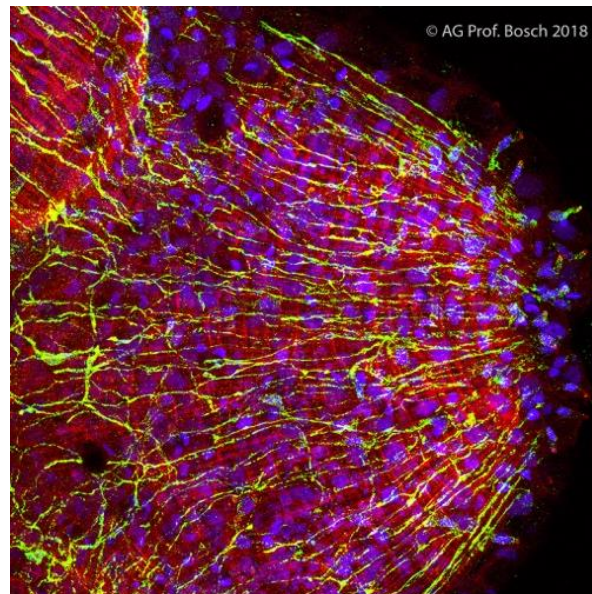


Forschung hautnah:  
Wissenschaftliches Schülerpraktikum vergeben  
durch den  
Förderverein der BiologieOlympiade e.V.

Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch  
Dr. Alexander Klimovich



Noah Meier

Kantonsschule Wettingen  
Universität Basel

16. Juli – 10. August 2018

# Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt .....	3
2	Abkürzungsverzeichnis .....	4
3	Einleitung .....	5
	3.1 Persönliche Vorstellung .....	5
	3.2 Praktikum .....	5
4	Projektinformationen .....	6
	4.1 Hydra .....	6
	4.2 Die Hydren in der Forschung .....	7
	4.3 Das Nervensystem von Hydra .....	7
	4.4 Fragestellung .....	8
5	Methoden .....	9
	5.1 in-situ-Hybridisierung (ISH) .....	9
	5.1.1 Primer designen .....	9
	5.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	10
	5.1.3 Gelelektrophorese .....	11
	5.1.4 Plasmidklonierung .....	11
	5.1.5 Sondenherstellung .....	14
	5.1.6 Fixierung und Färbung der Hydren .....	15
	5.2 Immunomarkierung (IHC) .....	17
	5.2.1 Fixierung und Antikörpermarkierung .....	17
6	Resultate .....	20
	6.1 in-situ-Hybridisierung .....	20
	6.2 Immunomarkierung .....	21
7	Diskussion .....	22
	7.1 Analyse der Ergebnisse .....	22
	7.1.1 in-situ-Hybridisierung .....	22
	7.1.2 Immunomarkierung .....	22
	7.2 Fazit .....	22
	7.3 Danksagung .....	23
8	Literaturverzeichnis .....	24
9	Abbildungsverzeichnis .....	25
10	Anhang .....	26
	10.1 Primerliste .....	26
	10.2 Zwischenresultate bei der Sondenherstellung .....	26

# 1 Abstrakt

«Süßwasserpolypen der Gattung *Hydra* besitzen ein rudimentäres Nervennetz», diese Aussage gilt nach dem heutigen Wissensstand der Zoologie. Doch wie können Hydren mit diesem einfachen Nervensystem komplexe Bewegungsabläufe koordinieren? Diese Arbeit beschäftigt sich mit unterschiedlichen Typen von Nervenzellen, die erst kürzlich aufgrund von differentieller Genexpression entdeckt wurden. Im Rahmen eines Laborpraktikums wurden drei Typen von Nervenzellen (II, V und VII) durch Immunomarkierung und in-situ-Hybridisierung «angefärbt» und es wurde versucht, sie zu lokalisieren. Es wurden Antikörper für die Neuropeptide RFamide, Ano-1, Ano-2, Scn und NDA-1 verwendet. Des Weiteren wurden in-situ-Sonden für Transkripte entwickelt, die spezifisch von einem der drei Nervenzelltypen exprimiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei der Immunomarkierung ein klares Signal für die Antikörperbindung an das Neuropeptid NDA-1, während die anderen markierten Proteine kaum zu einem erkennbaren Signal führten. Bei der in-situ-Hybridisierung konnte für die Nervenzellen von Typ VII eine tentakel-spezifische Färbung erzeugt werden. Die anderen Sonden führten zu keiner spezifischen Färbung. Es wird vermutet, dass das spezifische Vorkommen der Nervenzellen in den Tentakeln an eine bestimmte Funktion gekoppelt ist. Aufgrund der Sequenz der Transkripte sollten Tests zur antimikrobiellen Aktivität gewisser Proteine dieser Nervenzelltypen durchgeführt werden. Zudem sollte sowohl die Immunomarkierung mit den übrigen Antikörpern als auch die in-situ-Hybridisierung mit den restlichen Sonden(-vorläufer) mit angepassten Protokollen wiederholt werden, um noch bessere Resultate zu erzielen.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin-Base
AMP	Antimikrobielle Proteine
AP	Alkalische Phosphatase
DIG	Digoxigenin
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albuminum Fraktion V
C	Cytosin-Base
cDNA	Komplementäre DNA
Cl.	Cluster
CW	Uhrzeigersinn
CCW	Gegenuhrzeigersinn
CLSM	<i>Confocale laser scanning microscope</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphate
ds	doppelsträngig
Eppi	Eppendorf-Röhrchen (Tubes in verschiedenen Volumina)
G	Guanin-Base
GSP-F/R	<i>Gene specific primer (forward/reverse)</i>
HyS	Hybridisierungslösung
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> = Immunomarkierung
ISH	in-situ-Hybridisierung
M	Molarität = mol/Liter
MAB-T	Maleinsäure-Puffer mit <i>Tween 20</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NTMT	Alkalischer Phosphatasepuffer = NaCl, Tris, MgCl <sub>2</sub> und <i>Tween 20</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	PBS + <i>Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
Smp.	Schmelzpunkte
ss	einzelsträngig
SSC	Salzlösung-Natriumcitrat-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
T	Thymin-Base

## 3 Einleitung

### 3.1 Persönliche Vorstellung

Mein Name ist Noah Meier und ich habe im Juni 2016 meine Matura an der Kantonsschule Wettingen in der Schweiz abgeschlossen. Zuvor hatte ich an der Schweizer Biologie-Olympiade teilgenommen und die nationale Endrunde erreicht. Nach meiner Matura beschäftigte ich mich während eines Jahres im Rahmen des Zivildienstes für den Naturschutz und begann im Herbst 2017 mit dem Bachelorstudium in Biologie an der Universität Basel. Bisher beschränkte sich mein Wissen über die Gattung der Süßwasserpolyphen (*Hydra*) auf allgemeines Schulwissen sowie wenige Vorlesungen zum Stamm der Nesseltiere (*Cnidaria*).

### 3.2 Praktikum

Mehr und vor allem hoch aktuelles Wissen zur Gattung *Hydra* durfte ich während meinem Praktikum im Sommer 2018 erfahren. Das Praktikum fand an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel statt und dauerte vier Wochen. Die CAU ist die einzige Volluniversität im Bundesland Schleswig-Holstein und zählt über 26'000 Studierende sowie mehr als 2'000 Wissenschaftler<sup>1</sup>. Das Labor von Thomas C.G. Bosch und seiner Arbeitsgruppe (Abbildung 3.1) befindet sich im 4. Stockwerk des «Bioturms», dem Hauptgebäude des Biozentrums. Die Arbeitsgruppe beschäftigt über 20 Mitglieder darunter auch Bachelor- und Masterstudierende sowie Doktoranden.



Abbildung 3.1: AG-Bosch, (Bosch T. C., 2018)

---

<sup>1</sup> (Universität Kiel, 2018)

## 4 Projektinformationen

### 4.1 Hydra

Die Gattung der Süßwasserpolyphen (*Hydra*) gehört innerhalb des Stammes der Nesseltiere (*Cnidaria*) zur Klasse der Hydrozoen und weist rund 33 Arten auf<sup>2</sup>. Am besten erforscht sind jedoch die beiden Arten *H. vulgaris* und *H. viridissima*. Der Grundbauplan variiert innerhalb der Gattung Hydra nur geringfügig und kann daher universell beschrieben werden. Anders als viele Vertreter der Nesseltiere besitzen Hydren kein Medusenstadium. Wie ihr Name schon sagt, verbringen sie ihr ganzes Leben als Polyp festsitzend auf einem Substrat.

Der Polyp kann in drei Teile unterschieden werden: Kopf, Rumpf und Fuss (Abbildung 4.1). Hydren bestehen aus nur zwei Zellschichten – dem Endoderm und Ektoderm<sup>3</sup>. Dazwischen liegt die Extrazelluläre Matrix, auch Mesogloea genannt. Daneben gibt es undifferenzierte Stammzellen, die in 3 Typen unterschieden werden und alle im Rumpf der Polypen sitzen. Sowohl die Epidermis des Endoderms wie auch diejenige des Ektoderms besitzen ihre eigene Stammzellen, der dritte Typ von Stammzellen werden interstitielle Stammzellen (*I-Cells*) genannt (Abbildung 4.2) und liegt ebenfalls in der ektodermalen Schicht. *I-Cells* können sich in viele Zelltypen differenzieren: Keimbahn, Drüsen, Nervenzellen und Nematocysten (Nesselzellen)<sup>4</sup>. Hydra kann sich sowohl asexuell via Knospung als auch sexuell durch die Bildung von Spermien und Eizellen vermehren. Wie üblich bei Organsimen mit mehreren Fortpflanzungssystemen tritt die sexuelle Vermehrung tendenziell bei verminderter Qualität der Umweltfaktoren ein.

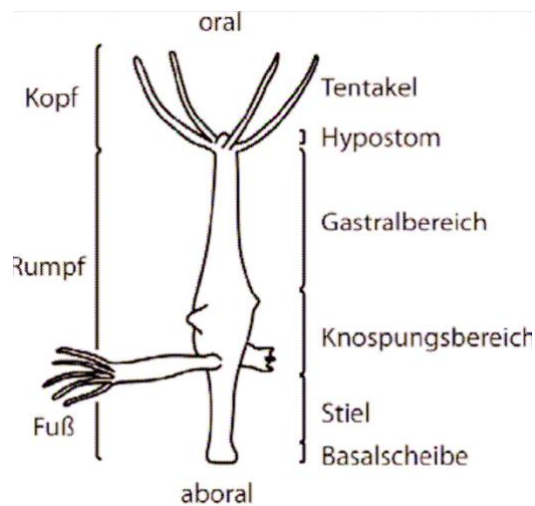


Abbildung 4.1: Grundbauplan Hydra; (Augustin, 2003)

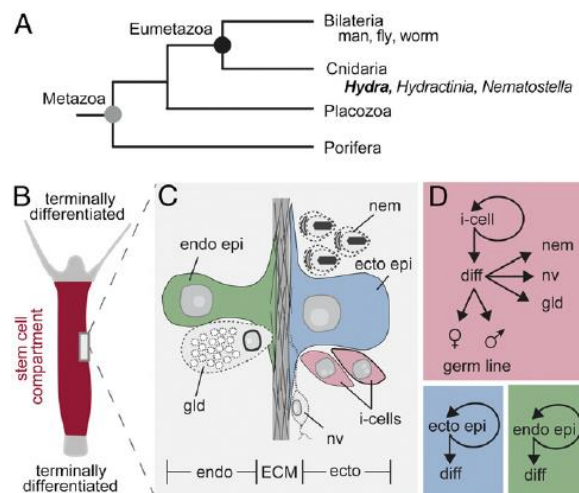


Abbildung 4.2: Grundbauplan Hydra; (Boehm, et al., 2012)

<sup>2</sup> (Wikipedia, 2018)

<sup>3</sup> (Augustin, 2003)

<sup>4</sup> (Boehm, et al., 2012)

## 4.2 Die Hydren in der Forschung

Im Vergleich zur Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) oder der Hausmaus (*Mus musculus*) haben sich Hydren erst spät als Modellorganismen etablieren können. Die Funktion von Modellorganismen liegt darin, Prinzipien der Biologie zu erklären, die über die Klade des Modellorganismus hinaus gehen. Hydren eignen sich u.a. aus folgenden Gründen besonders gut als Modellorganismen:

- **Handhabung:** Hydren lassen sich in einfachen Behältern mit schwach ionenhaltigem Wasser (exakte Zusammensetzung der einzelnen Ionen) gut halten und vermehren. Gewisse Arten (*H. viridissima*) besitzen endosymbiontische Algen, die Photosynthese betreiben, und benötigen daher bei guter Beleuchtung gar keine Nährstoffzugabe durch Fütterung.
- **Simpler Bauplan:** Der ganze physische Aufbau von Hydren ist vergleichsweise simpel. So bestehen sie aus nur zwei Zellschichten. Dies erlaubt es mikroskopische Beobachtungen (z.B. mit Färbungen) zu machen, ohne aufwendige histologische Präparate vorzubereiten.
- **Einfaches Mikrobiom:** Hydren werden von Bakterien aus nur etwa 10 Gattungen besiedelt. Dies hat zum Vorteil, dass die Interaktionen zwischen Bakterien und Hydren einfacher untersucht werden können und Effekte besser den jeweiligen Bakterien zugeordnet werden können. Dies spielt insbesondere eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Holobionten-Theorie, welche in der AG Bosch intensiv untersucht wird<sup>5</sup>.

## 4.3 Das Nervensystem von Hydra

Hydren besitzen ein physisch einfaches Nervennetz, welches funktionell komplexe Bewegungen hervorrufen kann<sup>5</sup>. Dr. Alexander Klimovich beschäftigt sich in der Bosch-AG u.a. mit dem Nervensystem der Hydren. Durch die komplette Sequenzierung sämtlicher mRNA im Cytoplasma aller Nervenzellen, konnte er verschiedene Expressionsmuster erkennen. Bei genauerer Betrachtung sind mindestens 7 Typen von Nervenzellen zu unterscheiden. Um mehr über die einzelnen Typen herauszufinden wird u.a. versucht, diese mittels Färbung von spezifisch und stark exprimierten Genen zu lokalisieren: mRNA-Färbung durch in-situ-Hybridisierung oder Proteinfärbung durch Immunomarkierung. Durch die zweite Methode konnte bereits die Lokalisierung von unterschiedlichen Typen von Nervenzellen bestimmt werden, u.a. Typ II in der Kopfregion oder Typ VII in den Tentakeln. Komplette unbekannt ist das Vorkommen der Nervenzellen von Typ V. Den Nervenzellen von Typ II wird eine Funktion als Schrittmacherzellen zugeschrieben, welche die Kontraktion der Hydren analog zu den Schrittmacherzellen des Herzrhythmus kontrolliert.

---

<sup>5</sup> (Klimovich & Bosch, 2018)

#### 4.4 Fragestellung

Während meinem Praktikum führte ich zwei Experimenten durch, die sich mit dem Nervensystem von *Hydra vulgaris* beschäftigten. Das Ziel beider Experimente war die Lokalisierung verschiedener Nervenzelltypen:

##### **1. Wo in den *H.vulgaris*-Polypen befinden sich die Nervenzellen von Typ V?**

- Färbung mittels in-situ-Hybridisierung von Transkripten stark exprimierter Gene aus Typ V (sowie aus Typ II und Typ VII als Referenz)

##### **2. Lassen sich Nervenzellen von Typ II durch die Immunmarkierung wichtiger Proteine anfärben und unter dem Konfokalmikroskop (CLSM) sichtbar machen?**

- Färbung mittels Immunmarkierung mit primären Antikörpern für die Neuroproteine RFamide, Ano-1, Ano-2, Scn und NDA-1

## 5 Methoden

### 5.1 in-situ-Hybridisierung (ISH)

Bei der in-situ-Hybridisierung geht es um die Färbung von messenger-RNA (mRNA) in ganzen Tieren (in situ = Vor Ort). Hierbei hybridisiert mRNA im Cytoplasma mit markierten antisense-RNA-Sonden. Diese Sonden müssen komplementär sein zur «Ziel-mRNA» und weisen Nukleotide mit einer Digoxigenin-Markierung (DIG) auf. An das Digoxigenin binden dann Antikörper, die mit Alkalischer Phosphatase (Anti-DIG-AP) konjugiert sind, welche im richtigen Substrat (NBT/BCIP) eine Färbereaktion hervorruft.

Bei diesem Experiment wurden Sonden entwickelt, die sich komplementär an die mRNA der Cluster 131995 (Typ V), 103279 (Typ II) und 62692 (Typ VII) binden können. Gen-Cluster sind Gruppen von Genen, die nahe beieinander liegen auf dem Chromosom und für ähnliche Proteine kodieren<sup>6</sup>. Die einzelnen Teilschritte für die in-situ-Hybridisierung sind in den nachfolgenden Unterkapiteln vorgestellt. Der Ablauf des Experimentes sei hier kurz zusammengefasst:

1. Primer für eine geeignete Sondenlänge finden (5.1.1)
2. Primer auf Effektivität testen: PCR und Gelelektrophorese (5.1.2, 5.1.3)
3. Fragment in 100 µl - Ansatz herstellen und aufreinigen (5.1.4)
4. Fragment in Plasmid ligieren (5.1.4)
5. Plasmide durch Elektroporation in kompetente *E.coli* bringen (5.1.4)
6. Bakterienkolonien auf Aufnahme des Plasmids und Richtung des Inserts testen: PCR und Gelelektrophorese (5.1.4)
7. Plasmide aufreinigen und lineare Form des Fragments amplifizieren (5.1.5)
8. Sondenherstellung durch Transkription mit T7/SP6 Polymerasen (5.1.5)
9. Fixierung und Färbung der Hydren (5.1.6)

#### 5.1.1 Primer designen

Als erster Schritt in der Herstellung von ISH-Sonden galt es, ein passendes Primerpaar für ein spezifisches Fragment zu finden. Die Sonden (2 Primer + Fragment) sollten, um ein starkes, aber trotzdem spezifisches Signal zu erzeugen, eine Länge von 500 - 1000 Basenpaare (bp) aufweisen.

Weitere Punkte die beachtet wurden:

- Primerlänge: 15-25bp
- Spezifität von Primer und Fragment (wichtig für eine hohe Selektivität bei der ISH)
- Schmelzpunkt (Smp.) der Primer: 55-60°C, idealerweise für forward (F) und reverse (R) Primer identisch
- Hoher Gehalt an Cytosin und Guanin Basen in den Primer ( $GC/AT \approx 1/1$ ), von den ersten 5 Basen sollen 3 GC-Basen sein

---

<sup>6</sup> (Freyer, 2019)

Die Schmelzpunkte der Primer wurde direkt von der Webseite: [www.eurofinsgenomics.eu](http://www.eurofinsgenomics.eu) berechnet. Anschliessend wurden die Primer dort zur Synthese bestellt (alle verwendeten Primer sind dem Anhang beigefügt). Für die Kontrolle der Spezifität wurde die Primer- und Fragmentsequenz zuvor mit Genomdatenbanken abgeglichen (BLASTN<sup>7</sup>).

### 5.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die PCR wird in einem Thermozykler durchgeführt und dauert bei 30-40 Zyklen etwa 1-2 h. Ein Zyklus besteht aus den 3 Phasen: Denaturierung (bei 94 °C), *Annealing* (i.d.R. bei 55-57 °C) und Elongation (bei 72 °C). Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige (ds) DNA aufgeschmolzen, durch die Spaltung der Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils komplementären Basen. Bei der *Annealing*-Phase werden die beiden Primer (forward und reverse) durch Wasserstoffbrücken sequenzspezifisch an die einzelsträngigen (ss) DNA-*Templates* gebunden. Und bei der Elongation wird die Taq-Polymerase<sup>8</sup> aktiv, die anschliessend an die Primer (5' nach 3') neue Deoxynucleosidtriphosphate (dNTP's) anbindet. So kann theoretisch bei jedem Zyklus die Anzahl an ds-DNA eines Genabschnitts verdoppelt werden<sup>9</sup>.

Als erstes wurde die PCR verwendet um die neu designten Primerpaare (siehe 5.1.1) zu testen. Als DNA-*template* wurde komplementäre DNA (cDNA) von Nervenzellen verwendet. Die cDNA wurde zuvor im Labor aus extrahierter mRNA durch reverse Transkription hergestellt. Weiter wurde der PCR-Reaktion dNTP's, Taq-Polymerase und ein Puffer zugegeben (siehe Tabelle 5.1). Das verwendete Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Die *Annealing*-Temperatur wurde anhand von den Schmelzpunkten der Primer ausgewählt – idealerweise  $\approx 2$  °C unter dem Schmelzpunkt. Das hierfür verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 5.2: PCR-Programmdargestellt.

Tabelle 5.1: PCR Ansatz (10 µl)

	cDNA (Nv)	F-Primer	R-Primer	taq-Polym.	dNTP's	Puffer	H <sub>2</sub> O
Vol. [µl]	1	1	1	0.05	0.2	2	4.75

Tabelle 5.2: PCR-Programm.

Funktion	Temperatur [°C]	Dauer [sec.]	Wiederholungen
Denaturierung	94	60	-
1. Denaturierung	94	15	Loop 40 Durchgänge
2. Annealing	55	15	
3. Elongation	72	30	
Elongation	72	120	-

<sup>7</sup> Tool zum Vergleich einer Nukleinsäure-Sequenz mit bereits bekannten Sequenzen

<sup>8</sup> Taq-Polymerase: Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*, funktioniert bei 72°C

<sup>9</sup> (Alberts, et al., 2008)

### 5.1.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der qualitativen Einschätzung der Länge von Fragmenten aus PCR-Reaktionen. Hierbei wird von der negativen Ladung des DNA-Moleküls Gebrauch gemacht. Grundsätzlich wird ein Agarose-Gel mit Taschen für die Beladung mit den PCR-Produkten in einem Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) unter Spannung gesetzt. Dadurch wandern die DNA-Fragmente vom Minuspol zum Pluspol durch das Agarosegel. Lange DNA-Fragmente (mit vielen Basenpaaren) wandern langsamer durch das Gel als kürzere Fragmente. Die Verwendung eines Markers (*Gene ruler*) als Massstab erlaubt dann die Einschätzung der Länge der aufgetragenen Fragmente.

Für die Herstellung des Gels wurde je nach Anzahl Proben 50 ml (für 7 Proben + Marker) oder 100ml (19 Proben + Marker) TAE-Puffer mit ca. 1 - 1.5% Agarose<sup>10</sup> versetzt und mehrmals bis zum Sieden erhitzt, sodass eine homogene Lösung entstand. Nachdem das Gel auf rund 50 °C abgekühlt war, wurde es mit einem Fluoreszenzfarbstoff (peqGREEN) versetzt, der die DNA-Banden unter UV-Strahlung sichtbar machen sollte. Falls der PCR-Puffer keinen Ladepuffer enthielt<sup>11</sup>, musste das PCR-Produkt zusätzlich mit einem Ladepuffer gemischt werden, bevor ca. 5 µl davon in die Taschen des Agarosegels eingetragen werden konnten (siehe Abbildung 5.1). Die Laufzeit war variabel und war abhängig von der gewählten Spannung (i.d.R. 80-100 V, je nach Gelgröße). Das Gel wurde gestoppt, wenn ca.  $\frac{3}{4}$  des Gels durchwandert worden war. In einem «Gel-Dokumentationssystem» wurden die Gele mit UV-Licht bestrahlt und die sichtbaren Banden fotografisch festgehalten. Die Auswertung von Hand (Vergleich der Banden mit Marker) erlaubte die Einschätzung ob das gewünschte Fragment amplifiziert wurde.

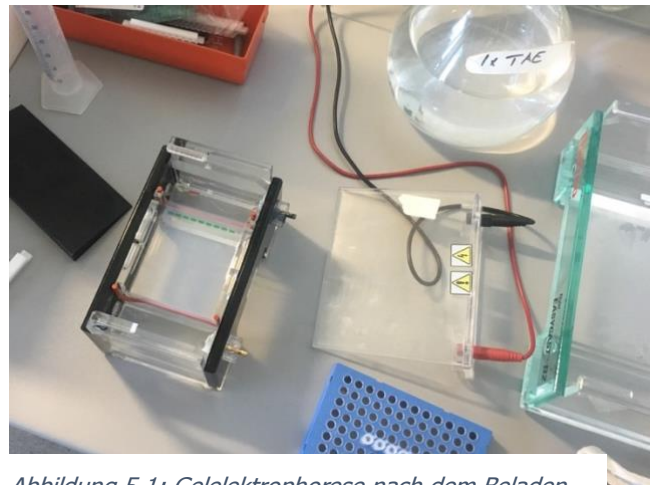


Abbildung 5.1: Gelelektrophorese nach dem Beladen  
©Noah Meier.

### 5.1.4 Plasmidklonierung

Für die Herstellung eines bestimmten DNA-Fragments in grossen Mengen wurde die Plasmidklonierung im Bakterium *Escherichia coli* angewendet. Die Plasmidklonierung setzte sich aus folgenden Teilschritten zusammen: PCR-Aufreinigung, Ligation, Transformation, Agarplattenherstellung und Ausplattierung, Kolonietest und Plasmidaufreinigung.

<sup>10</sup> Für sehr kleine Fragmente (unter 500 Basenpaarungen) können zur besseren Aufspaltung der unterschiedlichen Längen höhere Agarosekonzentrationen verwendet werden.

<sup>11</sup> Auf angefärbten PCR-Puffer wird oft verzichtet, wenn danach mit dem PCR-Produkt weitergearbeitet werden soll, z.B. für Klonierung.

- PCR-Aufreinigung:** Nachdem geeignete Primerpaare gefunden wurden, konnten 100 µl PCR-Ansätze nach Kapitel 5.1.2 (10-fache Menge) hergestellt werden. Das PCR-Produkt wurde mit einem Gel kontrolliert (siehe 5.1.3) und dann mit einem fertigen Kit der Marke Nucleospin aufgereinigt. Die Durchführung der Aufreinigung entsprach 1:1 der Gebrauchsanleitung des Kits<sup>12</sup>. Sinn der Aufreinigung war es, nicht umgesetztes Edukt der PCR (dNTP's, Polymerase, Template, Primer und Puffer) und Nebenprodukte (z.B. falsch gebundene Primer) zu entfernen. Die Sauberkeit der Aufreinigung und Konzentration der DNA wurde anschliessend mit einem Nanodrop-Spektrophotometer analysiert. Bei der Auswertung spielten die Verhältnisse der Absorption bei den Wellenlängen 260/230 und 260/280 eine wichtige Rolle. Generell absorbiert bei 260nm DNA und RNA Strahlung. Bei 230nm und 280nm hingegen absorbieren mögliche Verunreinigungen wie Proteine (230nm), EDTA oder Kohlenwasserstoffe (280nm) Strahlung. Verhältnisse von 260/230 und 260/280 ab 1.8 - 2 gelten in den meisten Fällen als rein.
- Ligation:** Als Vektor für die Klonierung wurde das Plasmid «pGEM-T easy» verwendet (Abbildung 5.2). Dieses Plasmid enthält zwei Bindestellen für die Insertion des gewünschten Fragmentes (T7 und SP6) sowie zwei Kontrollsysteme:
  - Es enthält eine Sequenz für Ampicillin-Resistenz, d.h. nur Bakterien mit einem Plasmid können auf einem Nährmedium mit Ampicillin wachsen.
  - Die Bindestellen T7 und SP6 sind von einer Gensequenz (LacZ) umhüllt, die ohne ein Insert zur Expression einer aktiven β-Galactosidase führt. Dieses Enzym setzt X-Gal zu einem blauen Produkt um. Ist ein Insert in das Plasmid aufgenommen worden (= positive Ligation), ist die β-Galactosidase inaktiv und es wird kein blauer Farbstoff (durch die Bakterien) produziert. Dies erlaubte eine blau-weiss Selektion beim Picken der positiven Kolonien.

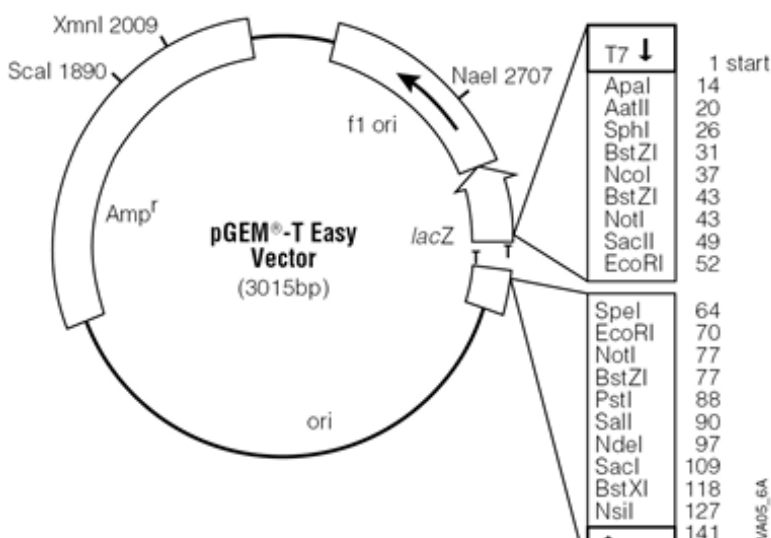


Abbildung 5.2: pGEM-T easy Vektorplasmid (Promega, 2018).

<sup>12</sup> (Machery-Nagel, 2017)

Für die Transformation wurde ein 10 µl Ansatz über Nacht (ON) bei 4 °C inkubiert (Tabelle 5.3). Die Spezifität für das amplifizierte Fragment wurde durch sogenannte «sticky ends» erhöht. Diese bestanden aus einer zusätzlichen Adenin-Base, welche während der PCR jeweils am Ende des DNA-Stranges von der Taq-Polymerase angehängt wurde. Bei der Ligation band diese komplementär an eine überstehende Thymin-Base an der SP6/T7 – Bindestelle des Plasmids.

Tabelle 5.3: Ligationsansatz 5 µl

Komponente	Ligationspuffer	pGEM-T Vektor	PCR-Produkt	T4-Ligase	mQ H <sub>2</sub> O
Vol. [µl]	2.5	0.5	1.5	0.5	auf 5 µl

- Transformation:** Um die transformierten Plasmide in kompetente *E.coli* einzuschleusen, wurde ein sogenannter Elektroporator verwendet. Hierbei wurde 1-1,2 µl des ligierten Plasmids zusammen mit den Bakterien in eine Aluminiumküvette mit zwei Elektroden gegeben. Für wenige Sekunden wurde ein elektrisches Feld aufgebaut, das die Membran der Bakterien permeabel macht und dadurch das Aufnehmen der Plasmide erleichtert. Wichtig war, dass kaum Salz in der Lösung vorhanden war, ansonsten hätte es zu einem Kurzschluss kommen können, der die Bakterien sofort abgetötet hätte. Die danach stark geschwächten Bakterien wurden in ein auf 60°C erwärmtes SOC-Medium (nährstoffreich) überführt, indem sie sich erholen und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator schnell vermehren sollten.
- Agarplatten-Herstellung:** Um den Erfolg der Transformation und Elektroporation zu analysieren, wurden LB-Agarplatten mit Ampicillin, IPTG und X-Gal gegossen (IPTG war wie X-Gal notwendig für die blau-weiss Selektion). Der flüssige LB-Agar wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Erst wenn dieser wieder auf ca. 50 °C abgekühlt worden war, wurden Ampicillin, IPTG und X-Gal dazu gegeben. Danach wurde dieser steril unter der *Cleanbench* in die Petrischalen gegossen und die abgekühlten Agarplatten bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.
- Ausplattieren:** Die transformierten Bakterien im SOC-Medium wurden dann auf den mit Ampicillin, IPTG und XGAL vorbereiteten LB-Agarplatten ausplattiert. Dies geschah ebenfalls unter der *Cleanbench*. Für jede Probe wurde eine Platte mit ca. 200 µl der Bakteriensuspension sowie eine zweite Platte mit dem ganzen zentrifugierten Zellpellet ausplattiert. Die Platten wurden wiederum über Nacht bei 37 °C inkubiert.
- Koloniecheck:** Aus den über Nacht herangewachsenen Bakterien auf den Agarplatten wurden weisse Kolonien (Bakterien mit Plasmid und Insert) auf eine Masterplatte übertragen und mit einer PCR auf die Länge des Inserts überprüft. Bei der PCR wurden Primer für SP6 und T7 verwendet. Die dafür notwendige *Annealing*-Temperatur betrug 55 °C. Als DNA-*Template* wurde mit einer Pipettenspitze eine minimale Menge einer weissen Kolonie gepickt

und mit dem PCR-Ansatz vermischt. Positive Kolonien weisen eine Bande mit der Länge des Fragments plus derjenigen der beiden Primern auf (ca. 100bp). Diese Kolonien wurden einerseits auf Masterplatten (LB-AMP-IPGT-XGAL) übertragen und beschriftet und andererseits in einem Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium + 1 µl Ampicillin bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht vermehrt.

- **Plasmidaufreinigung:** Der letzte Schritt der Plasmidklonierung lag bei der Aufreinigung der Plasmide aus den Bakterien in Flüssigkultur. Hierfür wurden die über Nacht inkubierten Bakterienkulturen im LB-Medium (mit Amp.) wiederum mit einem Nucleospin-Kit für Plasmide aufgereinigt. Das verwendete Protokoll entsprach ebenfalls der Gebrauchsanleitung<sup>13</sup>. Die Reinheit der Plasmide wurde wiederum mit dem Nanodrop, analog zur PCR-Aufreinigung, analysiert.

### 5.1.5 Sondenherstellung

Um aus den im Kapitel 5.1.4 Plasmidklonierung klonierten und isolierten Plasmiden ISH-Sonden herzustellen, musste zuerst die Richtung des Inserts bestimmt werden – Uhrzeigersinn (CW) oder Gegenuhrzeigersinn (CCW). Hierfür werden pro Plasmidprobe zwei PCR-Ansätze vorbereitet: Als DNA-*template* dienen die Kolonien auf den Masterplatten. Der erste Ansatz enthielt jeweils 1 µl T7-Primer plus 1 µl des Gen-spezifischen *forward* - Primer (GSP-F). Der zweite Ansatz enthielt wiederum 1 µl des T7-Primer plus 1 µl des *reverse* – Primer (GSP-R). Als *Annealing* - Temperatur

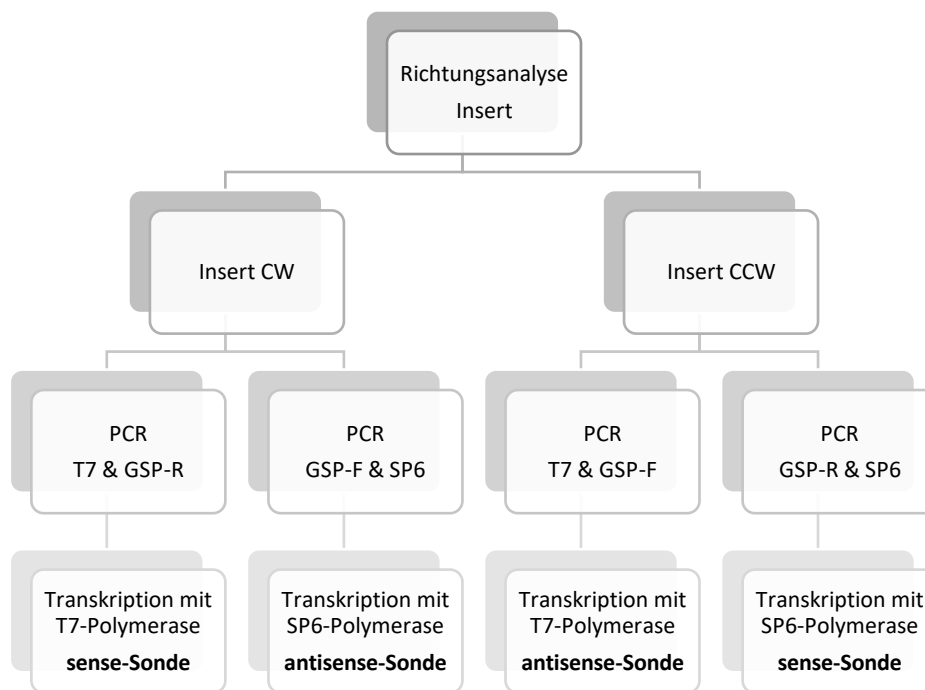


Abbildung 5.3: Ablauf Sondenherstellung.

<sup>13</sup> (Machery-Nagel, 2017)

wurde auch hier 55 °C gewählt. Bei korrekter Insertion des Fragmentes in das Plasmid sollte sich also bei der anschließenden Gelelektrophorese entweder eine Bande beim ersten Ansatz (Insert ist CCW) oder beim zweiten Ansatz (Insert ist CW) zeigen (vergleiche Abbildung 5.2).

Als nächstes wurde das Insert im zirkulären Plasmid amplifiziert und linearisiert. Dafür wurden wie in Abbildung 5.3 beschriebenen PCR-Ansätze vorbereitet. Anschliessend wurden mit SP6- und T7-Polymerasen ss-RNA-Sonden transkribiert. Das Spezielle dabei waren die NTPs, welche eine Digoxigenin-Markierung trugen. Es wurden immer sense- und antisense-Sonde hergestellt, damit eine Negativprobe (sense-Sonde) vorhanden war.

### 5.1.6 Fixierung und Färbung der Hydran

Die Fixierung und Färbung der Hydran dauerten sieben Arbeitstage. Die einzelnen Arbeitsschritte wird demnach chronologisch gegliedert vorgestellt (Abbildung 5.4).

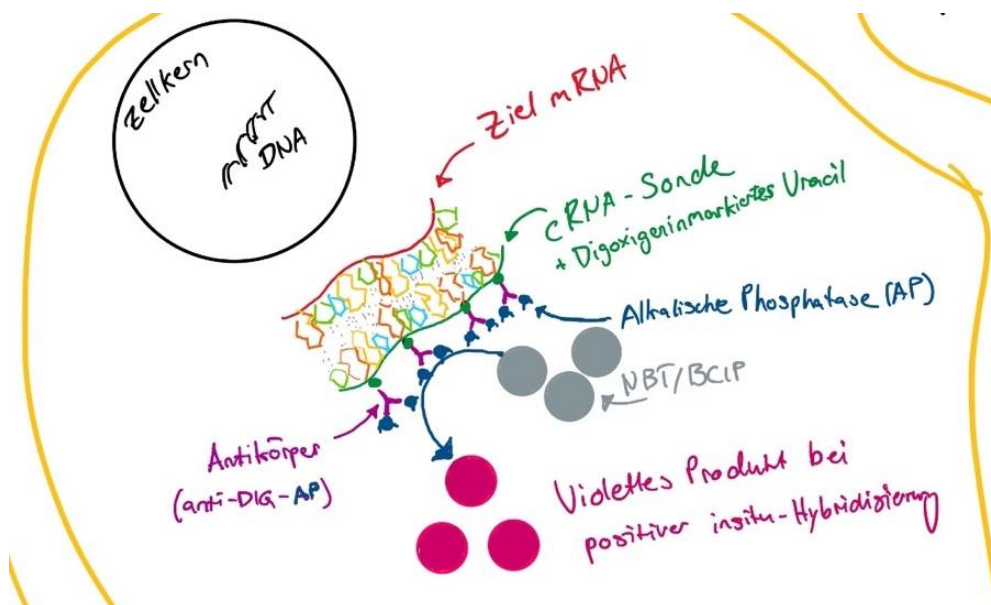


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Färbereaktion bei der ISH.

**Tag 1:** Zuerst mussten die Polypen, ohne verletzt zu werden, aus den Zuchtbehältern entnommen werden. Pro ISH-Probe wurden etwa 20 Polypen gebraucht. Aus praktischen Gründen wurden 12 Proben hergestellt. Daher wurden insgesamt 240 Polypen abgezählt. Diese wurden in einem 20 ml Tube mit Hydra-Zuchtmedium (S-Medium) zuerst mit 2 % Urethan in S-Medium für 2 min betäubt. Danach erfolgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in S-Medium während 3 h. Auf die PFA-Fixierung folgten zuerst 3 Waschgänge à 10 min mit Phosphat-gepufferten Salzlösung mit Tween (PBT) und dann nochmals 3 Waschgänge à 10 min mit Methanol. Danach wurden die Polypen über Nacht bei -80 °C gelagert.

**Tag 2:** Die Polypen wurden nun in die 12 Siebe einer ISH-Schale verteilt und zuerst mit Ethanol für 5 min gewaschen. Danach wurde in 3 Schritten à 5 min jeweils 25 % vom Ethanol mit PBT

ersetzt: EtOH 75 % / PBT 25 %, EtOH 50 % / PBT 50 %, EtOH 25 % / PBT 75 % und schliesslich 3x mit reinem PBT für 10 min gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit Proteinase K (10 µg/ml) in PBT für 20 min. Darauf folgten 2 Waschvorgänge mit Glycin (4 mg/ml) in PBT einmal für 2 min und einmal für 10 min. Dann wurde wieder 3x für 10 min mit PBT gewaschen. Darauf wurde 2x für 5 min mit Triethylamin (0.1M) in PBT gewaschen. Als nächstes wurden die Polypen zuerst 5 min mit Essigsäureanhydrid (2.5 µl/ml) in Triethylamin (0.1M) behandelt und dann für weitere 5 min nochmals dieselbe Menge Essigsäureanhydrid in denselben Waschvorgang hinzugefügt. Zuletzt folgten wieder 3 Waschvorgänge mit PBT à etwa 10 min. Die Polypen wurden dann über Nacht in PFA (4 %) in S-Medium bei 4 °C gelagert.

**Tag 3:** Nach drei weiteren Waschvorgängen à 10 min mit PBT wurden die Polypen zwei Mal für 10 min in 2-facher Natriumcitrat-Salzlösung (2X SSC) gewaschen und dann ein drittes Mal bei 70 °C mit 2X SSC für 20 min inkubiert. Dann wurde die SSC-Lösung in Hybridisierungslösung (HyS) in zwei Schritten umgetauscht: zuerst wurde 10 min mit 2X SSC 50 % / HyS 50 % gewaschen und dann nochmals 10 min mit HyS 100 % nachgewaschen. Danach wurden die Polypen über Nacht in tRNA bei 57 °C inkubiert (nach Protokoll nur 2 h). Dadurch sollte verhindert werden, dass die Sonden unspezifisch binden und so eine falsche Färbung hervorrufen. Die Inkubation der Polypen mit den Sonden in SSC-Formamid-Lösung bei 57 °C dauerte aus zeitlichen Gründen nur 20 h (nach Protokoll 72h).

**Tag 4:** Die folgenden Waschvorgänge wurden immer mit auf 57 °C vorgewärmten Lösungen durchgeführt. Dabei wurden die Hydren zuerst 10 min in reiner HyS gewaschen und dann in 4 Schritten à 10 min je ¼ durch 2X SSC ersetzt. Mit 0.1% CHAPS in 2X SSC wurde zweimal für 30 min bei 57 °C inkubiert. Danach folgten zwei Waschvorgänge à 10 min mit Maleinsäurepuffer und *Tween*-Zusatz (MAB-T) bei Raumtemperatur. Während einer Stunde wurde die Blockierung von ungewollten Bindestellen der Antikörper mit Bovinem Serum Albumin Fraktion V (BSA) in MAB-T durchgeführt. Es folgte eine weitere Blockierung in Blocklösung während 2 h bei 4 °C. Über Nacht wurden dann Antikörper mit konjugierter Alkalischer Phosphatase (Anti-DIG-AP) gelöst 1:2000 in Blocklösung an die Digoxigenin-markierten NTPs der Sonden gebunden und bei 4 °C inkubiert.

**Tag 5:** Während 8 Waschgängen à je 15 min mit MAB-T wurden die Polypen bei Raumtemperatur von nicht gebundenen Antikörpern gereinigt. Danach folgten 3 kurze Waschgänge (5 min) mit Alkalischem Phosphatasepuffer (NTMT = Natriumchlorid, Tris, Magnesiumchlorid und Tween) bei Raumtemperatur. Für weitere 5 min wurde mit 1 mM Levamisol in NTMT inkubiert. Durch die Zugabe von Nitroblautetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) in NTMT wurde die Färbereaktion gestartet. Die an die Antikörper gebundene alkalische Phosphatase sollte NBT und BCIP in ein blau/violettes Produkt umwandeln (siehe Abbildung 5.5). Nach etwa 40 min wurde die Reaktion gestoppt und die Polypen in Wasser überführt. Die Lagerung in 70%

Ethanol bei 4 °C über Nacht sollte den Hintergrund der Färbung zusätzlich ausbleichen. Nach der Einlagerung in Euparal werden die Polypen mikroskopiert und fotografisch festgehalten.

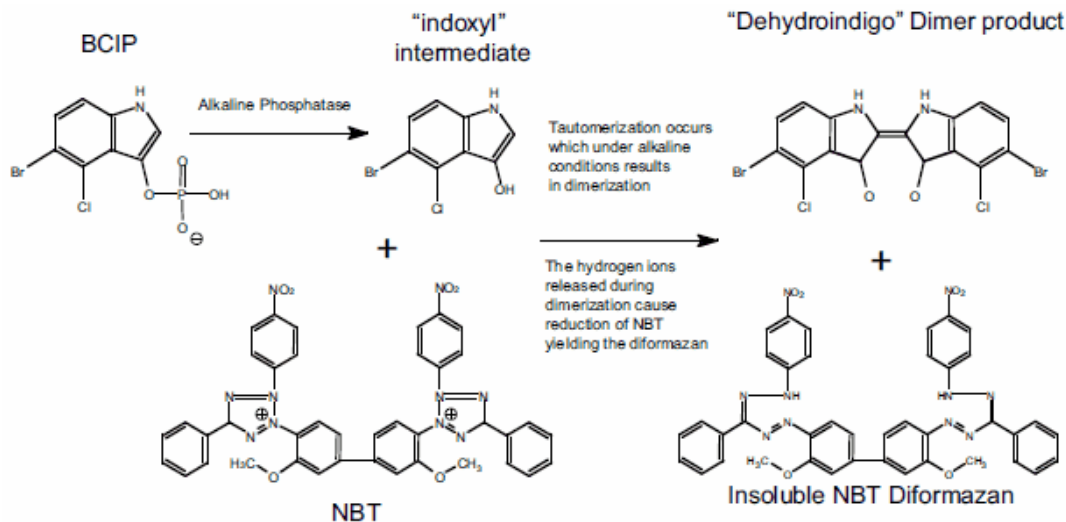


Abbildung 5.5: NBT/BCIP Färbereaktion<sup>14</sup>.

## 5.2 Immunomarkierung (IHC)

Bei der Immunomarkierung (IHC = engl. *Immunohistochemistry*) können wie bei der in-situ-Hybridisierung bestimmte Zellen angefärbt werden, aufgrund von zellspezifisch exprimierten Genen. Bei der IHC werden jedoch Proteine und nicht mRNA gefärbt. Die Färbung funktioniert über die Bindung zweier Antikörper. Die primären Antikörper sind spezifisch für die «Zielproteine», während die sekundären Antikörper spezifisch sind für die primären Antikörper und zusätzlich eine Fluoreszenzmarkierung besitzen.

Die hier verwendeten primären Antikörper stammten aus Kaninchen, in die die «Zielproteine» eingespritzt wurden und die Antikörper durch Immunreaktionen selektiert, vervielfacht und anschliessend isoliert wurden. Die sekundären Antikörper stammten durch dieselbe Methode aus Ziegen. Bei diesem Versuch wurden primäre Antikörper für folgende Neuropeptide verwendet: RFamide, Ano1, Ano2, Scn und NDA-1(x). Weiter wurden Aktinfilamente und Zellkerne (DNA) mit Phalloidin und TOPRO gefärbt. Dadurch sollten eine bessere Visualisierung und Lokalisierung der Nervenzellen ermöglicht werden.

### 5.2.1 Fixierung und Antikörpermarkierung

2 Tage bevor mit der Fixierung begonnen werden konnte, durften die Hydren nicht mehr gefüttert werden. Pro Antikörper-Färbung wurden etwa 10-15 Polypen verwendet, total also 50-75 Polypen. Die Fixierung mit den beiden Antikörpern dauerte zwei Tage, am dritten Tag konnte mit dem Mikroskopieren am CLSM begonnen werden.

<sup>14</sup> (Sigma Aldrich, 2018)

**Tag 1:** In zwei 2 ml Eppis wurden je etwa 30 Polypen in einer 2 % Urethan-Lösung in S-Medium während 2 min betäubt. Bei allen Schritten (ausser der Antikörperbindung bei 4 °C) war es wichtig, dass die Polypen immer in Bewegung blieben, dafür wurde eine Rotationsplattform verwendet. Danach folgte die Fixierung in 4 % PFA in S-Medium während 4 h. Anschliessend wurden die Polypen in PBT (PBS + 0.1 % *Tween*) vier Mal während 15 min gewaschen. Im nächsten Waschgang wurde PBS mit 0.5 % 100-fachem Triton (TritonX100) für 30 min angewendet. Mit 1 % BSA in PBT wurden während einer Stunde unspezifische Bindestellen für die Antikörper blockiert. Schliesslich wurden die Polypen in gleichen Mengen auf fünf kleine Eppis verteilt und von den angesetzten Verdünnungen (Tabelle 5.4) der primären Antikörper (rabbit) wurden jeweils 0.5 ml zu einem Eppi hinzugefügt und die Polypen über Nacht bei 4 °C inkubiert.

*Tabelle 5.4: Verdünnung, primäre Antikörper*

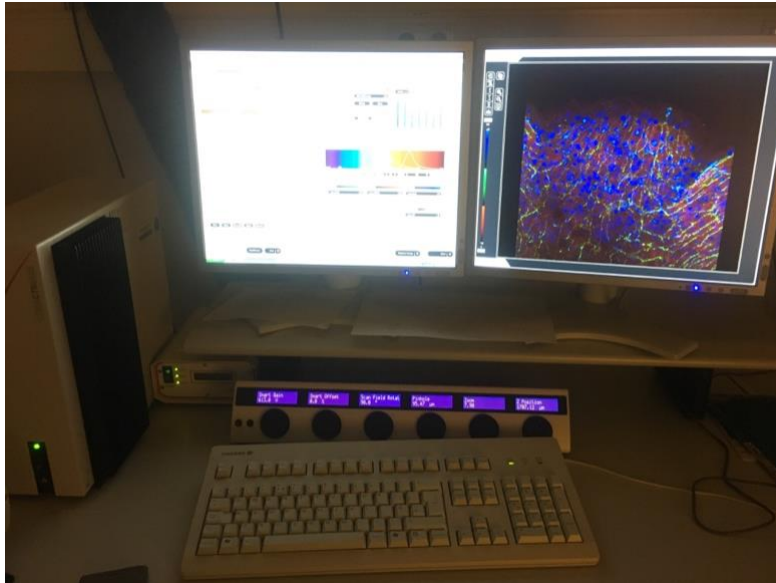
1 <sup>st</sup> Antikörper	RFamide	Ano-1	Ano-2	Scn	NDA-1 (x)
Verdünnung	1:30	1:2000	1:2000	1:2000	1:300
AK [ $\mu$ l]	17	0.7	0.7	0.7	1.7
PBT mit 1% BSA [ $\mu$ l]	500	1500	1500	1500	500

**Tag 2:** Die Polypen wurden in fünf grössere Eppis umgesetzt und die primären Antikörper abgesaugt. Es folgten vier Waschschrte à 15 min mit PBT (+1% BSA). Darauf wurden die Polypen in kleinere Eppis umgesetzt und die sekundären Antikörper (goat-antirabbit) wurden 1:1000 in PBT (+1% BSA) verdünnt und auf die fünf Eppis verteilt und während 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Von diesem Moment an mussten die Proben immer dunkel gestellt werden (in Alu-Folie gewickelt), da der Fluoreszenzstoff der sekundären Antikörper sehr lichtempfindlich ist. Danach wurden die Polypen wieder in grosse Eppis umgesetzt, die sekundäre Antikörper abgesaugt und vier Mal mit PBT<sup>15</sup> à je 15 min gewaschen. Es folgte die Färbung der Zellkerne mit Phalloidin 1:1000 verdünnt in PBT<sup>15</sup>. Pro Probe wurden 0.5 ml benötigt, daher wurde 2.5 ml der PBT-Lösung mit 2.5  $\mu$ l Phalloidin und 12.5% TritonX100 gemischt. Die Inkubation dauerte hierbei 40 min. Anschliessend wurde drei Mal mit PBT<sup>15</sup> nachgewaschen. Es folgte auf ähnliche Weise die Färbung von Aktin<sup>16</sup> mit TOPRO ebenfalls in einer 1:1000 Verdünnung. Es wurden 2.5 ml der PBT-Lösung mit 2.5  $\mu$ l TOPRO vermischt, aber auf das TritonX100 wurde hier verzichtet. Die Inkubation dauerte beim TOPRO nur etwa 10 min. Nach bereits 5 min konnte mit dem Einbetten der Polypen auf Objektträgern angefangen werden. Dafür wurden die Polypen vorsichtig auf dem Objektträger verteilt und die Flüssigkeit grösstenteils abgesaugt, ohne dass die Polypen austrocknen durften. Danach wurden sie mit einer Mischung aus Moviol und DABCO eingedeckt und mit einem Deckglas versiegelt. Die fertigen Objektträger wurden über Nacht bei 4 °C gelagert.

<sup>15</sup> PBT => PBS (+0.5% *Tween* + 1% BSA)

<sup>16</sup> Aktin ist ein wichtiger Bestandteil des Cytoskeletts und in allen Zellen vorhanden

**Tag 3:** Die Analyse der Proben erfolgte am Konfokal-Mikroskop (CLSM). Hierbei wurde Gebrauch gemacht von der fluoreszierenden Eigenschaft von TOPRO, Phalloidin und den sekundären Antikörpern. Diese drei Stoffe können durch Strahlung in bestimmten Wellenlängen angeregt werden und emittieren wiederum Strahlung in unterschiedlichen Wellenlängen. Dadurch konnten vom CLSM drei unterschiedliche Signale gemessen und am Computer beliebig farblich dargestellt werden. Es wurden 40 Schichten aufgenommen mit dem CLSM, so entstand praktisch ein kompletter Scan der Polypen (siehe Abbildung 5.6).



*Abbildung 5.6: CLSM-Analyse durch Computersteuerung  
©Noah Meier.*

## 6 Resultate

### 6.1 in-situ-Hybridisierung

Die ISH wurde für die Cluster 103279, 62692, 131995 sowie Ano3 mit neu erstellten Sonden durchgeführt (Tabelle 6.1). Eine klare spezifische Färbung war nur bei dem Cluster 62692 in den Ansätzen der Tentakel zu sehen (Abbildung 6.1). Die «positiv-Kontrolle» mit bereits bewährten Sonden für das Cluster AL8 hat keine deutliche spezifische Färbung ergeben. Die «negativ-Kontrollen» mit sense-Sonden für die Cluster 103279 und 62692, sowie die ISH ohne Sonde führten zu keiner Färbung. Weitere Zwischenresultate zur Sondenherstellung sind dem Anhang zu entnehmen.

Tabelle 6.1: Übersicht der ISH-Proben.

Probe	verwendete Sonde	Ergebnis Färbung
1	AL8, 1:15, positiv Kontrolle	keine Färbung
2	Cl. 103279, 1:15	keine Färbung
3	Cl. 103279, 1:5	keine Färbung
4	Cl. 62692, 1:15	klare Färbung in Tentakeln
5	Cl. 62692, 1:5	klare Färbung in Tentakeln
6	Cl. 131995, 1:15	keine Färbung
7	Cl. 131995, 1:5	keine Färbung
8	Ano3, 1:5	keine Färbung
9	Ano3, 1:15	keine Färbung
10	Cl. 103279, 1:15, negativ Kontrolle (sense)	keine Färbung
11	Cl. 62692, 1:15, negativ Kontrolle (sense)	keine Färbung
12	keine Sonde, negativ Kontrolle	keine Färbung

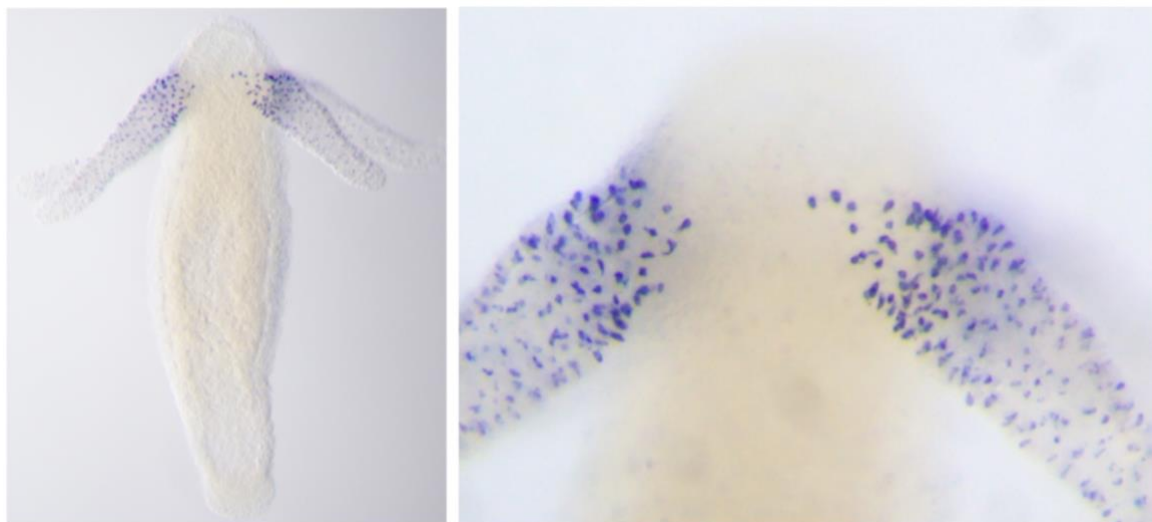


Abbildung 6.1: ISH-Probe 4: tentakelspezifische Färbung in Typ VII, unpublished data ©Bosch-AG.

## 6.2 Immunomarkierung

Beim Scanning der mit Antikörper markierten Polypen mit dem CLSM wurden 3 Signale empfangen. Das erste Signal stammte vom Fluoreszenzstoff TOPRO, welcher an DNA bindet, mit dem die Zellkerne markiert wurden (hier blau gefärbt). Das zweite Signal wurde durch den Fluoreszenzstoff Phalloidin emittiert, welches an Aktinfilamente bindet (hier rot gefärbt). Und das dritte Signal stammte von den fluoreszierenden sekundären Antikörpern der Immunomarkierung, welche spezifisch mit den an Neuropeptide gebundenen primären Antikörpern konjugiert waren (hier grün gefärbt). Die Immunomarkierung mit den fünf Antikörpern für die Proteine: RFamide, Ano1, Ano2, Scn und NDA-1 hat einzig bei NDA-1 ein spezifisches Signal gegeben unter dem CLSM (Abbildung 6.2 und Abbildung 6.3). Aus den Proben der anderen Antikörper wurden keine Aufnahmen generiert, aufgrund der Schwäche des Signals.

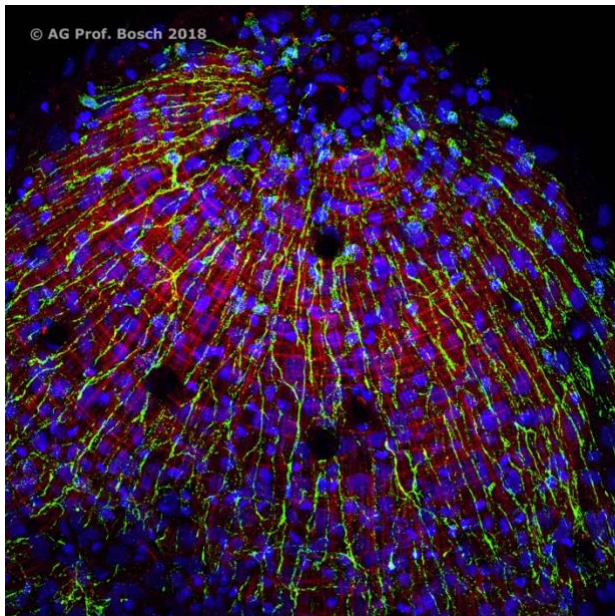


Abbildung 6.2: CLSM-Aufnahme, IHC mit NDA-1;  
unpublished data ©Bosch-AG

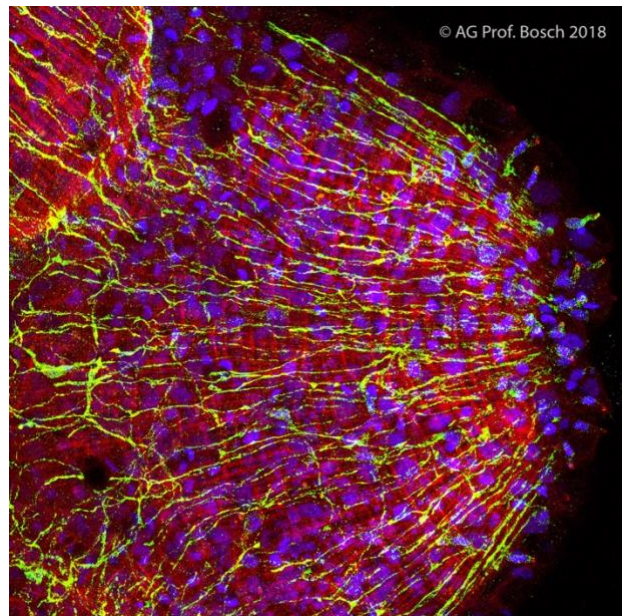


Abbildung 6.3: CLSM-Aufnahme, IHC mit NDA-1;  
unpublished data ©Bosch-AG

## 7 Diskussion

### 7.1 Analyse der Ergebnisse

#### 7.1.1 in-situ-Hybridisierung

Die ISH hat bei einer von vier neu designten Sonden hat mit beiden Sondenverdünnungen gut funktioniert. Die «positiv-Kontrolle» mit der bewährten AL8-Sonde hat nicht funktioniert. Eine Wiederholung der Sonden-Herstellung, eine längere Inkubation der Polypen mit den Sonden oder andere Anpassungen des Protokolls könnten noch bessere Ergebnisse liefern.

Die positive ISH mit der Sonde für das Cluster 62692 in Typ VII zeigt eine sehr spezifische Färbung in den Tentakel(-ansätzen) auf. Die angefärbten Cytoplasmen (mRNA) sind aufgrund der dreieckigen Form sicher Nervenzellen zuzuordnen. Das klar definierte Vorkommen des Cl. 62692, welches für Signalpeptide kodiert, deutet auf eine klare Funktionalität hin. Bisherige Analysen zum Protein aus dem Cl. 62692 zeigen Potenzial für antimikrobielle Aktivität. Weitere Untersuchungen müssen aufzeigen, ob hier tatsächlich eine Schnittstelle zwischen Nervensystem und Mikrobiom vorliegt.

#### 7.1.2 Immunomarkierung

Die Immunomarkierung mit Antikörper für die fünf Proteine (RFamide, Ano1, Ano2, Scn und NDA-1) hat nur bei NDA-1 ein deutliches Signal ergeben. Die Struktur der Verteilung der Fluoreszenzstoffe entspricht der erwarteten Netzstruktur des Nervensystems der Hydren. Schön sichtbar auf Abbildung 6.3 sind vereinzelt Nervenzellen, die rund um das Hypostom vom Nervennetz abstehen. Diesen Nervenzellen ist eine sensorische Funktion zuzuschreiben<sup>17</sup>. Für diese Probe hat sich das Protokoll bereits zuvor bewährt, sie galt daher als «Positiv-Kontrolle». Für die anderen Antikörper lassen sich durch Anpassungen im Protokoll wohl noch bessere Resultate erzielen.

### 7.2 Fazit

Mit meinen Experimenten konnte ich einen kleinen Puzzlestein zur aktuellen Forschung bei Hydren beitragen. Die Tatsache, an noch unbekannter Materie mitzuarbeiten und nicht bloss stumpfe Schulversuche auszuführen, war sehr motivierend und machte das Praktikum interessant für mich. Persönlich konnte ich stark von der Methodenvielfalt, der ich begegnet war, profitieren. Wie es mein Betreuer, A. Klimovich, zu Schluss des Praktikums formulierte, erhielt ich ein «Crashkurs in molekularbiologischen Methoden». Ich war schon immer überzeugt, dass ich mich in die organismische Biologie spezialisieren möchte, auf Ebene von Ökologie und Evolution. Nach diesem Praktikum weiss ich aber, dass sich dies durchaus auf interessante Weise mit molekularbiologischen Methoden kombinieren lässt.

---

<sup>17</sup> A.Klimovich, mündl. Korrespondenz

### 7.3 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. Bosch für die Einladung zum Laborpraktikum, Dr. Klimovich für die tolle Betreuung während den Arbeiten und dem ganzen «Hydra-Club» für die freundliche Aufnahme ins Team. Ausserdem möchte ich Martina Heller, Maximilian Fritz und Patricia Scholz vom Förderverein der Biologie-Olympiade aus Deutschland und Jacqueline Mock von der Schweizer Biologie-Olympiade vielmals für die Organisation des Praktikums danken.

## 8 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of THE CELL* (5. Auflage Ausg.).
- Augustin, R. (2003). *Molekulare Untersuchungen zur Musterbildung im einfachen Vielzeller Hydra, Dissertation*. Kiel.
- Boehm, A.-M., Konstantin Khalturin, F. A.-E., Hemmerich, G., Klostermeier, U. C., Lopez-Quintero, J. A., Oberg, H.-H., . . . Bosch, T. C. (2012). FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal Hydra. *PNAS*.
- Bosch, T. C. (August 2018). Von [www.bosch.zoologie.uni-kiel.de](http://www.bosch.zoologie.uni-kiel.de) abgerufen
- Bosch, T. C., Klimovich, A., Domazet-Loso, T., Gründer, S., Holstein, T. W., Jékely, G., . . . Yuste, R. (2016). *Back to the Basics: Cnidarians Start to Fire*. CellPress.
- Freyer, T. (2019). *Gen-Cluster: DocCheck Flexikon*. Von DocCheck Flexikon: <https://flexikon.doccheck.com/de/Gen-Cluster> abgerufen
- Klimovich, A. V., & Bosch, T. C. (2018). *Rethinking the Role of the Nervous System: Lessons From the Hydra Holobiont*. Kiel.
- Machery-Nagel. (Dezember 2017). Von Plasmid clean-up: User manual (15-16): [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM\\_pDNA\\_NS.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf) abgerufen
- Machery-Nagel. (Februar 2017). Von PCR clean-up, Gel extraction: User manual (17-18): [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM\\_PCRcleanup\\_Gellex\\_NSgelPCR.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gellex_NSgelPCR.pdf) abgerufen
- Promega. (28. August 2018). Von [www.promega.com](http://www.promega.com) abgerufen
- Sigma Aldrich. (September 2018). Von <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html> abgerufen
- Universität Kiel. (19. 08 2018). [www.uni-kiel.de](http://www.uni-kiel.de).
- Wikipedia. (18. Septemeber 2018). Von <https://de.wikipedia.org/wiki/S%C3%BC%C3%9Fwasserpolypen> abgerufen

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: AG-Bosch, (Bosch T. C., 2018) .....	5
Abbildung 4.1: Grundbauplan Hydra; (Augustin, 2003).....	6
Abbildung 4.2: Grundbauplan Hydra; (Boehm, et al., 2012).....	6
Abbildung 5.1: Gelelektrophorese nach dem Beladen ©Noah Meier. ....	11
Abbildung 5.2: pGEM-T easy Vektorplasmid (Promega, 2018).....	12
Abbildung 5.3: Ablauf Sondenherstellung.....	14
Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Färbereaktion bei der ISH. ....	15
Abbildung 5.5: NBT/BCIP Färbereaktion.....	17
Abbildung 5.6: CLSM-Analyse durch Computersteuerung ©Noah Meier.....	19
Abbildung 6.1: ISH-Probe 4: tentakelspezifische Färbung in Typ VII, unpublished data ©Bosch-AG. ....	20
Abbildung 6.2: CLSM-Aufnahme, IHC mit NDA-1; unpublished data ©Bosch-AG.....	21
Abbildung 6.3: CLSM-Aufnahme, IHC mit NDA-1; unpublished data ©Bosch-AG.....	21
Abbildung 10.1: Primerbestellung für die Sondenherstellung.....	26
Abbildung 10.2: PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen. ....	26
Abbildung 10.3: 100 µl PCR mit Kombinationen 1,3 und 6. ....	26
Abbildung 10.4: Koloniecheck 1. Ligation/Elektroporation (Bild 1 & 2), Koloniecheck 2. Ligation/Elektroporation (Bild 3). ....	27
Abbildung 10.5: PCR mit Sondenvorläufern. ....	27

# 10 Anhang

## 10.1 Primerliste

eurofins		Oligonukleotid Synthese Report											Seite 1/1		
Genomics		Dr. Alexander Klimovich Christian-Albrechts University Kiel Zoological Institute		Auftrags-Nr.: 4529888/11104529888-1 Kunden-Nr.: 14202 Kd-Auftrags-Nr.: AK180718		Auftragsdatum: 18.07.2018 Labor Nr.: 3347 Anzahl Oligos: 10/10		Eurofins Genomics Anzingerstraße 7a D- 85560 Ebersberg							
Nr.	Oligoname	Sequenz (5' -> 3')	OD	µg	nmol	Konzentration [pmol/µl]	Vol. für 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt	Synthese Maßstab	Reinigung	Modifikation	Barcode IDO	QC Report
1	AK_cl10327F1	AAGCAAACCAATGTGGT ACGTG (22)	7.98	208	30,7	-	307	58,4	6792	45,5 %	0.01 µmol	HPSF	-	025272995	MALDI
2	AK_cl10327F2	CAATGTGGTACGTGTTT AATGCC (23)	8.16	228	32,0	-	320	58,9	7110	43,5 %	0.01 µmol	HPSF	-	025272996	MALDI
3	AK_cl10327R1	TTGACGGTTGGGCAC C (18)	5.49	161	29,1	-	291	58,2	5547	61,1 %	0.01 µmol	HPSF	-	025272997	MALDI
4	AK_cl62692F1	TGGTTGTAATAACAGTA GACAGC (23)	7.69	207	29,2	-	292	58,9	7088	43,5 %	0.01 µmol	HPSF	-	025272998	MALDI
5	AK_cl62692R1	GTATGATGCATTTACGC GAGAC (23)	7.98	220	31,1	-	311	58,9	7079	43,5 %	0.01 µmol	HPSF	-	025272999	MALDI
6	AK_cl62692R2	CTGATCTTGTAATCTGA CAAATCG (25)	9.53	259	33,9	-	339	58,1	7640	36 %	0.01 µmol	HPSF	-	025273000	MALDI
7	AK_cl131995F1	AGATACAGCGGGATGC C (18)	5.99	163	29,5	-	295	58,2	5534	61,1 %	0.01 µmol	HPSF	-	025273001	MALDI
8	AK_cl131995F2	AGCATCAAATAATCACA CGTTG (24)	5.56	148	20,3	-	203	57,6	7305	37,5 %	0.01 µmol	HPSF	-	025273002	MALDI
9	AK_cl131995R1	GCTAAATAAGTTTGCTAG ATAGTCC (25)	8.49	229	29,8	-	298	58,1	7680	36 %	0.01 µmol	HPSF	-	025273003	MALDI
10	AK_cl131995R2	GTTATACAGATGCTTTGT CATCTC (25)	8.79	255	33,5	-	335	58,1	7613	36 %	0.01 µmol	HPSF	-	025273004	MALDI

Abbildung 10.1: Primerbestellung für die Sondenherstellung

## 10.2 Zwischenresultate bei der Sondenherstellung

Alle verwendeten Primer sind unter 10.1 aufgelistet. Die PCR-Tests 1-8 zeigen verschiedene Primerkombination für die drei zu untersuchenden Cluster auf (Abbildung 10.2). Da alle Kombinationen effektiv Fragmente amplifizieren konnten, wurden aufgrund der Länge der Fragmente mit den Kombinationen 1 (Primer 1+3), 3 (Primer 4+5) und 6 (Primer 7+10) weitergearbeitet (Abbildung 10.2). Bei den 100 µl-Ansätze konnten ebenfalls Fragmente amplifiziert werden (Abbildung 10.3), aber wie die Resultate vom Nanodrop aufzeigen, variieren die Konzentrationen der amplifizierten Fragmente (Tabelle 10.1).

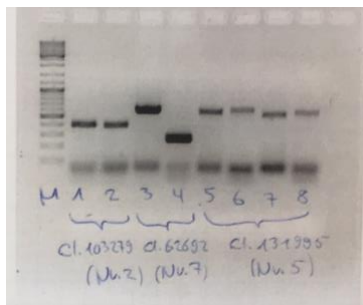


Abbildung 10.2: PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen.

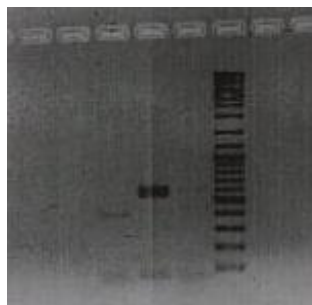


Abbildung 10.3: 100 µl PCR mit Kombinationen 1,3 und 6.

Plasmid-Probe	Konzentration [ng/μl]	260/280	260/230	Richtung des Inserts
<b>1.17</b>	508.4	1.86	2.31	CW (T7 und GSP-R)
1.1	339.6	1.87	2.25	CCW (T7 und GSP-F)
<b>2.12</b>	254.0	1.88	2.20	CW (T7 und GSP-R)
2.14	285.0	1.88	2.25	CW (T7 und GSP-R)
<b>3.2</b>	257.6	1.87	2.28	CW (T7 und GSP-R)
3.6	353.1	1.87	2.23	CW (T7 und GSP-R)
3	261.5	1.86	2.23	unbekannt
<b>6</b>	337.4	1.88	2.30	CW (T7 und GSP-R)

Tabelle 10.1: Nanodrop-Messwerte, PCR-Aufreinigung.

PCR-Probe	Konzentration [ng/μl]	260/280	260/230
Cl. 103279	48.4	1.74	1.73
Cl. 62692	134.1	1.81	2.07
Cl. 131995	34.6	1.83	1.11

Tabelle 10.2: Nanodrop-Messwerte, Plasmidisolierung

Beim Koloniecheck wurden jeweils 20 Kolonien getestet für jedes Cluster (5.1.4 Koloniecheck). Da bei Cl. 103279 und Cl. 131995 nur ein Kolonie, respektive gar keine Kolonie ein Plasmid mit einem Insert von korrekter Länge enthielt (Abbildung 10.4) wurde die Ligation und Elektroporation erneut durchgeführt (Abbildung 10.4). Schliesslich lagen von allen Clustern mindestens eine Kolonie mit Plasmid und Insert in der erwarteten Länge vor. Danach wurde die Plasmidisolierung (5.1.4 Plasmidisolierung) für folgenden Kolonien durchgeführt: 1.17, 1.1, 2.12, 2.14, 3.2, 3.6 und 3 & 6 für das Cluster Ano3 (wurde als zusätzliches Cluster in die ISH mit aufgenommen). Für sämtliche positive Kolonien wurde auch die Richtung des Inserts bestimmt (5.1.5 Sondenherstellung). Aufgrund der Richtungs- und Nanodropanalyse wurden folgende vier Plasmide für die Sondenherstellung verwendet: 1.17 (Cl. 103279), 2.12 (Cl. 62692), 3.2 (Cl. 131995) und 6 (Cl. Ano3).

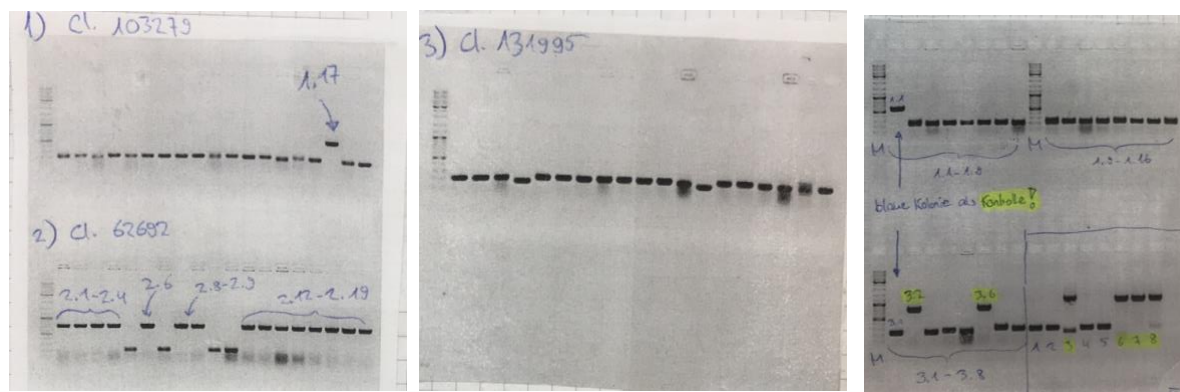


Abbildung 10.4: Koloniecheck 1. Ligation/Elektroporation (Bild 1 & 2), Koloniecheck 2. Ligation/Elektroporation (Bild 3).

Da die Richtung des Inserts bei den ausgewählten Plasmiden überall gleich war (CW), war auch der Ablauf zur Herstellung von sense/antisense-Sonden bei allen Plasmiden dieselbe (siehe Abbildung 5.3). Für sense-Sonden wurde mit T7 und GSP-R ein Fragment amplifiziert und danach mit T7-Polymerase die Sonden transkribiert und für antisense-Sonden wurde mit SP6 und GSP-F ein Fragment amplifiziert und danach mit SP6-Polymerase die Sonden transkribiert. Der Erfolg der Amplifikation (Abbildung 10.5) wurde mit einem Gel.

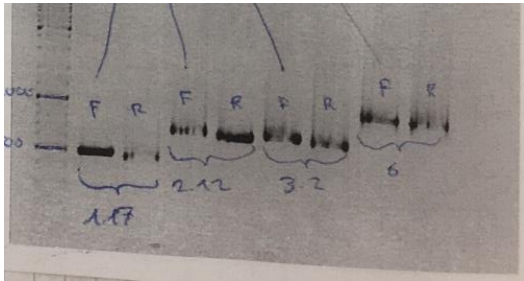


Abbildung 10.5: PCR mit Sondenvorläufern.