

Phylogenetisches Praktikum im ITZ
08.02.2010-19.02.2010

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*



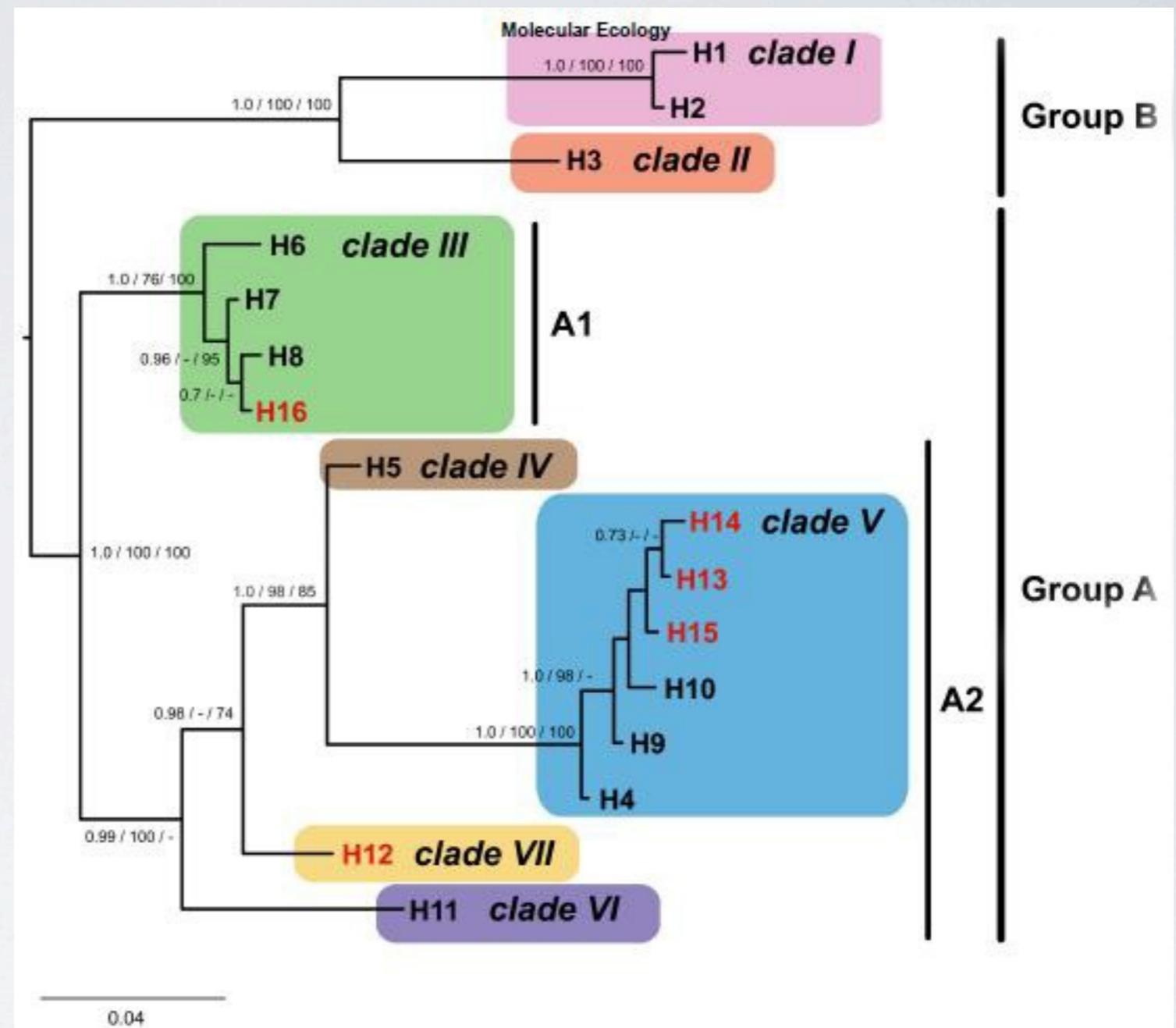
S. Sagasser

Praktikanten: Patrick Reinke und Jan Kleveman
Betreuerin: Karolin von der Chevallerie

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

I) Einleitung

- das basalste Metazoon
- nur 4 - 5 Zelltypen
- verschiedene Haplotypen
 - H1 - Grell
 - H2 - Roscoff



16S-basierender Baum, M. Eitel

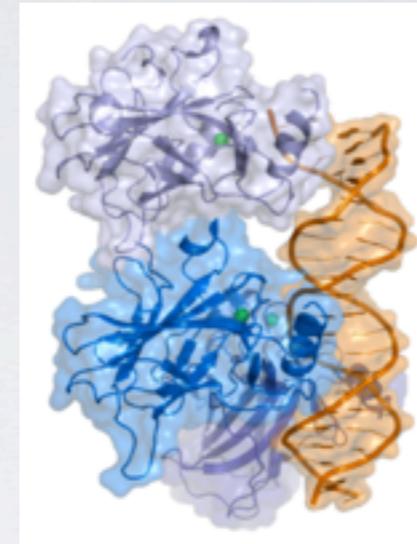
Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

2) Gene

- P53
 - Tumorsuppressorgen
 - Relevant für Apoptose
 - “bremst“ die Aktivität vieler Gene
- PCNA
 - “Klammer“ an DNA Polymerase
 - Nur in S-Phase des Zellzyklus exprimiert
 - Indikator für Zellproliferation
- SNAP25
 - SNARE-Komplex
 - Vesikel-Membran-Fusion
 - Neurosekretorischer Apparat

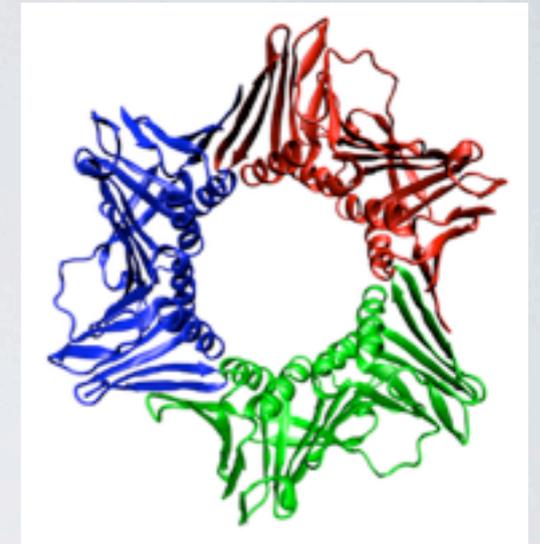
P53-Proteinstruktur

Figure: de.wikipedia.org/wiki/P53

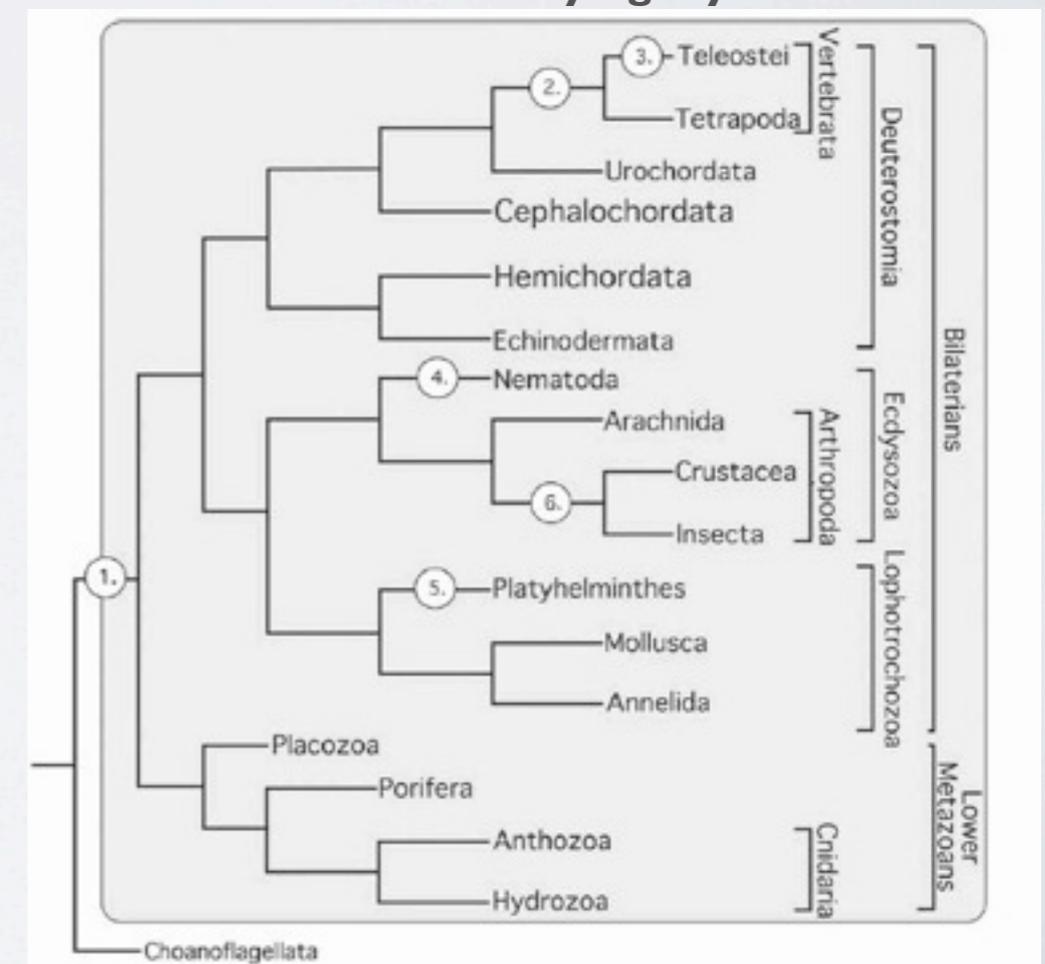


PCNA-Proteinstruktur

Figure: en.wikipedia.org/wiki/PCNA



SNARE-Phylogeny



Kloepper et al. - „SNAREing the Basis of Multicellularity“ (Mol. Biol. Evol.)

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

3) Methoden

Detailerklärung →

RNA-Isolation

DNA-Verdau

cDNA-Synthese

PCR-Check
(*Trox2*, *Actin*)

PCR-Amplifikation

Nested-PCR

Ausschneiden/
A-Tailing/
Aufreinigung

Ligation

Transformation

Bac-PCR

Cycle-Sequencing

← Detailerklärung

Jan

Patrick

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

- je Haplotyp ca. 100 Tiere

- Nukleinsäureisolation → 0.8% Gel (Check)

- DNA Verdau mit DNase (spätere PCRs sollen ausschließlich exprimierte Gene amplifizieren)

- cDNA Synthese → **im Detail**

- PCR-Kontrolle: cDNA wird mit bekannten, funktionierenden und intronübergreifenden Primern für *Trox-2* und *Aktin* amplifiziert und auf 1.2 % Gel aufgetragen

RNA-Isolation

DNA-Verdau

cDNA-Synthese

PCR-Check
(*Trox2*, *Actin*)

PCR-Amplifikation

Nested-PCR

Ausschneiden/
A-Tailing/
Aufreinigung

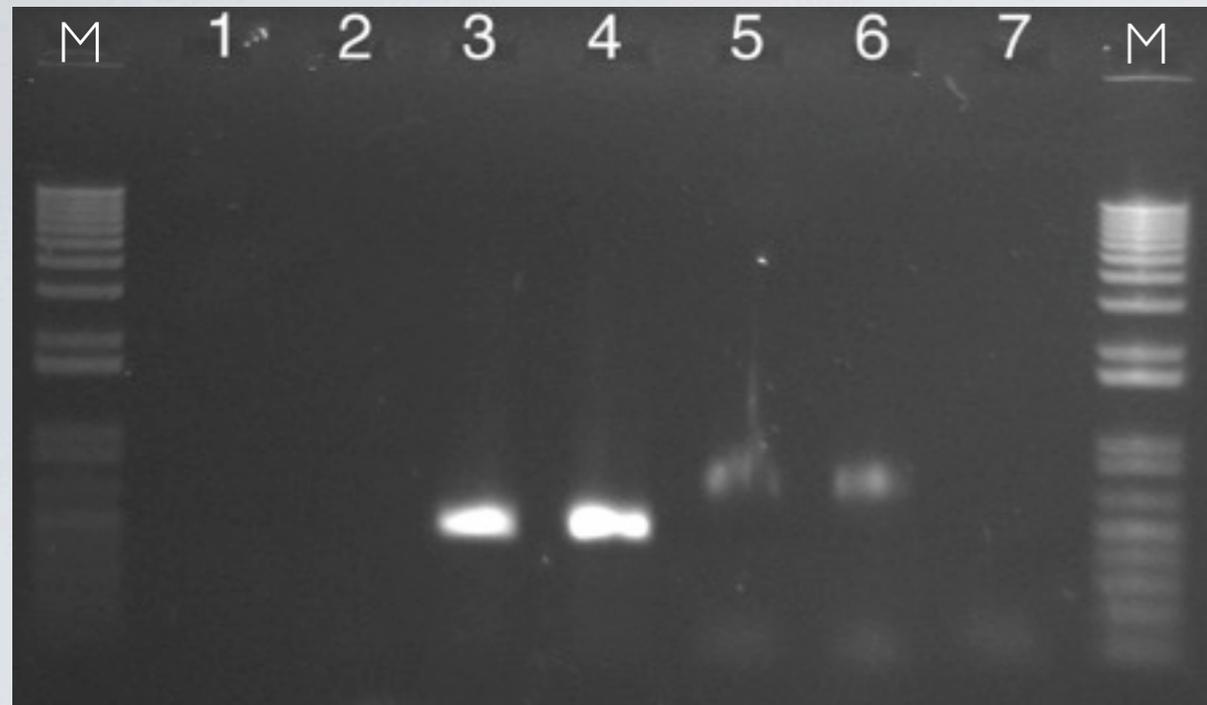
Ligation

Transformation

Bac-PCR

Cycle-Sequencing

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*



1: cDNA H1 1:1 - Aktin
2: cDNA H1 1:100 - Aktin
3: cDNA H2 1:1 - Aktin
4: cDNA H2 1:100 - Aktin
5: gDNA H2 1:100 - Aktin
6: gDNA H2 1:100 - Aktin
7: Negativkontrolle
M: Marker 1 KB

- PCR: Amplifikation von *p53*, *PCNA* und *SNAP25* mit H2 2.2 und H1 Karo, H1 8.1 verworfen

- Aufreinigung mit NaAc und EtOH bei -80°C

RNA-Isolation

DNA-Verdau

cDNA-Synthese

PCR-Check
(*Trox2*, *Actin*)

PCR-Amplifikation

Nested-PCR

Ausschneiden/
A-Tailing/
Aufreinigung

Ligation

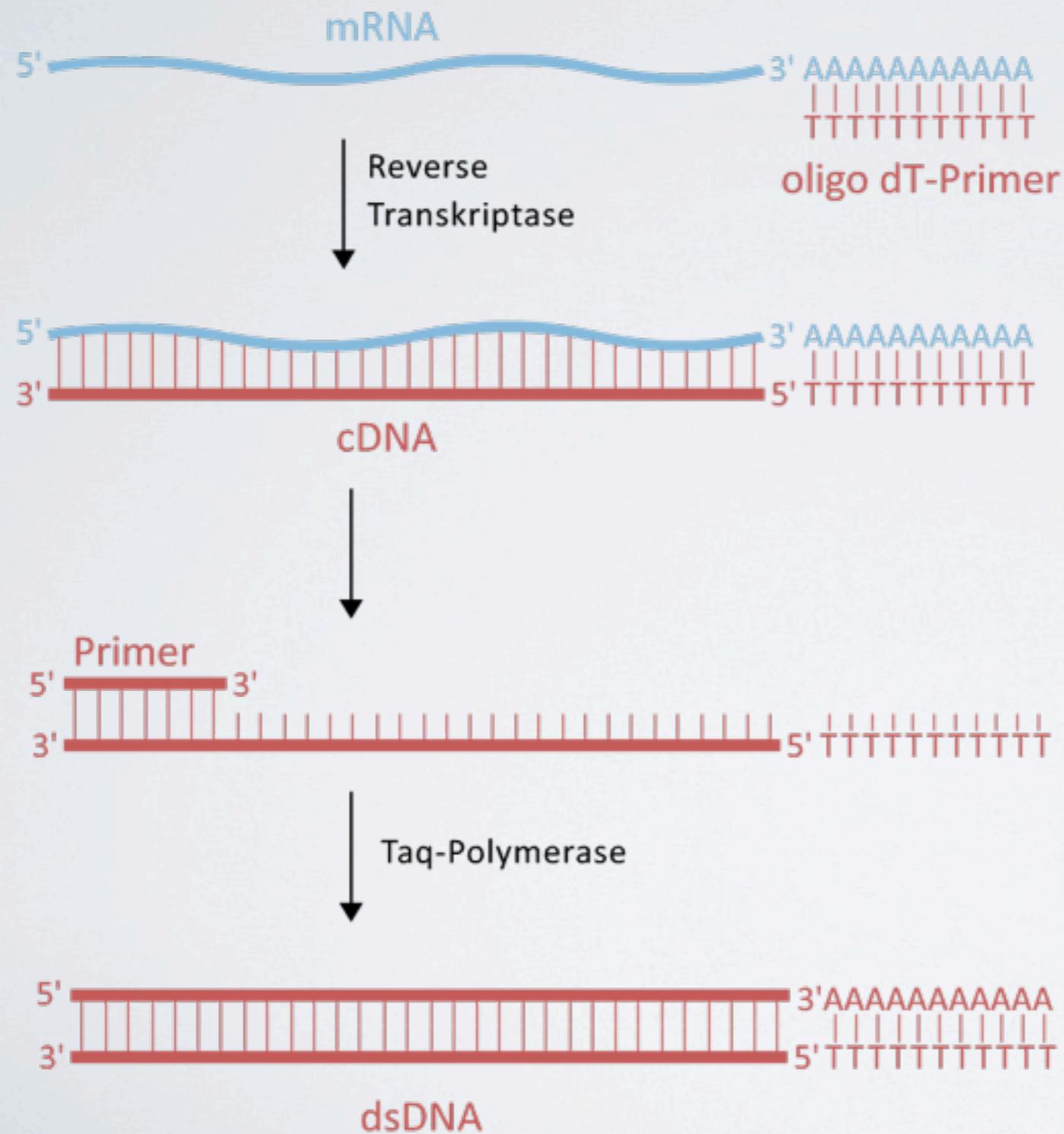
Transformation

Bac-PCR

Cycle-Sequencing

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

3) Methoden: cDNA-Synthese



RNA-Isolation

DNA-Verdau

cDNA-Synthese

PCR-Check
(TroX2, Actin)

PCR-Amplifikation

Nested-PCR

Ausschneiden/
A-Tailing/
Aufreinigung

Ligation

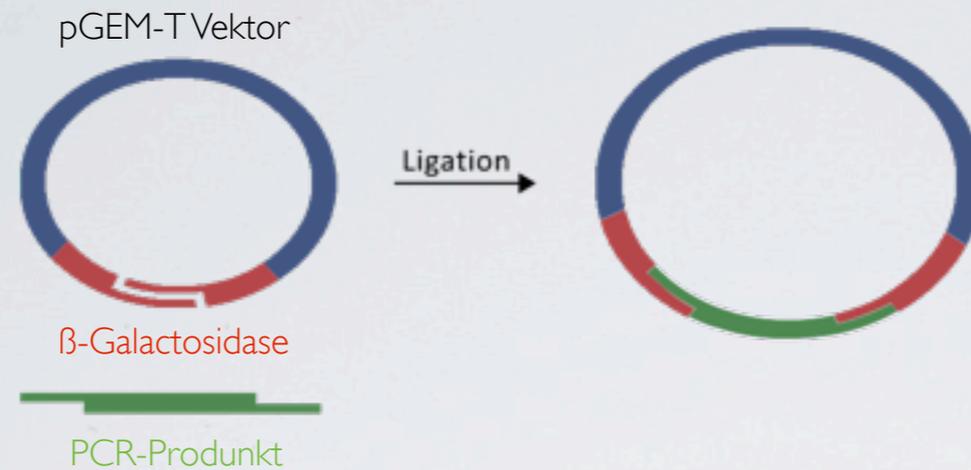
Transformation

Bac-PCR

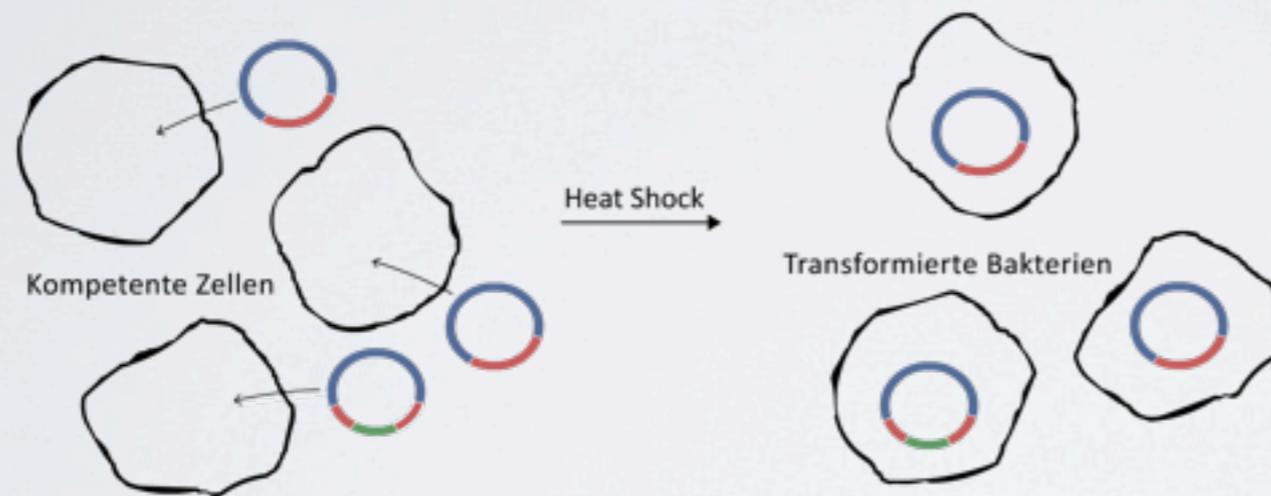
Cycle-Sequencing

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

Ligation:

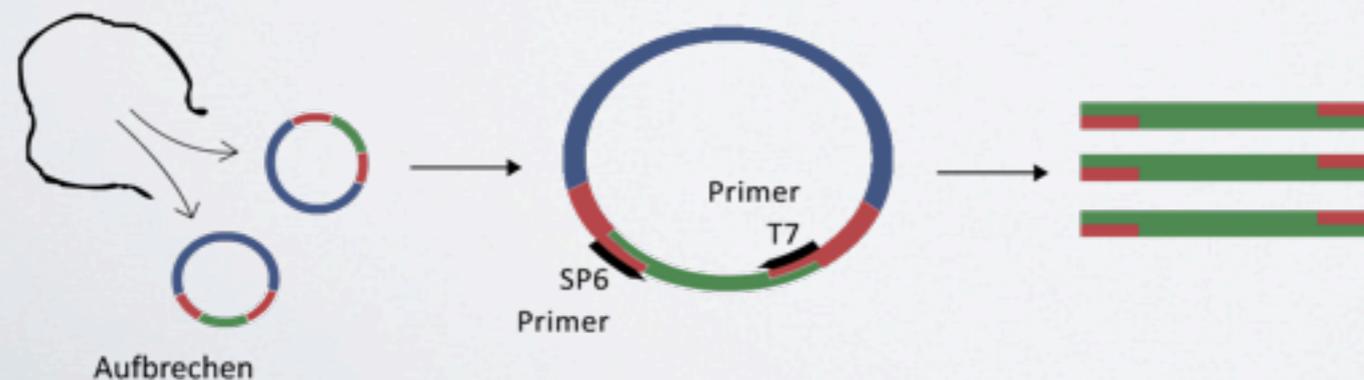


Transformation:



für Blau-weiß-Screening xGal als Zusatz

Bac-PCR:



RNA-Isolation

DNA-Verdau

cDNA-Synthese

PCR-Check
(*Trox2, Actin*)

PCR-Amplifikation

Nested-PCR

Ausschneiden/
A-Tailing/
Aufreinigung

Ligation

Transformation

Bac-PCR

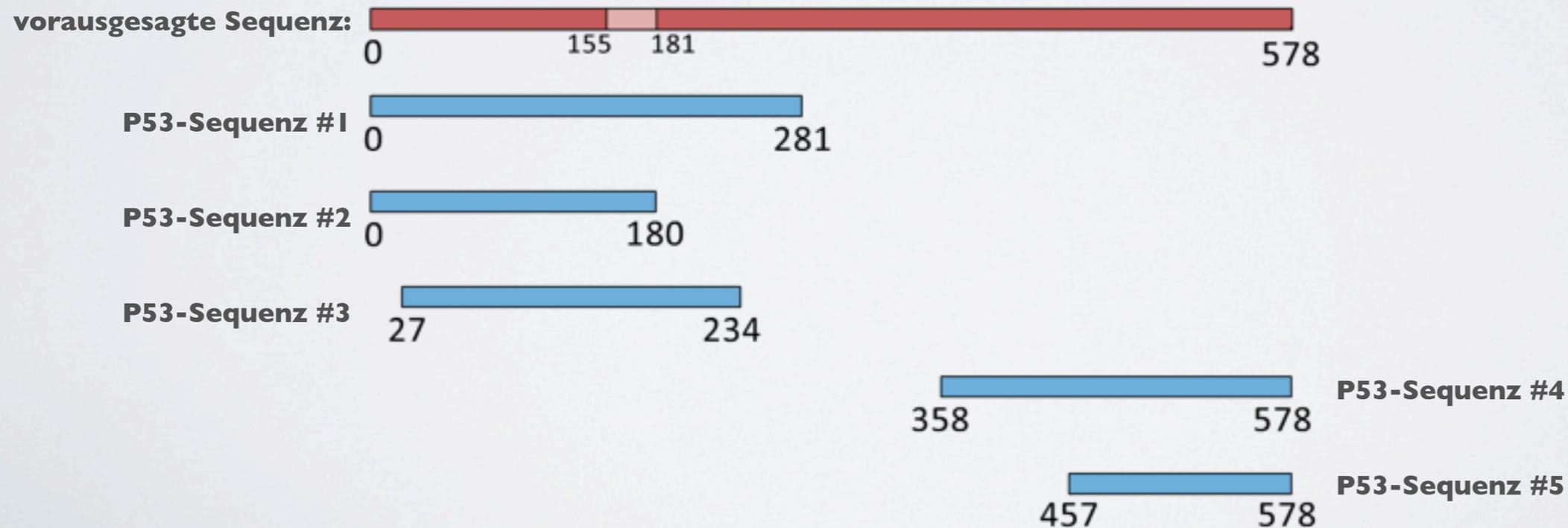
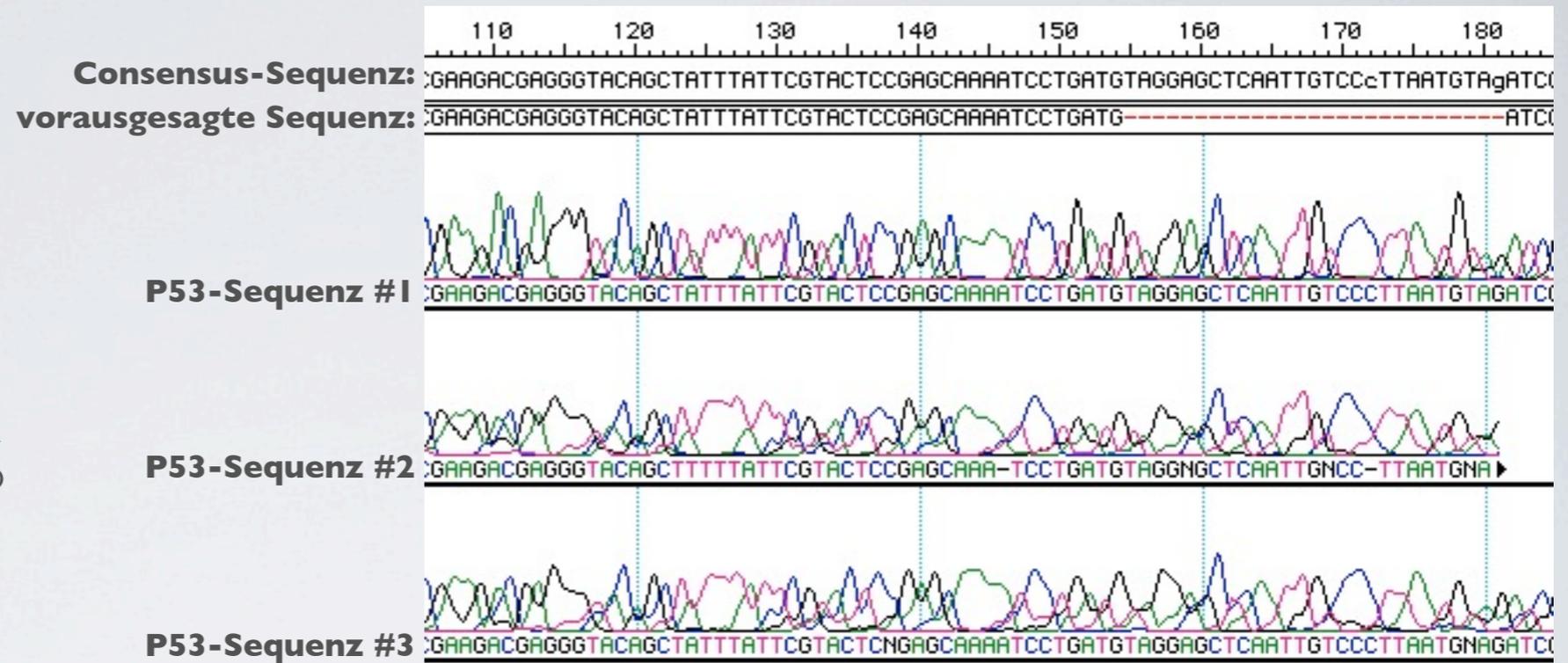
Cycle-Sequencing

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

4) Ergebnisse

P53

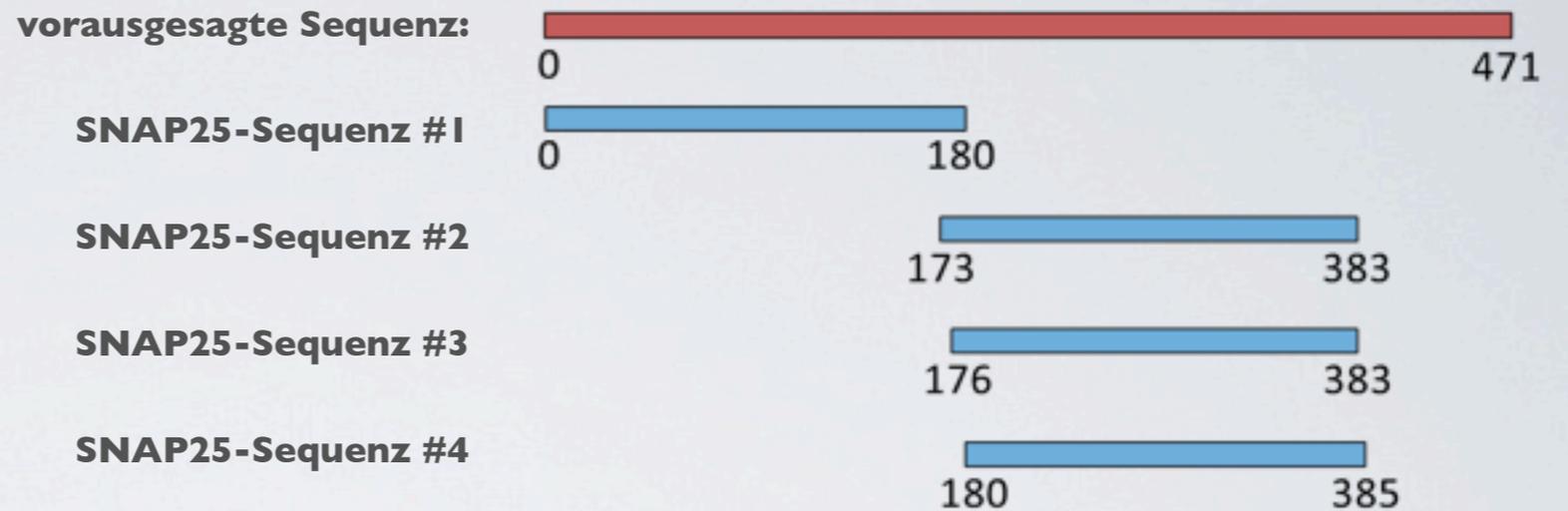
- Übereinstimmung der
Consensus-Sequenz 98%



Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

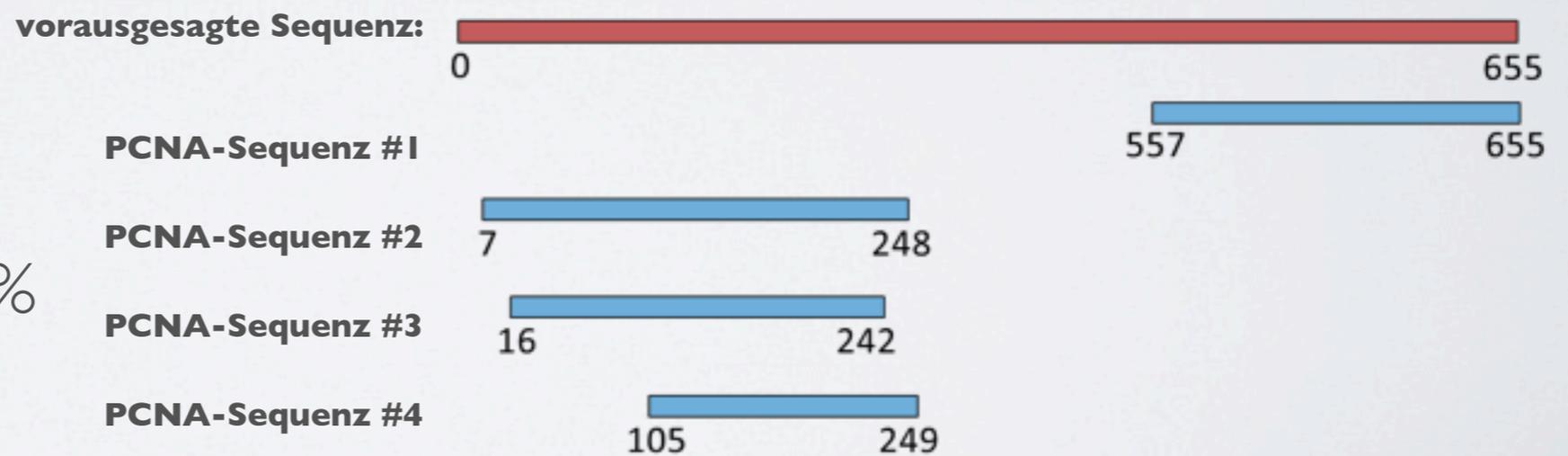
SNAP25

- Übereinstimmung der Consensus- mit der vorausgesagten Sequenz 96%



PCNA

- Übereinstimmung der Consensus- mit der vorausgesagten Sequenz 99%



5) Diskussion

Fehlerdiskussion: Warum nur kurze Fragmente bei der Sequenzierung?

- nicht sauber genug gearbeitet
- zu viel DNA
- Sequenziermaschine

Weiteres Vorgehen: Expressionsstudien

- RNA-Interferenz
- *In situ*-Hybridisierung
- Antikörpermarkierung
- qPCR

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*
