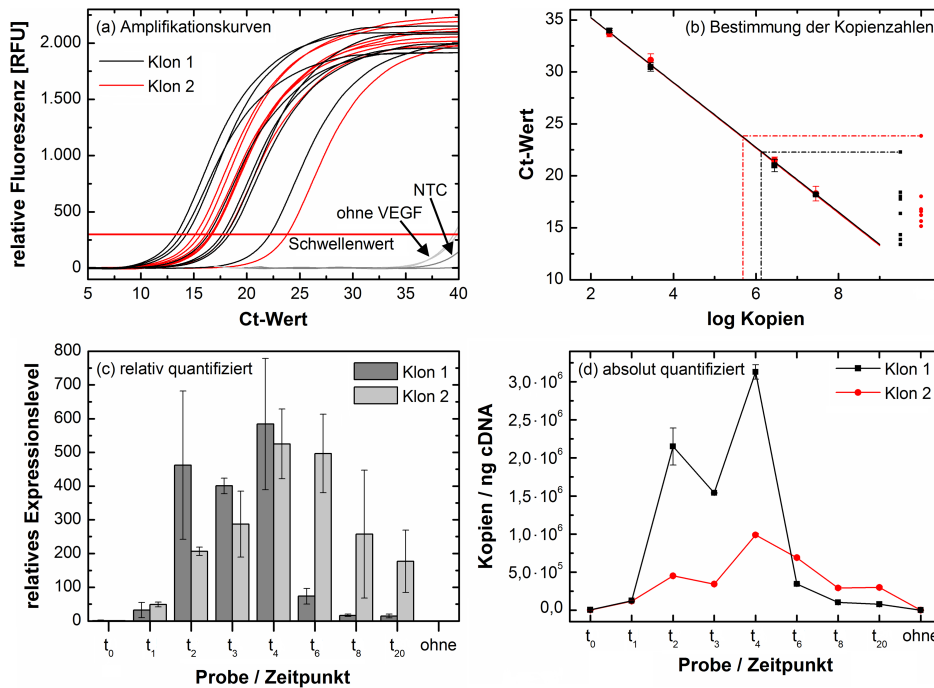


Abb. A.14: Real-time PCR-Analysen der Proben aus den Kultivierungen. Die Darstellung der gemittelten Amplifikationskurven ($n = 3$) der PCR mit den VEGF-Primern für alle Zeitpunkte, Proben ohne VEGF-Gen und Negativkontrollen (a) zeigt, dass die entsprechende cDNA erfolgreich amplifiziert werden konnte. Die Proben ohne VEGF, *no-RT controls* (Daten nicht gezeigt) und NTC sind erwartungsgemäß negativ. Durch Messung von jeweils vier Verdünnungstufen pGEM-3Z VEGF (einmal zusammen mit den Proben von Klon 1 (schwarz) und einmal gemeinsam mit Klon 2 (rot) analysiert) konnten durch lineare Regression Kalibrationsgeraden (b) erstellt werden. Die Ct-Werte der Amplifikationskurven der VEGF-Primer sind auf der rechten Seite aufgetragen (Klon 1 in schwarz und Klon 2 in rot), mit Hilfe der Kalibration ist ein direktes Ablesen der korrespondierenden Kopienzahlen möglich. Der Vergleich der Expressionslevel von VEGF über eine Kultivierungsdauer von 20 h beider Klone ist als relative Expression (c) jeweils bezogen auf Probe t_1 dargestellt. Die Expressionslevel sind ebenfalls als absolute Kopienzahlen (d) der mRNA von VEGF pro Nanogramm eingesetzter cDNA aufgetragen. Zudem ist die VEGF-Expression der *E. coli*-Kultivierung ohne VEGF-Vektor angegeben. In den *no-RT controls* und NTC konnten maximal 9 Kopien/ng nachgewiesen werden. Dies liegt am absoluten Rand der Nachweisgrenze einer qPCR und hat keinen Einfluss auf die Quantifizierung.

werden Gene mit den höchsten M-Werten schrittweise aus der Matrix ausgeschlossen und die M-Werte der verbleibenden Gene neu berechnet. Dies wird wiederholt, bis keine kleineren M-Werte mehr erhalten werden. In vorliegendem Fall liegen die M-Werte aller vier Referenzgene unter dem *cut-off* von 1,5. Der iterative Ausschlussprozess von geNorm errechnete *gapdh* und *gst* als die optimale Kombination an Referenzgenen und gab entsprechende Normalisierungsfaktoren für jeden Kultivierungszeitpunkt aus. Die Normalisierungsfaktoren sind das geometrische Mittel der Normalisierungen mit einem der beiden Gene. Das Dividieren der Werte für die relativen Quantitäten von cDNA von VEGF durch die korrespondierenden Normalisierungsfaktoren ergibt die normalisierten Expressionslevel. Diese wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf den Induktionszeitpunkt t_0 bezogen (Teilung durch den t_0 -Wert).

Absolute Quantifizierung: Um auch eine generell anwendbare Normalisierungsmethode zu demonstrieren, welche keine nicht regulierten Referenzsequenzen benötigt, wurden die erhaltenen qPCR-Daten zusätzlich absolut quantifiziert. Die Verwendung von Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA als Standard stellt eine Möglichkeit dafür dar. pGEM-3Z VEGF wurde nach der Plasmidpräparation mittels Elektrophorese von restlichen Verunreinigungen befreit. Nach der spektroskopischen Bestimmung der Massenkonzentration c_m , konnte mit folgender Gleichung und bekannter Anzahl an Basenpaaren n_{bp} des Plasmids die Kopienzahl c_{Kopie} errechnet werden:

$$c_{Kopie} \text{ [Kopien/L}^3] = \frac{c_m \text{ [M/L}^3]}{m_{Kopie} \text{ [M/mol]}} \quad (\text{A.4})$$

Die Masse einer Kopie m_{Kopie} berechnet sich mit Hilfe des Quotienten der molaren Masse eines Basenpaars \bar{M}_{bp} ($\sim 660 \text{ g/mol}$) und der Avogadro-Zahl N_A ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$):

$$m_{Kopie} \text{ [M/Kopien]} = n_{bp} \cdot \frac{\bar{M}_{bp} \text{ [M/mol]}}{N_A \text{ [Kopien/mol]}} \quad (\text{A.5})$$

Dekadische Verdünnungen mit bekannter Kopienzahl dienten, vergleichbar mit der Effizienzbestimmung (vgl. Abb. A.13), als Kalibration und wurden zusammen mit cDNA-Proben aus der Kultivierung in einem PCR-Lauf zusammen gemessen. Aus dem Vergleich der Ct-Werte der Proben mit der Kalibrationsgeraden konnte direkt ohne weitere Berechnung die jeweilige Kopienzahl der mRNA von VEGF in einer Probe bestimmt werden (Abb. A.14b). Der Vergleich ist legitim, da die Effizienzen von PCR mit Plasmid-DNA ($E = 2,16$) und cDNA (Klon 1: $E = 2,10$; Klon 2: $E = 2,14$) quasi identisch sind.

Bewertung der Quantifizierungen: Abb. A.14c und A.14d (t_0) verdeutlichen zunächst, wie effektiv die Genrepression im pET-System funktioniert. Zum Zeitpunkt der Induktion sind durchschnittlich nur 3.032 mRNA-Kopien vom VEGF-Gen in 1 ng cDNA enthalten. Grob geschätzt sind dies etwa drei Kopien pro Zelle [517]. Rund 1 h nach der Induktion ist die Expression etwa 25-fach erhöht, der Zellmetabolismus stellt sich langsam auf Proteinproduktion um. Zwischen 2 und 4 h wird das VEGF-Gen maximal exprimiert, mit maximal 2.800 Kopien pro Zelle ist dies eine Erhöhung um knapp das 1.000-fache. Sowohl relative als auch absolute Quantifizierung decken sich hier mit verschiedenen ähnlichen Studien [518–520]. Danach schwächt sich die Expression wieder ab, nach 20 h befinden sich die Zellen wahrscheinlich aufgrund von Limitierung an Substrat bereits in der Absterbephase. Die beiden Klone unterschieden sich vor allem nach längerer Kultivierung in ihrem Expressionsverhalten, während Klon 1 sehr schnell ein hohes Level erreicht, welches sich nach 4 h wieder deutlich senkt, zeigt Klon 2 bei insgesamt weniger starker Expression eine deutlich länger anhaltende mRNA-Produktion. Die Ergebnisse der beiden Quantifizierungsstrategien sind absolut konsistent, außer, dass der Unterschied zwischen den beiden Klonen bei den absoluten Werten deutlich ausgeprägter ist. Dies liegt an der völlig unterschiedlichen zugrundeliegenden

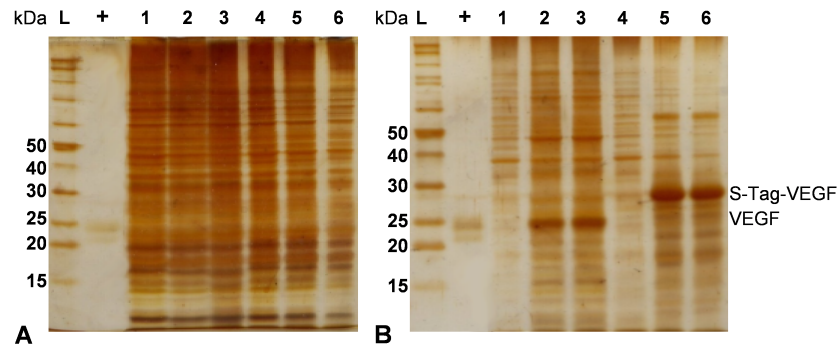


Abb. A.15: Analyse der löslichen und unlöslichen Fraktionen von *E. coli* pET-29a(+) VEGF und S-Tag-VEGF. Aufgetragen wurden stets Proben gleicher Proteinkonzentration. (A) Lösliche Fraktionen von unmodifiziertem VEGF 0 h (Spur 1), 4 h (Spur 2) und 6 h (Spur 3) nach Induktion sowie die gleichen Proben von S-Tag-VEGF (Spuren 4–6). (B) Diese Gel enthält in gleicher Probenreihenfolge die unlöslichen Fraktionen. Als Größenstandard (Spur L) diente ein 200 kDa Ladder und als Positivkontrolle (+) wurde kommerziell erhältliches in *E. coli* produziertes VEGF auf ein 16%iges SDS-Polyacrylamidgel (Silberfärbung) mit analysiert.

Mathematik und ist der Schwachpunkt der absoluten Quantifizierung. Schon kleine Unterschiede zwischen Ct-Werten bewirken drastisch verschiedene Kopienzahlen [406]. Gerade aus diesem Grund ist besonders im Bereich der Genexpression die relative Quantifizierung einer absoluten vorzuziehen. Zudem ist für die relative Quantifizierung keine aufwendige Klonierung von Standard-DNA notwendig. Da für die Bereitstellung von VEGF eine schnelle und starke Produktion im Vordergrund stand, wurden weitere Kultiverungen aus Kryokulturen von Klon 1 durchgeführt, da dieser insgesamt eine frühere und stärkere Expression aufwies. Zusammenfassend gesehen, generiert die quantitative *real-time* PCR sehr genaue und reproduzierbare Daten und eignet sich hervorragend zur Stammselektion. Es konnte gezeigt werden, dass unter der Voraussetzung einer genauen experimentellen Arbeitsweise die Nukleinsäureisolierung keine Quelle für Abweichungen darstellt. Daher war zu erwarten, dass die qPCR auch zum Nachweis von pflanzlicher DNA, der den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellt, gut geeignet ist.

A.2.5 Proteinproduktion

Zusammen mit Miriam Lübbecke wurde die Produktion beider VEGF-Varianten in Rosetta 2-Zellen im Schüttelkolben aufgebaut [505]. Die starke Überexpression von VEGF führte zur Ausformung von unlöslichen Proteinaggregaten, den *inclusion bodies*. Nach Ultraschallaufschluss und SDS-PAGE mit Silberfärbung konnte in der löslichen Fraktion kein VEGF nachgewiesen werden. In der unlöslichen Fraktion dagegen sind 4 h nach Induktion deutliche Banden mit der Größe von VEGF (23 kDa) bzw. S-Tag-VEGF (27 kDa) zu erkennen (Abb. A.15). Die Menge an rekombinatem Protein nimmt im weiteren Verlauf der Kultivierung kaum mehr zu. Nach den Daten der *real-time* PCR entspricht dies den Erwartungen vollkommen. *Genomics* und *proteomics* liefern hier gut vergleichbare Ergebnisse.

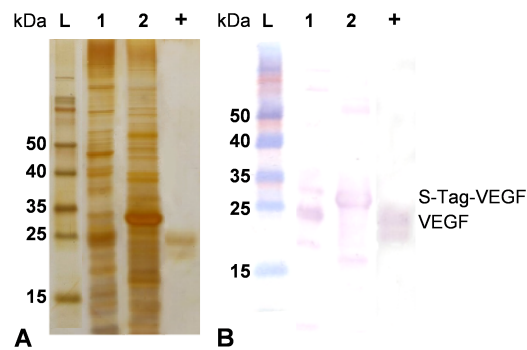


Abb. A.16: Identifizierung von VEGF mittels Western Blotting. (A) SDS-PAGE zum Nachweis von VEGF in den unlöslichen Fraktionen des Zelllysats. (B) Western Blot mit folgender Probenabfolge: Größenstandard (Spur L), VEGF-Produktion nach 4 h (Spur 1), S-Tag-VEGF nach 4 h (Spur 2) und kommerzielles VEGF (+) (16%iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Eine eindeutige Identifikation erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines VEGF-spezifischen Antikörpers. Die Visualisierung wurde auf Polyvinylidenfluorid mit einem *anti-rabbit* IgG-AP-Konjugat (Alkalische Phosphatase) durchgeführt. In beiden unlöslichen Fraktionen (Abb. A.16) konnte VEGF bzw. S-Tag-VEGF spezifisch nachgewiesen werden. Nach dem Nachweis der VEGF-Produktion, wurde ein *scale-up* der Proteinproduktion in einem 2 L-Bioreaktor mit unmodifiziertem VEGF realisiert. Medienzusammensetzung, Induktorkonzentration und weitere Kultivierungsparameter der Schüttelkolbenkultivierungen wurden übernommen, bzw. minimal angepasst (A.3.4). Abb. A.17 zeigt die *offline*- und *online*-Analytik, welche die Ergebnisse der *real-time* PCR bestätigt. Erst mit einer Verzögerung von ca. 1 h beginnt die VEGF-Produktion, was sich durch die resultierende Verlangsamung des Zellwachstums anhand der OD₆₀₀-Werte eindeutig erkennen lässt (Abb. A.17A). Die Proteinproduktion ist sowohl vom Ablauf als auch von der Stärke vergleichbar mit der in Schüttelkolben (Abb. A.17B). So konnte gezeigt werden, dass VEGF erfolgreich innerhalb von 4 h in einem für weitere Experimente ausreichenden Maßstab herzustellen ist.

A.2.6 Proteinaufreinigung

Inclusion bodies treten häufig bei der Expression humaner Gene in *E. coli* auf [521]. Der Nachteil ist, dass die Proteine nicht mehr korrekt gefaltet vorliegen und erst mit einem aufwändigen Protokoll wieder gelöst und gefaltet werden müssen. Auf der anderen Seite birgt dies die Vorteile, dass die Zielproteine weniger anfällig gegenüber Proteasen sind und bei ihrer Aufreinigung nicht mehr von der großen Menge der cytoplasmatisch gelösten Proteine getrennt werden müssen. Nach Abtrennung der löslichen Proteinfraction liegen die *inclusion bodies* schon in relativ reiner Form vor [522, 523]. Zur Aufreinigung von VEGF wurden drei verschiedenen Strategien verfolgt, die im Folgenden kurz beschrieben werden. Abb. A.18 zeigt die Chromatogramme und zwecks einer erleichterten Übersicht die SDS-PAGE ausschnittsweise. Die vollständigen Gele und genauere Erläuterungen bezüglich der angewendeten Proteinaufreinigungen und Abbildungen weiterer Proben sind in der Dissertation von Miriam Lübbecke einzusehen [505].

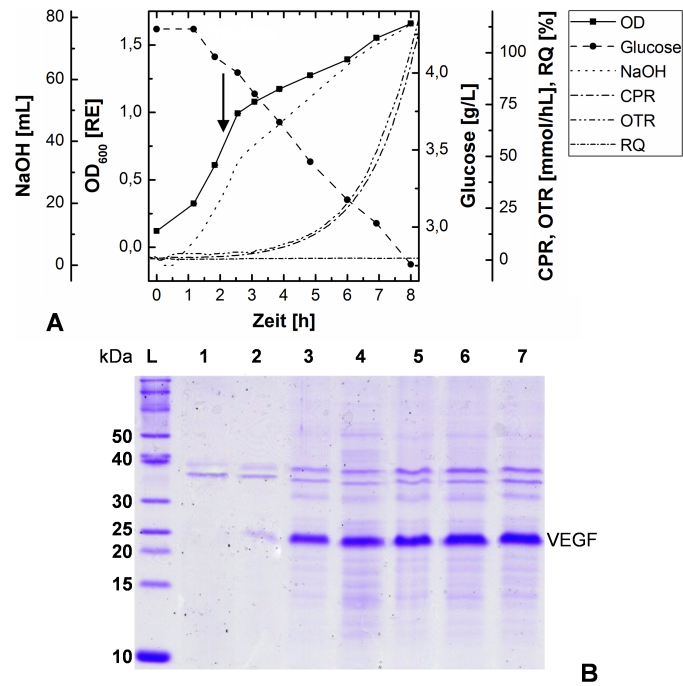


Abb. A.17: Reaktorkultivierung von *E. coli* pET-29a(+) VEGF in LB-Medium. (A) Typischer Wachstumsverlauf von *E. coli* in einem Fermenter. In der Wachstumskurve ist innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase ein Knick zu erkennen, welcher auf die Anpassung der Zellen an die Proteinproduktion zurückzuführen ist. Glucose wird kontinuierlich verbraucht und die Basenzugabe (zum Ausgleich der Acetat- und Lactatproduktion) spiegelt das Zellwachstum und die Proteinproduktion wider. Die Verläufe von Kohlendioxidproduktionsrate (CPR), Sauerstofftransferate (OTR) und respiratorischem Quotient (RQ) lassen insgesamt auf gute Kultivierungsbedingungen schließen. (B) SDS-PAGE-Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Nach 0 bzw. 2 h (Spuren 1, 2) wurde noch nicht induziert, VEGF-Produktion ist, wenn überhaupt nur marginal zu beobachten. Zum Zeitpunkt 3 h (etwa 45 min nach Induktion) ist VEGF produziert worden. Im weiteren Verlauf (4–8 h, Spuren 4–7) nimmt die VEGF Produktion nur noch wenig zu, was sich mit Ergebnissen der Schüttelkolbenversuche deckt (16%iges SDS-Gel, Coomassie-Brillant-Blaufärbung).

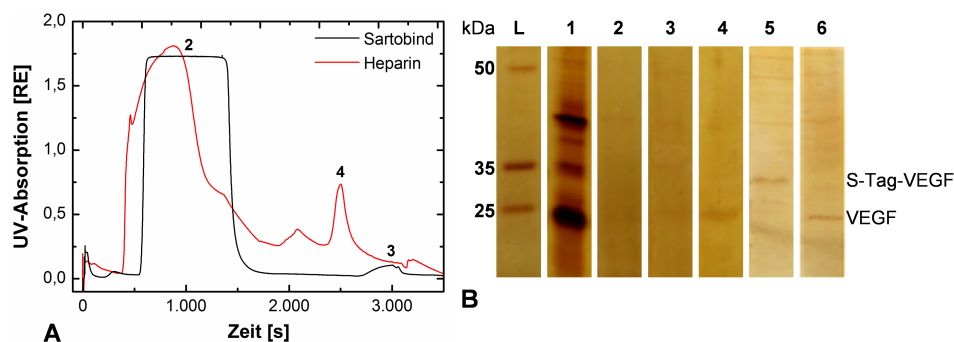


Abb. A.18: Aufreinigung des VEGF über drei verschiedene Ansätze. (A) Chromatogramme einer Probe aus einer Schüttelkolbenkultivierung, welche einmal mittels Sartobind-Membran (IEX) und einmal durch Heparin-Affinitätssäule (AC) aufgereinigt wurden. Dargestellt ist die UV-Absorption gegen die Zeit. (B) Zusammenstellung der SDS-PAGE-Analysen ausgewählter Fraktionen in folgender Reihenfolge: Größenstandard (Spur L), Zellysate für IEX und AC (Spur 1), Durchlauf des IEX-Versuchs (Spur 2) und Elutionfraktion der IEX bei 280 mM NaCl (Spur 3), VEGF-Elution aus dem AC-Versuch bei 900 mM NaCl (Spur 4), Waschfraktion der S-Tag-Aufreinigung (Spur 4) und das dazugehörige eluierte VEGF (Spur 5) (16%iges SDS-Gel, Silberfärbung).

Kationenaustauschchromatographie: Bei pH 5,5 hat VEGF eine positive Gesamtladung, da sein isoelektrischer Punkt (pI) bei 6,9 liegt. Dies ermöglicht die Bindung an das Säulenmaterial einer Kationenaustauschchromatographie (IEX). Entsprechend dem Protokoll von Siemeister *et al.* (1996) [522] wurden die *inculsion bodies* isoliert. Dithiothreitol (DTT) soll dabei die Solubilisierung, Harnstoff die Rückfaltung begünstigen [522]. Die Aufreinigung von VEGF erfolgte über einen Membranadsorber Sartobind S75 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mittels FPLC (Bio-Rad, Hercules, USA). Eluiert wurde mit einem ansteigenden Ionenstärkegradienten bis 300 mM Natriumchlorid (NaCl). Durch die Abtrennung der löslichen Proteine ist VEGF schon in der Auftragsfraktion relativ rein (Spur 1), es bindet anschließend an das Austauschmaterial und befindet sich nicht im Durchlauf (Spur 2). Reines VEGF eluiert ab einer Natriumkonzentration von 280 mM, allerdings nur mit schwacher Ausbeute (Spur 3). Entweder wird der Großteil des VEGF langsam und stark verdünnt abgewaschen oder ist nach der FPLC noch gebunden.

Heparin-Affinitätschromatographie: VEGF besitzt eine Heparin-Bindungsstelle [524, 525] und konnte daher mit einer HiTrap Heparin HP-Chromatographiesäule (GE Healthcare, Chalfont, UK) aufgereinigt werden. Nach Heiring *et al.* (2001) [523] wurden die *inclusion bodies* isoliert und in Harnstoff aufgenommen, um das Faltungsgleichgewicht auf die Seite nativer Faltung zu verschieben [526]. Die Aufreinigung erfolgte durch FPLC, eluiert wurde mit einem NaCl-Gradienten bis 2 M. Im ersten Elutionspeak (400 mM NaCl, rote Kurve) befindet sich neben VEGF noch Lysozym, welches zum Zellaufschluss verwendet wurde. In der zweiten Elutionsfraktion bei 900 mM NaCl (Spur 4) liegt VEGF in reiner Form vor. Die Bindung an die Heparin-Säule war unvollständig (Ergebnisse nicht gezeigt), mögliche Ursache ist eine unzureichende Proteinfaltung.

Aufreinigung mit Hilfe des S-Tags: Merck vermarktet passend zu seinem Vektorsystem das S-Tag Thrombin Purification Kit. In 2 M Harnstoff wurde das S-getaggte VEGF über den Tag an S-Protein gebunden, welches kovalent auf Agarose-*beads* immobilisiert ist. Nach Abwaschen sämtlicher Verunreinigungen wurde VEGF durch Zugabe von Thrombin an der *cleavage site* vom S-Tag und den *beads* gespalten. Nach Abtrennung der *beads* liegt reines Protein vor. In der Waschfraktion (Spur 5) ist ungebundenes S-Tag-VEGF zu erkennen. Die Elutionsfraktion (Spur 6) zeigt relativ reines ungetaggtetes VEGF in schwacher Konzentration. Wahrscheinlich erfolgte das Abspalten von den *beads* nur unvollständig.

Bewertung des *downstreamings*: Mit allen drei Strategien ist es prinzipiell möglich reines VEGF zu erhalten. Dennoch funktionierte keine Methode optimal, das beste Ergebnis liefert noch Heparin-Affinitätschromatographie (AC). Problem ist in allen Fällen die Elution. Durch eine umfangreiche Optimierung der Faltungs- und Pufferbedingungen könnte bei den FPLC-Methoden die Ausbeute deutlich gesteigert werden. Zudem ist eine IEX mit anschließender Heparin-AC denkbar. Das S-Tag-spezifische Kit ist hingegen sehr teuer, was eine weitere Optimierung

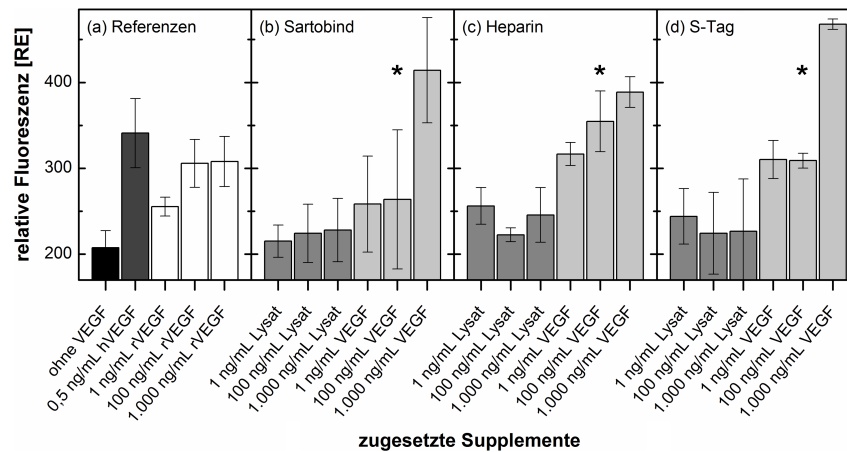


Abb. A.19: Ergebnisse der CellTiter-Blue-Tests. Diese wurden durchgeführt mit kommerziellen HUVEC kultiviert ohne VEGF (schwarz), mit humanem VEGF (dunkelgrau) oder mit kommerziellem rekombinanten VEGF in verschiedenen Konzentrationen (weiß) als Vergleichsreferenzen (a). Ebenso wurde mit Zellysat (grau) und aufgereinigtem VEGF (hellgrau) aus den Versuchen mit Kationenaustauschern (b), den Proben der Affinitätschromatographie (c) sowie den S-Tag-Aufreinigung (d) verfahren. Das Ausmessen der Fluoreszenz erfolgte nach 4 h. Angegeben sind Mittelwerte ($n = 6$) mit Standardabweichungen.

ökonomisch unsinnig macht. In einem anderen Ansatz könnten die Kultivierungsbedingungen derart verändert werden, dass keine *inculsion bodies* mehr gebildet werden, um die problematische Rückfaltung zu umgehen.

A.2.7 Bioaktivitätstest

Da VEGF₁₆₅ proliferationsfördernd auf Endothelzellen wirkt [527, 528], kann durch eine Kultivierung von adhärennten HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) die Aktivität des aufgereinigten VEGF getestet werden. Die Aktivitätstestung diente dazu, den Sinn von *transcriptomics*, *proteomics* und *downstream processing* zu überprüfen, denn nur aktives VEGF ist für eine weitere Verwendung interessant. Ein entsprechendes Testverfahren wurde von Sophia Bonk im Rahmen ihrer Masterarbeit¹² etabliert. Ebenso konnte Dr. Claas Haake in seiner Dissertation mit dieser Methode die Aktivität von in CHO-Zellen hergestelltem VEGF testen [506].

Zur Durchführung des Tests wurden kommerziell erhältliche HUVEC mit kommerziellem humanen VEGF, kommerziellem in *E. coli* rekombinant hergestelltem VEGF, mit verschiedenen Proben der eigenen Aufreinigungsversuche sowie ohne VEGF kultiviert. Als Test auf Wachstum und Proliferation wurde der CellTiter-Blue-Assay eingesetzt. Ein Ansatz ohne Zellen diente als Nullwert (*blank*). Von allen Proben wurde jeweils eine sechsfache Bestimmung durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in 96-Lochplatten, diesen wurde VEGF bzw. Zellysat zu einer Proteinendkonzentration von 1, 100 und 1.000 ng/mL zugesetzt. Die Aussaatdichte der HUVEC lag bei ca. 1.500 Zellen/cm². Messungen des CellTiter-Blue-Assays erfolgten zehn Tage nach Ansetzen der Kulturen.

¹²Masterarbeit von Sophia Bonk, Darstellung und Testung rekombinanter humaner Zytokine (2011), Naturwissenschaftliche Fakultät, Leibniz Universität Hannover, Seiten 29–36, 58–62

Abb. A.19 verdeutlicht klar die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben. Humanes VEGF (0,5 ng/mL) wirkt sich schon in geringer Konzentration positiv auf das Zellwachstum aus. Sowohl das gekaufte VEGF (Abb. A.19a) als auch die drei selbst aufgereinigten Varianten (Abb. A.19b–d) führen zu signifikant höherer Fluoreszenz im Vergleich zur Probe ohne VEGF ($q > 4,6$, $p < 0,01$). In den Ansätzen mit hohen VEGF-Konzentrationen (1 µg/mL) ist eine messbar höhere metabolische Aktivität der Endothelzellen nachzuweisen, als in den Ansätzen mit geringer VEGF-Konzentration ($q > 3,2$, $p < 0,05$). Die Zellysate (grau) mit ihrem verhältnismäßig geringen Anteil an VEGF zeigen nur ein leicht erhöhtes Zellwachstum, welches im Vergleich zur 1 µg/mL Probe des reinen VEGF statistisch signifikant kleiner ist ($q > 3,6$, $p < 0,05$).

Insgesamt hat das selbst hergestellte VEGF eine ähnliche biologische Aktivität im Vergleich mit kommerziellem VEGF. In hoher Konzentration liegt die Aktivität sogar über der des gekauften VEGF. Humanes VEGF hat gleichwohl die größte Aktivität. Das hergestellte VEGF eignete sich aber sehr gut für die beabsichtigte Verwendung in weiteren Experimenten [505].

A.2.8 Zusammenfassung: Methodenetablierung

Es wurde eine Produktionsmöglichkeit für VEGF etabliert, mit welcher letztendlich aktives Protein erhalten wird. Dabei sollte aber die Aufreinigung weiter optimiert werden. Es konnten Protokolle für PCR- und Klonierungsmethoden etabliert und getestet werden. Darüber hinaus wurde die *real-time* PCR samt der notwendigen Optimierungsschritte sowie umfangreicher Normalisierung und Auswertung mit verschiedenen Strategien erfolgreich eingeführt. Im Folgenden wird geschildert, wie die hier etablierten Methoden zum Aufbau der DNA-basierten Analysen von Arzneipflanzen verwendet und hierfür weiter optimiert wurden.

A.3 Verwendete Materialie

Der Großteil verwendeten der Chemikalien wurde bei AppliChem (Gatersleben), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) beschafft, Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Lochplatten, Reagier- und Zentrifugengefäße stammten i.d.R. von Eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nümbrecht).

A.3.1 Chemikalien

Aceton	Fluka
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix	Bio-Rad
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich
Agar	Sigma-Aldrich
Agarose	Carl Roth
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Betain	Sigma-Aldrich
BisTris	Fluka
5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	AppliChem
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fluka
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Chloroform	Fluka
Cystin	Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Diethylcarbonat (DECP)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DNA- und Proteinladder	Fermentas
dNTP-Mix	Fermentas
Essigsäure	Fluka
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid (EtBr)	Fluka
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formamid	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
Guanidinhydrochlorid	AppliChem
Harnstoff	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Fluka
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	Fluka
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Kaliumhydroxid (KOH)	Fluka
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kupfer(II)-chlorid (CuCl ₂)	Fluka
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluka
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Fluka
Mithramycin (MI)	Sigma-Aldrich
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich
Natriumacetat (NaAc)	Sigma-Aldrich

Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Fluka
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumsarkosinat	Sigma-Aldrich
Nonoxinol 40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
nukleinsäurefreies Wasser	AppliChem
Phenol	Fluka
Polyethylenglycol (PEG-4000)	Fluka
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
PVP	Sigma-Aldrich
<i>random</i> Hexamerprimer	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich
Spermin	Sigma-Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Bio-Rad
Trypton	Fluka
Tween 20	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Sigma-Aldrich

A.3.2 Enzyme und Proteine

DNase I	Sigma-Aldrich
EcoRI	Fermentas
EcoRV	Fermentas
Ex Taq DNA Polymerase	Takara Bio, Ōtsu, Japan
GoTaq DNA Polymerase	Promega
Lysozym	Sigma-Aldrich
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega
NcoI	Fermentas
NdeI	Fermentas
NotI	Fermentas
omnitaq-OLS DNA Polymerase	OLS OMNI Life Science, Bremen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas
Proteinkinase K	Macherey-Nagel
PstI	Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
RNase A	Promega
SacI	Fermentas
SalI	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
VEGF	Dianova, Hamburg
XbaI	Fermentas

A.3.3 Kits

BioSprint 96 DNA Plant Kit	Qiagen
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega
DNA 1000 Kit	Agilent
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
GoTaq qPCR Master Mix	Promega
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena
iQ Multiplex Powermix	Bio-Rad
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad
KAPA SYBR Fast Supermix	Peqlab, Erlangen
Loopamp DNA Amplification Kit	Eiken Chemical

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	Fermentas
NucleoMag 96 Plant	Macherey-Nagel
NucleoSpin Food	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plant II	Macherey-Nagel
NucleoSpin Soil	Macherey-Nagel
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Qiagen
PowerPlant DNA Isolation Kit	Mo Bio
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
QIAamp DNA Stool Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit	Invitrogen
Ready-to-use Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen
SensiMix SYBR No-ROX Kit	Bioline
S · Tag Thrombin Purification Kit	Merck
SYBR Premix Ex Taq II Master Mix	Takara Bio
TA Cloning Kit	Invitrogen
WesternBreeze Chromogenic Kit - Anti-Rabbit	Invitrogen
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega
Wizard Magnetic 96 DNA Plant System	Promega
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega

A.3.4 Lösungen, Medien, Vektoren und Zellen

Sämtliche Lösungen bzw. Puffer und Medien wurden mit Reinstwasser (Arium 611, Sartorius Stedim Biotech) angesetzt und steril filtriert (Sartolab, PES 0,2 µm, Sartorius Stedim Biotech). Die Lösungen für die Proteinaufreinigung wurden zusätzlich im Ultraschallbad entgast. Alle Medien wurden stets autoklaviert.

Lösungen

Amino-Bindungspuffer	0,01 M TE-Puffer, 1 M NaCl, pH 6,5
Amino-Waschpuffer	0,01 M TE-Puffer, pH 8
Amino-Elutionspuffer	0,01 M TE-Puffer, 1,5 M NaCl, pH 9 oder 13
CTAB-Puffer	20 g/L CTAB, 4% 0,5 M EDTA, 28% 5 M NaCl, 10 g/L PVP40, 10% 1 M Tris, pH 5
EDAC-Lösung	10 g/L EDAC in eiskaltem MES-Puffer
Extraktionspuffer	25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0,5% SDS, 200 mM Tris/HCL, pH 8
Galbraith-Puffer	45 nM MgCl ₂ , 20 mM MOPS, 30 mM Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100
Hybridisierungspuffer	5x SSC, 50% Formamid, 0,1% Natriumsarkosinat, 0,02% SDS, 2% <i>blocking reagent</i> (Roche)
LB01-Puffer	2 mM EDTA, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,5 mM Spermin, 15 mM Tris, 0,1% Triton X-100
MES-Puffer	0,1 M MES
Otto-I-Puffer	0,5% Tween 20, 100 mM Zitronensäure
Otto-II-Puffer	400 mM Natriumphosphat
phosphatgepufferte Saline (PBS)	1,4 mM Kaliumphosphat, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 4,3 mM Natriumphosphat, pH 7,5
Silica-Bindungspuffer	20 M BisTris, 1 mM EDTA, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 6,7
Silica-Waschpuffer	0,04 mM EDTA, 80 mM NaAc, 10 mM Tris/HCL, pH 7,6
SSC-Puffer (20x)	175,3 g/L NaCl, 88,3 g/L Trinatriumcitrat-Dihydrat, pH 7
TAE-Puffer (50x)	10% 0,5 M EDTA, 5,7% Essigsäure, 242 g/L Tris, pH 8,3
TBS-Puffer	150 mM NaCl, 7,7 mM Tris/HCL, pH 7,5
TE-Puffer	1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8
Tris.MgCl ₂ -Puffer	4 mM MgCl ₂ , 200 mM Tris, 0,5% Triton X-100
TSS-Puffer	5% DMSO, 1x LB-Medium, 30 mM MgCl ₂ , 10% PEG-4000

Medien

Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell
LB-Medium	5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton
LB (für Reaktorkultivierungen)	5 g/L Glucose, 5 g/L Hefeextrakt, 7,5 g/L NaCl, 7,5 g/L Trypton
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/L Agar (ggf. Antibiotika)
SOB-Medium	5 g/L Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 10 mM NaCl, 20 g/L Trypton, pH 7
SOC-Medium	20 mM Glucose, 5 g/L Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 10 mM NaCl, 20 g/L Trypton, pH 7
TB-Medium	0,4% Glycerin, 24 g/L Hefeextrakt, 2,13 g/L Kaliumphosphat, 12,54 g/L Natriumphosphat, 12 g/L Trypton

Vektoren

pCR2.1	Invitrogen
pET-29a(+)	Merck
pGEM-3Z	Promega
pGEM-5Zf(+)	Promega

Zellen

<i>E. coli</i> JM109	Promega
<i>E. coli</i> One Shot TOP10	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS	Merck
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Agilent
human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	PromoCell

A.4 Primer und Sonden

A.4.1 Multiplex-PCR

▷ Bärlauch

<i>its1</i>	TGCGTCGATGAAGAACGTAG TCGTGGCTAGGGGTCTTATG	<i>msl</i>	TACAAACTCATAATGCAAGACGAC CATCACATAAATAAAGCAAAACCA
<i>msl</i>	CGCCAACTTCCATGGGAAGAAACA TCCATGCCAGACCCTGCATCA	<i>pi-2</i>	CAGGCATTTAAGAGGGCGAAG GCCCGATTAGCAAACATAGG
<i>ztl</i>	CATGGCGCGAAGTGT CAGG GCCCCATGCAAATCTCG	<i>ztl</i>	TTCAAGCGGCGGCGAAGAAG CCTGCTACCGACCCGCCAAA

▷ Mistel

18S	AAACGGCTACCACATCCAAG GTACAAAGGGCAGGGACGTA	<i>asps</i>	AACAAGGAGTCCGCAAGAGA TCCAGCGATTCCCTTATGTC
<i>cml3p</i>	GGCCGCCATCGACGTTACCAATCT TGTCGCCCCCAACTCGTCTCCAG	<i>cml3p</i>	CATTATCCCGGCGGCAGCAC CGCGAGGGGCGGTATCATTG
<i>its1</i>	GGATTGGTTGGATCATAACGC TCCCTTCCCATTGAAAATCA	<i>leA</i>	TACGAGAGGCTAAGACTCAG TGGCACGGGAAGCCACATTT
<i>leB</i>	TGCGCTATTGGCCGCTGGTC TGGCAGGGGAAGCCACATTT	<i>vca</i>	TGTACGTGGTGGCTTACCAA TTCCATCCCTTCTGATCGTC
<i>trnH-trnK</i>	TATCCGCCCCCTCTTTATTT GCGGATATTATTAACCGTGCT		

▷ Weißdorn

<i>cmon</i>	TGCCCGATAAGGAAGTTTTG CGCCTTTGAGAGGATTTTCAG	<i>d4r</i>	AGGCGGACTTGGCGGATGAG ATACTGGCCCTGCTTGATGATGC
<i>leafy</i>	ATCCAGGTCCAGAACATTGTC CCAACTCGAGGACATCCCTA	<i>matK</i>	AATGATGTCGGAGGGATTTG TTCCGTAAAGAATTCGTCCAA
<i>pgip</i>	CGTACCTTGAAACCCTGGAA GGGTAAACTCCCCTGGGATA	<i>pgs</i>	AGTGGCTAATCGTGGTTGCTCA TTGATTCAATTAAGGCTCTCC

<i>pgs</i>	TTTTCTTGGGGAGTGGCTAATCG CCTCAAGGGTTGGCTCCCACA	<i>rpoB</i>	CGCCAAGTGGCTTTAGATTC TACATTTACCTCGCGGAACC
<i>trnL-trnF</i>	TCCTGAGCCAAATCCTGTTT CGCTCAGATCCATTTGTGAA		

A.4.2 Nested-PCR

<i>msl</i>	CTGAACGGAGAAGGGCTGTA TGACCGTAACAACAGTTCCA	<i>trnH-trnK</i>	TCCATTTGATATTTGGAATGAATC AAGTTATGCATGAACGTAATGCTC
<i>trnL-trnF</i>	ATGAAAATAAACAAGGGTTTCATAA GAAAAGAGTAGAATGAGAATGAATGA		

A.4.3 LAMP

▷ Bärlauch *msl*

FIP	GGCCCAAACCTTGAGTGCTGTA-TTTT-ACAACTCATAATGCAAGACG		
BIP	ACTGGTGTATCGGGCCGTAA-TTTT-ACTATTTGAGTCATAAACCCAA		
F3	CCAATCATTGGAAGAAGGATC	B3	CTTTGGCTAGCCCAAACG
Loop-F	CTCGAAGAGCACTAGGTTGCA	Loop-B	GGGCTGTGATGCAGGCTGATG

▷ Mistel *trnH-trnK*

FIP	TGGGCGGATATTATTAACCGTGC-TTTT-GAGGAAAGTTATGAGCATTACG		
BIP	CACGACCTTTACTATCAATCACAGA-TTTT- CTTTAGGTATTAGTACCATGGCT		
F3	GAAATTTCAACAGCAGCTAAG	B3	GTTGTATGTATCTGGTTCACTG
Loop-F	CCTAGGTATGGAAGTTATGCATGAA	Loop-B	GGTTGAAATTTAAAACC

▷ Weißdorn *trnL-trnF*

FIP	TGGGACTCTATCTTTATTCTCGTCC-TTTT-TTCACTCCACCGTAGTCTG		
BIP	AGTAAGAGGAAAATCCGTCGACT-TTTT-ATCGTTTTGGGGATAGAGG		
F3	TCGAATATTCATTGATCAAACCA	B3	AATTAGGGAGTCAACCGG
Loop-F	AATTATTA AAAAGATCTATC	Loop-B	TTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTC

A.4.4 Real-time PCR

▷ Bärlauch

<i>its1</i>	TGACACGTGGCATTAAACCAT GTGCACTCCACCAACAACCT	<i>its2</i>	AATTGCAGAATCCCGTGAAC CGAAAACACAAAGGGTCAAT
<i>msl</i>	TGCAAGACGACTGCAACCTA CCTGGAGCGCCAAAATATAA	<i>pi-2</i>	CAGGCATTTAAGAGGCGAAG TGGTGCGCAATGTAAGAGAG
<i>pi-2</i>	CTTTTCCAGGGCAATCAAAA CCCGATTAGCAAACATAGGC	<i>trnL-trnF</i>	CACAAATGGACCTGAAGTGG GAAACCGGTGACACAAGGAT

▷ Mistel

<i>its1</i>	GGGATGTGCCAAGGTAAAGA CGTTCTTCATCGACACGAGA	<i>its2</i>	AAGGGATTTGGGGTAGATGG ACATGGGAAAAACGCAGTCT
<i>trnH-trnK</i>	GGTTAATAATATCCGCCAGGT CATTCTTTCTTGCTGCTTGG	<i>trnH-trnK</i>	TATCCGCCCCCTTTTATTT TTTTGATGATTATTTGCTCCTTT
<i>trnS-trnfM</i>	GGAATAGAGGATGATCCAGCA AGCGCCATGACTTCTTCTTC		

▷ Weißdorn

<i>its1</i>	GACCCGAGAACCAGTTTCAA GAGATATCCGTTGCCGAGAG	<i>rpoB</i>	CGCCAAGTGGCTTTAGATTC TACATTTACCTCGCGGAACC
<i>trnL-trnF</i>	GGATTGAGCCTTGGTATGGA ATGCAGCCAACCTCATTTGT	<i>trnL-trnF</i>	CAAACGATCCGGTTGACTC CGCTCAGATCCATTTGTGAA
<i>trnM-atpE</i>	CAATCGGCAGGAACAAAATTA AGTTGGTCCGTCCGAATAAG		

A.4.5 Klonierung von Plasmidstandards

▷ Bärlauch

NcoI-*its* GGTGGTCCATGGCCCTTTCAAGAGATTGATGACAC
its-PstI GGTGGTCTGCAGGCAAAATGTGCAAACATCGTCAT

<i>its</i>	CCCTTTCAAGAGATTGATGACA GCAAAATGTGCAAACATCGT	<i>msl</i>	CAATATGGCCATTTTCAGTCAA TCATCACATAAATAAGCAAAACCA
<i>pi-2</i>	TTCCAGTTCTGGCAAGTTCA GCCCCATTAGCAAACATAGG	<i>trnL-trnF</i>	TTTCTTATTCATTTTACTCTTTCACAA ACCAACTGAGCTATCCCAACA

▷ Mistel

<i>its</i>	GGAAGGATCATTGTCCGATG ACATGGGAAAAACGCAGTCT	<i>trnH-trnK</i>	TATCCGCCCCCTCTTTATTT CATTCTTTCTTGCTGCTTGG
<i>trnS-trnfM</i>	ACCGGAGCTATCAACCACTC AGCGCCATGACTTCTTCTTC		

▷ Weißdorn

<i>its</i>	CGGAAGGATCATTGTCTGAAC GTAACCCCGCTGACCTG	<i>rpoB</i>	GTCAAGCAGTTCGCTTTCT TCTCCATATACCAAACGCTCA
<i>trnL-trnF</i>	GGATTGAGCCTTGGTATGGA TGGTGACACGAGGATTTTCA	<i>trnM-atpE</i>	GTTTTTGTTCATTAGAAATTTTATTCC TAGAGCTATTAATGTGATGTCGT

A.4.6 TaqMan-Sonden

Bärlauch	<i>pi-2</i>	JOE-TGACTTGCTTATAGACGGTCCA-Eclipse
	<i>trnL-trnF</i>	FAM-TCCATCTCATTTTCCTTGCA-BHQ1
Mistel	<i>its1</i>	TAM-CGACTCTCGCAATGGATAT-BHQ2
	<i>trnS-trnfM</i>	HEX-TCCTCTTGAGTCCATGAATCAA-BHQ2
Weißdorn	<i>its1</i>	RED-CCAAGGAACCTGAACGAAAG-BHQ2
	<i>trnM-atpE</i>	CY5-GGGACGAATAAGCAAAATAAGG-BBQ

A.4.7 Genomgrößenbestimmung

▷ Bärlauch

<i>chs</i> , außen	GCGGGGAAGCTCTTACTTCT GAGGTGGTTATGTGCGATT	<i>chs</i> , innen	AATCCAATCCGAACATGACG CACTCTTTTATGGCGGCTTG
<i>fdx</i> , außen	GGCCTTCTTCTTTTCTGTCGT GTGAGCTCCTCCTCCTTGTTG	<i>fdx</i> , innen	ACGACGTGTACATCCGGAC GTCGTGAGGTTAGCTCTGGT

▷ Mistel

<i>chs</i> , außen	CACGTGGTATTCTGCACCAC TCAAACGCTTCCCTCAAAC	<i>chs</i> , innen	GACCTAGCGGAGAACAATGC CCCACCAAGCTATCCAGATG
<i>fdx</i> , außen	AGCAACCACCACAACAATGA ACAGGTAAGCAGCACAGGT	<i>fdx</i> , innen	TGACAATGGCTGCCTACAAG GGCAAGTCAATGCCTTCTTC

▷ Weißdorn

<i>chs</i> , außen	CTTGTGGTCAAGCCTTGTT ACACTTGCCTTGTGCTTCT	<i>chs</i> , innen	GCTGACAGTGATGGGGCTAT GAAGGCCTCGTTAAGGCTCT
<i>fdx</i> , außen	CAGGGTCTTGCTCATCGTG CCGGCAGGTCAAATCATT	<i>fdx</i> , innen	GGACCAGACTTTCTGGATG CCTTCTCCTTGTGGTCTCA

▷ alle drei Pflanzen

<i>chs</i> , außen	CACGTGGTATTCTGCACCAC TCAAACGCTTCCCTCAAAC	<i>chs</i> , innen	AGCCCTGTTTGAATTGGTG GAAGGCCTCGTTAAGGCTCT
<i>fdx</i> , außen	AGCAACCACCACAACAATGA ACAGGTAAGCAGCACAGGT	<i>fdx</i> , innen	ACTGTACCGACGTAAG ACAGGTAAGCAGCACAGGT
<i>a/b-bp</i> , außen	CGCTTATGAGCTGTGGCATA CGCTGGAATTCTCCAAGTC	<i>a/b-bp</i> , innen	CGCTTATGAGCTGTGGCATA TGAGCAGCCATTCTGATACG
<i>a/b-bp</i> , außen	CGTATCAGAATGGCTGCTCA CAATTCCTCGACTTCTTGG	<i>a/b-bp</i> , innen	CGTATCAGAATGGCTGCTCA CGCTGGAATTCTCCAAGTC
<i>hmg-I/Y</i> , außen	AGCCTCTGTCACTTCTCCTT CTTGGCTACCACTTCCAGA	<i>hmg-I/Y</i> , innen	AGGCCATTCGTTGTTCTTT TGTGGACACAGCACCTGAAG

<i>pc</i> , außen	CCACTGTTTCGTGATTCGTG CGGATGAACTCGGTTCAAAT TTCAAACCCAAAACCAAAGC	<i>pc</i> , innen	GGATCGAGTGAAAGCACGC TCAAACGTTCCCTCAAAT GCATCTTTGGAACGTCTGGT
<i>psbS</i> , außen	CCGATCCGGACACTACACTT	<i>psbS</i> , innen	TCCTGTCTCCAGATTCAGC

A.4.8 VEGF-Experimente

NdeI-VEGF	GGTGGTCATATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCA		
XbaI-VEGF	GGTGGTCTAGAATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCA		
VEGF-PstI	GGTGGTCTGCAGTCACCGCCTCGGCTTGTACAT		
VEGF-SaII	GGTGGTGTGCGACTCACCGCCTCGGCTTGTAC		
<i>gapdh</i>	AGGTCTGATGACCACCGTTC GGAACGCCATACCAGTCAGT CACCATCGGGGATAATTCTG	<i>gst</i>	AGGCGTAGCGATTATGCAGT GGCGATGTAATTCAGCCATT GTTATGTGCCGGCTTCTACCC
<i>lacA</i>	GTGCTTATCCCGTTCGTTA	<i>rpoA</i>	AGCCAGCACGTCTTTAATCTCAGT
<i>vegf</i>	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT ATCTGCATGGTGATGTTGGA		

A.5 Verwendete Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle experimentellen Arbeiten mit DNA, RNA sowie *E. coli*-Zellen auf Eis durchgeführt. Zentrifugationen wurden gekühlt bei 4 °C vorgenommen. Alle verwendeten Geräte und Lösungen waren autoklaviert und die Lösungen mit DEPC-behandeltem oder nukleinsäure- bzw. RNase-freiem Wasser angesetzt. Bei der *real-time* PCR wurden ausschließlich originalverpackte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet.

A.5.1 Nukleinsäureisolierungen

In diesem Abschnitt werden Protokoll für die DNA- und RNA-Extraktion aufgeführt. In Kits enthaltene Puffer sind fett dargestellt. Ihre Zusammensetzung ist entweder unbekannt oder den Kit-Anleitungen zu entnehmen. Die Durchführungen sind an die Herstellerangaben angelehnt, wurde aber im Fall der DNA-Extraktion aus Pflanzenpulver entsprechend angepasst. Wichtige Punkte vor Beginn einer Aufreinigung sind jeweils den online verfügbaren Anleitungen nachzulesen. Inkubationsschritte werden in Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) bei 300 rpm durchgeführt.

CTAB-Methode

125 mg Pflanzenpulver in 500 µL CTAB-Puffer und 4 µL RNase A lösen, für 15 min bei 55 °C inkubieren und für 5 min bei 12.000 · g zentrifugieren. Überstand in ein neues Regaiergefäß überführen, 250 µL Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) zugeben und zehnfach invertieren und für 1 min bei 16.100 · g zentrifugieren. Wässrige Phase entnehmen und 50 µL 7,5 M Ammoniumacetat sowie 500 µL eiskalten Ethanol zugeben, zehnfach invertieren. Durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 · g DNA präzipitieren, Überstand entfernen und Pellet mit 500 µL 70% Ethanol waschen und für 1 min bei 13.000 · g zentrifugieren. Dann Pellet 15 min an der Luft trocknen. DNA in 100 mL Wasser resuspendieren und 20 min bei 65 °C inkubieren.

PVP-Methode

10 mg Pflanzenpulver mit 5 µL 1% β-Mercaptoethanol und 300 µL Extraktionspuffer mischen und vortexen. Lysat für 1 h bei RT inkubieren. PVP10 frisch lösen und zu 6% zur Mischung geben.

Dann 100 µL 7,5 M Ammoniumacetat zugeben. Inkubation erfolgt für 30 min auf Eis, dann zentrifugieren für 10 min bei 10.000 · g. Überstand abnehmen und 300 µL Isopropanol zusetzen, bei -20 °C für 30 min inkubieren, danach zentrifugieren für 10 min bei 10.000 · g. Das Pellet für 15 min lufttrocknen lassen, dann resuspendieren in 100 µL TE-Puffer und 2 µL RNase A zugeben, Inkubation für 15 min bei 37 °C. 500 µL Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) zugeben und zehnfach invertieren, Zentrifugation für 5 min bei 10.000 · g. Überstand abnehmen und mit 300 µL Isopropanol versetzen, Inkubation bei -20 °C für 10 min, Zentrifugation für 10 min bei 10.000 · g. Das Pellet mit 80% Ethanol waschen und lufttrocknen, dann in 100 µL TE-Puffer resuspendieren.

Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit

15 mg Pflanzenpulver werden mit 600 µL **Nuclei Lysis Solution** für 1 min gevortext. Es folgt eine Inkubation für 15 min bei 65 °C. Dann werden 3 µL **RNase Soln.** zugegeben, gevortext und 15 min bei 65 °C inkubiert. Das Lysat wird auf RT abgekühlt und mit 200 µL **Protein Precipitation Solution** für etwa 30 s gevortext, danach für 3 min bei 16.100 · g zentrifugiert. Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, es folgt Zugabe von 600 µL Isopropanol, zehnfaches Invertieren und 1 min bei 16.100 · g zentrifugieren. Nach Dekantieren des Überstands werden 600 µL 75%iger Ethanol zugegeben, erneut zehnmals invertiert und 1 min bei 16.100 · g zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet für 15 min luftgetrocknet. Es folgt die Zugabe von 100 µL **DNA Rehydration Solution** und Inkubation bei 65 °C für 1 h. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit dem PicoGreen-Assay.

Macherey-Nagel NucleoSpin Food

75 mg Pflanzenpulver in 550 µL Lysispuffer CF lösen, Zugabe von 10 µL Proteinkinase K, zehnfach invertieren und 30 min bei 65 °C inkubieren, dann 10 min bei 11.000 · g zentrifugieren. Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgt die Zugabe von 450 µL Bindungspuffer **C4**, 450 µL Ethanol, vortexen und zehnfach Invertieren. 750 µL dieser Mischung werden auf **NucleoSpin Food Column** gegeben, 1 min bei 11.000 · g zentrifugiert. Der Schritt wird wiederholt, bis sämtliche Mischung die Membran passiert hat. Zum Waschen werden nacheinander 400 µL Waschpuffer **CQW**, 700 µL Waschpuffer **C5** und 200 µL **C5** auf die Säule gegeben und stets 2 min bei 11.000 · g zentrifugiert. Zur Elution wird das *spin column* auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und zweifach mit 50 µL Elutionspuffer **CE** (70 °C) eluiert. Nach Zugabe des Puffers wird erst 5 min bei RT inkubiert, dann für 1 min bei 11.000 · g zentrifugiert.

Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II

20 mg Pflanzenpulver in 400 µL Lysispuffer **PL1** lösen und 1 min gevortexen. Es folgt die Zugabe von 10 µL RNase A, kurzes Vortexen und Inkubation für 10 min bei 65 °C. Lysat wird in **NucleoSpin Filter** pipettiert und bei 11.000 · g für 5 min zentrifugiert. Dem Durchfluss werden 450 µL Bindungspuffer **PC** zugegeben und mittels Pipette gemischt. Von der Mischung werden 700 µL in **NucleoSpin Plant II Column** pipettiert und bei 11.000 · g für 1 min zentrifugiert. Die restliche Mischung wird ebenfalls auf die Säule gegeben. Es folgen Waschschrte, zunächst mit 400 µL **PW1**, dann mit 700 µL **PW2** und 200 µL **PW2** jeweils mit 2 min Zentrifugation bei 11.000 · g. Die Elution erfolgt mit 50 µL Elutionspuffer **PE** (70 °C). Der Ansatz wird 5 min bei 70 °C inkubiert, dann bei 11.000 · g für 1 min zentrifugiert. Der Schritt wird wiederholt und die Durchflussfraktionen werden zum Abschluss vereinigt.

Macherey-Nagel NucleoSpin Soil

50 mg Pflanzenpulver werden in **NucleoSpin Bead Tube** gefüllt, 700 µL Lysispuffer **SL1** und 150 µL Verstärker **SX** werden zugegeben. Es wird kurz gevortext und das Gefäß in die Kugelmühle FastPrep FP120 (Thermo Scientific) eingebaut. Die Homogenisierung erfolgt zweimal bei Stufe 6 für 45 s, dazwischen wird 5 min gewartet. Das Lysat wird bei 11.000 · g für 2 min zentrifugiert, 150 µL Fällungspuffer **SL3** werden zugegeben, kurz gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wird 1 min bei 11.000 · g zentrifugiert. Der Überstand wird in **NucleoSpin Inhibitor Removal Column** überführt und bei 11.000 · g für 1 min zentrifugiert. Dem Durchfluss werden 250 µL Bindungspuffer **SB** zugegeben, kurz gevortext. 550 µL der Mischung werden in ein **NucleoSpin Soil Column** gegeben und 1 min bei 11.000 · g zentrifugiert. Der Schritt wird mit dem Rest wiederholt. Es werden 500 µL Bindungspuffer ins *spin column* gegeben und 30 s bei 11.000 · g zentrifugiert. Dann werden 550 µL Waschpuffer **SW1** zugegeben und 30 s bei 11.000 · g zentrifugiert. Der Schritt wird mit 700 µL Waschpuffer zweimal wiederholt. Danach wird das *spin column* 2 min bei 11.000 · g trocken zentrifugiert. Die Elution erfolgt zweifach mit 50 µL Elutionspuffer **SE** in ein neues Reaktionsgefäß, dann Inkubation für 5 min bei RT und 1 min bei 11.000 · g zentrifugiert.

Mo Bio PowerPlant DNA Isolation Kit

10 mg Pflanzenpulver in 550 µL **PowerPlant Bead Solution** geben, vortexen, 60 µL Lysispuffer **PB1** zugeben, zehnfach invertieren und 10 min bei 65 °C inkubieren. Homogenisierung erfolgt zweifach im FastPrep FP120 auf Stufe 4,5 für 45 s mit 50 min Pause dazwischen. Es folgt Zentrifugation für 1 min bei 10.000 · g. Zu 500 µL Überstand 250 µL **PB2** geben, zehnfach invertieren, 5 min auf Eis inkubieren und für 1 min bei 10.000 · g zentrifugieren. Zum Überstand 1 mL **PB3** geben und fünffach invertieren, dann 10 min bei RT inkubieren und 15 min bei 13.000 · g zentrifugieren. Das Pellet in 100 µL **PB6** resuspendieren, dann 500 µL **PB4** zusetzen und vortexen. 600 µL der Mischung in **Spin Filter** geben und für 1 min bei 10.000 · g zentrifugieren. Zum Waschen werden 500 µL **PB5** verwendet und für 30 s bei 10.000 · g zentrifugiert, dann trocken zentrifugieren für 1 min bei 10.000 · g. Elution erfolgt mit 50 µL **PB6**, Inkubation für 1 min bei RT und Zentrifugation für 30 s bei 10.000 · g.

Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System

20 mg Pflanzenpulver mit 275 µL **Digestion Solution**, 20 µL Proteinkinase K und 5 µL RNase A zusammengeben und vortexen, Inkubation für 16–18 h bei 55 °C, Zentrifugation für 2 min bei 2.000 · g. Es folgen die Zugabe von 250 µL **Wizard SV Lysis Buffer**, vortexen und inkubieren für 30 min bei RT. Das gesamte Lysat auf **Wizard SV Minicolumn** geben und für 3 min bei 13.000 · g zentrifugieren. Die Membran wird dreimal mit 650 µL **Wizard SV Wash Solution** gewaschen, Zentrifugation für 1 min bei 13.000 · g, dann noch für 2 min bei 13.000 · g trocken zentrifugieren. Zur Elution 200 µL DNA-freies Wasser auf die Membran geben, Inkubation für 2 min bei 65 °C und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 · g.

Qiagen DNeasy Plant Mini Kit

50 mg Pflanzenpulver werden in 400 µL Lysispuffer **AP1** gelöst, 4 µL RNase A wird zugesetzt, 1 min vortexen, dann bei 65 °C für 12 min inkubiert. Dabei wird zehnmals invertiert. Dem Ansatz

werden 130 μ L Fällungspuffer **AP2** zugegeben, kurz gevortext und für 5 min auf Eis gestellt. Das Lysat wird zweifach bei 16.100 \cdot g zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt. 300 μ L davon werden in ein **QIAshredder Mini Spin Column** überführt und für 2 min bei 16.100 \cdot g zentrifugiert. 450 μ L Bindungspuffer **AP3/E** werden zum Durchfluss gegeben und mit der Pipette durchmischt. 650 μ L der Mischung werden in **DNeasy Mini Spin Column** gegeben. Nach der Zentrifugation bei 16.100 \cdot g für 1 min wird der Durchfluss verworfen. Es folgen zwei Waschschritte. 500 μ L Waschpuffer **AW** wird für 1 min bei 16.100 \cdot g zentrifugiert, danach mit 500 μ L **AW** für 2 min. Die Elution erfolgt zweifach mit Elutionspuffer **AE**. 100 μ L werden ins *spin column* gegeben und für 5 min bei RT inkubiert, dann Zentrifugation bei 6.000 \cdot g.

Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit

50 mg Pflanzenpulver mit 2 mL Lysispuffer **ASL** versetzen und 1 min vortexen. 1,6 mL Lysat in ein Reaktionsgefäß überführen und 5 min bei 70 °C inkubieren, kurz vortexen und für 1 min bei 16.100 \cdot g zentrifugiert. 1,2 μ L Überstand entnehmen und eine **InhibitEX Tablet** zugeben, 5 min vortexen und dann 1 min bei RT inkubieren. Dann Zentrifugieren für 1 min bei 16.100 \cdot g. Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und 3 min bei 16.100 \cdot g zentrifugieren, Zugabe von 15 μ L Proteinkinase K und 200 μ L Puffer **AL** und Vortexen. Es folgen die Inkubation für 10 min bei 70 °C und die Zugabe von 200 μ L Ethanol. Das gesamte Lysat wird auf **QIAamp Spin Column** gegeben und für 1 min bei 16.100 \cdot g zentrifugiert. Waschen erfolgt mit 500 μ L **AW1**, Zentrifugation für 1 min bei 16.100 \cdot g und 500 μ L **AW2**, Zentrifugation für 3 min bei 16.100 \cdot g, dann trocken zentrifugieren für 1 min bei 16.100 \cdot g. Die Elution erfolgt zweifach mit Elutionspuffer **AE**. 100 μ L werden ins *spin column* gegeben und für 5 min bei RT inkubiert, dann Zentrifugation bei 6.000 \cdot g.

Macherey-Nagel NucleoMag 96 Plant

30 mg Pflanzenpulver werden in 500 μ L Puffer **MC1** für 1 min gevortext. Der Ansatz wird bei 56 °C für 30 min inkubiert, danach bei 6.000 \cdot g für 20 min zentrifugiert. 50 μ L Überstand, 45 μ L **MC2** und 4 μ L *beads* werden in Position A einer 96-Lochplatte vorgelegt. Die anderen Positionen aller Programme enthalten alle 100 μ L entsprechend dem Punkt „KingFisher-Programme“.

Promega Wizard Magnetic 96 DNA Plant System

20 mg Pflanzenpulver werden mit 300 μ L Puffer **A** 1 min gevortext. Der Ansatz wird bei RT für 30 min inkubiert und bei 2.000 \cdot g für 10 min zentrifugiert. 60 μ L Überstand und 30 μ L *bead*-Mischung (135 μ L Puffer **B** und 20 μ L *beads*) werden in Position A vorgelegt. Die anderen Positionen enthalten jeweils 100 μ L, zum Eluieren wird 50 μ L Wasser eingesetzt. Die verwendeten Programme finden sich unter Punkt „KingFisher-Programme“.

Qiagen BioSpring DNA Plant

30 mg Pflanzenpulver werden mit 300 μ L Puffer **RLT** 1 min gevortext. Der Ansatz wird bei RT für 30 min inkubiert und danach bei 6.000 \cdot g für 5 min zentrifugiert. 50 μ L Überstand, 50 μ L Puffer **RPW** und 5 μ L *beads* werden in Position A vorgelegt. Die anderen Positionen enthalten immer 100 μ L, zum Eluieren wird 50 μ L Wasser eingesetzt. Die verwendeten Programme finden sich unter Punkt „KingFisher-Programme“.

Silica-beads mit selbst hergestellten Puffern

100 mg Pflanzenpulver werden mit 500 µL Silica-Bindungspuffer in sechs Lysing Matrix D Tube (MP Biomedicals, USA) gegeben. Die Homogenisierung erfolgt zweimal bei Stufe 6 für 45 s, in der FastPrep FP120, dazwischen wird 5 min gewartet. Danach werden die Ansätze für 2 min bei $16.100 \cdot g$ zentrifugiert und die Überstände zusammengefasst. Für die Aufreinigung werden die 40 µL Lysat mit 20 µL *beads* und 40 µL Silica-Bindungspuffer in Position A einer 96-Lochplatte vorgelegt. Die weiteren Positionen enthalten je 100 µL und die Elution erfolgt mit 50 µL Wasser. Das Aufreinigungsprogramm ist dem Punkt „KingFisher-Programme“ zu entnehmen.

Amino-beads zur DNA-Extraktion

100 mg Pflanzenpulver werden mit 500 µL Amino-Bindepuffer entsprechend den Silica-beads in der FastPrep FP120 lysiert, für 2 min bei $16.100 \cdot g$ zentrifugiert und die Überstände werden vereinigt. Für die Aufreinigung werden die gewünschte Menge Lysat mit der optimalen Menge *beads* (siehe 4.1.5) und 40 µL Amino-Bindungspuffer in Position A einer 96-Lochplatte vorgelegt. Die weiteren Positionen enthalten je 100 µL und die Elution erfolgt mit 50 µL Amino-Elutionspuffer. Das Aufreinigungsprogramm ist dem Punkt „KingFisher-Programme“ zu entnehmen.

Speziesspezifische *magnetic beads*

Zum Koppeln von Oligonukleotiden an die Carboxy-beads wird folgendes Protokoll benutzt: 100 µL *beads* zweifach 10 min bei 20 rpm mit 100 µL MES-Puffer mit Hilfe eines Rotators waschen, Zugabe von 100 µL Oligonukleotide-Lösung (25 µM in MES-Puffer), 30 min bei RT und 20 rpm rotieren, 30 µL frische EDAC-Lösung zugeben und im Kühlraum bei 4 °C über Nacht rotieren. Zum Abwaschen nicht gebundener Oligonukleotide wird wie folgt verfahren: fünffach mit 100 µL Tris/HCL (pH 7,4) für 15 min bei 20 rpm waschen, mit 100 µL Hybridisierungspuffer für 30 min bei 20 rpm waschen, *beads* bei 4 °C im Hybridisierungspuffer lagern. Zur Bestimmung des gebundenen Anteils der DNA Konzentrationsmessungen in sämtlichen Waschfraktionen durchführen. 100 µL DNA-Lösung bzw. Lysat mit 20 µL *beads* zusammenbringen und auf 95 °C für 3 min denaturieren und in Position A einer 96-Lochplatte vorlegen. In allen weiteren Positionen werden ebenfalls 100 µL Puffer entsprechend dem Punkt „KingFisher-Programme“ vorgelegt. Vor dem Elutionsschritt wird erneut für 3 min auf 95 °C für erhitzt.

KingFisher-Programme

Für den KingFisher geeignete 96-Lochplatten (Thermo Scientific) werden entsprechend den Programmvorgaben angesetzt und in den KingFisher gestellt, dann Programm durchführen.

Tab. A.14: Macherey-Nagel NucleoMag 96 Plant.

Position	Belegung	Programm
A	Ansatz	Release: - ; Wash: 5 min (bottom medium); Collections: 1
B	MC3	Release: 30 s (fast); Wash: 1 min (medium); Collections: 3
C	MC4	Release: 30 s (fast); Wash: 1 min (medium); Collections: 3
D	100% EtOH	Release: 30 s (fast); Wash: 2 min (medium); Collections: 3
E	MC5	Release: - ; Wash: 1:30 min (very slow); Collections: -
F	MC6	Release: 10 s (fast); Elution: 30 s (medium); Collections: 1

Für NucleoMag 96 Plant wurden zur Optimierung folgende Programmvarianten untersucht (vgl. Abb. 4.8): + Waschpuffer (zweifacher Schritt C), + EtOH (zweifacher Schritt D), – Waschzeit (Halbierung der Waschzeiten), + Waschzeit (Verdoppelung der Waschzeiten), + Bindung / Elution (Verlängerung von Wasch- und Elutionsdauer in Schritt A und F auf 10 min), + EtOH / Waschzeit (zweifacher Schritt D und Verdreifachung der Waschzeiten) und – Aufsammlungen (alle Collections auf 1 eingestellt).

Tab. A.15: Promega Wizard Magnetic 96 DNA Plant System.

Position	Belegung	Programm
A	Ansatz	Release: - ; Wash: 5 min (bottom medium); Collections: 3
B	Wash Buffer	Release: 30 s (medium); Wash: 1 min (medium); Collections: 3
C	Wash Buffer	Release: 30 s (medium); Wash: 2 min (medium); Collections: 6
D	Wash Buffer	Release: 30 s (slow); Wash: 2 min (medium); Collections: 6
E	Wash Buffer	Release: 30 s (slow); Wash: 2 min (medium); Collections: 6
F	Wash Buffer	Release: - ; Wash: 2 min (very slow); Collections: -
G	Wasser	Release: 30 s (medium); Elution: 2 min (very slow); Collections: 1

Die getesteten Programmvarianten waren: – Waschpuffer (Verzicht auf die Schritte D–F).

Tab. A.16: Qiagen BioSpring DNA Plant.

Position	Belegung	Programm
A	Ansatz	Release: - ; Wash: 4 min (medium); Collections: 1
B	RPW	Release: 5 s (medium); Wash: 2 min (slow); Collections: 1
C	100% EtOH	Release: 5 s (fast); Wash: 1:30 min (medium); Collections: 1
D	100% EtOH	Release: 5 s (fast); Wash: 1:30 min (medium); Collections: 1
E	Wasser	Release: 10 s (fast); Elution: 2 min (medium); Collections: 3

Die Programmvarianten waren hier: + EtOH (zweifacher Schritt D), 70% EtOH (Wiederholung von Schritt D mit 70% EtOH) und 2x 70% EtOH (zweifacher Schritt D mit 70% EtOH).

Tab. A.17: Silica-*beads* mit selbst hergestellten Puffern.

Position	Belegung	Programm
A	Ansatz	Release: - ; Wash: 5 min (medium); Collections: 1
B	Waschpuffer	Release: 30 s (medium); Wash: 20 min (slow); Collections: 3
C	80% EtOH	Release: 30 s (fast); Wash: 1 min (medium); Collections: 3
D	80% EtOH	Release: 30 s (fast); Wash: 2 min (medium); Collections: 3
E	Wasser	Release: 10 s (fast); Elution: 2 min (medium); Collections: 3

Tab. A.18: Amino-*beads* zur DNA-Extraktion.

Position	Belegung	Programm
A	Ansatz	Release: - ; Wash: 5 min (medium); Collections: 1
B	Waschpuffer	Release: 30 s (medium); Wash: 20 min (slow); Collections: 3
C	80% EtOH	Release: 30 s (fast); Wash: 1 min (medium); Collections: 3
D	Elutionspuffer	Release: 10 s (fast); Elution: 2 min (medium); Collections: 3

Tab. A.19: Speziesspezifische *magnetic beads*.

Position	Belegung	Programm
A	Ansatz (95 °C)	Release: - ; Wash: 5 min (medium); Collections:
B	2x SSC, 0,1% SDS	Release: 30 s (medium); Wash: 5 min (slow); Collections: 3
C	1x SSC	Release: 30 s (medium); Wash: 5 min (slow); Collections: 3
D	0,5x SSC	Release: 30 s (medium); Wash: 5 min (slow); Collections: 3
E	0,05x SSC	Release: 30 s (fast); Wash: 1 min (medium); Collections: 3
F	Wasser (95 °C)	Release: 10 s (fast); Elution: 2 min (medium); Collections: 3

RNA-Isolierung mittels Phenol-Chlorofom-Extraktion

10^9 *E. coli*-Zellen werden abzentrifugiert ($4.000 \cdot g$ für 5 min) und in 900 μ L Lysozym-Lösung (1 mg/mL in TE-Puffer, pH 8,0) resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 90 μ L 10% SDS, das Erhitzen auf 65 °C für 2 min, die Zugabe von 100 μ L NaAc (1 M, pH 5,2) und dann die Zugabe von 1 mL mit Wasser gesättigtem Phenol (pH unter 7,0). Es wird zehnfach invertiert und bei 65 °C für 6 min inkubiert (dabei alle 40 s zehnmal invertieren). Dann folgt das Abkühlen auf Eis für 2 min, Zentrifugieren bei $16.100 \cdot g$ und 4 °C für 10 min, überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, Zugabe von einem Volumen Chloroform, zehnmal invertieren, zentrifugieren bei $16.100 \cdot g$ und inkubieren bei 4 °C für 5 min. Ggf. muss dies wiederholt werden. Anschließend wird die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgt die Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl, die Zugabe von zwei Volumen reinem kaltem EtOH (-20 °C, Auffüllen bis zum Rand), Inkubation bei -80 °C für 20 min, Zentrifugation bei $16.100 \cdot g$ und 4 °C für 15 min und Verwerfen des Überstands. Zum Waschen des Pellets wird es mit 1 mL 75% EtOH überschichtet, bei *full speed* und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird getrocknet und die RNA in 30–50 μ L RNase-freiem Wasser gelöst. Photometrisch (Nanodrop ND-1000) wird die Konzentration und Reinheit (A_{260}/A_{280}) der RNA-Lösung bestimmt sowie die Integrität der RNA gelelektrophoretisch kontrolliert (sterile RNase-freie Reaktionsgefäße verwenden).

Analytik Jena innuPREP RNA Mini Kit

Zellen (vgl. „Phenol-Chlorofom-Extraktion“) werden in 500 μ L Lysozym (1 mg/mL) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert, 300 μ L Lysepuffer **RL** werden zugesetzt und die Lösung wird homogenisiert. Es schließt sich folgende Schritte an: Inkubation für 3 min bei RT, Lösung auf **Spin-Filter D** geben, 1 min bei $16.100 \cdot g$ zentrifugieren, Durchlauf mit gleichen Volumen an 75% EtOH versetzen, **Spin-Filter R** sukzessiv durch Zentrifugation für 2 min bei $16.000 \cdot g$ beladen, Filter mit 500 μ L Waschpuffer **HS** und $16.100 \cdot g$ für 1 min waschen, Durchlauf verwerfen und äquivalenter Waschschritt mit 700 μ L Puffer **LS**. Nachfolgend wird die Säule für 3 min bei $16.000 \cdot g$ von Ethanol befreit und 50 μ L nukleasefreies Wasser appliziert, dann Inkubation für 2 min bei RT und für 1 min bei $8.000 \cdot g$ zentrifugieren.

Qiagen RNeasy Plus Mini Kit

Folgende Schritte werden nacheinander abgearbeitet: Lösen des Zellpellets (vgl. „Phenol-Chlorofom-Extraktion“) in 2 mL Puffer **RLT Plus** (versetzt mit 20 μ L β -Mercaptoethanol), homogenisieren

der Lösung mit einem Ultra-Turax, überführen des Lysats auf **gDNA Elininator Spin Column**, zentrifugieren bei $8.000 \cdot g$ für 7 min, verwerfen des *spin columns* und Durchfluss aufheben, Zugabe von 600 μL 70% EtOH, vorsichtiges Mischen durch auf- und abpipettieren, überführen von je 600 μL auf **RNeasy Spin Column**, zentrifugieren bei $8.000 \cdot g$ für 1 min, Zugabe von 700 μL **RW1**, zentrifugieren bei $16.100 \cdot g$ für 15 s, verwerfen des Durchflusses, Zugabe von 500 μL **RPE**, zentrifugieren bei $16.100 \cdot g$ für 15 s, verwerfen des Durchflusses, Zugabe von 500 μL **RPE**, zentrifugieren bei $8.000 \cdot g$ für 2 min, verwerfen des Durchflusses, überführen des *spin columns* auf ein neues Reaktionsgefäß, trocken zentrifugieren und bei $16.100 \cdot g$ für 1 min, überführen des *spin columns* auf eine neues Reaktionsgefäße, Zugabe von 60 μL RNase-freiem Wasser, zentrifugieren bei $8.000 \cdot g$ für 1 min und messen der Konzentration und Reinheit am Photometer.

DNase I-Verdau

Zu 50 μL RNA-Lösung werden gegeben: 12,5 μL 25 mM MgCl_2 , 1,25 μL 1 M Tris-HCl (pH 7,5) und 1 μL DNase I. Anschließend wird der Verdau nach folgendem Protokoll durchgeführt: Inkubieren bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h, Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1), vortexen für 30 s, zentrifugieren bei $16.000 \cdot g$ für 1 min, überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, Zugabe von einem Volumen Chloroform, vortexen für 30 s, zentrifugieren bei $16.000 \cdot g$ für 1 min, überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, Zugabe von 1/10 Volumen 5 M NaCl, Zugabe von zwei Volumen reinem EtOH, inkubieren bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min, zentrifugieren bei $16.000 \cdot g$ für 10 min, verwerfen des Überstands., waschen des Pellets mit 500 μL 75% EtOH, zentrifugieren bei $16.000 \cdot g$ für 7 min, verwerfen des Überstands, trocknen des Pellets mit Druckluft, lösen der RNA in 30 μL RNase-freiem Wasser, messen der Konzentration und Reinheit am Photometer.

Gelextraktion

Die Gelextraktion wird mit dem kommerziell erhältlichen QIAquick Gel Extraction Kit durchgeführt. Dazu werden PCR-Produkte bzw. Produkte eines Restriktionsverdaus mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die benötigten DNA-Fragmente anschließend mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung wird gemäß dem Protokoll von Qiagen durchgeführt. Die Konzentration der erhaltenen DNA wird photometrisch bestimmt bzw. mittels PicoGreen-Assay.

Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmiden erfolgt je nach Ansatzgröße mittels Plasmid Midi (Schüttelkolben) bzw. Mini Kit (nur für die Sequenzierung) oder PureYield Plasmid Midiprep System (Klonierung von Plasmidstandards) und einer Vakuumstation (Vac-Man 96 Manifold, Promega) vollständig gemäß den Herstellerangaben, welche auf den Webseiten der Hersteller heruntergeladen werden können. Die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA wird photometrisch bestimmt. Eine Unterscheidung von *low copy* bzw. *high copy* muss mit diesem Kits nicht getroffen werden.

Quant-iT PicoGreen dsDNA Kit

Es wird das Herstellprotokoll mit den Angaben für *high-range* exakt befolgt. Es wurden schwarze 96-Lochplatten der Firma Eppendorf verwendet.

A.5.2 Amplifikationsreaktionen

Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wird folgender Ansatz verwendet:

- 2 μL Total-RNA
- 3 μL dNTP-Mix (2 mM)
- 3 μL *random* Hexamerprimer (100 mM)
- 21 μL Wasser

Nach einer Inkubation von 5 min bei 65 °C und 1 min auf Eis erfolgt die Zugabe von:

- 8 μL M-MLV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer (Promega)
- 1 μL M-MLV Reverse Transcriptase

Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 42 °C und die Inaktivierung der Polymerase bei 90 °C für 10 min. Die cDNA-Lösung wird 1:20 mit DNA-freiem Wasser verdünnt und 5 μL davon werden als Template für die PCR verwendet.

PCR mit *Taq*-Polymerase

Konventionelle PCR wurden in einem Px2 Thermal Cycler (Thermo Scientific) durchgeführt. Für die PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase wird je Probe (5 μL cDNA bzw. 100 ng genomische DNA) folgender Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 50 μL (Menge entsprechend der Anzahl an Proben angepasst) erstellt:

- DNA-Probe
- 5 μL 10x PCR-Puffer (10 μL bei 5x Puffer)
- 4 μL dNTP-Mix (2 mM)
- 0,5–2 μL *forward*-Primer (10 pM)
- 0,5–2 μL *reverse*-Primer (10 pM)
- 0,25 μL *Taq*-Polymerase
- mit DNA-freiem Wasser auf 50 μL auffüllen

Das folgende PCR-Programm ist der Standard für alle durchgeführten konventionellen PCR:

- Initiale Denaturierung: 95 °C für 5 min
- 35-fache Wiederholung der Schritte:
 - Denaturierung: 95 °C für 30 s
 - Primer-Annealing: 50–70 °C (abhängig von den Primern) für 30 s
 - Elongation: 72 °C für 30 s
- Abschließende Elongation: 72 °C für 7 min

Zum *multiplexing* wird die PCR identisch ausgeführt, es werden aber die Primer von maximal drei Primerpaaren mit Volumen von 0,5–2 μL verwendet, dafür weniger Wasser.

PCR mit *Pfu*-Polymerase

Für die PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase wird folgender Mastermix pro Probe angesetzt:

- 1 µg DNA
- 5 µL 10x PCR-Puffer
- 5 µL dNTP-Mix (2 mM)
- 1 µL *forward*-Primer (10 pM)
- 1 µL *reverse*-Primer (10 pM)
- mit DNA-freiem Wasser auf 50 µL auffüllen

Für eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase wird folgendes Programm durchlaufen:

- Initiale Denaturierung: 95 °C für 3 min
- 35-fache Wiederholung der Schritte:
 - Denaturierung: 95 °C für 30 s
 - Primer-Annealing: 57 °C für 30 s
 - Elongation: 72 °C für 2 min
- Abschließende Elongation: 72 °C für 15 min

Kolonie-PCR

Einzelne Bakterienkolonien auf der Agarplatte werden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in ein mit 10 µL DNA-freiem Wasser gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wird 5 min bei 95 °C inkubiert, dann dienen 5 µL dieser Probe als Template in einer nachfolgenden PCR mit *Taq*-Polymerase eingesetzt. Der Nachweis positiver Kolonien erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese mit dem reinen Insert als Positiv- und Wasser als NTC.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Agarosegele werden 1 g Agarose (1%ige Gele) bzw. 1,5 g Agarose (1,5%ige Gele) in 100 mL TAE-Puffer suspendiert und in einer Mikrowelle bei 600 W kurz aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 60 °C werden 10 µL EtBr-Lösung zugesetzt und das Gel in die Gelstation gegossen. Die PCR-Proben werden 1:1 mit dem 2x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung der Amplikons erfolgt für rund 1 h bei 100 V. Die Visualisierung der Gele wird mit UV-Detektion mit einem UV-Tisch (Gel iX Imager, Intas, Göttingen) durchgeführt.

Nested-PCR

Im *one-tube*-Fall wird eine normale Multiplex-PCR durchgeführt, dabei wird zu den drei Primerpaaren für das *multiplexing* noch 0,5–2 µL je Primer der drei Nested-Primerpaare zugegeben. Beim *one-tube/one-tube* bzw. *one-tube/three-tubes* erfolgt zunächst eine konventionelle PCR. Diese wird entweder für 20 oder für 40 Zyklen durchgeführt. 1 µL dieser Reaktionsmischung werden entnommen und in einer weiteren Multiplex- (*one-tube*) oder drei konventionellen PCR (*three-tubes*) als

Template verwendet. Die zweiten PCR-Reaktionen erfolgen ebenfalls gemäß **A.5.2** bei optimaler Annealing-Temperatur der Nested-Primer. Die Auswertung erfolgt mittels 2100 Bioanalyzer, mikrofluidischen Chips und Reagenzien des DNA 1000 Kits gemäß Herstellervorgaben.

Loop-mediated isothermal amplification

Die LAMP-Reaktion wird genau wie in der Herstelleranleitung unter Punkt 3 und 4 beschrieben durchgeführt. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgt als Endpunktbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese oder durch Zugabe von 0,5 µL EtBr-Lösung und Verwendung einer UV-Lampe oder des UV-Tischs.

Aufbau des DNA-Arbeitsplatzes

Es wird eine DNA-Workstation (Kisker, Steinfurt) angeschafft, welche ausschließlich für qPCR-Anwendungen genutzt wird. Eine UV-Quelle denaturiert unerwünschte DNA an Reagenzien, Verbrauchsmitteln und Pipettierhilfen und trägt der enormen Sensitivität und dem damit verbundenen hohen Kontaminationsrisiko der *real-time* PCR Rechnung. Sämtliche benötigte Reagenzien werden nur an diesem Arbeitsplatz hergestellt und verwendet. Zusätzlich werden spezielle mit einem Filtereinsatz versehene DNA freie Pipettenspitzen und stets originalverpackte Reaktionsgefäße verwendet. Dies ist vor allem der in biotechnologischen Laboratorien ubiquitär vorhandenen *E. coli*-DNA geschuldet, dient aber auch zur Absicherung der Experimente mit pflanzlicher DNA, denn in beiden Fällen weisen die zu untersuchenden Targets keine Exon/Exon-Grenzen für ein Design kontaminationsunanfälliger Primerpaare auf.

***Real-time* PCR mit SYBR Green I**

Zur Herstellung der Mastermixe werden folgende Substanzen verwendet:

- 12,5 µL 2x SYBR-Supermix
- 0,25-1 µL *forward*-Primer (10 pM)
- 0,25-1 µL *reverse*-Primer (10 pM)
- mit DNA-freiem Wasser auf 25 µL auffüllen

Der vorbereitete Mastermix wird in die entsprechenden PCR-Platten (Bio-Rad) pipettiert und final mit 5 µL cDNA bzw. 50 ng genomischer DNA versetzt. Die Platte wird mit PCR-Folie (Bio-Rad) verklebt und in den Thermocycler überführt. Für die *real-time* Experimente wird standardgemäß folgendes PCR-Programm verwendet:

- Initiale Denaturierung: 50 °C für 2 min und 95 °C für 3 min
- 40 Amplifikationszyklen je:
 - Denaturierung: 95 °C für 15 s
 - Primer-Annealing: 49-68 °C (abhängig von den Primern) für 30 s
 - Elongation: 72 °C für 30 s
- Abschließende Elongation: 72 °C für 10 min
- Denaturierung und Reassoziaton zur Vorbereitung für die Schmelzkurvenanalyse

- 95 °C für 45 s
- Schmelzkurvenanalyse:
 - 50 °C Starttemperatur, 30 s je Schritt, Gradient 0,5 °C, 95 °C Endtemperatur

Alternativ kann auch ein Zwei-Schritt-Protokoll verwendet werden:

- Initiale Denaturierung: 95 °C für 3 min
- 40 Amplifikationszyklen je:
 - Denaturierung: 95 °C für 10 s
 - Annealing und Elongation: 58 °C für 30 s
- Denaturierung und Reassoziaton zur Vorbereitung für die Schmelzkurvenanalyse
 - 95 °C für 45 s
- Schmelzkurvenanalyse:
 - 50 °C Starttemperatur, 30 s je Schritt, Gradient 0,5 °C, 95 °C Endtemperatur

Die Fluoreszenzmessung erfolgt stets in der Elongationsphase. Zur Detektion wird standardmäßig der iQ SYBR Green Supermix benutzt. Als Thermocycler stand ein iQ5 real-time PCR Detection System (Bio-Rad) zur Verfügung, die Aufzeichnung und Primäranalyse der Daten erfolgte mit der iQ Optical System Software (Bio-Rad).

Real-time PCR mit TaqMan-Sonden

Für den Einsatz von TaqMan-Sonden wird der SYBR-Supermix durch den iQ Multiplex Powermix ersetzt und zusätzlich die Sonde (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) zugesetzt. Zum *multiplexing* werden dem Mastermix anstatt Wasser drei Sets an Primerpaaren und drei Sondentypen zugegeben. Es wird weiterhin mit 25 µL Proben gearbeitet. Als Programm wird ausschließlich ein Zwei-Schritt-Protokoll verwendet:

- Initiale Denaturierung: 50 °C für 2 min und 95 °C für 3 min
- 50 Amplifikationszyklen je:
 - Denaturierung: 95 °C für 15 s
 - Annealing und Elongation: 53-59 °C für 1 min

Systembedingt folgt keine Schmelzkurvenanalyse, die Fluoreszenz wird stets in der Elongationsphase gemessen.

A.5.3 Klonierungen

Restriktionsverdau

Von der aufgereinigten und zu schneidenden DNA werden 0,5-1 µg mit je 1 µL pro Restriktionsenzym (10 u/µL) und entsprechendem Restriktionspuffer (Fermentas) versetzt. Die Lösung wird mit Wasser auf 20 µL aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung wird die Reaktion anschließend gestoppt. Das Volumen und die Art des Restriktionspuffers für die unterschiedlichen Doppelverdauungen mit zwei Restriktionsenzymen werden mit Hilfe des DoubleDigest Tools¹³ ermittelt.

¹³www.fermentas.com/en/tools/doubledigest/

Ligation

Restriktionsverdauete und aufgereinigte Vektoren werden im molaren Verhältnis von 5:1 mit dem restriktionsverdauten Insert versetzt. Dazu wird 1 μL T4-DNA-Ligase (5 u/ μL) und 2 μL 10x Ligationspuffer appliziert. Nach Auffüllen der Reaktionslösung mit Wasser auf 20 μL wird die Ligation bei 16 °C über Nacht in einem PCR-Thermocycler durchgeführt.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen mittels Calciumchlorid-Methode

E. coli-Zellen in TB-Medium (0,5 mL, OD₆₀₀ = 0,4 RE) werden 5 min bei 4.000 · g und bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die Zellen in 10 mL gekühlter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Danach wird erneut 5 min rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien werden erneut in 10 mL CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Dann können die kompetenten Zellen aliquotiert (je 120 μL) und bei -80 °C eingefroren werden.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen mittels TSS-Methode

10 mL TB-Medium werden mit einer Kolonie angeimpft und die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,2–0,3 RE für 20 min auf Eis inkubiert und sanft abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1/10 Volumen TSS-Puffer resuspendiert. Die Zellen können sofort zur Transformation eingesetzt werden oder für einige Monate bei -80 °C gelagert werden.

Transformation mittels Hitzeschock

Auf Eis werden chemisch kompetenten Zellen aufgetaut. 25 μL der Zellen werden mit 5 μL eines Ligationsansatzes versetzt. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 15 min und ein 2 min Hitzeschock bei 42 °C. Direkt im Anschluss werden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt und mit 250 μL SOC-Medium appliziert. Dieser Transformationsansatz wird für 60 min bei 300 rpm und 37 °C geschüttelt. Anschließend werden die Zellen für 3 min bei 1.000 · g pelletiert und der Überstand bis auf ca. 100 μL verworfen. Das Restvolumen mit den resuspendierten Zellen wird auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

Herstellung von Agarplatten

1 L LB-Agar werden autoklaviert (20 min, 121 °C) und nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wird das jeweilige Antibiotikum zugegeben (Ampicillin: 4 mL Stammlösung (25 mg/mL); Chloramphenicol: 3 mL (10 mg/mL); Kanamycin: 0,88 mL (34 mg/mL)). Das so vorbereitete Medium wird in Petrischalen gegossen. Für ein Blau-Weiß-Screening können noch 40 mg X-Gal und 120 mg IPTG zugesetzt werden.

Sticky ends

Die Generierung der Inserts erfolgt mit *Pfu*-Polymerase. Es werden spezielle Primer verwendet welche zum Anbau von Restriktionsschnittstellen an die beiden Enden der Zielsequenz dienen. Nach Auftrennung und Visualisierung über Agarose-Gelelektrophorese werden die Banden mittel

Gelextraktion aufgereinigt und Vektor sowie PCR-Produkte separat mittels zweier Restriktionsendonukleasen geschnitten. Durch nachfolgende Ligation des aufgereinigten linearisierten Vektors mit dem aufgereinigten geschnittenen Insert wird das Vektor-Insertkonstrukt erhalten. Dazu werden die Vektoren pGEM-3Z (Standard für die *real-time* PCR mit VEGF, XbaI/SalI) und pGEM-5Zf(+) (VEGF, NdeI/PstI und Bärlauch *its*, PstI/NotI) und *E. coli* JM109- sowie XL1-Blue-Zellen eingesetzt.

Bei der Umklonierung von VEGF kann, ausgehend von diesem Vektor durch erneuten Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen, die Sequenz in den mit denselben Enzymen linearisierten Expressionsvektor pET-29a(+) eingeführt werden (VEGF, NotI/NdeI bzw. S-Tag-VEGF, NotI/SacI). Anschließend werden die beiden erhaltenen Vektoren in *E. coli* Rosetta2(DE3)pLysS transformiert und die Zellen auf Agarplatten ausplattiert. Einzelne Klone werden gepickt und in Flüssigkultur im Schüttelkolben überführt und angezogen. Zur Überprüfung der erhaltenen Plasmide wird sich der Kolonie-PCR, einer umfassenden Restriktionsanalyse und Sequenzierung bedient.

Blund ends

Zunächst erfolgt ein Restriktionsverdau des Vektors pGEM-5Zf(+) mit EcoRV-Restriktionsenzymen und dem folgenden Protokoll für 2 h bei 37 °C:

- 2 µg pGEM-5Zf(+)
- 4 µL 10x Puffer R (Fermentas)
- 4 µL EcoRV
- 32 µL Wasser

Nach Herstellung von Inserts mittels *Pfu*-Polymerase, Gelextraktion und Gelaufreinigung der linearisierten Vektoren erfolgt die Ligation nach den Standardprotokoll. XL1-Blue-Zellen werden mit den Ligationsansätzen transformiert und auf Agarplatten ausplattiert. Es folgt die Flüssigkultur und Analyse des Klonierungserfolgs.

Cut ligation

Für diese Methode wird folgender Ansatz (im molaren Verhältnis 5:1 von PCR-Produkt und Vektor) pipettiert:

- 200 ng Vektor
- 200 ng PCR-Produkt
- 2 µl PEG 4000
- 1 µl EcoRV
- 4 µl 10x Tango-Puffer (Fermentas)
- 1 µl 10 mM ATP
- 1 µl T4-DNA-Ligase

Der Ansatz wird mit Wasser auf 20 µL aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C im Thermocycler inkubiert. Nach der Ligation wird analog zur *blund-end*-Klonierung vorgegangen.

TA-Klonierung

Für die TA-Klonierung werden die Insert mittel *Taq*-PCR generiert und aufgereinigt. Die restliche Reaktion wird vollständig gemäß des Protokolls für das TA Cloning Kit durchgeführt und die Ligationsansätze in *E. coli* One Shot TOP10-Zellen transformiert. Anschließend werden die Zellen wie bei allen Klonierungsreaktionen vermehrt, die Vektoren werden isoliert und analysiert.

Herstellung von Gefrierkulturen

Es wird eine Schüttelkultur angesetzt und bei einer OD_{600} von 0,6 RE 500 μ L dieser Kultur mit 500 μ L Glyceringemisch und auf Eis gekühlt. Anschliesend werden die Gefrierkulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

A.5.4 Kultivierungen und Proteinassays

Schüttelkolbenkultivierung

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden in 100 mL Schüttelkolben 20 mL LB-Medium mit 200 μ L *E. coli*-Gefrierkultur sowie bei Bedarf mit Antibiotika (Ampicillin: 1,36 μ L/mL (25 mg/mL); Chloramphenicol: 3,4 μ L/mL (10 mg/mL); Kanamycin: 1 μ L/mL (34 mg/mL)) versetzt. Die Kultur wird über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 150 rpm inkubiert. Für eine Hauptkultur werden in 500 mL Schüttelkolben 100 mL LB-Medium eingesetzt, dazu wird 1 mL der jeweiligen Vorkultur appliziert.

Zur Produktion von Plasmidstandards wird für 8 h oder über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 150 rpm kultiviert, dann folgt die Plasmidpräparation. Zur VEGF-Produktion wird Kultur 3–5 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 150 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,5–0,8 RE wird durch Induktion mit 1 mL IPTG (1 mM Endkonzentration) die Genexpression eingeleitet. Die Kultur wird weitere 4–8 h im inkubiert.

Reaktorkultivierung

Als Vorkultur dient eine 100 mL Hauptkultur einer Schüttelkolbenkultivierung mit einer OD_{600} von etwa 1 RE. Die Kultivierung wird mit einem Biostat Aplus (Sartorius Stedim Biotech) entsprechend den Vorgaben von Dr. Michael Büring [529] durchgeführt.

Kationenaustauschchromatographie

50 mL Kulturbrühe werden bei $4.000 \cdot g$ für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 20 mL TBS-Puffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Nach zwischenzeitlichem Einfrieren des Zellpellet bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird es bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und in 25 mL Puffer A (10 μ g/mL DNase I (10 mg/L), 2 mM EDTA, 5 Vol.-% Glycerin, 10 mM, β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden fünffach 20 s mit dem Ultra-Turrax (*high speed*) homogenisiert und dann 10 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird auf Eis gekühlt und sechsfach für 15 s mit einer Ultraschallsonde (90 W, 0,6 s Pulsdauer) behandelt. Natriumdeoxycholat und NP-40 (0,05% bzw. 1% Endkonzentration) werden appliziert. Es folgt eine Inkubation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 10 min und eine Zentrifugation bei $4.000 \cdot g$ für 1 h. Das Pellet wird in 25 mL Puffer A zusammen mit 0,05% Natriumdeoxycholat und 1% NP-40 resuspendiert

und erneut 30 min zentrifugiert. Die so gewonnenen *inclusion bodies* werden auf Eis in 25 mL Puffer B (0,1 M DTT, 6 M Harnstoff, 50 mM MES, pH 5,5) resuspendiert. Für die FPLC werden alle Puffer und die Proben steril filtriert und im Ultraschallbad entgast. Das FPLC-Programm lautet wie folgt:

- Equilibrierung der Sartobind S75-Membran mit 15 mL Puffer B (2 mL/min Flussrate)
- 10 mL Proteinprobe werden von der Probenschleife auf die Membran gegeben (1 mL/min)
- Waschen mit Puffer B für 15 min (2 mL/min)
- Proteine werden mit einem Gradienten mit Puffer B (mit einem Zusatz von 300 mM NaCl) eluiert (1 mL/min)

Die Fraktionen werden mittel SDS-PAGE analysiert. Anschließend wird die VEGF-Fraktion mit zwei Volumen Puffer C (0,5 M Cystin, 0,1 M Glycin, 6 M Harnstoff, 20 mM HEPES, pH 7,4) vermischt und 4 h bei 4 °C inkubiert. Zur korrekten Faltung des VEGF wird die Lösung durch Zugabe von PBS mit 50 mM Glycin zu einer Endkonzentration an Harnstoff von 0,3 M verdünnt. Das VEGF wird dann mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und fünffach mit PBS gewaschen.

Heparin-Affinitätschromatographie

50 mL Kultur werden abzentrifugiert (15 min, 4.000 · g). Das Zellpellet wird in 4 mL 5 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl resuspendiert. Die Lösung wird gekühlt und dreifach jeweils 1 min mit Ultraschall (90 W, 0,6 s) behandelt. Der Zellaufschluss wird bei 4.000 · g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend mit 4 mL 5 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl gewaschen. Die erhaltenen *inclusion bodies* werden in 4 mL 7,5 M Harnstofflösung suspendiert und zur Proteinfaltung 1:10 mit 7 µM CuCl₂, 20 mM Tris/HCl, pH 8,4 verdünnt. Der Ansatz wird danach über Nacht bei RT inkubiert. Es folgt die FPLC:

- Equilibrierung der HiTrap Heparin HP-Säule mit 10 mL Bindungspuffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7,0) bei einer Flussrate von 1 mL/min
- 10 mL Proteinprobe werden über die Probenschleife auf die Säule gegeben (0,5 mL/min)
- Waschen mit 10 mL Bindungspuffer (1 mL/min)
- Elution mit 15 mL Elutionspuffer (10 mM Natriumphosphat, 2 M NaCl, pH 7,0) bei 0,5 mL/min
- Spülen mit 10 mL Bindungspuffer (1 mL/min)

Die Elutionsfraktionen werden einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Es folgt ein weiterer Faltungsschritt indem die VEGF-Lösung mit zwei Volumen Puffer C vermischt und 4 h bei 4 °C inkubiert wird. Dann wird mit 1x PBS und 50 mM Glycin zu einer Endkonzentration an Harnstoff von 0,3 M verdünnt. Das VEGF wird mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und gewaschen.

S-Tag-Aufreinigung

Die Aufreinigung des S-getaggten VEGF wird mit dem S · Tag Thrombin Purification Kit durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben sowie die Durchführung wird nach Herstelleranweisung durchgeführt.

SDS-Page

Zum Nachweis von VEGF auf Proteinebene wird eine Zellkultur abzentrifugiert (15 min, 4.000 · g). Der Überstand wird verworfen und die Pellets in 4 mL 1x PBS resuspendiert. Mit einer Ultraschallsonde erfolgt der Zellaufschluss dreifach für 1 min (90 W, 0,6 s) unter Eiskühlung. Zellbestandteile werden abzentrifugiert und sowohl lösliche Fraktion als auch die unlöslichen Fraktion für die SDS-PAGE genutzt.

Tab. A.20: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen.

Trenngelkomponente	12%	16%	Sammelgelkomponente	6%
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1), 40%	4,5 mL	6,0 mL	Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1), 40%	750 µL
SDS (1%)	1,5 mL	1,5 mL	SDS (1%)	300 µL
Tris/HCL (1,5 M), pH 8,8	4,2 mL	4,2 mL	Tris/HCL (1,5 M), pH 8,8	630 µL
Wasser	4,8 mL	3,3 mL	Wasser	3,77 mL
TEMED	30 µL	30 µL	TEMED	310 µL
APS (25%)	30 µL	30 µL	APS (25%)	10 µL

CellTiter-Blue-Assay

Der CellTiter-Blue-Assay beruht auf der Metabolisierung des blauen Redoxfarbstoffes Resazurin zu dem pinken fluoreszenten Farbstoff Resorufin. Da sterbende Zellen innerhalb kurzer Zeit ihre metabolische Aktivität verlieren, erzeugen diese kein fluoreszentes Signal. Für den CellTiter-Blue-Assay werden 1.500 HUVEC-Zellen pro Kavität einer 96-Lochplatte in 300 µL entsprechendem Medium ausgesät und für 10 Tage kultiviert. Nach je zwei Tagen erfolgt ein Mediumswechsel. Für die Durchführung des Tests werden 10% CellTiter-Blue-Reagenz zu jedem Ansatz. Nach 3–4 h der Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wird die Fluoreszenz bei 560 nm (Extinktion) und 590 nm (Emission) sowie die Absorption bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch bestimmt.

A.5.5 Genomgrößenbestimmung

Isolierung pflanzliche Zellkerne

In einer Petrischale werden ca. 2 cm² Blattgewebe pro mL Otto-I-Puffer verwendet. Das Blattgewebe wird mit einer Rasierklinge in eiskaltem Puffer in ca. 2 · 5 mm große Stücke zerteilt, wobei darauf geachtet wird, dass das Gewebe immer mit Puffer benetzt ist. Nach dem Zerkleinern wird die Petrischale vorsichtig geschwenkt um die Freisetzung der Kerne zu unterstützen. Es folgt ein Filtrationsschritt durch eine 40 µm Nylonmembran, anschließend die Zentrifugation bei 200 · g für 5 min. Der Überstand wird abgenommen und verworfen, 100 µl frischer eiskalter Otto-I-Puffer wird zugegeben und das Pellet resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 mL Otto-II-Puffer werden die Kerne durch die Zugabe von 50 µL RNase A und 50 µL PI- (1 mg/mL) bzw. 40 µL DAPI-Lösung (0,1 mg/mL) angefärbt und im Zytometer (Epics XL, Beckman Coulter, Brea, USA) mit Standardeinstellungen vermessen.

Die Isolierung mittels Galbraith-, LB01- und Tris.MgCl₂-Puffer wird dagegen in einem einzigen Schritt durchgeführt. Hier wird das Pflanzenmaterial zunächst im entsprechenden Puffer mit der

Rasierklinge zerkleinert und durch eine 40 μm Nylonmembran filtriert. Es entfällt der Zentrifugationsschritt und die Zellkerne werden direkt im Anschluss durch Zugabe des entsprechenden Farbstoffs angefärbt und vermessen.

Mikroskopische Untersuchungen

Für die mikroskopische Untersuchung wird bei jeder Extraktionsmethode der Filtrationsschritt ausgelassen. Dieser ist nur für die zytometrische Messung wichtig, da große Trümmer das Zytometer verstopfen könnten. Die Zellkernlösung wird direkt auf einen Objektträger überführt und durch Auftropfen des gewünschten Farbstoffs gefärbt. Die Zellkerne können in einer Zellschälkammer quantifiziert werden.

Zytometrische Untersuchungen

Die Zellkernlösung wird sofort nach der Filtration in ein Zytometergefäß überführt, darin angefärbt und vermessen. Falls nicht genug Zellkerne gemessen werden, kann zum Aufkonzentrieren die filtrierte Lösung in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei $200 \cdot g$ zentrifugiert werden. Es wird 1 mL des Überstands entfernt, das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert und erneut in ein Zytometergefäß überführt und vermessen.

A.6 Zusätzliche experimentelle Daten

Tab. A.21: Steigungen und Achsenabschnitte der Geradengleichungen für die „universelle“ Kalibration.

Spezies	Target	Plasmid-DNA		Pflanzen-DNA	
		Steigung (m)	Achsenabschnitt (b)	Steigung (m)	Achsenabschnitt (b)
Bärlauch	<i>its1</i>	-2,9217	34,402	-3,4648	18,112
	<i>its2</i>	-3,1738	36,418	-3,286	18,289
	<i>msl</i>	-3,2259	37,284	-3,153	29,484
	<i>pi-2</i>	-3,1085	41,088	-3,2731	29,822
	<i>trnL-trnF</i>	-3,0453	35,903	-3,0286	30,824
Mistel	<i>its1</i>	-3,2858	43,211	-3,2125	26,378
	<i>its2</i>	-2,7878	33,332	-3,5076	23,651
	<i>trnH-trnK</i>	-2,808	31,913	-3,357	23,239
	<i>trnS-trnFM</i>	-2,6309	31,67	-3,5088	24,093
		-2,6662	32,246	-3,3707	23,212
Weißdorn	<i>its1</i>	-3,2399	37,593	-3,2305	24,402
	<i>its1</i>	-3,3803	42,289	-3,4059	25,717
	<i>rpoB</i>	-2,9575	34,477	-3,3717	23,803
	<i>trnL-trnF</i>	-3,188	37,254	-3,2073	23,875
		-3,0957	36,677	-2,9357	23,854
	<i>trnM-atpE</i>	-2,9574	37,588	-2,9105	29,55

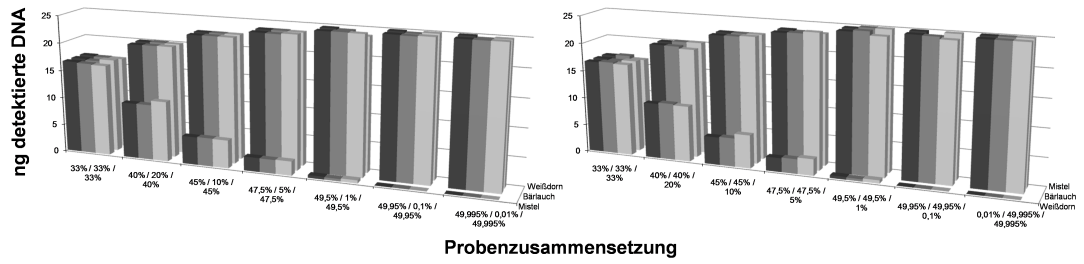


Abb. A.20: Weitere Daten zu Abb. 4.69.

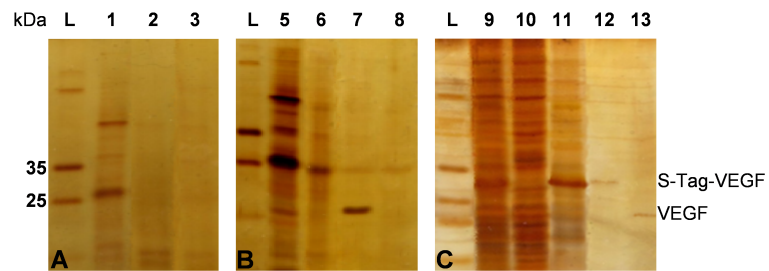


Abb. A.21: Weitere Daten zu Abb. A.18.

Literaturverzeichnis

- [1] JUNGNICKEL, K. *Salbei: Salvia officinale*. Die Natur ist der Arzt. NHV Theophrastus, Chemnitz, 2004.
- [2] ELSINGHORST, P. W., CAVLAR, T., MÜLLER, A., BRAUNE, A., BLAUT, M. UND GÜTSCHOW, M. The thermal and enzymatic taxifolin-alphitonin rearrangement. *J Nat Prod*, 74(10):2243–2249, 2011.
- [3] PANDALIS, G. UND KIESEWETTER, H. *Verwendung von Bärlauch zur Therapie oder Prophylaxe von Durchblutungsstörungen*. Europäisches Patenamt, PCT/EP1993/002442, 1994.
- [4] VED, D. K. UND GORAYA, G. S. *Demand and supply of medicinal plant in india*. National Medicinal Plants Board, Neu-Delhi, Indien, 2007.
- [5] Sandakan Rainforest Park. *Medicinal plants*. www.sandakanrfp.sabah.gov.my/medicinal%20plants.htm, 2007.
- [6] SENDL, A. Allium sativum and Allium ursinum: part 1. Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine*, 1(4):323–339, 1995.
- [7] SMEETS, K., VAN DAMME, E. J. UND PEUMANS, W. J. Comparative study of the post-translational processing of the mannose-binding lectins in the bulbs of garlic (*Allium sativum* L.) and ramsons (*Allium ursinum* L.). *Glycoconj J*, 11(4):309–320, 1994.
- [8] PREUSS, H. G., CLOUATRE, D., MOHAMADI, A. UND JARRELL, S. T. Wild garlic has a greater effect than regular garlic on blood pressure and blood chemistries of rats. *Int Urol Nephrol*, 32(4):525–530, 2001.
- [9] Ramsdale Family Register. *Ramsons - wild garlic*. Allium ursinum. www.ramsdale.org/ramsons.htm, 2009.
- [10] WICHTL, M. *Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2002.
- [11] KOSCIELNY, J., KLUSSENDORF, D., LATZA, R., SCHMITT, R., RADTKE, H., SIEGEL, G. UND KIESEWETTER, H. The antiatherosclerotic effect of Allium sativum. *Atherosclerosis*, 144(1):237–249, 1999.
- [12] AL-QATTAN, K. K., KHAN, I., ALNAQEEB, M. A. UND ALI, M. Mechanism of garlic (*Allium sativum*) induced reduction of hypertension in 2K-1C rats: a possible mediation of Na/H exchanger isoform-1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 69(4):217–222, 2003.
- [13] SCHMITT, B., SCHULZ, H., STORSBERG, J. UND KEUSGEN, M. Chemical characterization of Allium ursinum L. depending on harvesting time. *J Agric Food Chem*, 53(18):7288–7294, 2005.
- [14] PANGKAHILA, W. *Clinical trial on herbal medicine*. International Symposium for Biology, Chemistry, Pharmacology and Clinical Studies of Asian Plants, Surabaya, Indonesien, 2007.
- [15] KUMARI, K., MATHEW, B. C. UND AUGUSTI, K. T. Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from Allium cepa Linn. *Indian J Biochem Biophys*, 32(1):49–54, 1995.
- [16] REUTER, H. D. Allium sativum and Allium ursinum: part 2. Pharmacology and medicinal application. *Phytomedicine*, 2(1):73–91, 1995.
- [17] ERNST, E. Can Allium vegetables prevent cancer? *Phytomedicine*, 4(1):79–83, 1997.
- [18] LANDSHUTER, J., LOHMULLER, E. M. UND KNOBLOCH, K. Purification and characterization of a C-S-lyase from ramson, the wild garlic, Allium ursinum. *Planta Med*, 60(4):343–347, 1994.
- [19] DINGERMAN, T., HÄNSEL, R. UND ZÜNDORF, I. *Pharmazeutische Biologie: Molekulare Grundlagen und klinische Anwendung*. Springer-Verlag, Berlin, 2002.
- [20] RABINKOV, A., ZHU, X. Z., GRAFI, G., GALILI, G. UND MIRELMAN, D. Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning. *Appl Biochem Biotechnol*, 48(3):149–171, 1994.

- [21] SMEETS, K., VAN DAMME, E. J., VAN LEUVEN, F. UND PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of lectins and lectin-alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*). *Glycoconj J*, 14(3):331–343, 1997.
- [22] GARDNER, C. D., LAWSON, L. D., BLOCK, E., CHATTERJEE, L. M., KIAZAND, A., BALISE, R. R. UND KRAEMER, H. C. Effect of raw garlic vs. commercial garlic supplements on plasma lipid concentrations in adults with moderate hypercholesterolemia: a randomized clinical trial. *Arch Intern Med*, 167(4):346–353, 2007.
- [23] GHODRATI AZADI, H., GHAFFARI, S. M., RIAZI, G. H., AHMADIAN, S. UND VAHEDI, F. Antiproliferative activity of chloroformic extract of persian shallot, *Allium hirtifolium*, on tumor cell lines. *Cytotechnology*, 56(3):179–185, 2008.
- [24] Natürliche Medizin aus der Kräutergarten-Apotheke. *Mistel*. *Viscum album*. www.naturmedizin.lauftext.de/mistel.htm, 2009.
- [25] GERHARD, I., ABEL, U., LÖWE-MESCH, A., HUPPMANN, S. UND KÜHN, J. J. Problematik randomisierter Studien in der Komplementärmedizin dargestellt am Beispiel der Misteltherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd*, 11(3):150–157, 2004.
- [26] SCHEER, R., BAUER, R., BECKER, H., FICHELTMANN, V., KEMPER, F. H. UND SCHILCHER, H. *Die Mistel in der Tumorthherapie*. Grundlagenforschung und Klinik. 3. Mistelsymposium, Nonnweiler-Otzenhausen, 2003.
- [27] SENGUL, M., YILDIZ, H., GUNGOR, N., CETIN, B., ESER, Z. UND ERCISLI, S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci*, 22(1):102–106, 2009.
- [28] SCHEER, R., BAUER, R., BECKER, H., FINTELMANN, V., KEMPER, F. H. UND SCHILCHER, H. *Fortschritte in der Misteltherapie: Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. KVC Verlag, Essen, 2005.
- [29] FREUDLSPERGER, C., DAHL, A., HOFFMANN, J., REINERT, S. UND SCHUMACHER, U. Mistletoe lectin-I augments antiproliferative effects of the PPARgamma agonist rosiglitazone on human malignant melanoma cells. *Phytother Res*, 24(9):1354–1358, 2010.
- [30] JÄGER, S., BEFFERT, M., HOPPE, K., NADBerezny, D., FRANK, B. UND SCHEFFLER, A. Preparation of herbal tea as infusion or by maceration at room temperature using mistletoe tea as an example. *Sci Pharm*, 79(1):145–155, 2011.
- [31] LYU, S. Y. UND PARK, W. B. Transport of mistletoe lectin by M cells in human intestinal follicle-associated epithelium (FAE) in vitro. *Arch Pharm Res*, 31(12):1613–1621, 2008.
- [32] LYU, S. Y. UND PARK, W. B. Mistletoe lectin transport by M-cells in follicle-associated epithelium (FAE) and IL-12 secretion in dendritic cells situated below FAE in vitro. *Arch Pharm Res*, 33(9):1433–1441, 2010.
- [33] LYU, S. Y., KWON, Y. J., JOO, H. J. UND PARK, W. B. Preparation of alginate/chitosan microcapsules and enteric coated granules of mistletoe lectin. *Arch Pharm Res*, 27(1):118–126, 2004.
- [34] KIENLE, G. S. UND KIENE, H. *Die Mistel in der Onkologie: Fakten und konzeptionelle Grundlagen*. Schattauer, Stuttgart, 2003.
- [35] KIENE, H. Klinische Studien zur Misteltherapie karzinomatöser Erkrankungen. Eine Übersicht. *Therapeutikon*, 33(3):347–353, 1989.
- [36] KLEIJNEN, J. UND KNIPSCHILD, P. Mistletoe treatment for cancer: review of controlled trials in humans. *Phytomedicine*, 1(3):255–260, 1994.
- [37] KIENLE, G. S., BERRINO, F., BUSSING, A., PORTALUPI, E., ROSENZWEIG, S. UND KIENE, H. Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res*, 8(3):109–119, 2003.
- [38] ARNOLD, W. *Crataegus monogyna - Eingriffeliger Weißdorn*. Heilpflanzen. www.awl.ch/heilpflanzen/crataegus_arten/index.htm, 2010.
- [39] Enciklopedija Narodne Medicine. *Glog - Crataegus laevigata*. www.herbalia.org/index.php?id=crataegus-laevigata, 2011.
- [40] WANG, T., AN, Y., ZHAO, C., HAN, L., BOAKYE-YIADOM, M., WANG, W. UND ZHANG, Y. Regulation effects of *Crataegus pinnatifida* leaf on glucose and lipids metabolism. *J Agric Food Chem*, 59(9):4987–4994, 2011.

- [41] BARROS, L., CARVALHO, A. M. UND FERREIRA, I. C. Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochem Anal*, 22(2):181–188, 2011.
- [42] KIRAKOSYAN, A., SEYMOUR, E., KAUFMAN, P. B., WARBER, S., BOLLING, S. UND CHANG, S. C. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agric Food Chem*, 51(14):3973–3976, 2003.
- [43] LIU, T., CAO, Y. UND ZHAO, M. Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. *major*) fruits. *Food Chem*, 119(4):1656–1662, 2010.
- [44] SCHÜSSLER, M., HÖLZL, J. UND FRICKE, U. Myocardial effect of flavonoids from *Crataegus* species. *Arzneim Forsch*, 45(8):842–845, 1995.
- [45] KIM, S. H., KANG, K. W., KIM, K. W. UND KIM, N. D. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci*, 67(2):121–131, 2000.
- [46] BRIXIUS, K., WILLMS, S., NAPP, A., TOSSIOS, P., LADAGE, D., BLOCH, W., MEHLHORN, U. UND SCHWINGER, R. H. *Crataegus* special extract WS 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20(3):177–184, 2006.
- [47] TWAJ, H. A. A., KER'Y, A. A., JEBOORY, A. A. UND HAMMAD, M. N. *Crataegus azarolus* Linn. pharmacology and phytochemistry: part I. Pharmacology. *J Biol Sci Res*, 18(1):105–126, 1987.
- [48] RAJENDRAN, S., DEEPALAKSHMI, P. D., PARASAKTHY, K., DEVARAJ, H. UND DEVARAJ, S. N. Effect of tincture of *Crataegus* on the LDL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis*, 123(2):235–241, 1996.
- [49] SHANTHI, R., PARASATHY, K., DEEPALAKSHMI, P. D. UND NIRANJALI, D. S. Protective effect of tincture of *Crataegus* on oxidative stress in experimental atherosclerosis in rats. *J Clin Biochem Nutr*, 20(1b):211–213, 1996.
- [50] CHATTERJEE, S. S., KOCH, E., JAGGY, H. UND KRZEMINSKI, T. In vitro and in vivo investigations on the cardioprotective effects of oligomeric procyanidins of a *Crataegus* extract from leaves with flowers. *Arzneim Forsch*, 47(8):821–825, 1997.
- [51] CHEN, Z. Y., ZHANG, Z. S., KWAN, K. Y., ZHU, M., HO, W. K. UND HUANG, Y. Endothelium-dependent relaxation induced by hawthorn extract in rat mesenteric artery. *Life Sci*, 63(22):1983–1991, 1998.
- [52] AL MAKDESSI, S., SWEIDAN, H., DIETZ, K. UND JACOB, R. Protective effect of *Crataegus oxyacantha* against reperfusion arrhythmias after global no-flow ischemia in the rat heart. *Basic Res Cardiol*, 94(2):71–77, 1999.
- [53] SCHWINGER, R. H., PIETSCH, M., FRANK, K. UND BRIXIUS, K. *Crataegus* special extract WS 1442 increases force of contraction in human myocardium cAMP-independently. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35(5):700–707, 2000.
- [54] DEGENRING, F. H., SUTER, A., WEBER, M. UND SALLER, R. A randomised double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus* berries (*Crataegisan*) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine*, 10(5):363–369, 2003.
- [55] QUITTIER-DELEU, C., VOISELLE, G., FRUCHART, J. C., DURIEZ, P., TEISSIER, E., BAILLEUL, F., VASSEUR, J. UND TROTIN, F. Hawthorn extract inhibit LDL oxidation. *Pharmazie*, 58(5):577–581, 2003.
- [56] SVEDSTROM, U., VUORELA, H., KOSTIAINEN, R., LAAKSO, I. UND HILTUNEN, R. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoids prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr A*, 1112(1):103–111, 2006.
- [57] BERNATONIENE, J., MASTEIKOVA, R., MAJIENE, D., SAVICKAS, A., KEVELAITIS, E., BERNATONIENE, R., DVORACKOVA, K., CIVINSKIENE, G., LEKAS, R., VITKEVICIUS, K. UND PECIURA, R. Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina*, 44(9):706–712, 2008.
- [58] KISELOVA, Y., IVANOVA, D., CHERVENKOV, T., GEROVA, D., GALUNSKA, B. UND YANKOVA, T. Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytother Res*, 20(11):961–965, 2006.
- [59] AHUMADA, C., SÁENZ, T., GARCÍA, D., DE LA PUERTA, R., FERNANDEZ, A. UND MARTINEZ, E. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A2 inhibition. *J Pharm Pharmacol*, 49(3):329–331, 1997.

- [60] TADIĆ, V. M., DOBRIĆ, S., MARKOVIĆ, G. M., DORDEVIĆ, S. M., ARSIĆ, I. A., MENKOVIĆ, N. R. UND STEVIĆ, T. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J Agric Food Chem*, 56(17):7700–7709, 2008.
- [61] ROGERS, K. L., GRICE, I. D. UND GRIFFITHS, L. R. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of australian plants used traditionally as headache treatments. *Eur J Pharm Sci*, 9(4):355–363, 2000.
- [62] LESKOVAC, A., JOKSIC, G., JANKOVIC, T., SAVIKIN, K. UND MENKOVIC, N. Radioprotective properties of the phytochemically characterized extracts of *Crataegus monogyna*, *Cornus mas* and *Gentianella austriaca* on human lymphocytes in vitro. *Planta Med*, 73(11):1169–1175, 2007.
- [63] RIETZ, B., ISENSEE, H., STROBACH, H., AL MAKDESSI, S. UND JACOB, R. Cardioprotective actions of wild garlic (*Allium ursinum*) in ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*, 119(1):143–150, 1993.
- [64] ASDAQ, S. M., INAMDAR, M. N. UND ASAD, M. Pharmacodynamic interaction of garlic with propranolol in ischemia-reperfusion induced myocardial damage. *Pak J Pharm Sci*, 23(1):42–47, 2010.
- [65] CAROTENUTO, A., DE FEO, V., FATTORUSSO, E., LANZOTTI, V., MAGNO, S. UND CICALA, C. The flavonoids of *Allium ursinum*. *Phytochemistry*, 41(2):531–536, 1996.
- [66] SENDL, A., ELBL, G., STEINKE, B., REDL, K., BREU, W. UND WAGNER, H. Comparative pharmacological investigations of *Allium ursinum* and *Allium sativum*. *Planta Med*, 58(1):1–7, 1992.
- [67] STAJNER, D., MILIĆ, N., CANADANOVIĆ-BRUNET, J., KAPOR, A., STAJNER, M. UND POPOVIĆ, B. M. Exploring *Allium* species as a source of potential medicinal agents. *Phytother Res*, 20(7):581–584, 2006.
- [68] JANECZKO, Z., SOBOLEWSKA, D. UND PODOLAK, I. Pregnadienolone glycoside from wild garlic *Allium ursinum* L. *Acta Pol Pharm*, 57(2):131–133, 2000.
- [69] GOLUBKINA, N. A., MALANKINA, E. L., KOSHELEVA, O. V. UND SOLOV'eva, A. I. Content of biologically active substances - selenium, flavonoids, ascorbic acid and chlorophyllin of *Allium ursinum* L. and *Allium victorialis* L. *Vopr Pitan*, 79(1):78–81, 2010.
- [70] BEUTH, J., KO, H. L., GABIUS, H. J., BURRICHTER, H., OETTE, K. UND PULVERER, G. Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin Investig*, 70(8):658–661, 1992.
- [71] GÜRBÜZ, I., USTÜN, O., YEŞİLADA, E., SEZİK, E. UND AKYÜREK, N. In vivo gastroprotective effects of five turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. *J Ethnopharmacol*, 83(3):241–244, 2002.
- [72] YOON, T. J., YOO, Y. C., KANG, T. B., SONG, S. K., LEE, K. B., HER, E., SONG, K. S. UND KIM, J. B. Antitumor activity of the korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch Pharm Res*, 26(10):861–867, 2003.
- [73] LEE, J. Y., KIM, J. Y., LEE, Y. G., BYEON, S. E., KIM, B. H., RHEE, M. H., LEE, A., KWON, M., HONG, S. UND CHO, J. Y. In vitro immunoregulatory effects of korean mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biol Pharm Bull*, 30(11):2043–2051, 2007.
- [74] HEINY, B. M. Additive Therapie mit standardisiertem Mistelextrakt reduziert die Leukopenie und verbessert die Lebensqualität von Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom unter palliativer Chemotherapie (VEC-Schema). *Krebsmedizin*, 12(1):1–14, 1991.
- [75] BEUTH, J., STOFFEL, B., KO, H. L., BUSS, G., TUNGGAL, L. UND PULVERER, G. Immunoactive effects of various mistletoe lectin-1 dosages in mammary carcinoma patients. *Arzneim Forsch*, 45(4):505–507, 1995.
- [76] KIENLE, G. S., GLOCKMANN, A., SCHINK, M. UND KIENE, H. *Viscum album* L. extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. *J Exp Clin Cancer Res*, 28(1):79–111, 2009.
- [77] STEUER-VOGT, M. K., BONKOWSKY, V., AMBROSCH, P., SCHOLZ, M., NEISS, A., STRUTZ, J., HENNIG, M., LENARZ, T. UND ARNOLD, W. The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. *Eur J Cancer*, 37(1):23–31, 2001.
- [78] SCHUMACHER, K., SCHNEIDER, B., REICH, G., STIEFEL, T., STOLL, G., BOCK, P. R., HANISCH, J. UND BEUTH, J. Postoperative komplementäre Therapie des primären Mammakarzinoms mit lektinnormiertem Mistelextrakt - eine epidemiologische, kontrollierte, multizentrische retrolektive Kohortenstudie. *Dtsch Z Onkol*, 34(1):106–144, 2002.

- [79] SEIFERT, G., JESSE, P., LÄNGLER, A., REINDL, T., LUTH, M., LOBITZ, S., HENZE, G., PROKOP, A. UND LODE, H. N. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett*, 264(2):218–228, 2008.
- [80] FRITZ, P., MÜRDTER, T. E., SIEGLE, I., AULITZKY, W. UND VOELTER, W. Therapie mit Mistelextrakten in der Onkologie: Eine Kontroverse ohne Ende? *Onkologe*, 7(11):1247–1252, 2001.
- [81] LYU, S. Y. UND PARK, W. B. Mistletoe lectin modulates intestinal epithelial cell-derived cytokines and B cell IgA secretion. *Arch Pharm Res*, 32(3):443–451, 2009.
- [82] DUONG VAN HUYEN, J. P., BAYRY, J., DELIGNAT, S., GASTON, A. T., MICHEL, O., BRUNEVAL, P., KAZATCHKINE, M. D., NICOLETTI, A. UND KAVERI, S. V. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med*, 8(10):600–606, 2002.
- [83] ARNOLD, W. *Viscum album - Mistel*. Heilpflanzen. www.awl.ch/heilpflanzen/viscum_album/index.htm, 2012.
- [84] Die Gesundheitsplattform. *Mistel - vom Mythos zur Heilpflanze*. Krebserkrankungen. www.medichi.de/gesundheits-gestoert/krebserkrankungen/98-mistel-vom-mythos-zur-heilpflanze.html, 2011.
- [85] CEBOVIC, T., SPASIC, S. UND POPOVIC, M. Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells in vivo. *Phytother Res*, 22(8):1097–1103, 2008.
- [86] URBONAVICIŪTE, A., JAKSTAS, V., KORNYSOVA, O., JANULIS, V. UND MARUSKA, A. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. *J Chromatogr A*, 1112(2):339–344, 2006.
- [87] PARDO-DE-SANTAYANA, M., TARDÍO, J. UND MORALES, R. The gathering and consumption of wild edible plants in the campoo (cantabria, spain). *Int J Food Sci Nutr*, 56(7):529–542, 2005.
- [88] CHANG, Q., ZUO, Z., HARRISON, F. UND CHOW, M. S. Hawthorn. *J Clin Pharmacol*, 42(6):605–612, 2002.
- [89] FRÖHLICHER, T., HENNEBELLE, T., MARTIN-NIZARD, F., CLEENEWERCK, P., HILBERT, J. L., TROTIN, F. UND GREC, S. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem*, 115(3):897–903, 2009.
- [90] RAUDONIS, R., JAKSTAS, V., BURDULIS, D., BENETIS, R. UND JANULIS, V. Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method. *Medicina*, 45(5):382–394, 2009.
- [91] SCHÜSSLER, M., FRICKE, U., NIKOLOV, N. UND HÖLZL, J. Comparison of the flavonoids occurring in *Crataegus* species and inhibition of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase. *Planta Med*, 57(2):A133, 1991.
- [92] LACAILLE-DUBOIS, M. A., FRANCK, U. UND WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 8(1):47–52, 2001.
- [93] SCHILCHER, H., KAMMERER, S. UND WEGENER, T. Grundlegendes zur rationalen Phytotherapie. In: Schilcher, H., Kammerer, S. und Wegener, T. (Hrsg.). *Leitfaden Phytotherapie*, 1:1–30. Elsevier, München, 2010.
- [94] Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V. (BAH). *Zulassung und Registrierung von Phytopharmaka*. www.bah-bonn.de/index.php?id=180, 2011.
- [95] Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). *Deutsches Arzneibuch*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1998.
- [96] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *Pharmacopoea Europaea*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2012.
- [97] HÄNSEL, R. UND SPIESS, E. Pflanzliche Arzneidrogen und einfache Arzneizubereitungen. In: Hänzel, R. und Sticher, O. (Hrsg.). *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 8:189–224. Springer-Verlag, Berlin, 2007.
- [98] HAO, D., CHEN, S., XIAO, P. UND PENG, Y. Authentication of medicinal plants by DNA-based markers and genomics. *Chin Herb Med*, 2(4):250–261, 2010.
- [99] HEUBL, G. New aspects of DNA-based authentication of chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Med*, 76(17):1963–1974, 2010.
- [100] Society of Japanese Pharmacopoeia (SJP). *Japanese Pharmacopoeia*. Junkudo Book Shop, Tokio, Japan, 2001.

- [101] Korean Food and Drug Administration (KFDA). *Korean Herbal Pharmacopoeia*. Ministry of Health Family Welfare (South Korea), Seoul, Südkorea, 2002.
- [102] State Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of China*. Chemical Industry Publisher, Peking, China, 2005.
- [103] CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, 52(9):1361–1371, 2003.
- [104] SIOW, Y. L., GONG, Y., AU-YEUNG, K. K., WOO, C. W., CHOY, P. C. UND O, K. Emerging issues in traditional chinese medicine. *Can J Physiol Pharmacol*, 83(4):321–334, 2005.
- [105] MUKHERJEE, P. K., PITCHAIRAJAN, V., MURUGAN, V., SIVASANKARAN, P. UND KHAN, Y. Strategies for revitalization of traditional medicine. *Chin Herb Med*, 2(1):1–15, 2010.
- [106] AKINYEMI, K. O., OLADAPO, O., OKWARA, C. E., IBE C. C. UND FASURE, K. A. Screening of crude extracts of six medicinal plants used in south-west nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Compl Alt Med*, 5(6):doi:10.1186/1472-6882-5-6, 2005.
- [107] FRANZ, C., KLIER, B., REICH, E. UND NOVAK, J. Identification and authentication of herbal substances. *Planta Med*, 73(9):819–820, 2007.
- [108] LI, J., YI, T., LAI, H. S., XUE, D., JIANG, H., PENG, H. C. UND ZHANG, H. Application of microscopy in authentication of traditional tibetan medicinal plant *Halenia elliptica*. *Microsc Res Tech*, 71(1):11–19, 2008.
- [109] LI, T. UND ZHANG, H. Application of microscopy in authentication of traditional tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microsc Res Tech*, 71(6):448–458, 2008.
- [110] WAGNER, H. UND BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer-Verlag, Berlin, 1996.
- [111] VAN BEEK, T. A. UND MONTORO, P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A*, 1216(11):2002–2032, 2009.
- [112] LIANG, Y. Z., XIE, P. UND CHAN, K. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 812(1):53–70, 2004.
- [113] JOSHI, K., CHAVAN, P., WARUDE, D. UND PATWARDHAN, B. Molecular markers in herbal drug technology. *Curr Science*, 87(2):159–165, 2004.
- [114] POMS, R. E. UND ANKLAM, E. Tracking and tracing for allergen-free food production chains. In: Gilissen, L. J. W. J., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F. J., und Bogers, R. J. (Hrsg.). *Allergy matters: new approaches to allergy prevention and management*. Wageningen UR frontis series, 9:77–93. Springer-Verlag, Berlin, 2006.
- [115] MONACI, L. UND VISCONTI, A. Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends Food Sci Technol*, 21(6):272–283, 2010.
- [116] HEZEL, S. S. *In vitro-Untersuchungen zu Inhaltsstoffen von Hypericum perforatum L. sowie topische Anwendung von Hypericum perforatum-Extrakten bei der Atopischen Dermatitis*. PhD thesis, Universitätshautklinik, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., 2003.
- [117] TAYLOR, S. L., NORDLEE, J. A., NIEMANN, L. M. UND LAMBRECHT, D. M. Allergen immunoassays - considerations for use of naturally incurred standards. *Anal Bioanal Chem*, 395(1):83–92, 2009.
- [118] HUPFER, C. UND BUSCH, U. *Nachweis allergener Zutaten in Lebensmitteln*. Lebensmittel-Intoleranzen: Allergene und Unverträglichkeiten bei Lebensmitteln. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Oberschleißheim, 2007.
- [119] FOCKE, F., HAASE, I. UND FISCHER, M. DNA-based identification of spices: DNA isolation, whole genome amplification, and polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*, 59(2):513–520, 2011.
- [120] BLOCK, A. *Entwicklung und Validierung von qualitativen und quantitativen Nachweisverfahren für gentechnisch veränderten Raps*. PhD thesis, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technischen Universität, München, 2004.
- [121] FISCHER, M. UND HAASE, I. PCR in der Lebensmittelanalytik - Bedeutung und Anwendungsbeispiele. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, 50(3):206–209, 2006.
- [122] MAFRA, I., FERREIRA, I. M. P. L. V. O. UND OLIVEIRA, M. B. P. P. Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol*, 227(3):649–665, 2008.

- [123] MARMIROLI, N., MAESTRI, E., GULLI, M., MALCEVSCI, A., PEANO, C., BORDONI, R. UND DE BELLIS, G. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem*, 392(3):369–384, 2008.
- [124] SHAW, P. C., NGAN, F. N., BUT, P. P. H. UND WANG, J. Molecular markers in chinese medicinal materials. In: Shaw, P. C., Wang, J. und But, P. P. H. (Hrsg.). *Authentication of chinese medicinal material by DNA technology*, 1:1–24. World Scientific Publishing, Singapur, 2002.
- [125] ZHANG, Y. B., SHAW, P. C., SZE, C. W., WANG, Z. T. UND TONG, Y. Molecular authentication of chinese herbal materials. *J Food Drug Anal*, 15(1):1–9, 2007.
- [126] SUCHER, N. J. UND CARLES, M. C. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Med*, 74(6):603–623, 2008.
- [127] SHAW, P. C., WONG, K. L., CHAN, A. W. K., WONG, W. C. UND BUT, P. P. H. Patent applications for using DNA technologies to authenticate medicinal herbal material. *Chin Med*, 4(21):doi:10.1186/1749–8546–4–21, 2009.
- [128] LASHERMES, P., COMBES, M.C. UND CROS, J. Use of non-radioactive digoxigenin-labelled DNA probes for RFLP analyses in coffee. *Technique et utilisations des marqueurs moléculaires*, 72(1):21–25, 1995.
- [129] CHEUNG, K. S., KWAN, H. S., BUT, P. P. H. UND SHAW, P. C. Pharmacognostical identification of american and oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *J Ethnopharmacol*, 42(1):67–69, 1994.
- [130] VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J. UND KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 23(21):4407–4414, 1995.
- [131] CHENG, K. T., SU, B., CHEN, C. T. UND LIN, C. C. RAPD analysis of Astragalus medicines marketed in taiwan. *Am J Chin Med*, 28(2):273–278, 2000.
- [132] HOSOKAWA, K., MINAMI, M., KAWAHARA, K., NAKAMURA, I. UND SHIBATA, T. Discrimination among three species of medicinal Scutellaria plants using RAPD markers. *Planta Med*, 66(3):270–272, 2000.
- [133] KRESS, W. J., WURDACK, K. J., ZIMMER, E. A., WEIGT, L. A. UND JANZEN, D. H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(23):8369–8374, 2005.
- [134] CHIOU, S. J., YEN, J. H., FANG, C. L., CHEN, H. L. UND LIN, T. Y. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta Med*, 73(13):1421–1426, 2007.
- [135] CHEN, S., YAO, H., HAN, J., LIU, C., SONG, J., SHI, L., ZHU, Y., MA, X., GAO, T., PANG, X., LUO, K., LI, Y., LI, X., JIA, X., LIN, Y. UND LEON, C. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*, 5(1):e8613, 2010.
- [136] GAO, C., ZHANG, F., ZHANG, J., GUO, S. UND SHAO, H. Identification of Anoctochilus based on rDNA ITS sequences alignment and SELDI-TOF-MS. *Int J Biol Sci*, 5(7):727–735, 2009.
- [137] LIU, T., YAN, H. UND GUO, X. Discrimination of the medicinal plant Fallopia multiflora and its adulterants by diagnostic polymerase chain reaction (PCR). *J Med Plant Res*, 5(15):3461–3465, 2011.
- [138] KELLY, L. Phylogenetic relationships in Asarum (Aristolochiaceae) based on morphology and ITS sequences. *Am J Bot*, 85(10):1454–1467, 1998.
- [139] LIU, C. S., BAI, G. B. UND YAN, Y. N. Studies on the botanical sources and DNA molecular identification of Herba Asari based on ITS sequence. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 30(5):329–332, 2005.
- [140] YAMAJI, H., FUKUDA, T., YOKOYAMA, J., PAK, J. H., ZHOU, C. Z., YANG, C. S., KONDO, K., MOROTA, T., TAKEDA, S., SASAKI, H. UND MAKI, M. Reticulate evolution and phylogeography in Asarum sect. Asiasarum (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol*, 44(2):863–884, 2007.
- [141] LEE, S. K., LI, P. T., LAU, D. T., YUNG, P. P., KONG, R. Y. UND FONG, W. F. Phylogeny of medicinal Phyllanthus species in china based on nuclear ITS and chloroplast atpB-rbcL sequences and multiplex PCR detection assay analysis. *Planta Med*, 72(8):721–726, 2006.
- [142] DONG, T. T., MA, X. Q., CLARKE, C., SONG, Z. H., JI, Z. N., LO, C. K. UND TSIM, K. W. Phylogeny of Astragalus in china: molecular evidence from the DNA sequences of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. *J Agric Food Chem*, 51(23):6709–6714, 2003.

- [143] YIP, P. Y. UND KWAN, H. S. Molecular identification of *Astragalus membranaceus* at the species and locality levels. *J Ethnopharmacol*, 106(2):222–229, 2006.
- [144] LU, K. T., LEE, H. C., LIU, F. S., LO, C. F. UND LIN, J. H. Discriminating *Astragali radix* from *Hedysarum radix* in chinese medicine preparations using nested PCR and DNA sequencing methods. *J Food Drug Anal*, 17(5):380–385, 2009.
- [145] HOSOKAWA, K., HISHIDA, A., NAKAMURA, I. UND SHIBATA, T. The sequences of the spacer region between the *atpF* and *atpA* genes in the plastid genome allows discrimination among three varieties of medicinal *Angelica*. *Planta Med*, 72(6):570–571, 2006.
- [146] TONOSAKI, K. UND NISHIO, T. Identification of species in tribe Brassiceae by dot-blot hybridization using species-specific ITS1 probes. *Plant Cell Rep*, 29(10):1179–1186, 2010.
- [147] LAHAYE, R., SAVOLAINEN, V., DUTHOIT, S., MAURIN, O. UND VAN DER BANK, M. A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (south africa). *Nat Preced*, 1896(1):hd1:10101/npre.2008.1896.1, 2008.
- [148] YANG, Z. Y., CHAO, Z., HUO, K. K., XIE, H., TIAN, Z. P. UND PAN, S. L. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern china. *Phytomedicine*, 14(6):416–423, 2007.
- [149] HE, J., WONG, K. L., SHAW, P. C., WANG, H. UND LI, D. Z. Identification of the medicinal plants in *Aconitum L.* by DNA barcoding technique. *Planta Med*, 76(14):1622–1628, 2010.
- [150] JIGDEN, B., WANG, H., KIM, Y. J., NOH, J. H., GOTOV, C., LEE, J. I. UND YANG, D. C. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of four *Cimicifuga* species. *Corp Sci*, 50(5):1961–1966, 2010.
- [151] YAO, H., SONG, J. Y., MA, X. Y., LIU, C., LI, Y., XU, H. X., HAN, J. P., DUAN, L. S. UND CHEN, S. L. Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region. *Planta Med*, 75(6):667–669, 2009.
- [152] LAU, D. T., SHAW, P. C., WANG, J. UND BUT, P. P. H. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Planta Med*, 67(5):456–460, 2001.
- [153] DING, X., XU, L., WANG, Z., ZHOU, K., XU, H. UND WANG, Y. Authentication of stems of *Dendrobium officinale* by rDNA ITS region sequences. *Planta Med*, 68(2):191–192, 2002.
- [154] ZHANG, Y. B., WANG, J., WANG, Z. T., BUT, P. P. H. UND SHAW, P. C. DNA microarray for identification of the herb of *Dendrobium* species from chinese medicinal formulations. *Planta Med*, 69(12):1172–1174, 2003.
- [155] XU, H., WANG, Z., DING, X., ZHOU, K. UND XU, L. Differentiation of *Dendrobium* species used as "Huangcao Shihu" by rDNA ITS sequence analysis. *Planta Med*, 72(1):89–92, 2006.
- [156] LIU, Y., ZHANG, L., LIU, Z., LUO, K., CHEN, S. UND CHEN, K. Species identification of *rhododendron* (*Ericaceae*) using the chloroplast deoxyribonucleic acid *PsbA-trnH* genetic marker. *Pharmacogn Mag*, 8(29):29–36, 2012.
- [157] NOVAK, J., GRAUSGRUBER-GÖRGER, S. UND LUKAS, B. DNA-based authentication of plant extracts. *Food Res Int*, 40(3):388–392, 2007.
- [158] ARCA, M., HINSINGER, D. D., CRUAUD, C., TILLIER, A., BOUSQUET, J. UND FRASCARIA-LACOSTE, N. Deciduous trees and the application of universal DNA barcodes: a case study on the circumpolar *Fraxinus*. *PLoS One*, 7(3):e34089, 2012.
- [159] WANG, C. Z., LIANG, Y., GUO, B. UND XIAO, P. Molecular authentication of medicinal *Epimedium* species - a case of diagnostic PCR authentication of *Epimedium koreanum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 35(14):1799–1802, 2010.
- [160] SUN, Z., GAO, T., YAO, H., SHI, L., ZHU, Y. UND CHEN, S. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method. *Planta Med*, 77(3):301–306, 2011.
- [161] ZHAO, K. J., DONG, T. T., CUI, X. M., TU, P. F. UND TSIM, K. W. Genetic distinction of *radix Adenophorae* from its adulterants by the DNA sequence of 5S-rRNA spacer domains. *Am J Chin Med*, 31(6):919–926, 2003.
- [162] XUE, H. G., ZHOU, S. D., HE, X. J. UND YU, Y. Molecular authentication of the traditional chinese medicinal plant *Euphorbia pekinensis*. *Planta Med*, 73(1):91–93, 2007.

- [163] HAN, J. P., SONG, J. Y., LIU, C., CHEN, J., QIAN, J., ZHU, Y. J., SHI, L. C., YAO, H. UND CHEN, S. L. Identification of cistanche species (Orobanchaceae) based on sequences of the plastid psbA-trnH intergenic region. *Yao Xue Xue Bao*, 45(1):126–130, 2010.
- [164] ZHENG, C. J., ZHAO, S. J., ZHAO, Z. H. UND GUO, J. Molecular authentication of the traditional medicinal plant *Fallopia multiflora*. *Planta Med*, 75(8):870–872, 2009.
- [165] MA, X. Y., XIE, C. X., LIU, C., SONG, J. Y., YAO, H., LUO, K., ZHU, Y. J., GAO, T., PANG, X. H., QIAN, J. UND CHEN, S. L. Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Biol Pharm Bull*, 33(11):1919–1924, 2010.
- [166] WANG, C. Z., LI, P., DING, J. Y., JIN, G. Q. UND YUAN, C. S. Identification of *Fritillaria pallidiflora* using diagnostic PCR and PCR-RFLP based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Planta Med*, 71(4):384–386, 2005.
- [167] SUI, X. Y., HUANG, Y., TAN, Y., GUO, Y. UND LONG, C. L. Molecular authentication of the ethnomedicinal plant *Sabia parviflora* and its adulterants by DNA barcoding technique. *Planta Med*, 77(5):492–496, 2011.
- [168] LIU, L., WANG, X. UND WANG, L. rDNA ITS sequence analysis of wild *Gentiana* from gansu province. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 35(5):565–568, 2010.
- [169] GUO, X., WANG, X., SU, W., ZHANG, G. UND ZHOU, R. DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. *Biol Pharm Bull*, 34(8):1198–1203, 2011.
- [170] LUCAS, C., THANGARADJOU, T. UND PAPPENBROCK, J. Development of a DNA barcoding system for seagrasses: successful but not simple. *PLoS One*, 7(1):e29987, 2012.
- [171] DANIEL, C., KERSTEN, T., KEHRAUS, S., KÖNIG, G. M. UND KNÖSS, W. Identifizierung und Charakterisierung von Arzneipflanzen mit "Metabolic Fingerprinting". *Z Phytother*, 29(6):270–274, 2008.
- [172] YANG, Z. Y., CHAO, Z., HUO, K. K., WU, B. Y. UND PAN, S. L. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 sequences of 4 *Leonurus* species. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26(11):1593–1595, 2006.
- [173] SHARMA, S. K., DKHAR, J., KUMARIA, S., TANDON, P. UND RAO, S. R. Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA. *Gene*, 495(1):10–15, 2012.
- [174] LEE, C. UND WEN, J. Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. *Mol Phylogenet Evol*, 31(3):894–903, 2004.
- [175] NGAN, F. N., SHAW, P. C., BUT, P. P. H. UND WANG, J. Molecular authentication of *Panax* species. *Phytochemistry*, 50(5):787–791, 1999.
- [176] KIM, O. T., BANG, K. H., IN, D. S., LEE, J. W., KIM, Y. C., SHIN, Y. S., HYUN, D. Y., LEE, S. S., CHA, S. W. UND SEONG, N. S. Molecular authentication of ginseng cultivars by comparison of internal transcribed spacer and 5.8S rDNA sequences. *Plant Biotechnol Rep*, 1(3):163–167, 2007.
- [177] GONG, W., FU, C. X., LUO, Y. P. UND QIU, Y. X. Molecular identification of *Sinopodophyllum hexandrum* and *Dysosma* species using cpDNA sequences and PCR-RFLP markers. *Planta Med*, 72(7):650–652, 2006.
- [178] LEE, E. J., HWANG, I. K., KIM, N. Y., LEE, K. L., HAN, M. S., LEE, Y. H., KIM, M. Y. UND YANG, M. S. An assessment of the utility of universal and specific genetic markers for opium poppy identification. *J Forensic Sci*, 55(5):1202–1208, 2010.
- [179] ZHAO, Y. P., QIU, Y. X., GONG, W., LI, J. H. UND FU, C. X. Authentication of *Actinidia macrosperma* using PCR-RFLP based on trnK sequences. *Bot Stud*, 48(2):239–242, 2007.
- [180] ZHU, Y. J., CHEN, S. L., YAO, H., TAN, R., SONG, J. Y., LUO, K. UND LU, J. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*. *Yao Xue Xue Bao*, 45(3):376–382, 2010.
- [181] MIZUKAMI, H., OKABE, Y., KOHDA, H. UND HIRAOKA, N. Identification of the crude drug *Atractylodes rhizome* (Byaku-jutsu) and *Atractylodes lancea rhizome* (So-jutsu) using chloroplast trnK sequence as a molecular marker. *Biol Pharm Bull*, 23(5):589–594, 2000.
- [182] PARVEEN, I., SINGH, H. K., RAGHUVANSHI, S., PRADHAN, U. C. UND BABBAR, S. B. DNA barcoding of endangered indian *Paphiopedilum* species. *Mol Ecol Resour*, 12(1):82–90, 2012.
- [183] SASAKI, Y., FUSHIMI, H., CAO, H., CAI, S. Q. UND KOMATSU, K. Sequence analysis of chinese and japanese *Curcuma* drugs on the 18S rRNA gene and trnK gene and the application of amplification-refractory mutation system analysis for their authentication. *Biol Pharm Bull*, 25(12):1593–1599, 2002.

- [184] LUO, Y. M., ZHANG, W. M., DING, X. Y., SHEN, J., BAO, S. L., CHU, B. H. UND MAO, S. G. SNP marker and allele-specific diagnostic PCR for authenticating herbs of *Perilla*. *Yao Xue Xue Bao*, 41(9):840–845, 2006.
- [185] RIDGWAY, K. P., DUCK, J. M. UND YOUNG, J. P. Identification of roots from grass swards using PCR-RFLP and FFLP of the plastid trnL (UAA) intron. *BMC Ecol*, 3(8):doi:10.1186/1472-6785-3-8, 2003.
- [186] SAHIN, F. P., YAMASHITA, H., GUO, Y., TERASAKA, K., KONDO, T., YAMAMOTO, Y., SHIMADA, H., FUJITA, M., KAWASAKI, T., SAKAI, E., TANAKA, T., GODA, Y. UND MIZUKAMI, H. DNA authentication of *Plantago* herb based on nucleotide sequences of 18S-28S rRNA internal transcribed spacer region. *Biol Pharm Bull*, 30(7):1265–1270, 2007.
- [187] LEE, J. H., LEE, J. W., SUNG, J. S., BANG, K. H. UND MOON, S. G. Molecular authentication of 21 korean *Artemisia* species (Compositae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism based on trnL-F region of chloroplast DNA. *Biol Pharm Bull*, 32(11):1912–1916, 2009.
- [188] ALBACH, D. C., LI, H. Q., ZHAO, N. UND JENSEN, S. R. Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (Scrophulariaceae). *Biochem Syst Ecol*, 35(5):293–300, 2007.
- [189] XUE, C. Y. UND XUE, H. G. Application of real-time scorpion PCR for authentication and quantification of the traditional chinese medicinal plant *Drynaria fortunei*. *Planta Med*, 74(11):1416–1420, 2008.
- [190] AL-QURAINY, F., KHAN, S., TARROUM, M., AL-HEMAID, F. M. UND ALI, M. A. Molecular authentication of the medicinal herb *Ruta graveolens* (Rutaceae) and an adulterant using nuclear and chloroplast DNA markers. *Genet Mol Res*, 10(4):2806–2816, 2011.
- [191] LONG, C., KAKIUCHI, N., TAKAHASHI, A., KOMATSU, K., CAI, S. UND MIKAGE, M. Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in china. *Planta Med*, 70(11):1080–1084, 2004.
- [192] WANG, H. UND WANG, Q. Z. Analysis of rDNA ITS sequences of *Radix et Rhizoma, Salviae miltiorrhizae* and plants of *Salvia L.* *Chin Tradit Herb Drugs*, 36(9):1381–1385, 2005.
- [193] SCHMIDERER, C., MADER, E. UND NOVAK, J. DNA-based identification of *Helleborus niger* by high-resolution melting analysis. *Planta Med*, 76(16):1934–1937, 2010.
- [194] XUE, C. Y., LI, D. Z., LU, J. M., YANG, J. B. UND LIU, J. Q. Molecular authentication of the traditional tibetan medicinal plant *Swertia mussotii*. *Planta Med*, 72(13):1223–1226, 2006.
- [195] ARAGANE, M., SASAKI, Y., NAKAJIMA, J., FUKUMORI, N., YOSHIZAWA, M., SUZUKI, Y., KITAGAWA, S., MORI, K., OGINO, S., YASUDA, I. UND NAGUMO, S. Peyote identification on the basis of differences in morphology, mescaline content, and trnL/trnF sequence between *Lophophora williamsii* and *L. diffusa*. *J Nat Med*, 65(1):103–110, 2011.
- [196] LIU, J., MÖLLER, M., GAO, L. M., ZHANG, D. Q. UND LI, D. Z. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L.*, Taxaceae) and the discovery of cryptic species. *Mol Ecol Resour*, 11(1):89–100, 2011.
- [197] ZHU, S., ZHOU, L., PANG, H., HUANG, H., GAO, X. UND ZENG, C. Molecular identification of one *Uncaria* plant. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 36(5):535–537, 2011.
- [198] YANG, M., ZHANG, D., LIU, J. UND ZHENG, J. A molecular marker that is specific to medicinal Rhubarb based on chloroplast trnL/trnF sequences. *Planta Med*, 67(8):784–786, 2001.
- [199] YESSON, C., BÁRCENAS, R. T., HERNÁNDEZ, H. M., RUIZ-MAQUEDA MDE, L., PRADO, A., RODRÍGUEZ, V. M. UND HAWKINS, J. A. DNA barcodes for mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. *Mol Ecol Resour*, 11(5):775–783, 2011.
- [200] YIP, P. Y., CHAU, C. F., MAK, C. Y. UND KWAN, H. S. DNA methods for identification of chinese medicinal materials. *Chin Med*, 2(9):doi:10.1186/1749-8546-2-9, 2007.
- [201] WANG, C., GUO, B. UND XIAO, P. Molecular methods for authentication of chinese medicinal materials. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 36(3):237–242, 2011.
- [202] KERSTEN, T., DANIEL, C., KÖNIG, G. M. UND W., KNÖSS. Das Potenzial PCR-basierter Markermethoden zur Identifizierung von Arzneipflanzen. *Z Phytother*, 29(3):122–128, 2008.
- [203] TECHEN, N., CROCKETT, S. L., KHAN, I. A. UND SCHEFFLER, B. E. Authentication of medicinal plants using molecular biology techniques to compliment conventional methods. *Curr Med Chem*, 11(11):1391–1401, 2004.

- [204] CIMINO, M. T. Successful isolation and PCR amplification of DNA from National Institute of Standards and Technology herbal dietary supplement standard reference material powders and extracts. *Planta Med*, 76(5):495–497, 2010.
- [205] PEIST, R., HANSEL, D., TWIELING, G. UND LÖFFERT, D. PCR inhibitors in plant DNA preparations. *QIAGEN News*, 3(1):7–9, 2001.
- [206] PASTINEN, T., PARTANEN, J. UND SYVANEN, A. C. Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation. *Clin Chem*, 42(9):1391–1397, 1996.
- [207] CAI, H., WHITE, P. S., TORNEY, D., DESHPANDE, A., WANG, Z., KELLER, R. A., MARRONE, B. UND NOLAN, J. P. Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring. *Genomics*, 66(2):135–143, 2000.
- [208] PASTINEN, T., RAITIO, M., LINDROOS, K., TAINOLA, P., PELTONEN, L. UND SYVANEN, A. C. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res*, 10(7):1031–1042, 2000.
- [209] LOWE, C. R. Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures. *Curr Opin Struct Biol*, 10(4):428–434, 2000.
- [210] KURG, A., TÖNNISSON, N., GEORGIU, I., SHUMAKER, J., TOLLETT, J. UND METSPALU, A. Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test*, 4(1):1–7, 2000.
- [211] PIRRUNG, M. C., CONNORS, R. V., ODENBAUGH, A. L., MONTAGUE-SMITH, M. P., WALCOTT, N. G. UND TOLLETT, J. J. The arrayed primer extension method for DNA microchip analysis. Molecular computation of satisfaction problems. *J Am Chem Soc*, 122(9):1873–1882, 2000.
- [212] GROSSMAN, P. D., BLOCH, W., BRINSON, E., CHANG, C. C., EGGERDING, F. A., FUNG, S., IOVANNISCI, D. M., WOO, S. UND WINN-DEEN, E. S. High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucl Acids Res*, 22(21):4527–4534, 1994.
- [213] VON BRUCHHAUSEN, F., EBEL, S., HACKENTHAL, E. UND HOLZGRABE, U. *Folgeband 4 Stoffe A-K*. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer-Verlag, Berlin, 1999.
- [214] WAGNER, H., BLADT, S. UND ZGAINSKI, E. M. *Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen*. Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- [215] VON BRUCHHAUSEN, F., EBEL, S., HACKENTHAL, E. UND HOLZGRABE, U. *Folgeband 5 Stoffe L-Z*. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer-Verlag, Berlin, 1999.
- [216] ZHONG, Y. D. *Big chinese herb dictionary*. China Shanghai Science and Technology Publishing, Shanghai, China, 1977.
- [217] SCHÖLLHORN, V. *Verfahren zur selektiven quantitativen Bestimmung der Konzentration von Lektinen, insbesondere Mistel-Lektinen*. Deutsches Patent- und Markenamt, DE4123263C2, 1994.
- [218] ZISKA, P. UND FRANZ, H. Determination of lectin contents in commercial mistletoe preparations for cancertherapy using the ELISA technique. In: Bøg-Hansen, T. C. und Breborowicz, J. (Hrsg.). *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, 4:473–480. Walter de Gruyter, Berlin, 1985.
- [219] VANG, O., LARSEN, K. P. UND BØG-HANSEN, T. C. A new quantitative and highly specific assay for lectin-binding activity. In: Bøg-Hansen, T. C. und van Driessche, E. (Hrsg.). *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, 5:637–644. Walter de Gruyter, Berlin, 1986.
- [220] WILLER, F., WAGNER, H. UND SCHECKLIES, E. Urtica-Wurzelextrakte: Standardisierung mit Hilfe der ELISA-Technik und der HPLC. *Dtsch Apoth Ztg*, 131(24):1217–1221, 1991.
- [221] ROUGÉ, P. UND PÉRE, D. Occurrence of lectin during the life cycle of Lathyrus species. In: Bøg-Hansen, T. C. (Hrsg.). *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*, 2:137–150. Walter de Gruyter, Berlin, 1982.
- [222] LIS, H. UND SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annu Rev Biochem*, 42(11):541–574, 1973.
- [223] PIETTA, P. G., MAURI, P. L., MANERA, E., CEVA, P. L. UND RAVA, A. An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. *Chromatographia*, 27(9):509–512, 1989.
- [224] REHWALD, A. *Analytical investigation of Crataegus species and Passiflora incarnata L. by high performance liquid chromatography*. PhD thesis, Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Schweiz, 1995.

- [225] ZHAO, Z., HU, Y., LIANG, Z., YUEN, J. P., JIANG, Z. UND LEUNG, K. S. Authentication is fundamental for standardization of chinese medicines. *Planta Med*, 72(10):865–874, 2006.
- [226] LEE, K. H., KOZUKA, M. UND ITOKAWA, H. Asian herbal products: the basis for development of high-quality dietary supplements and new medicines. In: Shi, J., Ho, C. T. und Shahidi, F. (Hrsg.). *Asian functional foods*, 2:22–72. CRC Press, Boca Raton, USA, 2005.
- [227] XUE, H. G., ZHOU, S. D., HE, X. J. UND YU, Y. Molecular authentication of the traditional dai medicinal plant *Croton caudatus*. *Planta Med*, 73(6):611–613, 2007.
- [228] XUE, H. G., WANG, H., LI, D. Z., XUE, C. Y. UND WANG, Q. Z. Differentiation of the traditional chinese medicinal plants *Euphorbia humifusa* and *E. maculata* from adulterants by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *Planta Med*, 74(3):302–304, 2008.
- [229] XUE, C. Y., LI, D. Z. UND WANG, Q. Z. Identification and quantification of the traditional chinese medicinal plant *Gentiana macrophylla* using TaqMan real-time PCR. *Planta Med*, 74(15):1842–1845, 2008.
- [230] XUE, C. Y., LI, D. Z. UND WANG, Q. Z. Application of LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis to the authentication of the traditional chinese medicinal plant *Cimicifuga foetida*. *Planta Med*, 75(8):873–875, 2009.
- [231] KÖPPEL, R., DVORAK, V., ZIMMERLI, F., BREITENMOSER, A., EUGSTER, A. UND WAIBLINGER, H. U. Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *Eur Food Res Technol*, 230(3):367–374, 2010.
- [232] POMS, R. E., ANKLAM, E. UND KUHN, M. Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *J AOAC Int*, 87(6):1391–1397, 2004.
- [233] NEUSSER, M. Schnelles Verfahren der PCR-Optimierung mit „Real-Time“-PCR. *Biospektrum*, 7(6):539–541, 2001.
- [234] PFAFFL, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, 10(1):92–95, 2004.
- [235] RECK, M. *Optimierung der Sekretion von rekombinanten Proteinen aus Escherichia coli durch Analyse der Genexpression*. PhD thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 2009.
- [236] PFAFFL, M. W. Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR green I technology. In: Meuer, S. C., Wittwer, C. und Nakagawara, K. (Hrsg.). *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*, 29:281–291. Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- [237] RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S. C., Wittwer, C. und Nakagawara, K. (Hrsg.). *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*, 3:21–34. Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- [238] PECCOUD, J. UND JACOB, C. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys J*, 71(1):101–108, 1996.
- [239] TICHOPAD, A., DZIDIC, A. UND PFAFFL, M. W. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnol Lett*, 24(24):2053–2056, 2002.
- [240] TICHOPAD, A., DILGER, M., SCHWARZ, G. UND PFAFFL, M. W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucl Acids Res*, 31(20):e122, 2003.
- [241] LIVAK, K. J. UND SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods*, 25(4):402–408, 2001.
- [242] PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res*, 29(9):e45, 2001.
- [243] PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. UND NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26(6):509–515, 2004.
- [244] PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W. UND DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res*, 30(9):e36, 2002.
- [245] HELLEMANS, J., MORTIER, G., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. UND VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*, 8(2):R19, 2007.

- [246] Biogazelle NV. *qPCR analysis*. Courses. www.biogazelle.com/course/4_qPCR_analysis.pdf, 2010.
- [247] VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. UND SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7):R34, 2002.
- [248] WIEDEMANN, C., SCHULZ, H. L. UND WEBER, B. H. F. Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum*, 10(1):99–102, 2004.
- [249] BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169–193, 2000.
- [250] PFAFFL, M. W. UND HAGELEIT, M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*, 23(4):275–282, 2001.
- [251] LARIONOV, A., KRAUSE, A. UND MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinform*, 6(62):doi:10.1186/1471-2105-6-62, 2005.
- [252] CHINI, V., FOKA, A., DIMITRACOPOULOS, G. UND SPILIOPOULOU, I. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Lett Appl Microbiol*, 45(5):479–484, 2007.
- [253] GENTLE, A., ANASTASOPOULOS, F., MCBRIEN, N. A. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *Biotechniques*, 31(3):502–508, 2001.
- [254] SWILLENS, S., GOFFARD, J. C., MARÉCHAL, Y., DE KERCHOVE D'EXAERDE, A. UND EL HOUSNI, H. Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucl Acids Res*, 32(6):e56, 2004.
- [255] SNIDER, J. V., WECHSER, M. A. UND LOSSOS, I. S. Human disease characterization: real-time quantitative PCR analysis of gene expression. *Drug Discov Today*, 6(20):1062–1067, 2001.
- [256] WONG, M. L. UND MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1):75–85, 2005.
- [257] WITTWER, C. T. UND GARLING, D. J. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques*, 10(1):76–83, 1991.
- [258] MORRISON, T. B., WEISS, J. J. UND WITTWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6):954–962, 1998.
- [259] PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K., LEONG, F. T., DOUGLAS, S. H., FIELD, S. L., BELL, S. M., COMBARET, V., PUISIEUX, A., MIGHELL, A. J., ROBINSON, P. A., INGLEHEARN, C. F., ISAACS, J. D. UND MARKHAM, A. F. Real-time PCR based on SYBR-green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol*, 3(18):doi:10.1186/1472-6750-3-18, 2003.
- [260] BUSCH, U. Real-time PCR. *J Verbrauchersch Lebensmittelsich*, 2(2):111–112, 2007.
- [261] MITAS, M., MIKHITARIAN, K., WALTERS, C., BARON, P. L., ELLIOTT, B. M., BROTHERS, T. E., ROBISON, J. G., METCALF, J. S., PALESCH, Y. Y., ZHANG, Z., GILLANDERS, W. E. UND COLE, D. J. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. *Int J Cancer*, 93(2):162–171, 2001.
- [262] PATTYN, F., SPELEMAN, F., DE PAEPE, A. UND VANDESOMPELE, J. RTPPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucl Acids Res*, 31(1):122–123, 2003.
- [263] REMLER, R. *Quantitative Real Time PCR: Prinzip und Anwendung am Beispiel GVO-Analytik und dem Nachweis von Rindfleisch in Wurstwaren*. Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten Jahrestagung, Wolfpassing, Österreich, 2001.
- [264] Premier Biosoft. *Real time PCR*. Tech notes. www.premierbiosoft.com/tech_notes/real_time_PCR.html, 2011.
- [265] LÖFFLER, J., HENKE, N., HEBART, H., SCHMIDT, D., HAGMEYER, L., SCHUMACHER, U. UND EINSELE, H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*, 38(2):586–590, 2000.
- [266] MARRAS, S. A., KRAMER, F. R. UND TYAGI, S. Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genet Anal*, 14(5):151–156, 1999.

- [267] THELWELL, N., MILLINGTON, S., SOLINAS, A., BOOTH, J. UND BROWN, T. Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection. *Nucl Acids Res*, 28(19):3752–3761, 2000.
- [268] CHEN, R., HUANG, W., LIN, Z., ZHOU, Z., YU, H. UND ZHU, D. Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus. *J Virol Methods*, 122(1):57–61, 2004.
- [269] SMITH, D. S., MAXWELL, P. W. UND DE BOER, S. H. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. *J Agric Food Chem*, 53(26):9848–9859, 2005.
- [270] COUCH, J. A. UND FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Mol Bio Rep*, 8(1):8–12, 1990.
- [271] DO, N. UND ADAMS, R. P. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *Biotechniques*, 10(2):162–166, 1991.
- [272] JOHN, M. E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucl Acids Res*, 20(9):2381, 1992.
- [273] HENSON, J. M. UND FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu Rev Phytopathol*, 31(1):81–109, 1993.
- [274] WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63(10):3741–3751, 1997.
- [275] TERRY, C. F., HARRIS, N. UND PARKES, H. C. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *J AOAC Int*, 85(3):768–774, 2002.
- [276] ENGEL, K. H. UND MOREANO, F. Methods to detect the application of genetic engineering in composed and processed foods. In: Heller, K. J. (Hrsg.). *Genetically engineered food: methods and detection*, 11:205–230. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2003.
- [277] SAGHAI-MAROOF, M. A., SOLIMAN, K. M., JORGENSEN, R. A. UND ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(24):8014–8018, 1984.
- [278] KIM, C. S., LEE, C. H., SHIN, J. S., CHUNG, Y. S. UND HYUNG, N. I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucl Acids Res*, 25(5):1085–1086, 1997.
- [279] ZHANG, H. P., BAI, S., XU, L. UND SUN, Y. Fabrication of mono-sized magnetic anion exchange beads for plasmid DNA purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(3):127–133, 2009.
- [280] FREDRICKS, D. N., SMITH, C. UND MEIER, A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*, 43(10):5122–5128, 2005.
- [281] JARA, C., MATEO, E., GUILLAMON, J. M., TORIJA, M. J. UND MAS, A. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int J Food Microbiol*, 128(2):336–341, 2008.
- [282] MORIUCHI, R., MONMA, K., KAMATA, K. UND IBE, A. Study of DNA extraction methods for testing for genetically modified organisms in soyproducts. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49(5):347–351, 2008.
- [283] SAGI, N., MONMA, K., IBE, A. UND KAMATA, K. Comparative evaluation of three different extraction methods for rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *J Agric Food Chem*, 57(7):2745–2753, 2009.
- [284] ARIEFDJOHAN, M. W., SAVAIANO, D. A. UND NAKATSU, C. H. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr J*, 9(23):doi:10.1186/1475–2891–9–23, 2010.
- [285] NAWROT, U., WŁODARCZYK, K., WRÓBEL, M., WASIK, A. UND DOBOSZ, T. Comparison of the utility of five commercial kits for extraction of DNA from *Aspergillus fumigatus* spores. *Acta Biochim Pol*, 57(4):567–571, 2010.
- [286] TOMASO, H., KATTAR, M., EICKHOFF, M., WERNERY, U., AL DAHOUK, S., STRAUBE, E., NEUBAUER, H. UND SCHOLZ, H. C. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of *Brucellae* in tissue using quantitative real-time PCR. *BMC Infect Dis*, 10(100):doi:10.1186/1471–2334–10–100, 2010.
- [287] ROSE, H. L., DEWEY, C. A., ELY, M. S., WILLOUGHBY, S. L., PARSONS, T. M., COX, V., SPENCER, P. M. UND WELLER, S. A. Comparison of eight methods for the extraction of *Bacillus atrophaeus* spore DNA from eleven common interferents and a common swab. *PLoS One*, 6(7):e22668, 2011.

- [288] ZIMMERMANN, A., LÜTHY, J. UND PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Eur Food Res Technol*, 207(2):81–90, 1998.
- [289] HOLDEN, M. J., BLASIC JR., J. R., BUSSJAEGER, L., KAO, C., SHOKERE, L. A., KENDALL, D. C., FREESE, L. UND JENKINS, G. R. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. *J Agric Food Chem*, 51(9):2468–2474, 2003.
- [290] PEANO, C., SAMSON, M. C., PALMIERI, L., GULLI, M. UND MARMIROLI, N. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. *J Agric Food Chem*, 52(23):6962–6968, 2004.
- [291] KLEIN, J., ALTENBUCHNER, J. UND MATTES, R. Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. *J Biotechnol*, 60(3):145–153, 1998.
- [292] QUIRASCO, M., SCHOEL, B., PLASENCIA, J., FAGAN, J. UND GALVEZ, A. Suitability of real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *J AOAC Int*, 87(3):639–646, 2004.
- [293] SCHURMAN, T., DE BOER, R., PATTY, R., KOOISTRA-SMID, M. UND VAN ZWET, A. Comparative evaluation of in-house manual, and commercial semi-automated and automated DNA extraction platforms in the sample preparation of human stool specimens for a *Salmonella enterica* 5'-nuclease assay. *J Microbiol Methods*, 71(3):238–245, 2007.
- [294] DAUPHIN, L. A., HUTCHINS, R. J., BOST, L. A. UND BOWEN, M. D. Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs. *J Clin Microbiol*, 47(12):3920–3926, 2009.
- [295] DAUPHIN, L. A., STEPHENS, K. W., EUFINGER, S. C. UND BOWEN, M. D. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Yersinia pestis* DNA from bacterial suspensions and spiked environmental samples. *J Appl Microbiol*, 108(1):163–172, 2010.
- [296] DAUPHIN, L. A., WALKER, R. E., PETERSEN, J. M. UND BOWEN, M. D. Comparative evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for detection of *Francisella tularensis* DNA from suspensions and spiked swabs by real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(3):299–306, 2011.
- [297] PERSSON, S., DE BOER, R. F., KOOISTRA-SMID, A. M. UND OLSEN, K. E. Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 69(3):240–244, 2011.
- [298] MURRAY, M. G. UND THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 8(19):4321–4325, 1980.
- [299] DOYLE, J. J. UND DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19(1):11–15, 1987.
- [300] DOYLE, J. J. UND DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1):13–15, 1990.
- [301] MAGUIRE, T. L., COLLINS, G. G. UND SEDGLEY, M. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae. *Plant Mol Bio Rep*, 12(2):106–109, 1994.
- [302] SHANKAR, K., CHAVAN, S., SHINDE, S. UND PATIL, B. An improved DNA extraction protocol from four in vitro banana cultivars. *Asian J Biotechnol*, 3(1):84–90, 2011.
- [303] LI, H., LUO, J., HEMPHILL, J. K., WANG, J. T. UND GOULD, J. H. A rapid and high yielding DNA miniprep for cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Mol Bio Rep*, 19(1):183a–183e, 2001.
- [304] AITCHITT, M., AINSWORTH, C. C. UND THANGAVELU, M. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Mol Bio Rep*, 11(4):317–319, 1993.
- [305] POREBSKI, S., BAILEY, L. G. UND BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Bio Rep*, 15(1):8–15, 1997.
- [306] XIN, X., KAWASAKI, S., FUJIMURA, T. UND WANG, C. A protocol for high-throughput extraction of DNA from rice leaves. *Plant Mol Bio Rep*, 23(3):291–295, 2005.
- [307] XU, Q., WEN, X. UND DENG, X. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* trutt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Mol Bio Rep*, 22(1):301a–301g, 2004.

- [308] GAWEL, N. J. UND JARRET, R. L. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Mol Bio Rep*, 9(3):262–266, 1991.
- [309] STEWART JR., C. N. UND VIA, L. E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*, 14(5):748–750, 1993.
- [310] KHAN, I. A., AWAN, F. S., AHMAD, A. UND KHAN, A. A. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Mol Bio Rep*, 22(1):89a–89e, 2004.
- [311] MAHUKU, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Mol Bio Rep*, 22(1):71–81, 2004.
- [312] TIAN, H., HUHMER, A. F. UND LANDERS, J. P. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Anal Biochem*, 283(2):175–191, 2000.
- [313] CADY, N. C., STELICK, S. UND BATT, C. A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosens Bioelectron*, 19(1):59–66, 2003.
- [314] CATAPANO, C. V., CHANDLER, K. B. UND FERNANDES, D. J. Inhibition of primer RNA formation in CCRF-CEM leukemia cells by fludarabine triphosphate. *Cancer res*, 51(7):1829–1835, 1991.
- [315] BAILEY, A. M., PAJAK, L., FURCHEY, I. R., COWAN, C. A. UND EMANUEL, P. A. Robotic nucleic acid isolation using a magnetic bead resin and an automated liquid handler for biological agent simulants. *J Assoc Lab Autom*, 8(6):113–120, 2003.
- [316] PARHAM, N. J., PICARD, F. J., PEYTAU, R., GAGNON, M., SEYRIG, G., GAGNE, P. A., BOISSINOT, M. UND BERGERON, M. G. Specific magnetic bead based capture of genomic DNA from clinical samples: application to the detection of group B streptococci in vaginal/anal swabs. *Clin Chem*, 53(9):1570–1576, 2007.
- [317] OSTER, J., PARKER, J. UND À BRASSARD, L. Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences. *Magn Magn Mater*, 225(1):145–150, 2001.
- [318] STROHMEIER, O., EMPERLE, A., FOCKE, M., ROTH, G., MARK, D., ZENGERLE, R. UND VON STETTEN, F. *Magnetic bead based DNA purification on a disposable centrifugal microfluidic foil cartridge*. 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Groningen, Niederlande, 2010.
- [319] ELKIN, C., KAPUR, H., SMITH, T., HUMPHRIES, D., POLLARD, M., HAMMON, N. UND HAWKINS, T. Magnetic bead purification of labeled DNA fragments for high-throughput capillary electrophoresis sequencing. *Biotechniques*, 32(6):1296–1302, 2002.
- [320] LIEN, K. Y., LIU, C. J., LIN, Y. C., KUO, P. L. UND LEE, G. B. Extraction of genomic DNA and detection of single nucleotide polymorphism genotyping utilizing an integrated magnetic bead-based microfluidic platform. *Microfluid Nanofluid*, 6(4):539–555, 2008.
- [321] LIEN, K. Y., LIU, C. J., KUO, P. L. UND LEE, G. B. *Bead-based microfluidic platform integrated with optical detection devices for rapid detection of genetic deletion from saliva*. 22nd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Sorrento, Italien, 2009.
- [322] AZIMI, S. M., NIXON, G., AHERN, J. UND BALACHANDRAN, W. A magnetic bead-based DNA extraction and purification microfluidic device. *Microfluid Nanofluid*, 11(2):157–165, 2011.
- [323] STEMMER, C., BEAU-FALLER, M., PENCREAC'H, E., GUERIN, E., SCHNEIDER, A., JAQMIN, D., QUOIX, E., GAUB, M. P. UND OUDET, P. Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA extraction: toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics. *Clin Chem*, 49(11):1953–1955, 2003.
- [324] SMITH, K., DIGGLE, M. A. UND CLARKE, S. C. Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. *J Clin Microbiol*, 41(6):2440–2443, 2003.
- [325] CALDARELL-STEFAÑO, R., VAGO, L., BONETTO, S., NEBULONI, M. UND COSTANZI, G. Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR. *Mol Pathol*, 52(3):158–163, 1999.
- [326] MACE, E. UND CROUCH, J. The "auto"matic choice for plant DNA purification: automating the Wizard magnetic 96 plant system on Thermo labsystems' Kingfisher. *Promega Notes*, 93(1):30–32, 2003.
- [327] BITNER, R., KOLLER, S. UND SHENOI, H. Wizard magnetic DNA purification system for food: part I. DNA isolation and analysis of GMO food by PCR. *Promega Notes*, 76(1):14–18, 2001.

- [328] GRUNST, T. UND KEPHART, D. Wizard magnetic DNA purification system for food: part II. Semi-automated DNA isolation and analysis of GMO foods. *Promega Notes*, 76(1):19–22, 2001.
- [329] RUDI, K., KROKEN, M., DAHLBERG, O. J., DEGGERDAL, A., JAKOBSEN, K. S. UND LARSEN, F. Rapid, universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *Biotechniques*, 22(3):506–511, 1997.
- [330] BRETON, C., CLAUX, D., METTON, I., SKORSKI, G. UND BERVILLE, A. Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J Agric Food Chem*, 52(3):531–537, 2004.
- [331] CHENG, D. W. UND ARMSTRONG, K. C. Direct capture and cloning of receptor kinase and peroxidase genes from genomic DNA. *Genome*, 45(5):977–983, 2002.
- [332] SCOTT, D. L., CLARK, C. W., TOOLEY, P. W., CARRAS, M. M. UND MAAS, J. L. The use of biomagnetic separation to recover DNA suitable for PCR from *Claviceps* species. *Lett Appl Microbiol*, 31(2):95–99, 2000.
- [333] GERSTNER, J. A., HAMILTON, R. UND CRAMER, S. M. Membrane chromatographic systems for high-throughput protein separations. *J Chromatogr A*, 596(2):173–180, 1992.
- [334] DANCETTE, O. P., TABOUREAU, J. L., TOURNIER, E., CHARCOSSET, C. UND BLOND, P. Purification of immunoglobulins G by protein A/G affinity membrane chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 723(1):61–68, 1999.
- [335] KNUDSEN, H. L., FAHRNER, R. L., XU, Y., NORLING, L. A. UND BLANK, G. S. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *J Chromatogr A*, 907(1):145–154, 2001.
- [336] GHOSH, R. Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges. *J Chromatogr A*, 952(1):13–27, 2002.
- [337] MONTESINOS-CISNEROS, R. M., LUCERO-ACUNA, A., ORTEGA, J., GUZMÁN, R. UND TEJEDA-MANSIR, A. Breakthrough performance of large proteins on ion-exchange membrane columns. *Biotechnol Appl Biochem*, 48(2):117–125, 2007.
- [338] ENDRES, H. N., JOHNSON, J. A., ROSS, C. A., WELP, J. K. UND ETZEL, M. R. Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechnol Appl Biochem*, 37(3):259–266, 2003.
- [339] SYREN, P. O., ROZKOV, A., SCHMIDT, S. R. UND STROMBERG, P. Milligram scale parallel purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules and a multi-channel peristaltic pump. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 856(1):68–74, 2007.
- [340] YANG, Y., HEBRON, H. R. UND HANG, J. High performance DNA purification using a novel ion exchange matrix. *J Biomol Tech*, 19(3):205–210, 2008.
- [341] MONTESINOS-CISNEROS, R. M., ORTEGA, J., GUZMÁN, R. UND TEJEDA-MANSIR, A. Breakthrough performance of linear-DNA on ion-exchange membrane columns. *Bioprocess Biosyst Eng*, 29(2):91–98, 2006.
- [342] MONTESINOS-CISNEROS, R. M., OLIVAS JDE, L., ORTEGA, J., GUZMÁN, R. UND TEJEDA-MANSIR, A. Breakthrough performance of plasmid DNA on ion-exchange membrane columns. *Biotechnol Prog*, 23(4):881–887, 2007.
- [343] RICKWOOD, D. UND LUND, V. Attachment of DNA and oligonucleotides to magnetic particles: methods and applications. *Fresenius J Anal Chem*, 330(4):330, 1988.
- [344] LEVISON, P. R., BADGER, S. E., DENNIS, J., HATHI, P., DAVIES, M. J., BRUCE, I. J. UND SCHIMKAT, D. Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification. *J Chromatogr A*, 816(1):107–111, 1998.
- [345] DAUPHIN, L. A., MOSER, B. D. UND BOWEN, M. D. Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. *J Microbiol Methods*, 76(1):30–37, 2009.
- [346] BALL, S. L. UND ARMSTRONG, K. F. Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *J Econ Entomol*, 101(2):523–532, 2008.
- [347] OTTENWÄLDER, B. DNA-Sequencing: Automation und Probenvorbereitung. *Laborwelt*, 7(2):21–27, 2006.
- [348] TYAGI, G., CHARAK, S. UND MEHROTRA, R. Binding of an indole alkaloid, vinblastine to double stranded DNA: a spectroscopic insight in to nature and strength of interaction. *J Photochem Photobiol B*, 108(1):48–52, 2012.

- [349] ZHANG, G., HU, X. UND FU, P. Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *J Photochem Photobiol B*, 108(1):53–61, 2012.
- [350] PÉREZ, J. S. UND FREY, D. D. Behavior of the inadvertent pH transient formed by a salt gradient in the ion-exchange chromatography of proteins. *Biotechnol P*, 21(3):902–910, 2005.
- [351] WINNIK, W. M. Continuous pH/salt gradient and peptide score for strong cation exchange chromatography in 2D-nano-LC/MS/MS peptide identification for proteomics. *Anal Chem*, 77(15):4991–4998, 2005.
- [352] TSONEV, L. I. UND HIRSH, A. G. Theory and applications of a novel ion exchange chromatographic technology using controlled pH gradients for separating proteins on anionic and cationic stationary phases. *J Chromatogr A*, 1200(2):166–182, 2008.
- [353] ARAKAWA, T., KITA, Y. UND EJIMA, D. Stress-free chromatography: IEC and HIC. *Curr Pharm Biotechnol*, 10(4):461–463, 2009.
- [354] SCUDERI, D., LE BARBU-DEBUS, K. UND ZEHACKER, A. The role of weak hydrogen bonds in chiral recognition. *Phys Chem Chem Phys*, 13(40):17916–17929, 2011.
- [355] ARCHER, M. J., LIN, B., WANG, Z. UND STENGER, D. A. Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA. *Anal Biochem*, 355(2):285–297, 2006.
- [356] MOROZUMI, Y., TAKIZAWA, Y., TAKAKU, M. UND KURUMIZAKA, H. Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities. *Nucl Acids Res*, 37(13):4296–4307, 2009.
- [357] MYLLYKANGAS, S., NATSOULIS, G., BELL, J. M. UND JI, H. P. Targeted sequencing library preparation by genomic DNA circularization. *BMC Biotechnol*, 11(122):doi:10.1186/1472–6750–11–122, 2011.
- [358] STEVENSON, K. A., MURALIDHARAN, G., MAYA, L., WELLS, J. C., BARHEN, J. UND THUNDAT, T. Covalent attachment of gold nanoparticles to DNA templates. *J Nanosci Nanotechnol*, 2(3):397–404, 2002.
- [359] KÖKPINAR, Ö. *Untersuchung von Membranadsorbersystemen in der Proteinaufreinigung und Entwicklung Aptamer-basierter Affinitätschromatografie*. PhD thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 2008.
- [360] AKIYAMA, H., SAKATA, K., MAKIYMA, D., NAKAMURA, K., TESHIMA, R., NAKASHIMA, A., OGAWA, A., YAMAGISHI, T., FUTO, S., OGUCHI, T., MANO, J. UND KITTA, K. Interlaboratory study of DNA extraction from multiple ground samples, multiplex real-time PCR, and multiplex qualitative PCR for individual kernel detection system of genetically modified maize. *J AOAC Int*, 94(5):1540–1547, 2011.
- [361] KAMLE, S., KUMAR, A. UND BHATNAGAR, R. K. Development of multiplex and construct specific PCR assay for detection of cry2Ab transgene in genetically modified crops and product. *GM Crops*, 2(1):74–81, 2011.
- [362] KIM, D. M., CHUNG, S. H. UND CHUN, H. S. Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a korean fermented soybean food starter. *Food Microbiol*, 28(7):1402–1408, 2011.
- [363] CHAMBERLAIN, J. S., GIBBS, R. A., RANIER, J. E., NGUYEN, P. N. UND CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acids Res*, 16(23):11141–11156, 1988.
- [364] HAYDEN, M. J., NGUYEN, T. M., WATERMAN, A. UND CHALMERS, K. J. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9(80):doi:10.1186/1471–2164–9–80, 2008.
- [365] LÖFFERT, D., KARGER, S., TWIELING, G., ULBER, V. UND KANG, J. Optimization of multiplex PCR. *QIAGEN News*, 2(1):1–4, 1999.
- [366] TIAN, F., WANG, X., TENG, D., YANG, Y., GUAN, Q., AO, C. UND WANG, J. Optimization of a multiplex PCR assay for detecting transgenic soybean components in feed products. *Appl Biochem Biotechnol*, 165(6):1225–1234, 2011.
- [367] SCHOSKE, R., VALLONE, P. M., RUITBERG, C. M. UND BUTLER, J. M. Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal Bioanal Chem*, 375(3):333–343, 2003.
- [368] SAMBROOK, J. UND RUSSELL, D. W. *Molecular cloning - a laboratory manual*, volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, third edition edition, 2001.

- [369] WANG, N., CHEN, R. UND WANG, Y. Conservation of ribosomal protein gene ordering in 16 complete genomes. *Sci China C Life Sci*, 43(2):120–128, 2000.
- [370] OLSEN, G. J. UND WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*, 7(1):113–123, 1993.
- [371] HENKE, W., HERDEL, K., JUNG, K., SCHNORR, D. UND LOENING, S. A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucl Acid Res*, 25(19):3957–3958, 1997.
- [372] CHAKRABARTI, R. UND SCHUTT, C. E. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucl Acid Res*, 29(11):2377–2381, 2001.
- [373] SPIESS, A. N., MÜLLER, N. UND IVELL, R. Trehalose is a potent PCR enhancer: lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of Taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clin Chem*, 50(7):1256–1259, 2004.
- [374] RALSER, M., QUERFURTH, R., WARNATZ, H. J., LEHRACH, H., YASPO, M. L. UND KROBITSCH, S. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 347(3):747–751, 2006.
- [375] BitesizeBio. *PCR problems? Try an additive.* <http://bitesizebio.com/articles/pcr-problems-try-an-additive/>, 2007.
- [376] Ralser, M. *An economic PCR enhancer for GC-rich PCR templates.* www.protocol-online.org/protocols/An-Economic-PCR-Enhancer-for-GC-Rich-PCR-Templates-3469.html, 2009.
- [377] IOOS, R., FOURRIER, C., IANCU, G. UND GORDON, T. R. Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chain reaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathol*, 99(5):582–590, 2009.
- [378] IOOS, R., FABRE, B., SAURAT, C., FOURRIER, C., FREY, P. UND MARCAIS, B. Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pine. *Phytopathol*, 100(1):105–114, 2010.
- [379] REUTER, T. *Vergleichende Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung von isogenem und transgenem (Bt) Mais und zum Verbleib von „Fremd“-DNA im Gastrointestinaltrakt und in ausgewählten Organen und Geweben des Schweines sowie in einem rohen Fleischerzeugnis.* PhD thesis, Landwirtschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2003.
- [380] FINNEY, D. J. *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve.* Cambridge University Press, Cambridge, Vereinigtes Königreich, first edition edition, 1947.
- [381] TETZNER, R. *Entwicklung von Realtime-PCR-Methoden zur Analyse von DNA-Methylierung.* PhD thesis, Naturwissenschaftliche-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2006.
- [382] BENTE, D. A. *Evaluierung konventioneller und real-time RT-PCR-Protokolle für die spezifische Diagnose des Virus der Klassischen Schweinepest.* PhD thesis, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 2003.
- [383] GREDES, T. *Untersuchung der Genaktivität im Kiefergelenkknorpel des Schweins (*Sus scrofa domesticus*) nach Vorverlagerung des Unterkiefers.* PhD thesis, Medizinische Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, 2007.
- [384] MCGOLDRICK, A., BENSAUDE, E., IBATA, G., SHARP, G. UND PATON, D. J. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent probes. *J Virol Methods*, 79(1):85–95, 1999.
- [385] WEI, T., LU, G. UND CLOVER, G. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *J Virol Methods*, 151(1):132–139, 2008.
- [386] NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N. UND HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acids Res*, 28(12):e63, 2000.
- [387] MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N. UND NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(1):150–154, 2001.
- [388] TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H. UND NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*, 3(5):877–882, 2008.

- [389] MANNECK, H. Loopamp - alternatives Amplifikationsverfahren der Zukunft? *Klinische Chemie*, 6(1):1–6, 2009.
- [390] ALHASSAN, A., GOVIND, Y., TAM, N. T., THEKISOE, O. M., YOKOYAMA, N., INOUE, N. UND IGARASHI, I. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitol Res*, 100(5):1165–1168, 2007.
- [391] MEKATA, T., SUDHAKARAN, R., KONO, T., SUPAMATTAYA, K., LINH, N. T., SAKAI, M. UND ITAMI, T. Real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification as a simple method for detecting white spot syndrome virus. *Lett Appl Microbiol*, 48(1):25–32, 2009.
- [392] MORISHITA, S., TANI, H., KURATA, S., NAKAMURA, K., TSUNEDA, S., SEKIGUCHI, Y. UND NODA N. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and simple quantification of WT1 mRNA. *Clin Biochem*, 42(6):515–520, 2009.
- [393] CAI, Z., LOU, G., CAI, T., YANG, J. UND WU, N. Development of a novel genotype-specific loop-mediated isothermal amplification technique for Hepatitis B virus genotypes B and C genotyping and quantification. *J Clin Virol*, 52(4):288–294, 2011.
- [394] JENKINS, D. M., KUBOTA, R., DONG, J., LI, Y. UND HIGASHIGUCHI, D. Handheld device for real-time, quantitative, LAMP-based detection of Salmonella enterica using assimilating probes. *Biosens Bioelectron*, 30(1):255–260, 2011.
- [395] HAN, F., WANG, F. UND GE, B. Detecting potentially virulent Vibrio vulnificus strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*, 77(8):2589–2595, 2011.
- [396] AOI, Y., HOSOGAI, M. UND TSUNEDA, S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J Biotechnol*, 125(4):484–491, 2006.
- [397] LUCCHI, N. W., DEMAS, A., NARAYANAN, J., SUMARI, D., KABANYWANYI, A., KACHUR, S. P., BARNWELL, J. W. UND UDHAYAKUMAR V. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS One*, 29(5):e13733, 2010.
- [398] KOX, L. F. F., BROUWERSHAVEN, I. R., VOSSENBERG, B. T., BELD, H. E., BONANTS, P. J. UND DE GRUYTER, J. Diagnostic values and utility of immunological, morphological, and molecular methods for in planta detection of Phytophthora ramorum. *Phytopathol*, 97(9):1119–1129, 2007.
- [399] SCHMITTGEN, T. D., ZAKRAJSEK, B. A., MILLS, A. G., GORN, V., SINGER, M. J. UND REED, M. W. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, 285(2):194–204, 2000.
- [400] GAL, A. B., CARNWATH, J. W., DINNYES, A., HERRMANN, D., NIEMANN, H. UND WRENZYCKI, C. Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev*, 18(3):365–371, 2006.
- [401] HOSPODSKY, D., YAMAMOTO, N. UND PECCIA, J. Accuracy, precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *Appl Environ Microbiol*, 76(21):7004–7012, 2010.
- [402] MACKAY, I. M., ARDEN, K. E. UND NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. *Nucl Acids Res*, 30(6):1292–1305, 2002.
- [403] WILHELM, J. UND PINGOUD, A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 4(11):1120–1128, 2003.
- [404] HINDENACH, B. R. UND STAFFORD, D. W. Nucleotide sequence of the 18S-26S rRNA intergene region of the sea urchin. *Nucl Acids Res*, 12(3):1737–1747, 1984.
- [405] REITER, M. UND PFAFFL, M. W. RT-PCR optimization strategies. In: Kennedy, S. und Oswald, N. (Hrsg.). *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*, 5:97–118. Caister Academic Press, Norwich, Vereinigtes Königreich, 2011.
- [406] PFAFFL, M. W. *Quantification strategies in real-time RT-PCR*. www.gene-quantification.de/strategy.html, 2002.
- [407] ZHOU, M. Y. UND GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol*, 2(1):1–7, 2000.
- [408] PARK, H. K. UND ZENG, C. A vector for purification-free cloning of polymerase chain reaction products. *Anal Biochem*, 377(1):108–110, 2008.

- [409] MÜLHARDT, C. *Molekularbiologie / Genomics*. Der Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 6. auflage edition, 2009.
- [410] RUIJTER, J. M., RAMAKERS, C., HOOGAARS, W. M., KARLEN, Y., BAKKER, O., VAN DEN HOFF, M. J. UND MOORMAN, A. F. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucl Acids Res*, 37(6):e45, 2009.
- [411] LIN, M. H., TSENG, C. H., TSENG, C. C., HUANG, C. H., CHONG, C. K. UND TSENG, C. P. Real-time PCR for rapid genotyping of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clin Biochem*, 34(8):661–666, 2001.
- [412] DORAK, M. T. *Real-time PCR*. Bios Advanced Methods. Taylor & Francis Group, Oxford, Vereinigtes Königreich, print edition edition, 2006.
- [413] LE BLANCQ, S. M., KHRAMTSOV, N. V., ZAMANI, F., UPTON, S. J. UND WU, T. W. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol*, 90(2):463–478, 1997.
- [414] DESQUESNES, M. UND DAVILA, A. M. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet Parasitol*, 109(3):213–231, 2002.
- [415] STEWART, F. J. UND CAVANAUGH, C. M. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria. *J Mol Evol*, 65(1):44–67, 2007.
- [416] ROGERS, S. O. UND BENDICH, A. J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol*, 9(5):509–520, 1987.
- [417] PROKOPOWICH, C. D., GREGORY, T. R. UND CREASE, T. J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46(1):48–50, 2003.
- [418] DUBOUZET, J. G. UND SHINODA, K. Relationships among old and new world Alliums according to ITS DNA sequence analysis. *TAG Theoret App Gen*, 98(4):422–433, 1999.
- [419] ZUBER, D. UND WIDMER, A. Genetic evidence for host specificity in the hemi-parasitic *Viscum album* L. (Viscaceae). *Mol Ecol*, 9(8):1069–1073, 2000.
- [420] GOODENBOUR, J. M. UND PAN, T. Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucl Acids Res*, 34(21):6137–6146, 2006.
- [421] LEE, Z. M., BUSSEMA DER 3., C. UND SCHMIDT, T. M. rrnDB: documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucl Acids Res*, 37(Database issue):D489–D493, 2009.
- [422] KANAYA, S., YAMADA, Y., KINOCHI, M., KUDO, Y. UND IKEMURA, T. Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *J Mol Evol*, 53(4):290–298, 2001.
- [423] NEMETH, A. UND LANGST, G. Chromatin organization of active ribosomal RNA genes. *Epigenetics*, 3(5):243–245, 2008.
- [424] CASE, R. J., BOUCHER, Y., DAHLLOF, I., HOLMSTROM, C., DOOLITTLE, W. F. UND KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*, 73(1):278–288, 2007.
- [425] MESSERER, S. *Entwicklung und Evaluierung von Real-time PCR-Verfahren zum Nachweis von Ehrlichia canis und Anaplasma phagocytophilum (Anaplasmataceae)*. PhD thesis, Tierärztlichen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2006.
- [426] HOLTHAUS, K. *Quantitativer Nachweis von Lawsonia intracellularis mittels real-time PCR in Kotproben von Schweinen*. PhD thesis, Außenstelle für Epidemiologie, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 2008.
- [427] BEIFUSS, B. *Etablierung einer molekularen Sofortdiagnostik von Dermatophyten auf Speziesebene aus nativem Material von Patienten mit Hautmykosen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Real-time PCR (LightCycler)*. PhD thesis, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2008.
- [428] HARTMANN, B. *Entwicklung einer Real-Time PCR-Nachweismethode für Yersinia enterocolitica*. PhD thesis, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2007.
- [429] ROSA, S. U. *Real Time-PCR-Untersuchungen zur Persistenz von infektiösen Toxoplasma gondii-Dauerstadien in Rohwurst-Erzeugnissen*. PhD thesis, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, 2009.

- [430] BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. UND WITTEW, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4):611–622, 2009.
- [431] BioCharts. *Quantitative real time PCR: TaqMan oder SYBR green?* <http://biocharts.blogspot.de/2009/02/quantitative-real-time-pcr-taqman-oder.html>, 2009.
- [432] HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. UND GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(16):7276–7280, 1991.
- [433] LEE, L. G., CONNELL, C. R. UND BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res*, 21(16):3761–3766, 1993.
- [434] ARMBRUSTER, K. *Entwicklung einer Multiplex-TaqMan-PCR zur Diagnostik der viralen Enzephalitis*. PhD thesis, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., 2006.
- [435] ERLICH, H. A., GIBBS, R. UND KAZAZIAN JR., H. H. *Polymerase chain reaction*, volume 18 of *Current communications in molecular biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989.
- [436] SCHILD, T. A. *Einführung in die Real-Time-TaqMan PCR-Technologie*. 7700 SDS Workshop, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, 2010.
- [437] TANG-NELSON, K. UND LIGHTNER, D. V. *Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, Taura syndrome virus, and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp*. Department of Veterinary Science and Microbiology, University of Arizona, Tucson, USA, 2001.
- [438] Life Technologies. *TaqMan chemistry vs. SYBR green chemistry for real-time PCR*. qPCR education. <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/taqman-assays-vs-sybr-green-dye-for-qpcr.html>, 2012.
- [439] VALASEK, M. A. UND REPA, J. J. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29(3):151–159, 2005.
- [440] HADRIKH, I., MARY, C., MAKNI, F., ELLOUMI, M., DUMON, H., AYADI, A. UND RANQUE, S. Comparison of PCR-ELISA and real-time PCR for invasive aspergillosis diagnosis in patients with hematological malignancies. *Med Mycol*, 49(5):489–494, 2011.
- [441] FEUILLET, C., LEACH, J. E., ROGERS, J., SCHNABLE, P. S. UND EVERSOLE, K. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends Plant Sci*, 16(2):77–88, 2011.
- [442] RABINOWICZ, P. D. UND BENNETZEN, J. L. The maize genome as a model for efficient sequence analysis of large plant genomes. *Curr Opin Plant Biol*, 9(2):149–156, 2006.
- [443] KRON, P., SUDA, J. UND HUSBAND, B. C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annu Rev Evol Syst*, 38(8):847–876, 2007.
- [444] Redaktion Pflanzenforschung.de. *Herausforderungen bei der Genomsequenzierung von Pflanzen*. Aktuelles. www.pflanzenforschung.de/journal/aktuelles/herausforderungen-bei-der-genomsequenzierung-von-pflanzen?, 2011.
- [445] GREILHUBER, J., VOLLETH, M. UND LOIDL, J. Genome size of man and animals relative to the plant *Allium cepa*. *Can J Genet Cytol*, 25(6):554–560, 1983.
- [446] BAROW, M. *Beziehungen zwischen Genomgröße, Basenzusammensetzung und Endopolyploidie bei Samenpflanzen*. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2003.
- [447] GRIME, J. P. UND MOWFORTH, M. A. Variation in genome size - an ecological interpretation. *Nature*, 299(1):151–153, 1982.
- [448] RICOCH, A., YOCKTENG, R., BROWN, S. C. UND NADOT, S. Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome*, 48(3):511–520, 2005.
- [449] OHRI, S., FRITSCH, R. M. UND HANELT, P. Evolution of genome size in *Allium* (Alliaceae). *Plant Syst Evol*, 210(1):57–86, 1998.

- [450] ZONNEVELD, B. J. M., LEITCH, I. J. UND BENNETT, M. D. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Ann Bot*, 96(2):229–244, 2005.
- [451] LABANI, R. M. UND ELKINGTON, T. T. Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L. (Liliaceae). *Heredity*, 59(1):119–128, 1987.
- [452] NAGL, W. UND STEIN, B. DNA characterization in host-specific *Viscum album* subspecies (Viscaceae). *Plant Syst Evol*, 166(4):246–248, 1988.
- [453] MARIE, D. UND BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell*, 78(1):41–51, 1993.
- [454] ULRICH, I., FRITZ, B. UND ULRICH, W. Application of DNA fluorochromes for flow cytometric DNA analysis of plant protoplasts. *Plant Science*, 55(4):151–158, 1988.
- [455] ZONNEVELD, B. J. M. New record holders for maximum genome size in Eudicots and Monocots. In: Greilhuber, J., Doležel, J., Leitch, I. J., Loureiro, J. und Suda, J. (Hrsg.). *Genome size*. Journal of botany, 6:58–61. Hindawi Publishing, Kairo, Ägypten, 2010.
- [456] JEDRZEJCZYK, I. UND SLIWINSKA, E. Leaves and seeds as materials for flow cytometric estimation of the genome size of 11 Rosaceae woody species containing DNA-staining inhibitors. In: Greilhuber, J., Doležel, J., Leitch, I. J., Loureiro, J. und Suda, J. (Hrsg.). *Genome size*. Journal of botany, 16:142–150. Hindawi Publishing, Kairo, Ägypten, 2010.
- [457] TALENT, N. UND DICKINSON, A. Polyploidy variation in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary influences from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Can J Bot*, 83(10):1268–1304, 2005.
- [458] GARCIA, S., GARNATJE, T., HIDALGO, O., MAS DE XAXARS, G., PELLICER, J., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, I., VITALES, D. UND VALLÈS, J. First genome size estimations for some Eudicot families and genera. *Coll Bot*, 29(1):7–16, 2011.
- [459] DOLEŽEL, J., BARTOS, J., VOGLMAYR, H. UND GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51(2):127–128, 2003.
- [460] FEULGEN, R. UND ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 135(2):203–248, 1924.
- [461] CHIECO, P. UND DERENZINI, M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*, 111(5):345–358, 1999.
- [462] GREILHUBER, J., BARANYI, M. UND GREILHUBER, J. Feulgen densitometry: importance of a stringent hydrolysis regime. *Plant Biol*, 1(5):538–540, 1999.
- [463] LOUREIRO, J., RODRIGUEZ, E., SANTOS, C., DOLEŽEL, J. UND SUDA, J. FLOWer: A Plant DNA Flow Cytometry Database. In: Doležel, J., Greilhuber, J. und Suda, J. (Hrsg.). *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*, 18:423–438. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2008.
- [464] KASTEN, F. H. Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. *Biotech Histochem*, 78(1):45–49, 2003.
- [465] WILHELM, J., PINGOUD, A. UND HAHN, M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucl Acids Res*, 31(10):e56, 2003.
- [466] BAROW, M. UND MEISTER, A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ*, 26(4):571–584, 2003.
- [467] BAROW, M. Endopolyploidy in seed plants. *Bioessays*, 28(3):271–281, 2006.
- [468] BENNETT, M. D. DNA amount, latitude, and crop plant distribution. *Environ Exp Bot*, 16(2):93–108, 1976.
- [469] LEVIN, D. A. UND FUNDERBURG, S. W. Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *Am Nat*, 114(6):784–795, 1979.
- [470] KNIGHT, C. A., MOLINARI, N. A. UND PETROV, D. A. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Ann Bot*, 95(1):177–190, 2005.
- [471] DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J. UND SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc*, 2(9):2233–2244, 2007.

- [472] RUCH, F. Determination of DNA content by microfluorometry. In: Wied, G. L. (Hrsg.). *Introduction to quantitative cytochemistry*, 23:281–294. Academic Press, New York, USA, 1966.
- [473] DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochem Anal*, 2(4):143–154, 1991.
- [474] DOLEŽEL, J. UND GREILHUBER, J. Nuclear genome size: are we getting closer? *Cytometry Anal*, 77(7):635–642, 2010.
- [475] MÁRQUEZ, M. G., GALEANO, A., OLMOS, S. UND ROUX, M. E. Flow cytometric analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes in a model of immunodeficiency in Wistar rats. *Cytometry*, 41(2):115–122, 2000.
- [476] SOSA, G. A., QUIROGA, M. F. UND ROUX, M. E. Flow cytometric analysis of T-lymphocytes from nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in a model of secondary immunodeficiency in Wistar rats. *Immunobiol*, 214(5):384–391, 2009.
- [477] GALBRAITH, D. W., HARKINS, K. R., MADDOX, J. M., AYRES, N. M., SHARMA, D. P. UND FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601):1049–1051, 1983.
- [478] DOLEŽEL, J., BINAROVÁ, P. UND LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plant*, 31(2):113–120, 1989.
- [479] OTTO, F. J. Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. In: Radbruch, A. (Hrsg.). *Flow cytometry and cell sorting*, 10:101–104. Springer-Verlag, Berlin, 1992.
- [480] DOLEŽEL, J. UND GOHDE, W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, 19(2):103–106, 1995.
- [481] PFOSSER, M., AMON, A., LELLEY, T. UND HEBERLE-BORS, E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry Anal*, 21(4):387–393, 1995.
- [482] LOUREIRO, J., RODRIGUEZ, E., DOLEŽEL, J. UND SANTOS, C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Ann Bot*, 98(3):679–689, 2006.
- [483] DOLEŽEL, J. UND BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot*, 95(1):99–110, 2005.
- [484] DOLEŽEL, J., SGOBATI, S. UND LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol Plant*, 85(4):625–631, 1992.
- [485] CLARINDO, W. R. UND CARVALHO, C. R. Flow cytometric analysis using SYBR green I for genome size estimation in coffee. *Acta Histochem*, 113(2):221–225, 2011.
- [486] DICKSON, M. L., ARUMUGANATHAN, K., KRESOVICH, S. UND DOYLE, J. J. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. *Am J Bot*, 79(9):1081–1086, 1992.
- [487] LYSÁK, M. A. UND DOLEŽEL, J. Estimation of nuclear DNA content in sesleria (Poaceae). *Caryologia*, 52(2):123–132, 1998.
- [488] DOLEŽEL, J., GREILHUBER, J., LUCRETTI, S., MEISTER, A., LYSÁK, M. A., NARDI, L. UND OBERMAYER, R. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Ann Bot*, 82(1):17–26, 1998.
- [489] GAO, J. UND SCOTT, J. G. Use of quantitative real-time polymerase chain reaction to estimate the size of the house-fly *Musca domestica* genome. *Insect Mol Biol*, 15(6):835–837, 2006.
- [490] JEYAPRAKASH, A. UND HOY, M. A. The nuclear genome of the phytoseiid *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) is among the smallest known in arthropods. *Exp Appl Acarol*, 47(4):263–273, 2009.
- [491] KAEWKONG, W., IMTAWIL, K., MALEEWONG, W., INTAPAN, P. M., SRI-AROON, P., WONGKHAM, S. UND WONGKHAM, C. Genome size estimation of liver fluke *Opisthorchis viverrini* by real-time polymerase chain reaction based method. *Parasitol Int*, 61(1):77–80, 2012.
- [492] MOUNSEY, K. E., WILLIS, C., BURGESS, S. T., HOLT, D. C., MCCARTHY, J. UND FISCHER, K. Quantitative PCR-based genome size estimation of the astigmatid mites *Sarcoptes scabiei*, *Psoroptes ovis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Parasit Vectors*, 5(3):doi:10.1186/1756-3305-5-3, 2012.
- [493] HERRMANN, A., SCHULZ, W. UND HAHLBROCK, K. Two alleles of the single-copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element. *Mol Gen Genet*, 212(1):93–98, 1988.

- [494] ELLIOTT, R. C., PEDERSEN, T. J., FRISTENSKY, B., WHITE, M. J., DICKEY, L. F. UND THOMPSON, W. F. Characterization of a single copy gene encoding ferredoxin I from pea. *Plant Cell*, 1(7):681–690, 1989.
- [495] JENSEN, P. E., KRISTENSEN, M., HOFF, T., LEHMBECK, J., STUMMANN, B. M. UND HENNINGSEN, K. W. Identification of a single-copy gene encoding a type I chlorophyll a/b-binding polypeptide of photosystem I in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, 84(4):561–567, 2006.
- [496] GUPTA, R., WEBSTER, C. I. UND GRAY, J. C. The single-copy gene encoding high-mobility-group protein HMG-I/Y from pea contains a single intron and is expressed in all organs. *Plant Mol Biol*, 35(6):987–992, 1997.
- [497] BICHLER, J. UND HERRMANN, R. G. Analysis of the promoters of the single-copy genes for plastocyanin and subunit delta of the chloroplast ATP synthase from spinach. *Eur J Biochem*, 190(2):415–426, 1990.
- [498] WEDEL, N., KLEIN, R., LJUNGBERG, U., ANDERSSON, B. UND HERRMANN, R. G. The single-copy gene psbS codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. *FEBS Lett*, 314(1):61–66, 1992.
- [499] ARNON, D. I. Photosynthesis 1950–1975: changing concepts and perspectives. In: Trebst, A. und Avron, M. (Hrsg.). *Photosynthesis I: photosynthetic electron transport and photophosphorylation*. Encyclopedia of plant physiology, 5:7–56., 1977.
- [500] HUANG, P. L., HAHLBROCK, K. UND SOMSSICH, I. E. Detection of a single-copy gene on plant chromosomes by in situ hybridization. *Mol Gen Genet*, 211(1):143–147, 1988.
- [501] GOTO-YAMAMOTO, N., WAN, G. H., MASAKI, S. UND KOBAYASHI, S. Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, 162(6):867–872, 2002.
- [502] YLÄ-HERTTUALA, S., RISSANEN, T. T., VAJANTO, I. UND HARTIKAINEN, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 49(10):1015–1026, 2007.
- [503] NONAKA, Y., SODE, K. UND IKEBUKURO, K. Screening and improvement of an anti-VEGF DNA aptamer. *Molecules*, 15(1):215–225, 2010.
- [504] CRESSEY, R., WATTANANUPONG, O., LERTPRASERTSUKE, N. UND VINITKETKUMNUEN, U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumorigenesis. *BMC Cancer*, 5(128):doi:10.1186/1471-2407-5-128, 2005.
- [505] LÜBBECKE, M. *Neue Analyse- und Detektionsmethoden in der Microarray-Technologie*. PhD thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 2011.
- [506] HAAKE, C. *Prozesse zur Produktion, Aufreinigung und Testung von rekombinanten humanen Zytokinen aus chinese hamster ovary-Zellen*. PhD thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 2012.
- [507] RAINES, R. T., MCCORMICK, M., VAN OOSBREE, T. R. UND MIERENDORF, R. C. The S-tag fusion system for protein purification. In: Jankowsky, E. (Hrsg.). *Methods in Enzymology*, 326(23): 362–376. Elsevier, München, 2000.
- [508] LIU, W. UND SAINT, D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(2):347–353, 2002.
- [509] RAMAKERS, C., RUIJTER, J. M., DEPREZ, R. H. UND MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339(1):62–66, 2003.
- [510] RADONIC, A., THULKE, S., MACKAY, I. M., LANDT, O., SIEGERT, W. UND NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(4):856–862, 2004.
- [511] BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. UND CLARK, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genom*, 21(3):389–395, 2005.
- [512] INFANTE, C., MATSUOKA, M. P., ASENSIO, E., CANAVATE, J. P., REITH, M. UND MANCHADO, M. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 9(28):doi:10.1186/1471-2199-9-28, 2008.
- [513] REZWAN, F., LAN, R. UND REEVES, P. R. Molecular basis of the indole-negative reaction in *Shigella* strains: extensive damages to the *tna* operon by insertion sequences. *J Bacteriol*, 186(21):7460–7465, 2004.

- [514] PARK, H. K., YOON, J. W., SHIN, J. W., KIM, J. Y. UND KIM, W. rpoA is a useful gene for identification and classification of *Streptococcus pneumoniae* from the closely related viridans group Streptococci. *FEMS Microbiol Lett*, 305(1):58–64, 2010.
- [515] PETIT, C., PERNIN, F., HEYDEL, J. M. UND DÉLYE, C. Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. *BMC Res Notes*, 5(18):doi:10.1186/1756-0500-5-18, 2012.
- [516] MESTDAGH, P., VAN VLIERBERGHE, P., DE WEER, A., MUTH, D., WESTERMANN, F., SPELEMAN, F. UND VANDESOMPELE, J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*, 10(6):R64, 2009.
- [517] KANNO, J., AISAKI, K. I., IGARASHI, K., NAKATSU, N., ONO, A., KODAMA, Y. UND NAGAO, T. "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genom*, 7(64):doi:10.1186/1471-2164-7-64, 2006.
- [518] GUZMAN, L. M., BELIN, D., CARSON, M. J. UND BECKWITH, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol*, 177(14):4121–4130, 1995.
- [519] LEE, C., KIM, J., SHIN, S. G. UND HWANG, S. Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 123(3):273–280, 2006.
- [520] SKULJ, M., OKRSLAR, V., JALEN, S., JEVSEVAR, S., SLANC, P., STRUKELJ, B. UND MENART, V. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb Cell Fact*, 7(6):doi:10.1186/1475-2859-7-6, 2008.
- [521] KOPITO, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, 10(12):524–530, 2000.
- [522] SIEMEISTER, G., SCHNURR, B., MOHRS, K., SCHÄCHTELE, C., MARMÉ, D. UND MARTINY-BARON, G. Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 222(2):249–255, 1996.
- [523] HEIRING, C. UND MÜLLER, Y. A. Folding screening assayed by proteolysis: application to various cysteine deletion mutants of vascular endothelial growth factor. *PEDS*, 14(3):183–188, 2001.
- [524] STAUFFER, M. E., SKELTON, N. J. UND FAIRBROTHER, W. J. Refinement of the solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR*, 23(1):57–61, 2002.
- [525] TUGUES, S., KOCH, S., GUALANDI, L., LI, X. UND CLAESSEON-WELSH, L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med*, 32(2):88–111, 2011.
- [526] HARTL, F.U. UND HAYER-HARTL, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16(6):574–581, 2009.
- [527] FERRARA, N. UND HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161(2):851–858, 1989.
- [528] GOSPODAROWICZ, D., ABRAHAM, J. A. UND SCHILLING, J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(19):7311–7315, 1989.
- [529] BÜRING, M. G. *Charakterisierung der zellbezogenen Enzymproduktion prokaryontischer Systeme innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen*. PhD thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 2009.

Abkürzungsverzeichnis

AC	Affinitätschromatographie
AFLP	<i>amplified fragment-length polymorphism</i>
AMG	Arzneimittelgesetz
AM-RL	Arzneimittelrichtlinie
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APEX	<i>arrayed primer extension reaction</i>
AP-PCR	PCR mit <i>arbitrary primers</i>
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
cDNA	komplementäre DNA
CE	Kapillarelektrophorese
CHO	<i>chinese hamster ovary cell</i>
CPR	Kohlendioxidproduktionsrate
Ct	<i>threshold cycle</i>
DAB	Deutsches Arzneibuch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicine
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELSD	Lichtstreuendetektor
EMA	European Medicines Agency
EU	Europäische Union
FDM	<i>first derivative maximum</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GC	Gaschromatographie
GCP	gute klinische Praxis

GMO	gentechnisch veränderter Organismus
HBD	Heparin-Bindungsdomäne
HKG	Haushaltsgen
HMPC	Herbal Medicinal Products Committee
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IR	Infrarotstrahlung
<i>its</i>	<i>internal transcribed spacer</i>
LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
LC	Flüssigchromatographie
LOD	<i>limit of detection</i>
LUX	<i>light upon extension</i>
MCS	<i>multiple cloning sites</i>
ML	Mistellektin
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTC	<i>no template control</i>
OLS	<i>oligonucleotide ligation assay</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
OTR	Sauerstofftransferrate
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pET	<i>plasmid expression by T7-RNA-polymerase</i>
PGF	<i>placental growth factor</i>
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
pI	isoelektrischer Punkt
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
RBD	Rezeptor-Bindungsdomäne
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

RFU	relative Fluoreszenzintensität
RI	Brechungsindexdetektor
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Umkehrphase
RQ	respiratorischer Quotient
rRNA	ribosomale RNA
SDM	<i>second derivative maximum</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
σ	Standardabweichung
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
<i>SQ</i>	Ausgangsmenge
TLC	Dünnschichtchromatographie
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff
<i>trn</i>	<i>intergenic spacer</i> zwischen zwei tRNA-Genen
tRNA	transfer-RNA
VarK	Variationskoeffizient
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

3.1	Bärlauch	5
3.2	Mistel	6
3.3	Weißdorn	8
3.4	Inverkehrbringung von pflanzlichen Arzneimitteln	10
3.5	Amplifikationsverläufe	22
3.6	PCR-Effizienz 1	23
3.7	PCR-Effizienz 2	24
3.8	Detektionsformate für die <i>real-time</i> PCR	29
4.1	Pflanzenpulver	32
4.2	Optimale Pulvermenge	37
4.3	Genomische DNA	37
4.4	DNA-Ausbeuten der konventionellen Extraktionsmethoden	39
4.5	DNA-Qualität der konventionellen Extraktionsmethoden	40
4.6	DNA-Zusammensetzung in Abhängigkeit der Extraktionsmethode	42
4.7	Interaktionsarten von DNA und Magnetpartikeln	44
4.8	NucleoMag 96 Plant	47
4.9	Wizard Magnetic 96 DNA	47
4.10	BioSpring 96 DNA Plant	48
4.11	Vergleich der <i>bead</i> -basierten Kits	48
4.12	Silica- <i>beads</i> mit selbst hergestellten Puffern	49
4.13	Vergleich von 5, 10 und 20 μ L Amino- <i>beads</i>	51
4.14	Einfluss von Salzgehalt und pH-Wert auf die Elution	53
4.15	Einsatz der Amino- <i>beads</i> für <i>Lefteria</i> -DNA	55
4.16	DNA-Ausbeute in Abhängigkeit von Lysat- und <i>bead</i> -Menge	55
4.17	Kosten-/Nutzenabwägung	57
4.18	DNA-Ausbeuten der <i>bead</i> -basierten Extraktionsmethoden	58
4.19	DNA-Zusammensetzung bei <i>bead</i> -basierten Extraktionsmethoden	59
4.20	Auswahl der besten Extraktionsmethode	61
4.21	Aktivierung von Carboxygruppen	63
4.22	Test der speziesspezifischen <i>beads</i>	63
4.23	Spezifität der speziesspezifischen <i>beads</i>	64
4.24	Bindungskapazität der speziesspezifischen <i>beads</i>	65
4.25	<i>Real-time</i> PCR von speziesspezifisch extrahierter DNA	66
4.26	Sequenzdaten	68
4.27	Mistel <i>its1</i>	70
4.28	Pflanzenspezifische Targets für den Multiplex-Assay	72
4.29	Duplex-Tests	72
4.30	Triplex-Tests	72
4.31	Temperaturoptimierung	73

4.32	PCR- <i>enhancer</i>	73
4.33	Gradient mit Triton X-100	75
4.34	Analytische Spezifität	75
4.35	Spezifität im Triplex-Ansatz	75
4.36	Nachweisgrenzen	76
4.37	Relative Nachweisgrenzen	77
4.38	Dynamischer Bereich	78
4.39	Nested-PCR	81
4.40	Nested-PCR-Varianten	82
4.41	Test verschiedener Nested-PCR-Formate	83
4.42	Analytische Spezifität	83
4.43	Dynamischer Bereich	84
4.44	Kapillarelektrophorese	84
4.45	Nachweisgrenzen	85
4.46	Diagnostische Sensitivität und Spezifität	85
4.47	LAMP-Primerdesign	87
4.48	<i>Loop</i> -Primer	88
4.49	LAMP-Reaktion	90
4.50	Agarose-Gelelektrophorese	91
4.51	Weitere Visualisierungstechniken	92
4.52	Reaktionszeit	93
4.53	Analytische Spezifität	93
4.54	Nachweisgrenzen	94
4.55	Target-Sequenzen	99
4.56	Primerdesign	100
4.57	Schmelzkurvenanalyse	103
4.58	Klonierungsstrategien	104
4.59	Inserts für den Methodenvergleich	106
4.60	Klonierungsinserts	109
4.61	Klonierungsinserts	110
4.62	Verdünnungsreihen zur Bestimmung der PCR-Effizienz	111
4.63	Regressionsanalyse der Verdünnungsreihen	112
4.64	Bestimmung der DNA-Zusammensetzung von <i>Lefteria</i>	115
4.65	Bestimmung der DNA-Zusammensetzung von <i>Lefteria</i>	120
4.66	Nachweisgrenzen der Plasmidstandards	122
4.67	Nachweisgrenzen für pflanzliche DNA	122
4.68	Nachweisgrenzen für pflanzliche DNA	123
4.69	Analyse von DNA-Gemischen	126
4.70	Analyse von DNA-Gemischen	128
4.71	Analyse von DNA-Gemischen	129
4.72	Analyse von DNA-Gemischen	130
4.73	Analyse von DNA-Gemischen	131
4.74	Analyse von DNA-Gemischen	133
4.75	Analyse von DNA-Gemischen	136
A.1	Test der vier Zellkernpuffer	145
A.2	Test der unterschiedlichen Farbstoffe	147
A.3	Ergebnisse der Zytometrie	150

A.4	Primerbindung am <i>single-copy</i> -Gen	151
A.5	Primerbindung am <i>single-copy</i> -Gen	153
A.6	Kalibrationsgeraden	154
A.7	pET-System	158
A.8	Klonierungsstrategien	159
A.9	Vektorkarten	160
A.10	VEGF-Vektoren	161
A.11	Ermittlung des Ct-Werts	163
A.12	Bestimmung der Annealing-Temperatur	163
A.13	Bestimmung der Effizienzen	164
A.14	Quantifizierung der VEGF-Proben	166
A.15	SDS-PAGE-Nachweis von VEGF	168
A.16	Western Blot für VEGF	169
A.17	Reaktorkultivierung	170
A.18	Proteinaufreinigung	170
A.19	Bioaktivitätstest	172
A.20	Weitere Daten zu Abb. 4.69	198
A.21	Weitere Daten zu Abb. A.18	198

Tabellenverzeichnis

3.1	Originalrezeptur einer Lefteria-Tablette	4
3.2	Medizinische Eigenschaften von Bärlauch, Mistel und Weißdorn	9
3.3	Bekannte DNA-basierte Nachweisassays für Arzneipflanzen	16
3.4	Bekannte <i>real-time</i> PCR-Anwendungen für Arzneipflanzen	20
3.5	Vergleich von Quantifizierungsstrategien	28
4.1	DNA-Extraktionsmethoden	33
4.2	Aufreinigungsprozeduren	34
4.3	Einfluß von Methode und Matrix auf die DNA-Extraktion	37
4.4	Extraktionsleistung der getesteten Methoden	43
4.5	<i>Bead</i> -Oberflächen	45
4.6	DNA-Bindungskapazitäten der verwendeten <i>magnetic beads</i>	58
4.7	Charakterisierung der modifizierten Magnetpartikel.	64
4.8	Potentielle Targets für den Nachweis von Bärlauch, Mistel und Weißdorn auf DNA-Basis.	69
4.9	Annealing-Temperaturen	71
4.10	Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR	75
4.11	Diagnostische Sensitivität	79
4.12	Analytische Leistungsmerkmale	80
4.13	Amplifikationsbedingungen der Nested-PCR	81
4.14	Diagnostische Sensitivität	86
4.15	Analytische Leistungsmerkmale	86
4.16	Amplifikationsbedingungen der LAMP	89
4.17	Diagnostische Sensitivität	95
4.18	Analytische Leistungsfähigkeit	95
4.19	<i>Real-time</i> PCR-Target-Sequenzen	101
4.20	Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen	102
4.21	Klonierungsinserts	104
4.22	Bewertung der Klonierungsmethoden	108
4.23	PCR-Effizienzen	113
4.24	DNA-Zusammensetzung von Lefteria	114
4.25	Target-Kopien in den Pflanzengenomen	116
4.26	Pflanzenzellen in Lefteria	117
4.27	Berechnungsgrundlage	117
4.28	Dynamische Messbereiche	121
4.29	Nachweisgrenzen	124
4.30	Analytische Spezifität	125
4.31	Proben zum Test auf diagnostische Sensitivität	127
4.32	Diagnostische Sensitivität	129
4.33	Proben zum Test des Gesamtassays	129
4.34	Bewertung des Gesamtassays	131

4.35	Annealing-Temperatur der TaqMan-Sonden	134
4.36	Konzentration der TaqMan-Sonden	135
5.1	Zusammenfassung der DNA-Extraktion	139
5.2	Zusammenfassung der qualitativen Analyse	140
5.3	Zusammenfassung der quantitativen Analyse	141
A.1	Bekannte Genomgrößendaten der drei Arzneipflanzen	143
A.2	Zellkernextraktionspuffer	145
A.3	Test der vier Zellkernpuffer	146
A.4	Zellkernfarbstoffe	147
A.5	Referenzpflanzen	149
A.6	Ergebnisse der Zytometrie	150
A.7	Genomgrößenbestimmung durch <i>real-time</i> PCR	150
A.8	Pflanzliche <i>single-copy</i> -Gene	152
A.9	Primerfunktionalitäten	153
A.10	Ergebnisse der <i>real-time</i> PCR	155
A.11	VEGF-Stämme	161
A.12	Gen-Targets für die <i>real-time</i> PCR	163
A.13	PCR-Effizienzen	165
A.14	Macherey-Nagel NucleoMag 96 Plant	184
A.15	Promega Wizard Magnetic 96 DNA Plant System	185
A.16	Qiagen BioSpring DNA Plant	185
A.17	Silica- <i>beads</i> mit selbst hergestellten Puffern	185
A.18	Amino- <i>beads</i> zur DNA-Extraktion	185
A.19	Speziesspezifische <i>magnetic beads</i>	186
A.20	SDS-PAGE	196
A.21	„Universelle“ Kalibration	197

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kai-Oliver Mutz
Geburtsdatum: 20.10.1982
Geburtsort: Hannover
Nationalität: deutsch

Studium

seit Apr. 2009 Promotionsstudium am Institut für Technische Chemie der
Leibniz Universität Hannover
Okt. 2006 – Sept. 2008 Life Science Studium an der Leibniz Universität Hannover,
Abschluss: Master of Science
Okt. 2003 – Sept. 2006 Life Science Studium an der Leibniz Universität Hannover,
Abschluss: Bachelor of Science

Schulbildung

Aug. 1995 – Jun. 2002 Gymnasium Sarstedt, Abschluss: Abitur
Aug. 1993 – Jul. 1995 Orientierungsstufe Pattensen
Aug. 1989 – Jul. 1993 Grundschule Pattensen

Publikationsliste

Veröffentlichungen

MUTZ, K. O., WALTER, J. G., STAHL, F. UND SCHEPER, T. A new real-time PCR method for qualitative and quantitative detection of plants in traditional herbal drugs. eingereicht, 2012.

SCHMIDT, S., WILLERS, J., STAHL, F., MUTZ, K. O., SCHEPER, T., HAHN, A. UND SCHUCHARDT, J. P. Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. *Lipids in Health and Disease*, 11(172):doi:1186/1476-511X-11-172, 2012.

MUTZ, K. O., HEILKENBRINKER, A., LÖNNE, M., WALTER, J. G. UND STAHL, F. Transcriptome analysis using next generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(1):22–30, 2012.

SCHMIDT, S., STAHL, F., MUTZ, K. O., SCHEPER, T., HAHN, A. UND SCHUCHARDT, J. P. Transcriptome-based identification of antioxidative gene expression after fish oil supplementation in normo- and dyslipidemic men. *Nutrition & Metabolism*, 9(45):doi:10.1186/1743-7075-9-45, 2012.

SCHMIDT, S., SCHUCHARDT, J. P., STAHL, F., MUTZ, K. O., SCHEPER, T. UND HAHN, A. Different gene expression profiles in normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation: results from a randomized controlled trial. *Lipids in Health and Disease*, 22(105):doi:10.1186/1476-511X-11-105, 2012.

STAHL, F., HITZMANN, B., MUTZ, K. O., LANDGREBE, D., LÜBBECKE, M., KASPER, C., WALTER, J. G. UND SCHEPER, T. Transcriptome analysis. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 127(1):1–25, 2011.

Kongressbeiträge

SCHMIDT, S., SCHUCHARDT, J. P., STAHL, F., MUTZ, K. O., SCHEPER, T. UND HAHN, A. *Different gene expression profiles in normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation: results from a randomized placebo-controlled trial*. XVII Lipid Meeting, Leipzig, 08. – 10. Dezember 2011.

SCHAPER, D., MUTZ, K. O., LINDNER, P., BEUTEL, S., VAN GRIENSVEN, M., KASPER, C. UND SCHEPER, T. *Nano-CT adaption for cell culture optimization*. High Resolution X-ray CT Symposium, Dresden, 31. August – 02. September 2010.

WOLFF, C., GROTE, B., BICE, I., MUTZ, K. O., STANKE, M., BEUTEL, S., HITZMANN, B. UND SCHEPER, T. *Traditionsbraukunst - Über die Entstehung des VE-Bock's*. 1st International Brewing Contest, Hamburg, 06. – 08. Mai 2010.

LÜBBECKE, M., MUTZ, K. O., STAHL, F. UND SCHEPER, T. *Detection strategies for protein microarrays based on aptamers*. 9. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, 07. – 09. Dezember 2009.