

**Friedrich Schiller-Universität Jena**

Max Planck Institut für chemische Ökologie, Jena

Abteilung Biochemie



---

seit 1558

**Charakterisierung und Regulation der potentiellen  
DIMBOA-Glc O-Methyltransferasen BX10e, BX10f und BX10g**

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades eines

Bachelor of Science (B.Sc.) Biochemie/Molekularbiologie

Vorgelegt von

**Peter Hempel**

Geboren am 14.08.1988 in Leisnig

Jena, September 2014

Gutachter:

Dr. Tobias Köllner

Prof. Dr. Severin Sasso

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Grundlagen .....	7
1.2 Zielstellung.....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	5
2. Material.....	10
2.1 Geräte .....	10
2.2 Chemikalien .....	11
2.3 Fertigsysteme.....	11
2.4 Enzyme .....	12
2.5 Primer .....	12
2.6 Klonierungsvektor, Bakterienstamm und Maislinie.....	13
3. Methoden.....	14
3.1. Klonierung der synthetisierten DNA-Sequenzen in <i>E.coli</i> .....	14
3.1.1 Amplifikation der cDNA .....	14
3.1.2 Enzymverdau und Ligation von pASK-IBA37plus und den PCR-Produkten .....	15
3.1.3 Transformation der NEB 10 $\beta$ Kultur mit den Klonierungsvektoren .....	15
3.1.4 Selektion der positiven Kolonien mittels Kolonie-PCR.....	15
3.1.5 Kontrollverdau und Sequenzierung der positiven Kolonien .....	16
3.1.6 Lagerung der gentechnisch veränderten Organismen.....	17
3.2 Induzierte Expression der Zielproteine .....	17
3.3 Aufreinigung der Zielproteine .....	17
3.3.1 Zellaufschluss .....	17
3.3.2 Aufreinigung über Ni-NTA-Säulchen .....	18
3.3.3 Umpuffern und Aufkonzentrieren .....	18
3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	18
3.5 Überprüfung der Zielproteine auf enzymatische Aktivität.....	18
3.5.1 Aufreinigung des Substrats DIMBOA-Glc mittels präparativer HPLC .....	18
3.5.2 Enzym-Substrat-Reaktion als Aktivitätssays.....	19
3.5.3 Messung der Substrat/Produkt-Konzentrationen über LC-MS/MS.....	19
3.6 Induktionsexperiment .....	21
3.6.1 Kultivierung der B73-Maiskeimlinge .....	21
3.6.2 Induktion mit Jasmonsäure und DIMBOA .....	21

3.6.3	Aufbereitung und Lagerung der Pflanzenproben.....	21
3.6.4	Extraktion der Glukoside.....	22
3.6.5	Extraktion der Phytohormone.....	22
3.6.6	Messung und Auswertung der Phytohormone Glucoside über LC-MS/MS .....	22
3.6.7	Auswertung der Messergebnisse mit Analyst 1.6 und Excel .....	22
3.7	Ermittlung der Transkriptionsakkumulation über qRT-PCR.....	23
3.7.1	RNA-Extraktion, DNase-Verdau und cDNA-Synthese .....	23
3.7.2	qRT-PCR .....	24
3.8	Statistischer Test zur Bewertung der Ergebnisse – one way ANOVA .....	24
4.	Ergebnisse und Auswertung .....	25
4.1	Bx10e, Bx10f und Bx10g als Bande im SDS-Gel.....	25
4.2	Negatives Aktivitätsassay DIMBOA-Glc/HDMBOA-Glc .....	25
4.3	Positives Aktivitätsassay Kaempferol/methyliertes Kaempferol .....	27
4.4	Induzierbarkeit des Glucosidstoffwechsels bei B73 .....	29
4.5	Autoinduktion von Phytohormonen durch Jasmonsäure bzw. DIMBOA.....	30
4.6	Transkriptakkumulationen in induziertem Pflanzenmaterial .....	31
5	Einbettung ins System .....	31
	Anhang.....	33
	Literaturverzeichnis.....	34

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Benzoxazinoide Grundstruktur	7
Abb. 2: Bx10 – Einordnung in Syntheseweg und Phylogenetischer Baum	7
Abb. 3: Lösungsmittelgradient der präparativen HPLC	20
Abb. 4: Lösungsmittelgradienten der HPLC	21
Abb. 5: SDS-Page der Zielproteine	26
Abb. 6: Aktivitätsassay DIMBOA-Glc/HDMBOA-Glc	27
Abb. 7: Aktivitätsassay Kaempferol/Methyliertes Kaempferol	29
Abb. 8: Balkendiagramm der festgestellten Glucosid-Konzentrationen in mg/g(FW)	30
Abb. 9: Balkendiagramm der Phytohormon-Konzentrationen in mg/g(FW)	31
Abb. 10: Balkendiagramm der Transkriptakkumulation für die bekannten und potentiellen DIMBOA O-Methyltransferasen	32

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-Lsg.	Adenosintriphosphatlösung
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikmeter
ddH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Lsg.	Desoxi-Nukleotidtriphosphat-Lösung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FD-Puffer	FastDigest-Puffer
g	Gramm
h	Stunden
HPLC	high performance liquid chromatography

Hz	Hertz
Kae	Kaempferol
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
LC	Liquid-Chromatographie
MS	Massenspektometrie
m/z	Masse/Ladungszahl
Meth. Kae	Methyliertes Kaempferol
MethOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRM	Multiple reaction monitoring
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
oligo-dt	15–25 Desoxythymidine
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Retentionszeit
s	Sekunden
V	Volt
Lsg.	Lösung
Tab.	Tabelle
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
OD	Optische dichte
UV	Ultraviolettstrahlung
mM	Millimolar

## 1. Einleitung

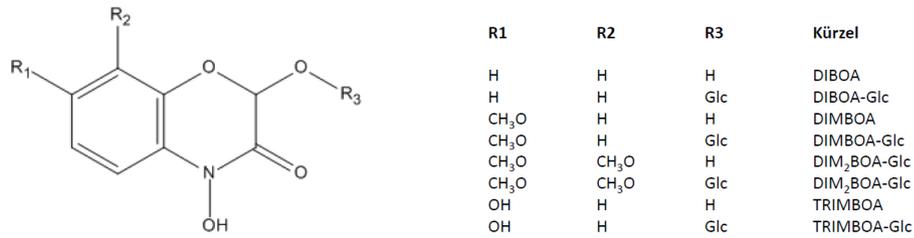
### 1.1 Grundlagen

Mais, *Zea mays*, ist eine der bedeutendsten Kulturpflanzen der Welt. Die größten Maisanbauggebiete liegen in seiner ursprünglichen Heimat in Amerika. Über die Hälfte der Ernte kommt von dort [1]. Aber auch in Deutschland nehmen die Anbauflächen jährlich zu. 2014 wurde im Vergleich zum Vorjahr eine Steigerung um 3% festgestellt und in den letzten vier Jahren waren stets mehr als 2,5 Mio. ha mit Mais bepflanzt [2]. Die steigenden Ölpreise und das Verlangen der Weltbevölkerung nach schnell nachwachsenden und billigen Rohstoffen lassen die ehemalige Futterpflanze auch in Europa in den Focus rutschen. Da sie als C4-Pflanze aus wenig viel machen kann.

Intensive Züchtungen haben es ermöglicht, dass der heute meist angebaute Hybridmais um bis zu 60% gesteigerte Erträge im Vergleich zu traditionellen Linien abwirft [3]. Der Weiterentwicklung dieser Kulturpflanze scheinen keine Grenzen gesetzt, Das 2,3 Mrd. bp umfassende Genom der Maislinie B73 ist vollständig entschlüsselt. 32000 Gene sind auf zehn Chromosomen angeordnet. 80% des Genoms besteht aus Transposons, repetitive Sequenzen [3], die durch Stressoren aktiviert werden können und dann ihre Position im Genom verändern können [4]. Durch diese induzierte Mutationsfreudigkeit ist der Mais sehr anpassungsfähig und zeigt regional unterschiedlichste Phänotypische und genotypische Profile zur Abwehr von Feinden und ungünstigen klimatischen Bedingungen [5].

Diese unschätzbare Vielfalt, die anspruchslose Kultivierung und die Tatsache, dass sowohl ein komplettes Genom als auch ein wirtschaftliches Interesse vorhanden ist, machen *Zea mays* zu einem beliebten Modellorganismus in der Biochemie. Ein spannendes Thema sind die Benzoxazinoide. Sie gehören zu den Sekundärmetaboliten und leiten sich von der Hydroxamsäure ab, wie in Abbildung 1 ersichtlich. Ihre Aktivität ist zuerst in einer Maismutante aufgefallen, die deutlich weniger DIMBOA-Glc als andere Maislinien produziert. In ihr werden die nötigen Enzyme für die Benzoxazinoidbiosynthese nicht exprimiert [6], daher wird sie benzoxazinless (bx) genannt. Die Enzyme, die mit auf Grund dieser Mutante entdeckt wurden erhielten die Kennung Bx und wurden dann entlang des Synthesewegs durchnummeriert. Bx10 würde also den 10. Zwischenschritt des Benzoxazinoidwegs katalysieren. Dieser Zwischenschritt ist die Methylierung der OH-Gruppe am Stickstoff der DIMBOA-Glc. Dazu wird ein Donor der Methylgruppe

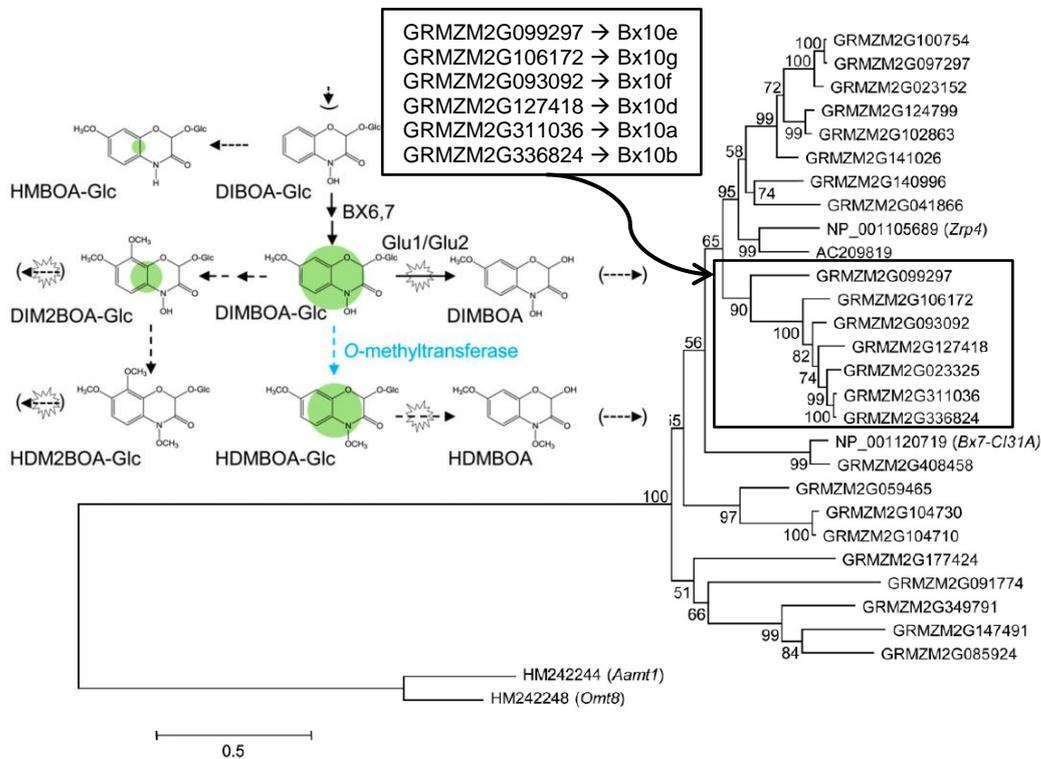
benötigt, diese Aufgabe übernimmt S-Adenosilmethionin. Als Produkt entsteht HDMBOA-Glc, diese Verbindung ist instabiler, als die in Vakuolen gespeicherte DIMBOA-Glc, aber zu gleich auch toxischer und somit wirksamer bei Schädlingsbefall [5].



**Abb. 1: Benzoxazinoide Grundstruktur**  
Hydroxamsäurederivate mit Substituenten an Position 3, 7 und 8

1.2 Zielstellung

Im Genom von B73 wurde eine Reihe von Sequenzen aufgespürt, die aufgrund ihrer Homologien als Bx10 DIMBOA O-Methyltransferasen in Frage kommen könnten. Für Bx10a, Bx10b und Bx10d ist diese Funktion bereits nachgewiesen [5]. Ein Ziel dieser Arbeit soll die heterologe Expression von Bx10e, Bx10f und Bx10g mit anschließender Überprüfung der Aktivität als DIMBOA O-Methyltransferase.



**Abb. 2: Bx10 – Einordnung in Syntheseweg und Phylogenetischer Baum**

Es gibt Bemühungen zu erforschen, ob DIMBOA, die aktive Form als Phytohormon wirksam wird und eventuell nach der Freisetzung regulatorisch in die Genexpression oder den Phytohormonhaushalt der Pflanze eingreift, wie es von der Jasmonsäure bekannt ist [7]. Dazu wurde ein Induktionsexperiment durchgeführt, in dem B73 Keimlinge, einer Verletzung und zusätzlich Jasmonsäure bzw. DIMBOA ausgesetzt waren. Mittels LC/MS/MS wurden Phytohormon- und Benzoxazinoidlevel gemessen und ausgewertet. Um einen möglichen Einfluss auf die Genregulation zu prüfen wurde eine qRT-PCR für die bekannten Bx10s und die im Klonierungsexperiment untersuchten Homologen durchgeführt.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese-System Mupid-One	ADVANCE
API 3000 LC/MS/MS-System	ABSCIEX
API 5000 LC/MS/MS-System	ABSCIEX
Brutschrank B6120	Heraeus
Chromatographiesäule SUPELCOSIL LC-18-D8-SEMI-PREP (25 cm x 10 mm; 5 µm)	Sigma Aldrich
Chromatographiesäule XDB-C18 (4,6 x 50 mm; 1,8 µm)	Agilent
Fraktionssammler SF2110	ADVANTEC
Geldokumentationssystem Gene Genius	SYNGENE
Homogenisator Vortex-Genie 2	Scientific Industries
HPLC Chromatographiesystem 1100 series	HEWLETT PACKARD
HPLC Chromatographiesystem 1200 Infinity	Agilent
Inkubationsschüttelschrank CERTOMAT BS-1-B	Braun Biotech
Inkubator Heraeus helvitront	Heraeus
Ion Trap MS Esquire 6000	BRUKER
Klimatisierter Inkubator/Schüttler Innova 4230	New Brunswick
Laborzentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter
Laborzentrifuge Aventis J25	Beckmann Coulter
Mikrowelle	BOMANN
pH-Meter pH 526 Multical	WTW
Photometer Septronic 20 Genesys	Spectronic Instruments
Präzisionswaage BP 3109	Sartorius
Real-Time PCR-System MX3000P	STRATAGENE
Rotationsverdampfer R-114/B-480	Büchi
Spectrophotometer peqLab Nanodrop 2000G	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler peqStar 2x Gradient	Peqlab
Thermocycler Primus 96 plus	MWG-BIOTECH
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf
Tischzentrifuge Pico Fuge	STRATAGENE
Tischzentrifuge Spectrofuge mini	Cabnet
Tischzentrifuge 5810	Eppendorf
Tissue lyser MM300	Retsch
Trockentemperiersystem vapoTherm	Barkey
Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 mit Mikrospitze MS 72	Bandelin
Vakuumpumpe CVC2	Vaccubrand
Wachstumschamber	Convinon
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Synthesis A10	Millipore
Wasserbad	GFL

## 2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol 99%	Sigma
Acetonitril	VWR
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ameisensäure 0,5%	Roth
Bromphenolblau	Roth
Carbenicillin	Roth
DTT 99%	Merck
EDTA 99%	Roth
Eisessig	Roth
Ethanol, vergällt 96%	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Roth
HCl	Toth
Imidazol	Roth
Methanol	Merck
NaCl	Roth
LB-Medium	Invitrogen
SAM	NEB
SDS	Roth
SOC-Medium	Gibco
Stickstoff	Linde
Tris	Roth
Tween 20	Sigma Aldrich

## 2.3 Fertigsysteme

Fertigsystem	Hersteller
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Berkeley
DyEx 2.0 Spin Kit	Qiagen
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Konzentratorröhrchen Vivaspin 4	Sartorius
Ni-NTA Spin columns	Qiagen
Nucleo Spin Plasmid	MACHEREY-Nagel
PageRuler prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
QIA quick PCR Purification Kit	Qiagen

Roti-Blue Kolloidale Coomassie-Färbung	Roth
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
SDS Gele Mini PROTEAN TGX 15 well	Bio-Rad
SYBR Green III fast	Agilent

## 2.4 Enzyme

Enzym	Klasse	Hersteller
Bsa I	Restriktionsendonuklease	NEB
DNAse I	Endonuklease	NEB
GoTaq	DNA Polymerase	Promega
Hind III	Restriktionsendonuklease	NEB
Nco I	Restriktionsendonuklease	NEB
Phusion	DNA Polymerase	NEB
Super Script III	Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-Ligase	DNA Ligase	NEB

## 2.5 Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'
Primer für DNA-Amplifikation und Sequenzierung:	
Bx!0e-synt_pASK-37.fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGC CTTACTCGGGGAATACTC
Bx!0e-synt_pASK-37.rev	ATGGTAGGTCTCATATCAATTCCG GGTACAGTTCGATGATAGA
Bx!0f-synt_pASK-37.fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGG CCCTGTCAACGCAAGACC
Bx!0f-synt_pASK-37.rev	ATGGTAGGTCTCATATCACGGA TAGACCTCAATCACCGATA
Bx!0g-synt_pASK-37.fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCATGGC GTTTACGGAAGAGAGTTC
Bx!0g-synt_pASK-37.rev	ATGGTAGGTCTCATATCAGGGATA GACCTCAATCACAGACA
Primer für Kolonie-PCR:	
pASK IBA.fwd	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK IBA.rev	CGCAGTAGCGGTAAACG

Primer für qRT-PCR:

BX10aGRMZM2G311036.fwd	CAGCAGGTGGTGGTGATAAT
BX10aGRMZM2G311036.fwd	AGCGCCAGACTCACAAAGG
BX10bGRMZM2G336824.fwd	CAGCAGGTGGTGGTGATAAT
BX10bGRMZM2G336824.rev	AGCGCCAGACTCACAAAGG
Bx10d_GRMZM2G127418.fwd	GAAAGCCGCTTCTTGATGCC
Bx10d_GRMZM2G127418.rev	GGAACATATTGCCCCGCAACG
Bx10e_GRMZM2G099297.fwd	TCATGCCGATCGTGCTGAGG
Bx10e_GRMZM2G099297.rev	TGTCACCGGCAACGTACTGG
Bx10f_GRMZM2G093092.fwd	GCCACCCAAGTAAGCTTCG
Bx10f_GRMZM2G093092.rev	AGAGACAGCGATAGGATGGA
Bx10g_GRMZM2G106172.fwd	CGCAGGCGACATGTTTCAGA
Bx10g_GRMZM2G106172.rev	GCTCAGCCCCATTGACCATC

## 2.6 Klonierungsvektor, Bakterienstamm und Maislinie

System	Hersteller
Vektor pASK-IBA37plus	IBA
Kompetente <i>E.coli</i> Zellen NEB10β	NEB
Maislinie B73	-

### 3. Methoden

#### 3.1. Klonierung der synthetisierten DNA-Sequenzen in *E.coli*

Es lagen cDNA-Sequenzen, welche die drei potentiellen O-Methyltransferasen Bx10e, Bx10f und Bx10g kodieren. Diese wurden zur Synthese und Optimierung für das Expressionssystem *E.coli* gegeben. Ziel war es, die Sequenzen in den Klonierungsvektor pASK-IBA37plus einzubringen und den kompetenten Stamm NEB 10 $\beta$  zu transformieren, um eine induzierbare Proteinbiosynthese der Zielproteine zu ermöglichen.

##### 3.1.1 Amplifikation der cDNA

In einer Polymerasekettenreaktion wurde die erhaltene cDNA exponentiell vermehrt. Die DNA Polymerase Phusion kam bei der Amplifikation zur Anwendung, da sie sich durch Schnelligkeit, Genauigkeit und Zuverlässigkeit auszeichnet. Diese Eigenschaften sind bei der cDNA-Amplifikation von großer Bedeutung, da die erzeugten PCR-Produkte überdurchschnittlich lang sind und für eine spätere Funktionalität der Proteine das Vermeiden von Mutationen entscheidend ist. Die erhaltenen Produkte wurden mit dem QIA quick PCR Purification Kit aufgereinigt. Reinheit und Konzentrationen der drei PCR-Produkte sowie der Leerkontrolle wurden am Spectrophotometer bestimmt. Die Konzentration der Proben wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 120 ng/ $\mu$ l eingestellt.

**Tab. 1: cDNA-PCR-Programm**

	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
35 x	Denaturierung	98 °C	10 s
	Primer-Hybridisierung	60 °C	10 s
	Elongation	72 °C	45 s
	Terminale Elongation	72 °C	5 min
	Lagerung	4 °C	$\infty$

**Tab. 2: cDNA-PCR-Ansatz**

Komponente	V in $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	32
HF-Puffer	10
Fwd-Primer	2,5
Rev-Primer	2,5
dNTP-Lsg.	1
Phusion	1
Template-DNA	1
Gesamt	50

### 3.1.2 Enzymverdau und Ligation von pASK-IBA37plus und den PCR-Produkten

5000 ng des Vektors pASK-IBA37plus (10 µl) wurden in 10 µl FD-Puffer mit 1,5 µl Bsa I vorverdaut und mit Nucleo Spin Plasmid Säulchen aufgereinigt. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt gemeinsam mit Bsa I verdaut.

**Tab. 3: Verdau-Ansatz**

Komponente	V in µl
ddH <sub>2</sub> O	12
FD-Puffer	2
Bsa I	1
pASK-IBA37plus	1
PCR-Produkt	1
Gesamt	17

**Tab. 4: Verdau im Thermocycler**

Inkubation	37 °C	1,5 h
Inaktivierung von Bsa I	65 °C	5 min

Dem Verdau-Ansatz aus Tab. 3 wurden 1 µl T4-Ligase und 1µl ATP-Lsg. (10 mM) zugesetzt und 30 min bei RT inkubiert.

### 3.1.3 Transformation der NEB 10β Kultur mit den Klonierungsvektoren

10 µl des inkubierten Ligationsansatzes wurden zu 25 µl NEB 10β gegeben und für 20 min zur Aufnahme der Plasmide auf Eis inkubiert. Im Wasserbad erfolgte für 45 s bei 42 °C ein Hitzeschock, der dafür sorgte, die Durchlässigkeit der Bakterienmembranen deutlich zu senken. Nach der Zugabe von 100 µl SOC-Medium verblieben die Kulturen für 1 h im Inkubationsschüttelschrank bei 37 °C. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der Kulturen auf LB-Medium, das zur Unterdrückung nichttransformierten Zellen 60 µg/ml Carbenicillin enthielt. Die Platten lagerten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

### 3.1.4 Selektion der positiven Kolonien mittels Kolonie-PCR

Je 16 ausgewählte Kolonien für Bx10f und Bx10g, sowie 14 Kolonien für Bx10e, kamen über sterile Stäbchen in die 25 µl Kolonie-PCR-Ansätze und spezifische PCR-Produkte konnten mit Vektorprimern amplifiziert werden.

Die Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte auf einem 1% (w/v) Agarose-Gel. Für 16 min bei 135 V. mit GeneRuler als Massenstandard. Das erhaltene Gelbild findet sich in Anhang 1.

**Tab. 5: Kolonie-PCR-Programm**

	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
35 x	Denaturierung	95 °C	50 s
	Primer-Hybridisierung	55 °C	30 s
	Elongation	72 °C	90 s
	Terminale Elongation	72 °C	5 min
	Lagerung	4 °C	∞

**Tab. 6: Kolonie-PCR-Ansatz**

50 x 25 µl Mastermix	
Komponente	V in µl
ddH <sub>2</sub> O	910
GoTaq-Puffer	250
Fwd-Primer	25
Rev-Primer	25
dNTP-Lsg.	25
GoTaq	15
Gesamt	1250
+ gepickte Kolonie	

### 3.1.5 Kontrollverdau und Sequenzierung der positiven Kolonien

Jeweils vier positive Kolonien wurden in 4 ml LB-60Carb-Medium bei 37 °C im Inkubationsschüttelschrank über Nacht kultiviert. 1 µl jeder Kultur wurde für den Sequenzierungsansatz entnommen. Der Rest der Kulturen wurde mit Nucleo Spin Plasmid Säulchen aufgearbeitet. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt und ein Kontrollverdau mit Hind III und Nco I für Bx10e und Bx10f, sowie Pst I für Bx10g für 30 min bei 37 °C angesetzt. Die erhaltenen Fragmente sind als Gelbild in Anhang 2 zu finden.

Die Sequenzierung nach Sanger wurde mit einer PCR vorbereitet und das mit DyeEx 2.0 aufgereinigte Produkt zur Sequenzierung gegeben. Das Ergebnis war positiv.

**Tab. 7: Plasmid-PCR-Programm**

	Initiale Denaturierung	96 °C	5 min
35 x	Denaturierung	96 °C	10 s
	Primer-Hybridisierung	50 °C	20 s
	Elongation	60 °C	4 min
	Lagerung	4 °C	∞

**Tab. 8: Plasmid-PCR-Ansatz**

Komponente	V in µl
ddH <sub>2</sub> O	14
BigDye-Puffer	2
Fwd-Primer	1
Rev-Primer	1
BigDye	2
Flüssigkultur	1
Gesamt	21

### 3.1.6 Lagerung der gentechnisch veränderten Organismen

1 ml der Flüssigkultur wurde durch Zugabe von 0,5 ml Glycerol kälteunempfindlich bei -80 °C eingefroren und somit konserviert.

### 3.2 Induzierte Expression der Zielproteine

Im Flüssigkulturansatz von 100 ml LB-60Carb-Medium vermehrten sich die Zellen bei 37 °C im Klimatisierter Inkubator/Schüttler bis zu einer OD von 0,8, was am Photometer überwacht werden konnte. Sobald die gewünschte optische Dichte erreicht war, wurde mit 2mg/µl Anhydrotetracyclin-Lsg. (10 µl) die Expression eingeleitet und das System auf 18 °C abgekühlt, um weiteres Wachstum zu verringern.

### 3.3 Aufreinigung der Zielproteine

#### 3.3.1 Zellaufschluss

Durch zentrifugieren der Flüssigkultur für 5 min bei 5000 x g und 4 °C konnte ein Pellet gebildet werden, das schließlich in 4 ml Extraktionspuffer (Anhang 3) resuspendiert und mit Ultraschall in 4 unterschiedlichen Tiefen für je 20 s bei einer Intensität von 60% zur Lyse der Zellen behandelt wurde. Nach 20 min in der Zentrifuge bei 16000 x g und 4 °C konnte der Überstand überführt und als Proteinrohextrakt bei -20 °C eingefroren werden.

### 3.3.2 Aufreinigung über Ni-NTA-Säulchen

Die Verwendung der Ni-NTA-Säulchen wird durch die Markierung der Zielproteine mit einem 6 x His-Tag ermöglicht, der auf pASK-IBA37plus codiert ist. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll, die beiden Elutionsfraktionen wurden vereint.

### 3.3.3 Umpuffern und Aufkonzentrieren

Der hohe Salzgehalt im Elutionspuffer stört die Aktivität der aufgereinigten Proteine in den anschließenden Aktivitätsassays, so dass diese in Konzentratorröhrchen umpuffert und bei der Gelegenheit etwas aufkonzentriert werden.

### 3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

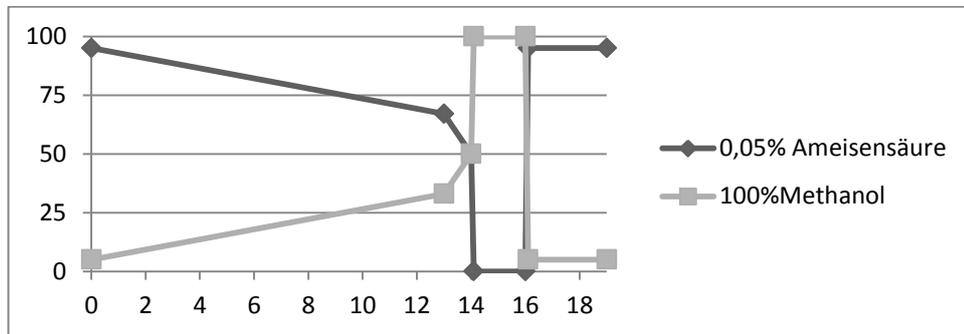
Ein Mini PROTEAN TGX 15 well SDS-Gel wurde mit Proteinrohextrakt, aufgereinigtem Protein und konzentriertem Protein beladen. Zum Beurteilen der Banden wurde mit PageRuler ein Marker aufgetragen. Das Gel lief 30 min bei 140 V und wurde mit Roti-Blue nach Anweisung eingefärbt.

### 3.5 Überprüfung der Zielproteine auf enzymatische Aktivität

#### 3.5.1 Aufreinigung des Substrats DIMBOA-Glc mittels präparativer HPLC

Ein vom Betreuer bereitgestelltes Maisrohextrakt wurde über die Chromatographiesäule SUPELCOSIL LC-18-D8-SEMI-PREP aufgereinigt, da es sowohl das Substrat, als auch das erwartete Produkt des Aktivitätsassays enthielt. Als Lösungsmittel wurden 0,05% Ameisensäure in ddH<sub>2</sub>O und Methanol verwendet. Methanol wurde gegenüber Acetonitril bevorzugt, da es durch ein geringeres Elutionsvermögen die Auftrennung der Peaks unterstützt. Das System stand unter einem Druck von 400 bar und bei einer Flussrate von 4 ml/min wurden 100 µl in die 25 °C warme Säule injiziert. In Testläufen wurde die Auftrennung am Ion Trap Massenspektrometer überwacht. Die Falle war auf 60 m/z bis 1000 m/z eingestellt, wobei die Zielmasse bei 400 m/z lag. Ein UV-Chromatogramm der Wellenlänge 270 nm wurde parallel aufgezeichnet. Durch den kombinierten Einsatz der Detektionsmethoden gelang es den DIMBOA-Glc-Peak aufzuspüren.

Durch Variationen am Lösungsmittelgradienten, sowie dem Injektionsvolumen konnte eine zufriedenstellende Auflösung der Peaks bei vertretbarem zeitlichem Aufwand erreicht werden.



**Abb. 3: Lösungsmittelgradient der präparativen HPLC**  
x-Achse: t in min; y-Achse: prozentualer Anteil der Lösungsmittel

Abbildung 3 zeigt den Gradienten der in der Methode Verwendung fand und die in Anhang 3 dargestellte Auftrennung der Fraktionen ermöglichte. DIMBOA-Glc war bei einer Retentionszeit von 10 min bis 10,21 min zu erwarten. Diese Fraktion wurde gesammelt, im Rotationsverdampfer eingeeengt und im Stickstoffstrom getrocknet, bis die Masse bei 3,19 mg stabil war. In ddH<sub>2</sub>O gelöst wurde eine Stammlsg. Von 2,5 mg/ml hergestellt, die im Aktivitätsassay eingesetzt werden konnte.

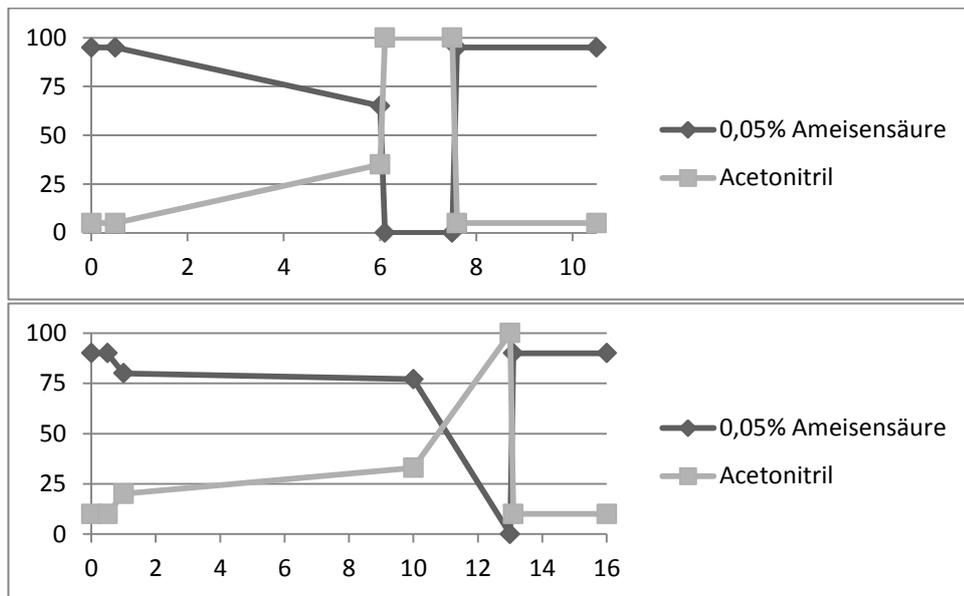
### 3.5.2 Enzym-Substrat-Reaktion als Aktivitätsassays

Es wurde überprüft, ob die exprimierten Proteine DIMBOA-Glc zu HDMBOA-Glc methylieren. Dazu wurden 30 µl aufkonzentrierte Protein-Lsg mit 10 µl DIMBOA-Glc 0,5 mg/ml, 10 µl DTT 20 mM und 10 µl SAM 4 mM versetzt. DIMBOA-Glc diente als Substrat und SAM stellte die Methylgruppe. Nach 6 h Inkubationszeit bei 25 °C folgten das Abstoppen der Reaktion mit 2,5 µl Ameisensäure 99% und Abzentrifugieren der denaturierten Proteine für 15 min bei 16000 x g. Der Überstand wurde in LC-Vials mit Insert überführt und bei -20 °C bis zur Vermessung gelagert.

### 3.5.3 Messung der Substrat/Produkt-Konzentrationen über LC-MS/MS

Über Chromatographie konnte das Stoffgemisch des inkubierten Assayansatzes durch spezifische Wechselwirkungen der Bestandteile mit mobiler und stationärer Phase aufgetrennt werden.

Die Proben passierten eine 25 °C warme XDB-C18-Säule. Elutionsmittel waren 0,05% Ameisensäure und Acetonitril mit nichtlinearem Gradienten bei einer Flussrate von 0,8 ml/min und einem Injektionsvolumen von 5 µl. Neben dem selbst durchgeführten Aktivitätsassay wurde auch eine Enzym-Substrat-Reaktion vermessen, bei der Kaempferol als Substrat diente. Die Gradienten der beiden Methoden sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4: Lösungsmittelgradienten der HPLC**  
 x-Achse: t in min; y-Achse: prozentualer Anteil der Lösungsmittel  
 oben: Gradient für Kaempferol/methyliertes Kaempferol  
 unten: Gradient für DIMBOA-Glc/HDMBOA-Glc

Bei der an die HPLC gekoppelten Tandem-MS bewirken in Reihe geschaltene Quadrupole die Erzeugung von Fragmenten, die spezifisch für bekannte Verbindungen sind. Es ist daher möglich, definierte Übergänge zu detektieren und so Substanzen in der Lösung nach zu weisen. Dieser sogenannte MRM-Scan wurde für die gesuchten Substrate und Produkte durchgeführt.

**Tab. 9: Übergänge und Geräteeinstellung der MRM-Messung**

Substanz	RT [min]	Übergang	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
DIMBOA-Glc	2,606	418/372	-22	-4	-8	-5
HDMBOA-Glc	2,966	407/356	-15	-8	-15	-4
Kae	7,055	287/153	-31	-10	-40	-16
Meth. Kae	5,850	301/258	-31	-10	-40	-16

### 3.6 Induktionsexperiment

In diesem Experiment wurden B73 Maispflanzen kultiviert und schließlich Entzündungsmediatoren und DIMBOA ausgesetzt. Dann wurden Phytohormone und Glucoside extrahiert und vermessen. Außerdem wurde eine Genexpressionsanalyse mit den gewonnenen Proben durchgeführt, um mögliche Transkriptionsakkumulationen aufzuzeigen.

#### 3.6.1 Kultivierung der B73-Maiskeimlinge

Einzelsamen wurden 1,5 cm tief in 200 cm<sup>3</sup> Töpfe mit Pflanzensubstrat gepflanzt. In der Wachstumskammer wurden sie 16 h am Tag mit 75% Intensität bei 24 °C am Tag und 20 °C in der Nacht beleuchtet. Sie verblieben so für 2 Wochen und wurden bei Bedarf von unten gewässert.

#### 3.6.2 Induktion mit Jasmonsäure und DIMBOA

6 Pflanzen verblieben in der Erde und bildeten die Kontrollgruppe Erde. 18 Pflanzen wurden abgeschnitten und in 10 ml Wasser gestellt mit den folgenden Zusätzen:

- 6 x 200 µl Ethanol als Kontrollgruppe Kontrolle
- 6 x 200 µl 100 mM Jasmonsäure in Ethanol als Gruppe Jasmonsäure
- 6 x 200 µl 100 µM DIMBOA in Ethanol als Gruppe DIMBOA

Die Pflanzen wurden 12 h bei gleicher Beleuchtung inkubiert.

#### 3.6.3 Aufbereitung und Lagerung der Pflanzenproben

Die Pflanzen wurden entnommen bzw. abgeschnitten und sofort gewogen, in Alufolie eingepackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und bei -80 °C gelagert.

#### 3.6.4 Extraktion der Glukoside

Ein Rohextrakt aus 50 mg Pulver wurde in 1 ml MethOH/ddH<sub>2</sub>O/Ameisensäure-Gemisch (50%-49,5%-0,5%) mit 5 Glasperlen im Tissue lyser bei 30 Hz für 3 min gewonnen. Bei 14000 x g wurde für 3 min das Pflanzenmaterial abzentrifugiert und der Überstand für die Messungen in LC Vials mit Insert überführt und bei -20 °C gelagert.

#### 3.6.5 Extraktion der Phytohormone

50 mg Pflanzenmaterial wurden mit 250 µl Methanol, in dem 7 µl interne Standards für Salicylsäure, Jasmonsäure, Jasmonsäureisoleucin und weitere Phytohormone enthalten waren, mit 5 Glasperlen bei 30 Hz für 3 min im Tissue lyser extrahiert. Bei 14000 x g für 3 min bildete sich ein Pellet aus Pflanzenresten und der überstand wurde überführt und in Reagenzgläsern mit 5 ml Methanol verdünnt.

HR-XC Material diente als Kationen-Austauscher. Es wurde mit 1 ml Methanol eingestellt und mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O equilibriert. 5 x 1 ml Rohextrakt wurde aufgeladen und schließlich mit 900 µl Acetonitril eluiert und aufgefangen. Nach jedem Schritt wurde für 5 min bei 10 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom getrocknet und für die Chromotographie in 200 µl MethOH/ddH<sub>2</sub>O/Ameisensäure-Gemisch (50%-49,5%-0,5%) resuspendiert und in LC-Vials mit Insert überführt.

#### 3.6.6 Messung und Auswertung der Phytohormone Glucoside über LC-MS/MS

Die Messungen unterschieden sich nur in der Methode von denen der Aktivitätsassays, die bereits besprochen sind. Die Übergänge sind das entscheidende und können Nachgeschlagen werden.

#### 3.6.7 Auswertung der Messergebnisse mit Analyst 1.6 und Excel

Für die Auswertung wurde mit Analyst 1.6 (Applied Biosystems) eine Quantifizierungsmethode erstellt, Die an Hand der Retentionszeiten und m/z-Werte die Peakflächen errechnet und den Flächeninhalt wiedergibt. Dieser Wert konnte in Excel (Microsoft) exportiert werden, wo unter Berücksichtigung der internen Standards oder Retentionsfaktoren (Rf) Die Formel zur Berechnung der Konzentration in ng/g(FW) sieht für interne Standards wie folgt aus:

$$c \left[ \frac{ng}{g(FW)} \right] = \frac{Pf \text{ Probe [counts]} * c(int. Standard) * \text{kleinste Pf eines int. Standards}}{\frac{Pf \text{ int. Standard}}{\text{kleinste Pf eines int. Standards}} * FW}$$

Pf=Peakfläche; FW=Frishwaage

### 3.7 Ermittlung der Transkriptionsakkumulation über qRT-PCR

Über qRT-PCR sollte die Ansammlung von RNA der untersuchten Gene und der bekannten DIMBOA-Glc O-Methyltransferasen in dem induzierten Pflanzenmaterial untersucht werden. Dazu musste aus der RNA cDNA synthetisiert werden und diese in einer quantitativen Realtime PCR zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

#### 3.7.1 RNA-Extraktion, DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Die RNA der Proben wurden mit dem RNeasy Plant Mini Kit nach Anleitung extrahiert, am Spectrophotometer wurde die RNA-Konzentration der Proben ermittelt um die erfordernten 0,75 µg einsetzen zu können. Dazu wurde 1 µl DNase Puffer und 1 µl DNase I und mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde DNase I mit 1 µl EDTA für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Für die cDNA Synthese wurde 1 µl oligo-dt Primer und 1 µl dNTP-Lsg. zugegeben und 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird mit 1 µl der reversen Transkriptase Super Script III, 4 µl first strand buffer, 1 µl DTT und 1 µl RNase out die cDNA-Synthese im Thermocycler ermöglicht.

#### **Tab. 10: cDNA-Synthese**

Inkubation	
25 °C	5 min
50 °C	1 h
70 °C	15 min
4 °C	∞

### 3.7.2 qRT-PCR

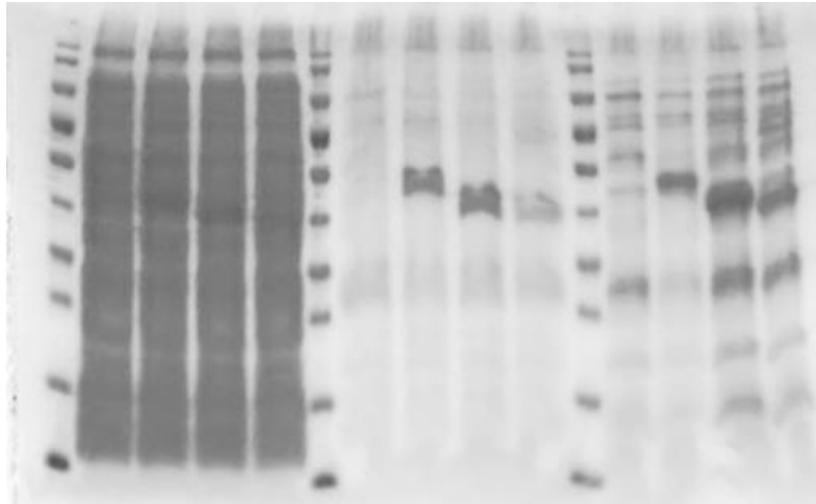
Die Realtime PCR wurde mit dem SYBR Green III fast Fertigsystem durchgeführt. Die Polymerasekettenreaktion und Fluoreszenzmessung erfolgte im Real-Time PCR-System MX3000P.

### 3.8 Statistischer Test zur Bewertung der Ergebnisse – one way ANOVA

Da mehrere, voneinander unabhängige Datenreihen gegeneinander verglichen werden sollten, bot sich die one way ANOVA an. Das Programm der Wahl war SigmaPlot 11.0 (Systat Software). Der angebotene Test untersuchte die Messreihen zuerst auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und teste auf Gleichheit der Varianzen. Daraufhin wurde ein paarweiser Vergleich der Proben durchgeführt und dem Nutzer präsentiert.

## 4. Ergebnisse und Auswertung

### 4.1 Bx10e, Bx10f und Bx10g als Bande im SDS-Gel



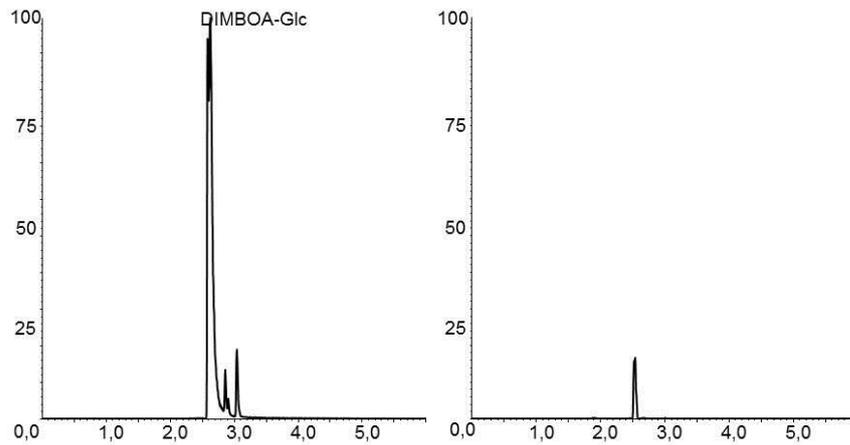
**Abb. 5: SDS-Page der Zielproteine**

Von links nach rechts: Marker; Rohextrakt leerer Vektor; Rohextrakt Bx10e; Rohextrakt Bx10f; Rohextrakt Bx10g; Marker; Aufgereinigt leerer Vektor; aufgereinigt Bx10e; Aufgereinigt Bx10f; Aufgereinigt Bx10g; Marker; Aufkonzentriert leerer Vektor; Aufkonzentriert Bx10e; Aufkonzentriert Bx10f; Aufkonzentriert Bx10g

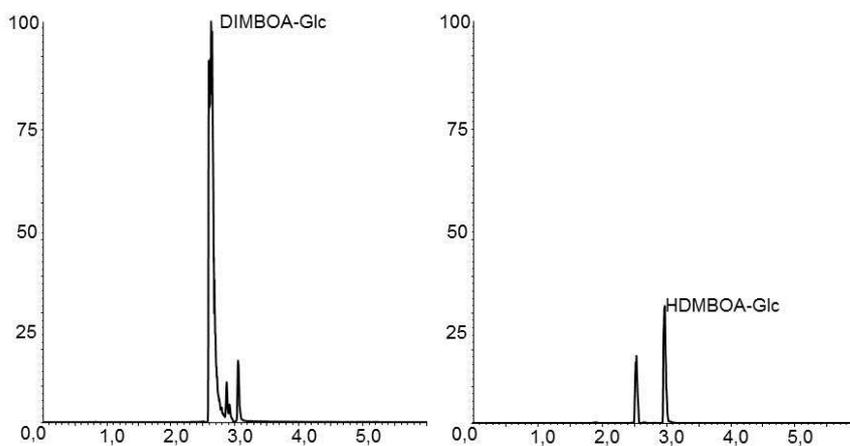
Das Gel zeigt sehr schön, dass der Versuch die synthetisierten cDNA-Sequenzen der potentiellen DIMBOA O-Methyltransferasen über den Klonierungsvektor pASK-IBA37plus in den Bakterienstamm NEB 10 $\beta$  ein zu bringen. Diese wurden dann durch Anhydrotetracyclin expremiert und Proteine wurden synthetisiert.

### 4.2 Negatives Aktivitätsassay DIMBOA-Glc/HDMBOA-Glc

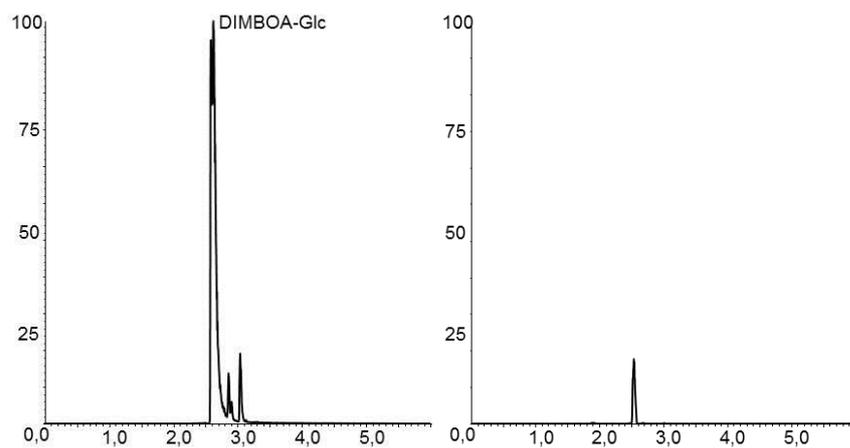
Die Auswertung des Aktivitätsassays zeigt nicht das gewünschte Bild. Wie in der nächsten Abbildung zu erkennen ist wurde DIMBOA-Glc lediglich von der Positivkontrolle Bx10d zu HDMBOA-Glc umgesetzt. Die potentiellen DIMBOA O-Methyltransferasen Bx10e Bx10f und Bx10g zeigten wie der leere Vektor keinerlei Aktivität.



Leerer Vektor → kein HDMBOA-Glc gebildet → keine Aktivität



Bx10d (Positiv-Kontrolle) → HDMBOA-Glc gebildet → Aktivität

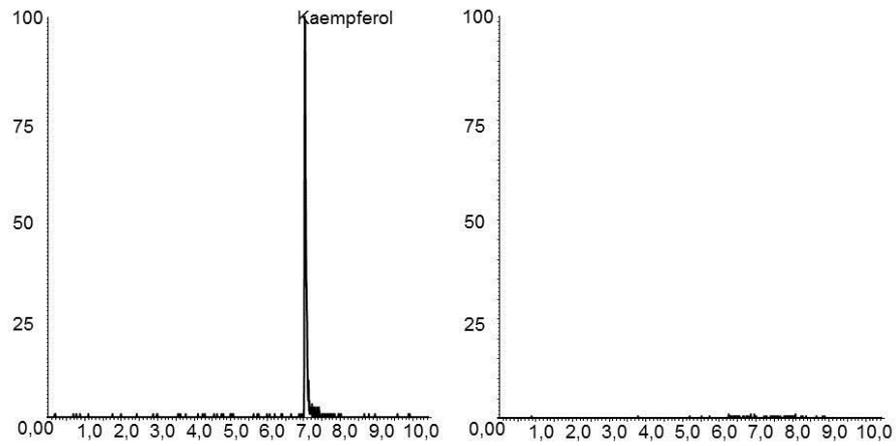


Bx10e, Bx10f und Bx10g → kein HDMBOA-Glc gebildet → keine Aktivität

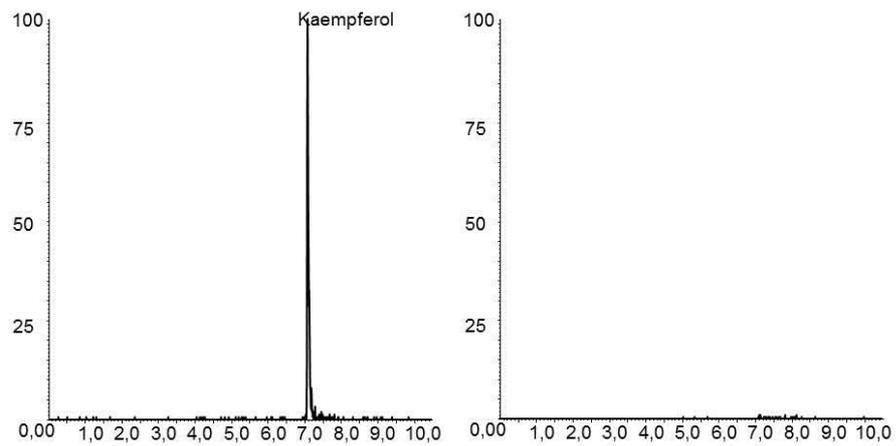
**Abb. 6: Aktivitätsassay DIMBOA-Glc/HDMBOA-Glc**

DIMBOA-Glc bei der erwarteten Retentionszeit von 2,6 min; HDMBOA-Glc nur bei der Positiv-Kontrolle zur erwarteten Retentionszeit von 3 min

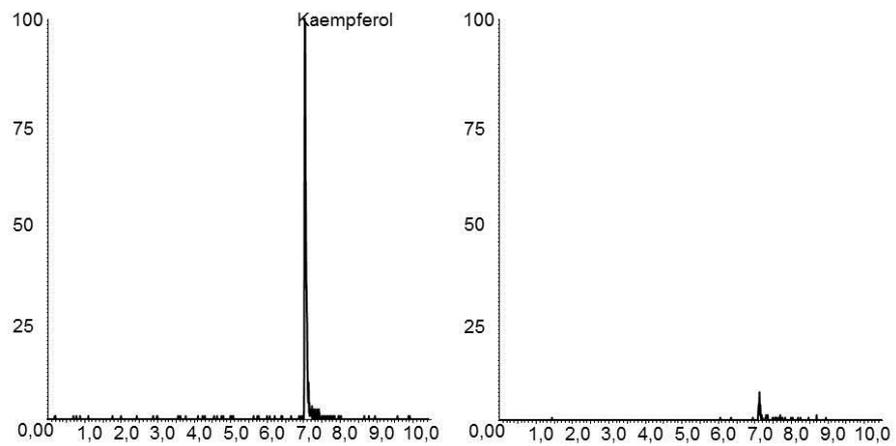
## 4.3 Positives Aktivitätsassay Kaempferol/methyliertes Kaempferol



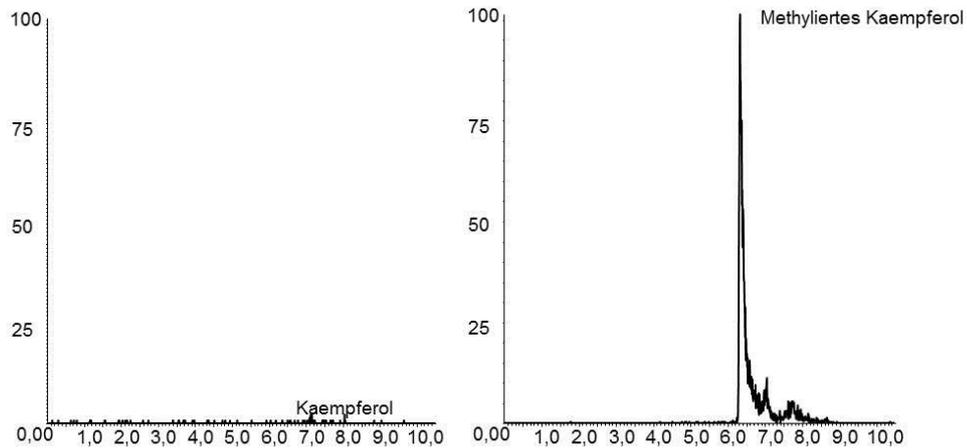
Leerer Vektor → kein Kaempferol methyliert → keine Aktivität



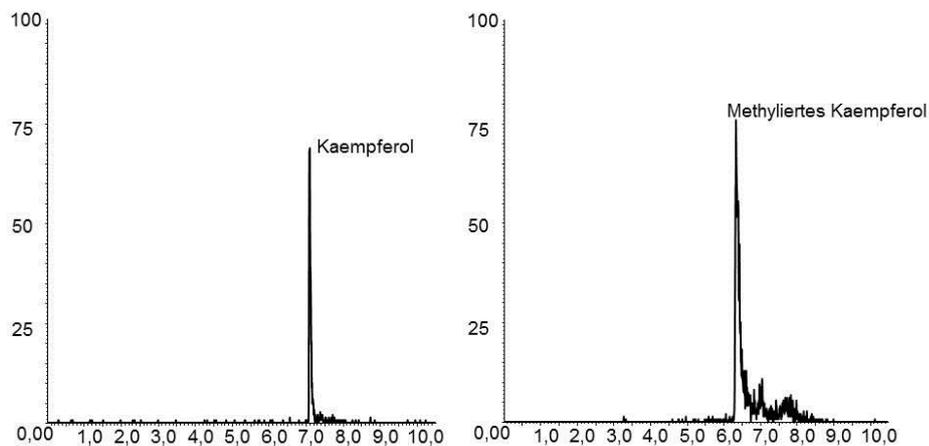
Bx10d → kein Kaempferol methyliert → keine Aktivität



Bx10e → kaum Kaempferol methyliert → fast keine Aktivität



Bx10f → Kaempferol komplett methyliert → sehr hohe Aktivität



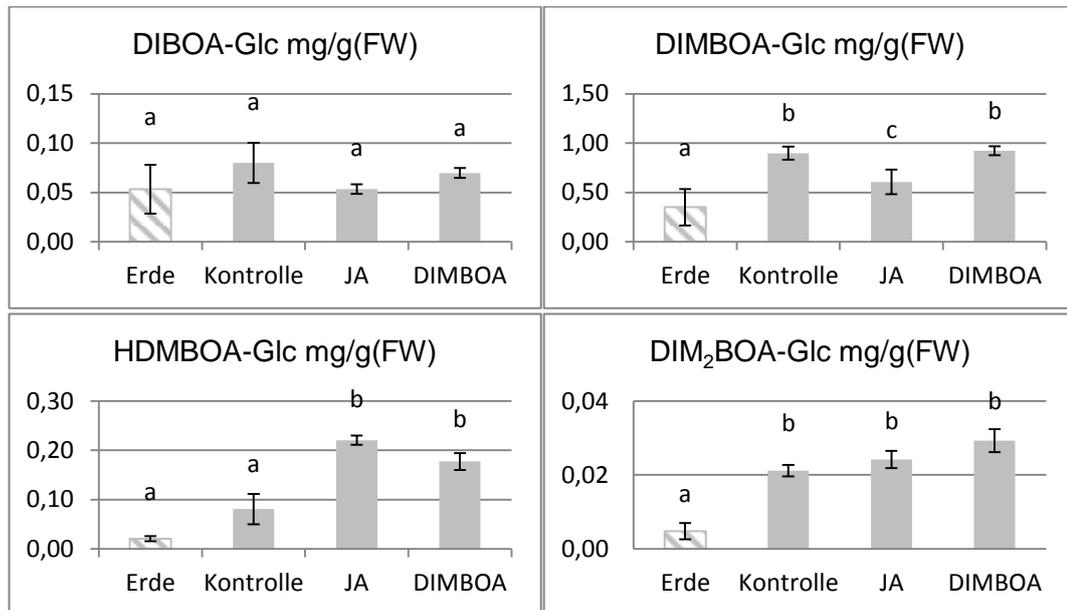
Bx10g → Kaempferol methyliert → Aktivität

#### Abb. 7: Aktivitätsassay Kaempferol/Methyliertes Kaempferol

Kaempferol bei der erwarteten Retentionszeit von 7 min; Methyliertes Kaempferol bei Bx10f und Bx10g; mit Retentionszeit zwischen 6 min 6,5 min etwas nach der erwarteten Retentionszeit von 5,85

Kaempferol wurde als Substrat von Bx10f und Bx10g angenommen. Bx10f hat das Substrat beinahe vollständig zu einer methylierten Form umgesetzt. Bx10e hingegen zeigte eine so schwache Aktivität, dass eine substratspezifische Reaktion in diesem Fall unwahrscheinlich erscheint. Wichtig ist auch, dass in Anwesenheit von Bx10d Kaempferol nicht umgesetzt wurde, da dies die Bildung eines spezifischen Enzym-substrat-Komplexes bei Bx10f und Bx10g aufzeigt.

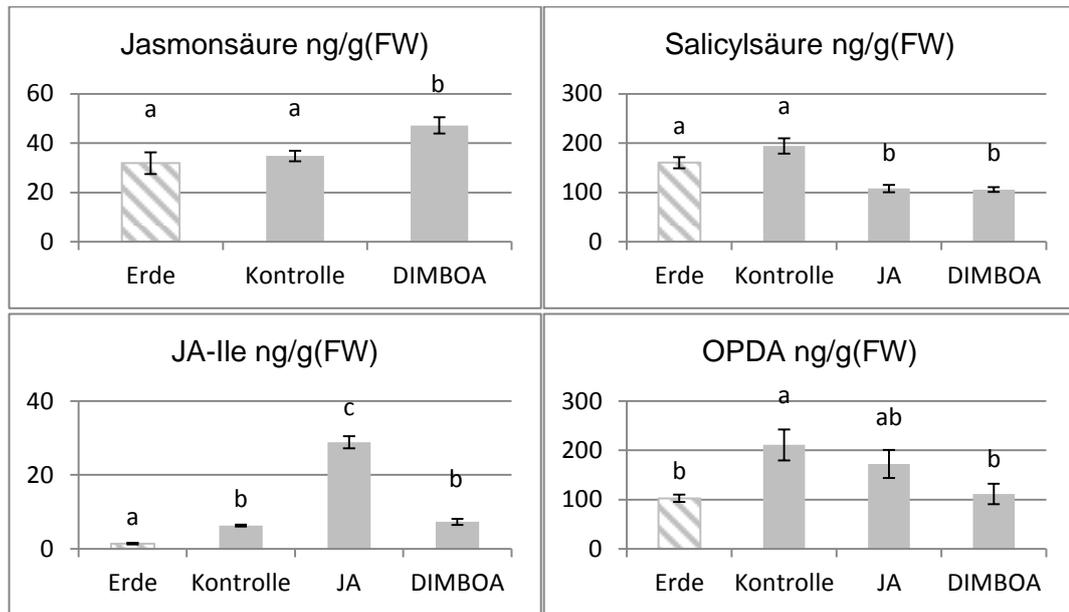
## 4.4 Induzierbarkeit des Glucosidstoffwechsels bei B73



**Abb. 8: Balkendiagramm der festgestellten Glucosid-Konzentrationen in mg/g(FW)**

Die graphische Darstellung der Glucosidkonzentration in mg/g(FW) zeigt eine Induzierbarkeit der HDMBOA-Glc-Bildung durch Jasmonsäure, wie auch durch DIMBOA, was nicht verwundert, da Jasmonsäure als Vorstufe von Jasmonsäureisoleucin Einfluss auf die Abwehrmechanismen der Maispflanzen nimmt. Die Konzentration der anderen aufgeführten Glucoside wird von der Behandlung mit Jasmonsäure und DIMBOA nicht merklich beeinflusst. Dies könnte seine Ursache darin haben, dass DIBOA-Glc als Vorstufe rasch umgesetzt wird und auch DIMBOA-Glc, wenn es vermehrt gebildet wurde doch schon als HDMBOA-Glc vorliegt.

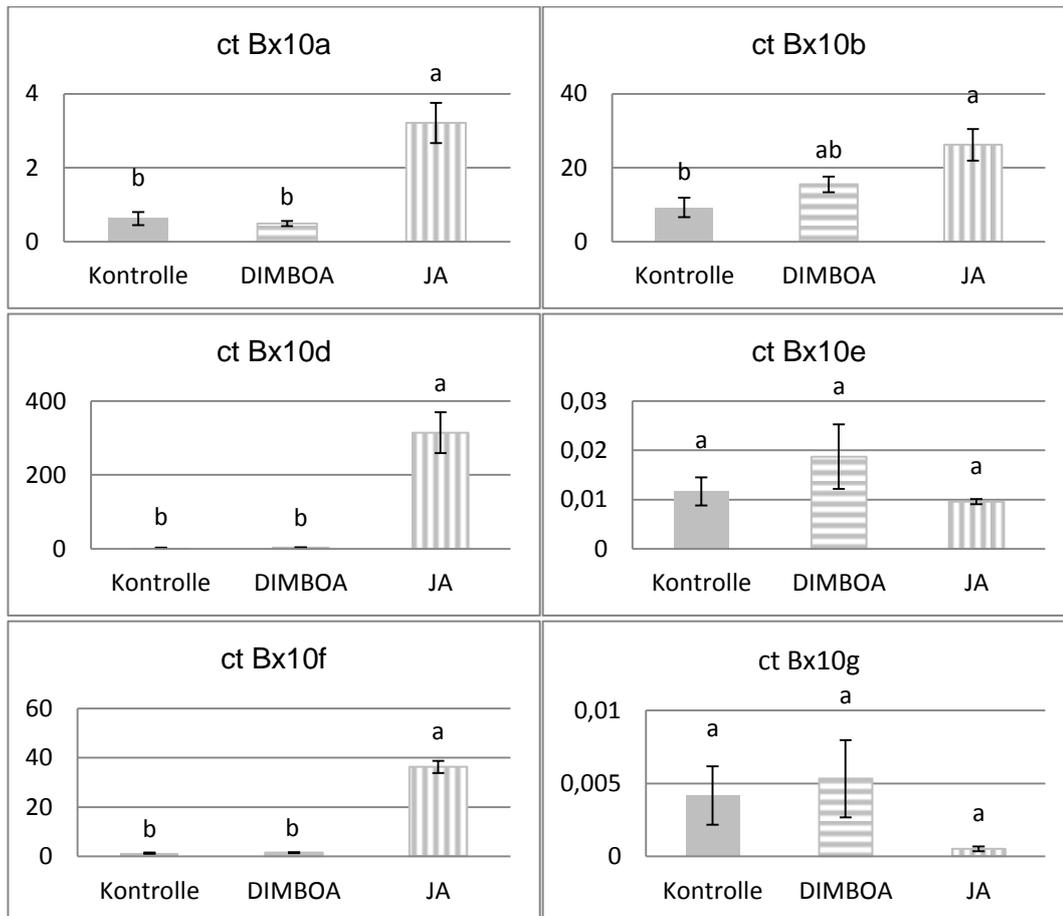
## 4.5 Autoinduktion von Phytohormonen durch Jasmonsäure bzw. DIMBOA



**Abb. 9: Balkendiagramm der Phytohormon-Konzentrationen in mg/g(FW)**

Eine Autoinduktion durch DIMBOA konnte nur bei der Jasmonsäurekonzentration festgestellt werden. Salicylsäure-Konzentrationen und auch OPDA-Konzentrationen sind unter Einfluss von DIMBOA eher zurückgegangen. Bei der Betrachtung von Jasmonsäureisoleucin fällt auf, dass die Konzentration bei Anwesenheit von Jasmonsäure stark zunimmt, was nicht verwundert, da das Isoleucin die aktivierte Form der Jasmonsäure ist.

#### 4.6 Transkriptakkumulationen in induziertem Pflanzenmaterial



**Abb. 10: Balkendiagramm der Transkriptakkumulation für die bekannten und potentiellen DIMBOA O-Methyltransferasen**

Die Balkendiagramme zeigen deutlich, dass DIMBOA nicht in der Lage ist, in die Genregulation einzugreifen. Keines der aufgeführten Gene wird in seiner Gegenwart deutlich stärker ausgelesen. Bx10e könnte möglicherweise von DIMBOA beeinflusst werden, jedoch ist der Fehler der Messwerte zu groß, um eine sichere Aussage zu treffen. Im Gegensatz dazu, scheint Jasmonsäure einen Einfluss auf alle bekannten DIMBOA O-Methyltransferasen zu haben, In den Zellen findet sich jeweils unter Einfluss von Jasmonsäure deutlich mehr O-Methyltransferase kodierende RNA. Auch Bx10f, das sehr starke Aktivität bei der Methylierung von Kaempferol zeigte, wird deutlich häufiger in Anwesenheit von Jasmonsäure abgelesen.

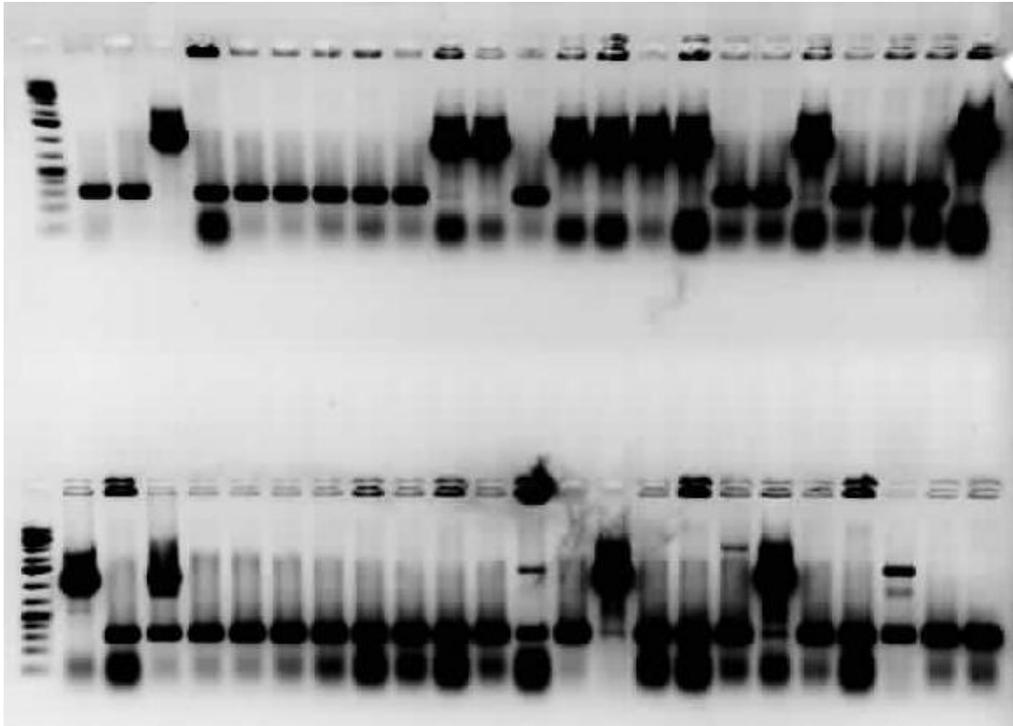
## 5 Einbettung ins System

GRMZM2G099297 (Bx10e), GRMZM2G093092 (Bx10f) und GRMZM2G106172 (Bx10g) konnten in *E.coli* exprimiert werden. Sie zeigten jedoch keine Aktivität als DIMBOA O-Methyltransferase, sodass sie wohl nicht länger als Bx10s bezeichnet werden sollten. Jedoch konnte für Bx10f und Bx10g eine Aktivität als O-Methyltransferase am Kaempferol nachgewiesen werden. Damit wurde deutlich, dass die im B73 Genom gefundenen Sequenzen in diesen beiden Fällen mit Sicherheit Enzyme kodieren und möglicherweise eine evolutionäre Brücke zwischen den Flavonoiden und den Benzoxazinoide schlagen konnten. Das methylierte Kaempferol ist noch nicht charakterisiert, sodass in dieser Hinsicht auch wieder eine neue Tür geöffnet wurde und ein neues Forschungsgebiet erschlossen werden kann.

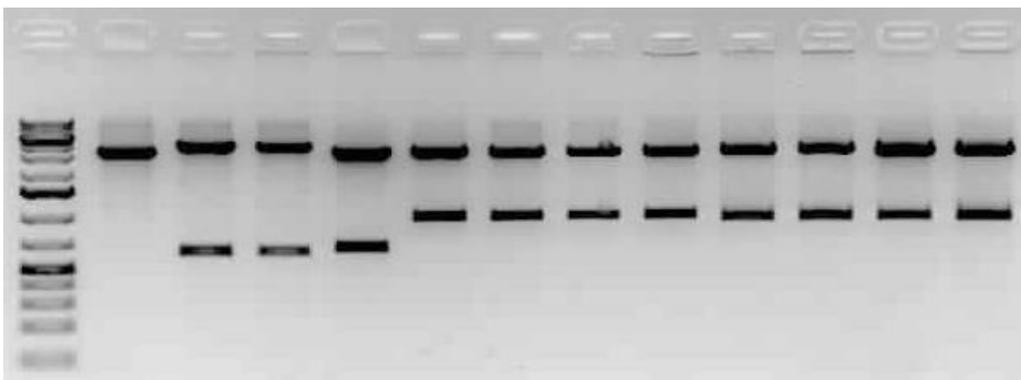
Im Induktionsexperiment wurde gezeigt, dass DIMBOA bei den hier geschaffenen Bedingungen weder einen nennenswerten Einfluss auf den Phytohormonspiegel und Benzoxazinoidspiegel noch die Genexpression der Bx10s hat.

**Anhang**

Anhang 1



Anhang 2



**Literaturverzeichnis**

1. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E> 10.09.2014
2. [http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Pflanze/Statistik-zur-Maisanbauflaeche-aktualisiert\\_article1409264907.html](http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Pflanze/Statistik-zur-Maisanbauflaeche-aktualisiert_article1409264907.html) 10.09.2014
3. Schnabele P.S., et al., 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity and Dynamics. *Science* 326, 1112-1115.
4. Lisch, D., 2009 Epigenetic Regulation of Transposable Elements in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 60, 43-66.
5. Meihls, L.N., Handrick, V., Glauser, G., Barbier, B., Kaur, H., Haribal, M., Lipka, A., Gershenzon, J., Buckler, E., Erb, M., Köllner, T.G., Jander, G., 2013. Natural Variation in Maize Aphid Resistance is Associated with 2,4-Dihydroxy-7-Methoxy-1,4-Benzoxazin-3-One Glucoside Methyltransferase Activity. *The Plant Cell* 25, 2341-2355.
6. Hamilton, R.A., 1964. A corn mutant deficient in 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4 benzoxazin-3-one with an altered tolerance of Atrazin. *Weeds* 12. 27-30.
7. Martin Heil, et al., 2012 How Plants Sense Wounds: Damaged-Self Recognition Is Based on Plant-Derived Elicitors and Induces Octadecanoid Signaling *ploe one* Volume 7, Issue 2 Selbstständigkeitserklärung

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Jena, 11.09.2014

Peter Hempel