

Phylogenetisches Praktikum im ITZ  
08.02.2010-19.02.2010

Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*



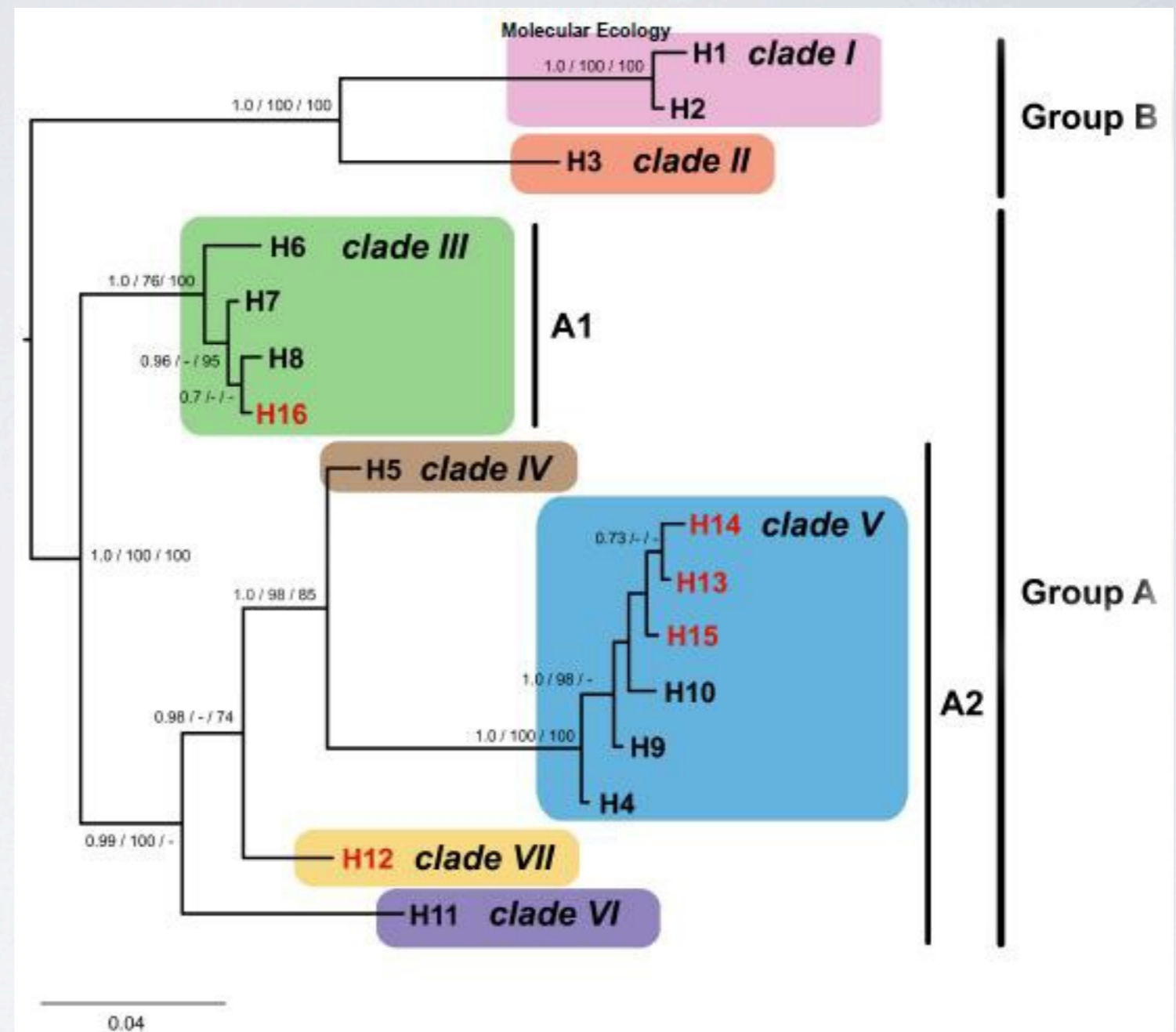
S. Sagasser

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

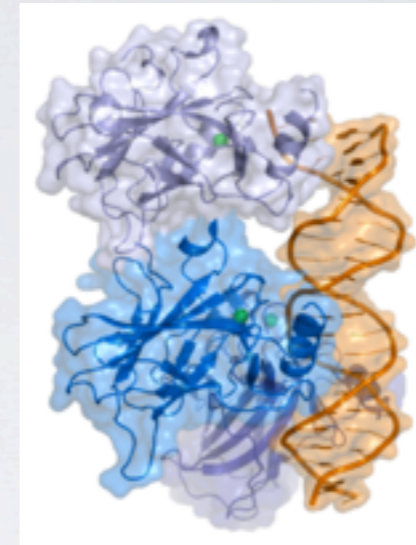
# Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

## 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](http://de.wikipedia.org/wiki/P53)

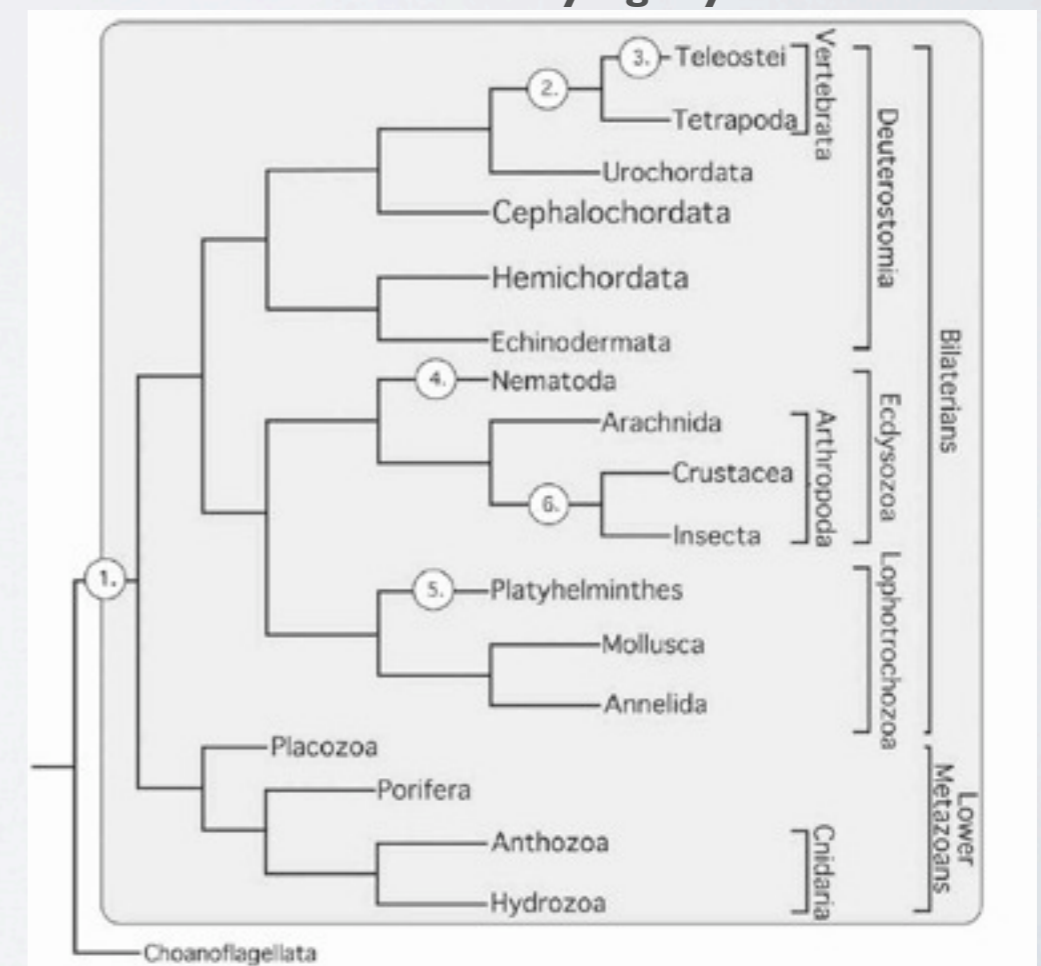


### PCNA-Proteinstruktur

Figure: [en.wikipedia.org/wiki/PCNA](http://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

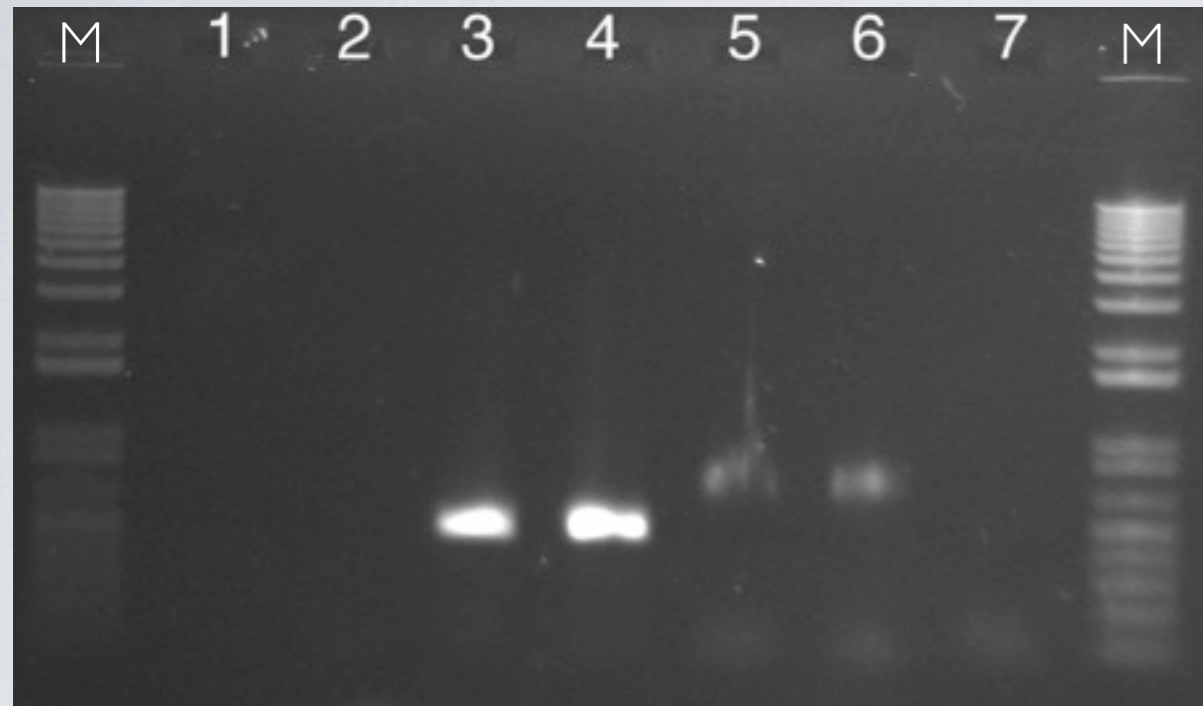
Ligation

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

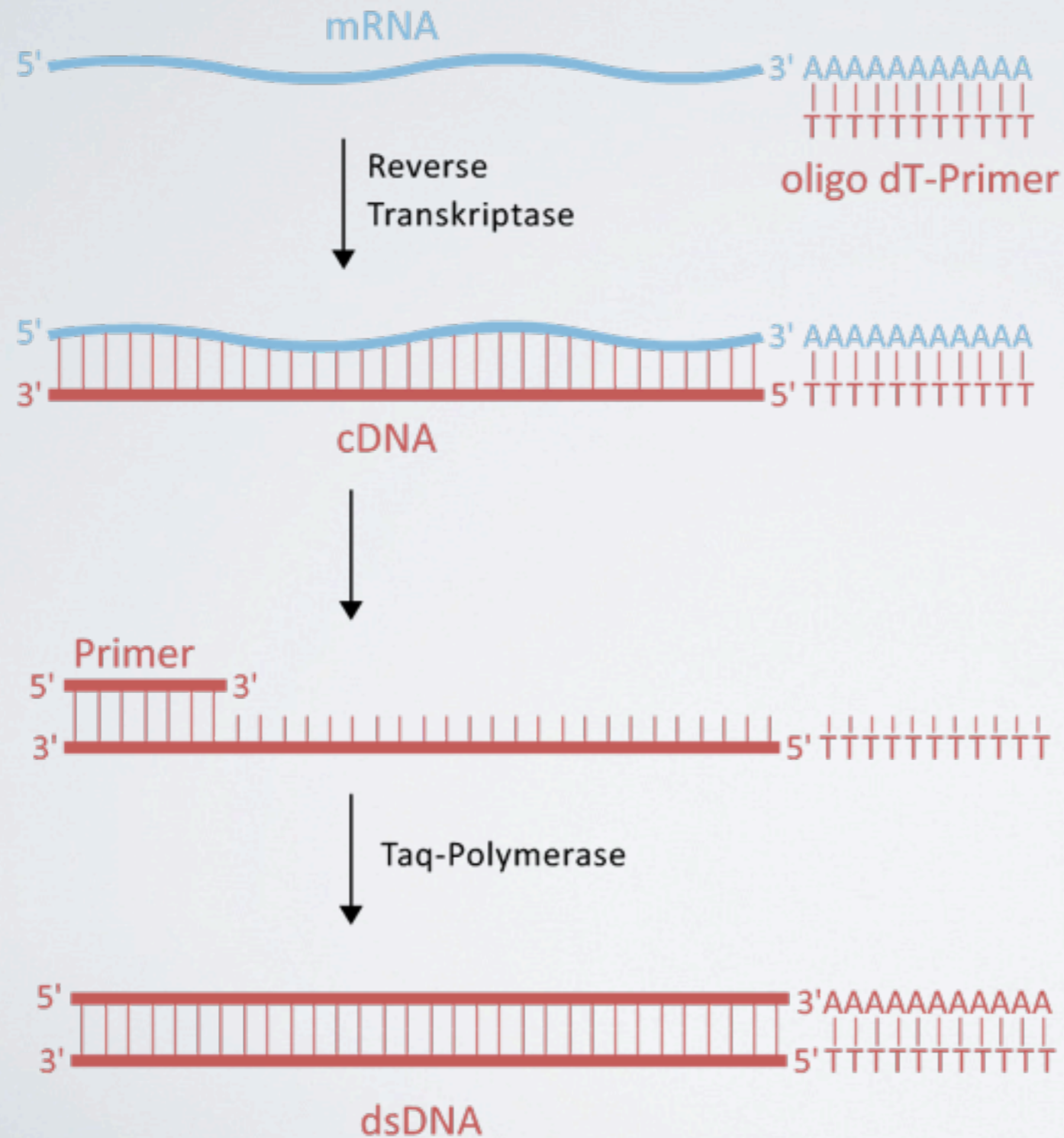
Transformation

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

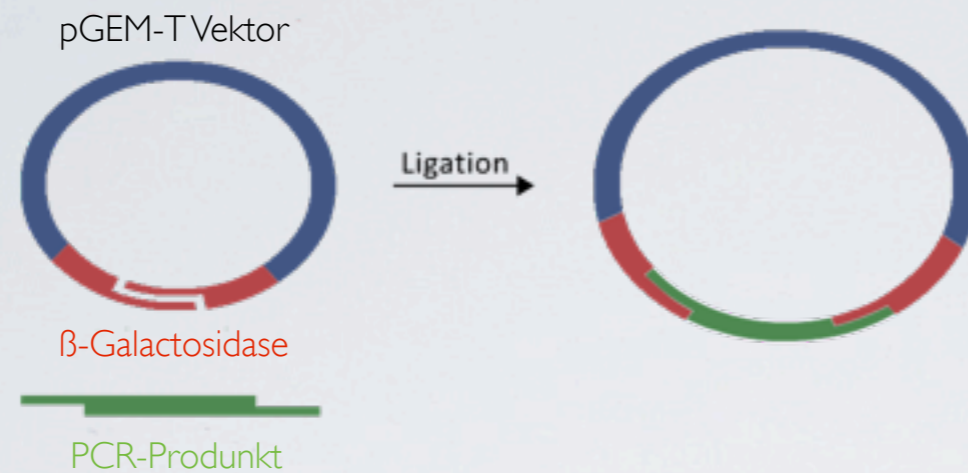
Transformation

Bac-PCR

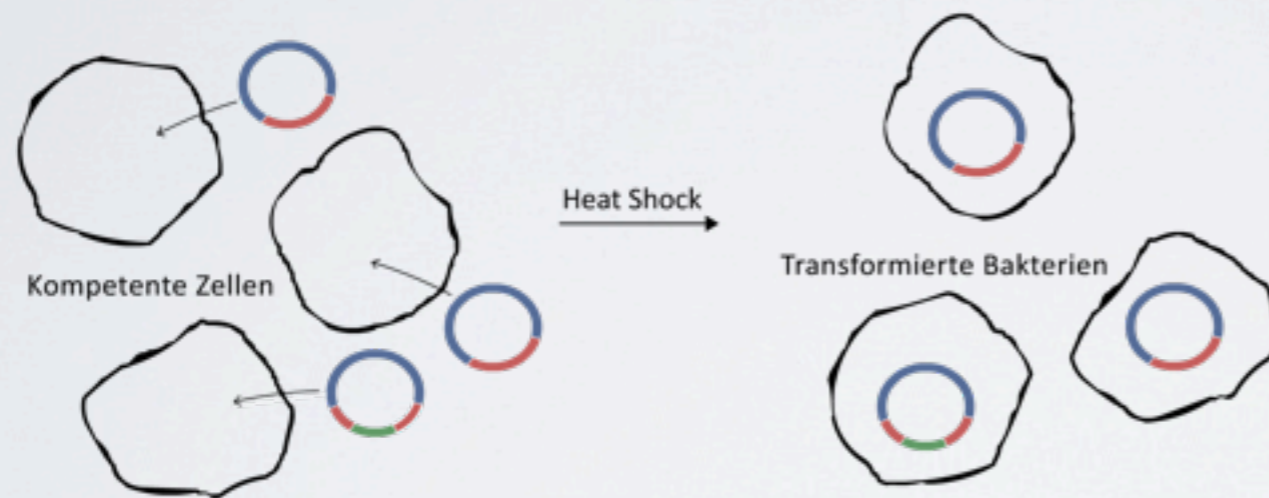
Cycle-Sequencing

# Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

Ligation:

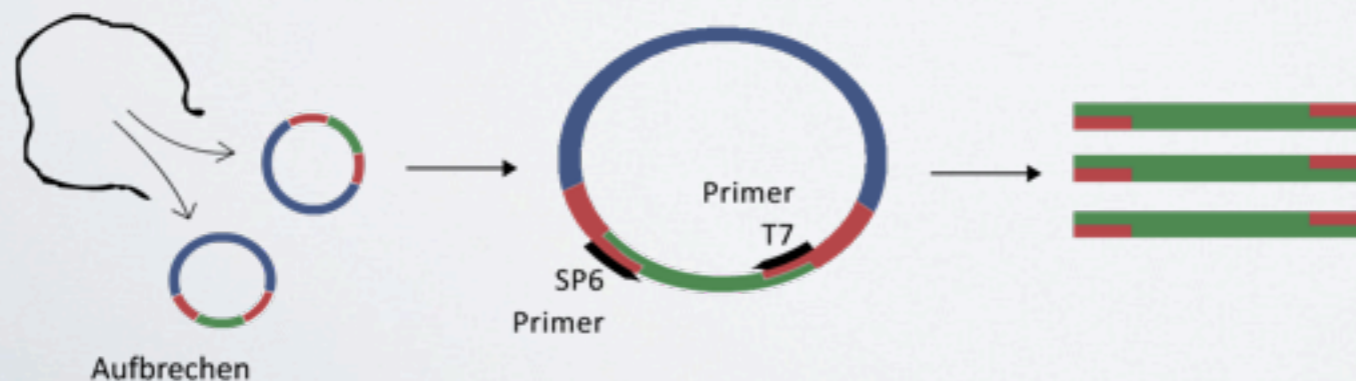


Transformation:



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

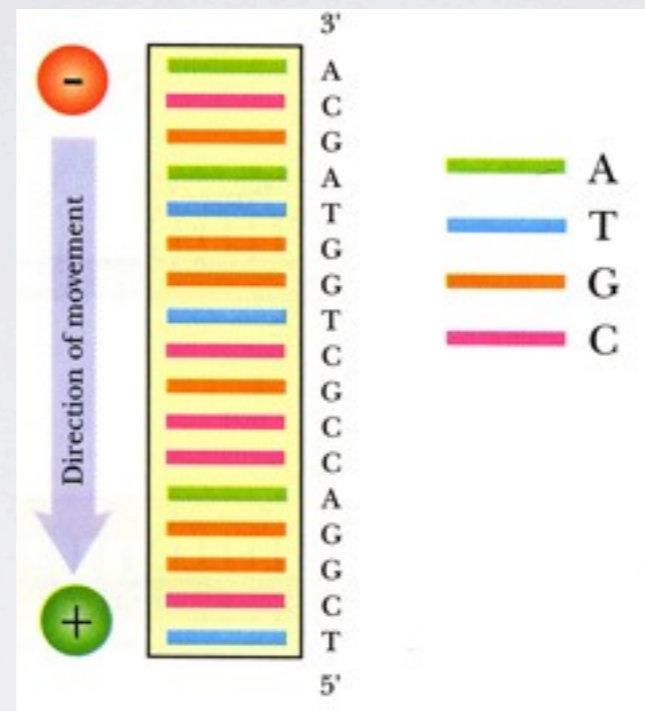
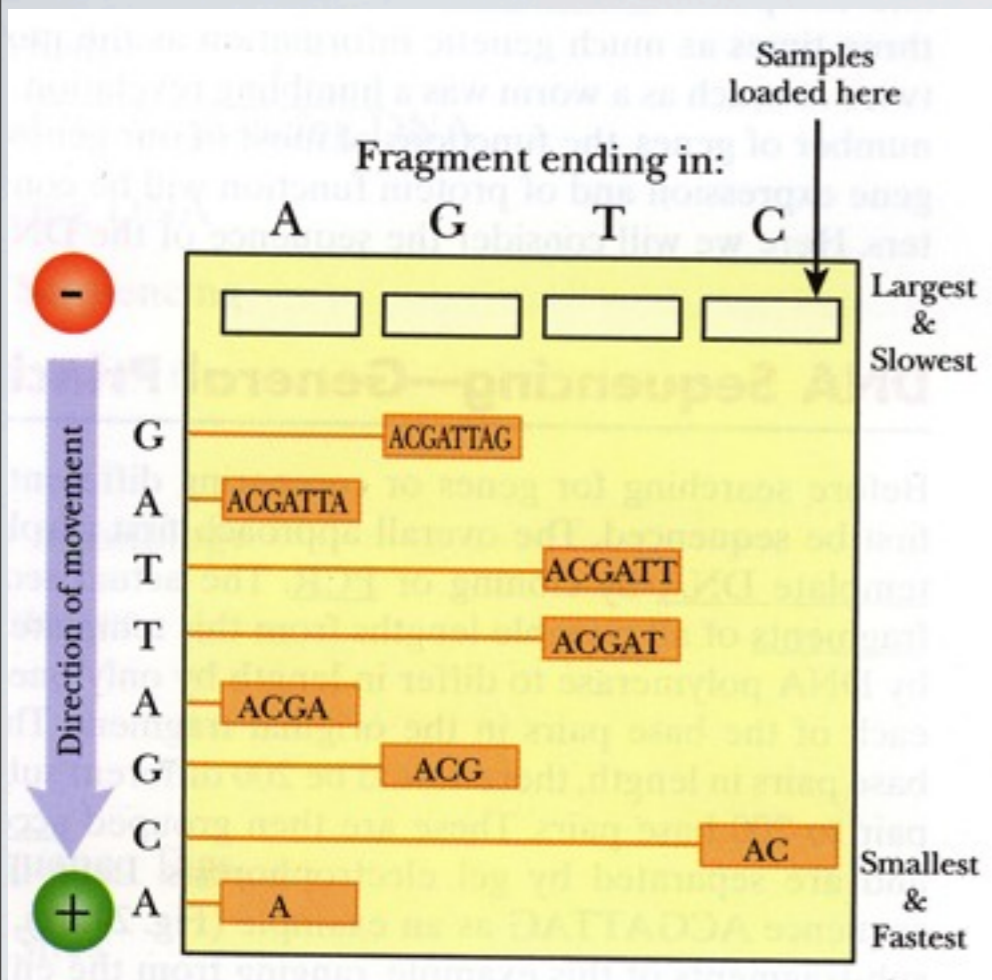
Bac-PCR

Cycle-Sequencing



# Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

## 3) Methoden: Cycle-Sequenzierung



Figures: Clark - Molecular Biology; © Elsevier 2006

Sequenzierung nach Sanger

Fluoreszenz markierte ddNTPs

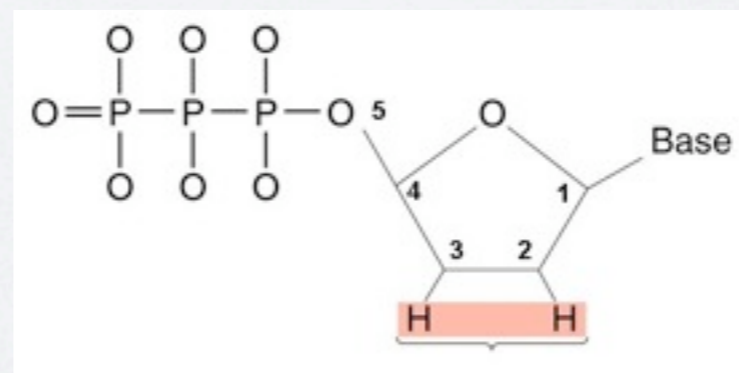


Figure © 2000 by Griffiths *et al.*

RNA-Isolation

DNA-Verdau

cDNA-Synthese

PCR-Check  
(*Trox2, Actin*)

PCR-Amplifikation

Nested-PCR

Ausschneiden/  
A-Tailing/  
Aufreinigung

Ligation

Transformation

Bac-PCR

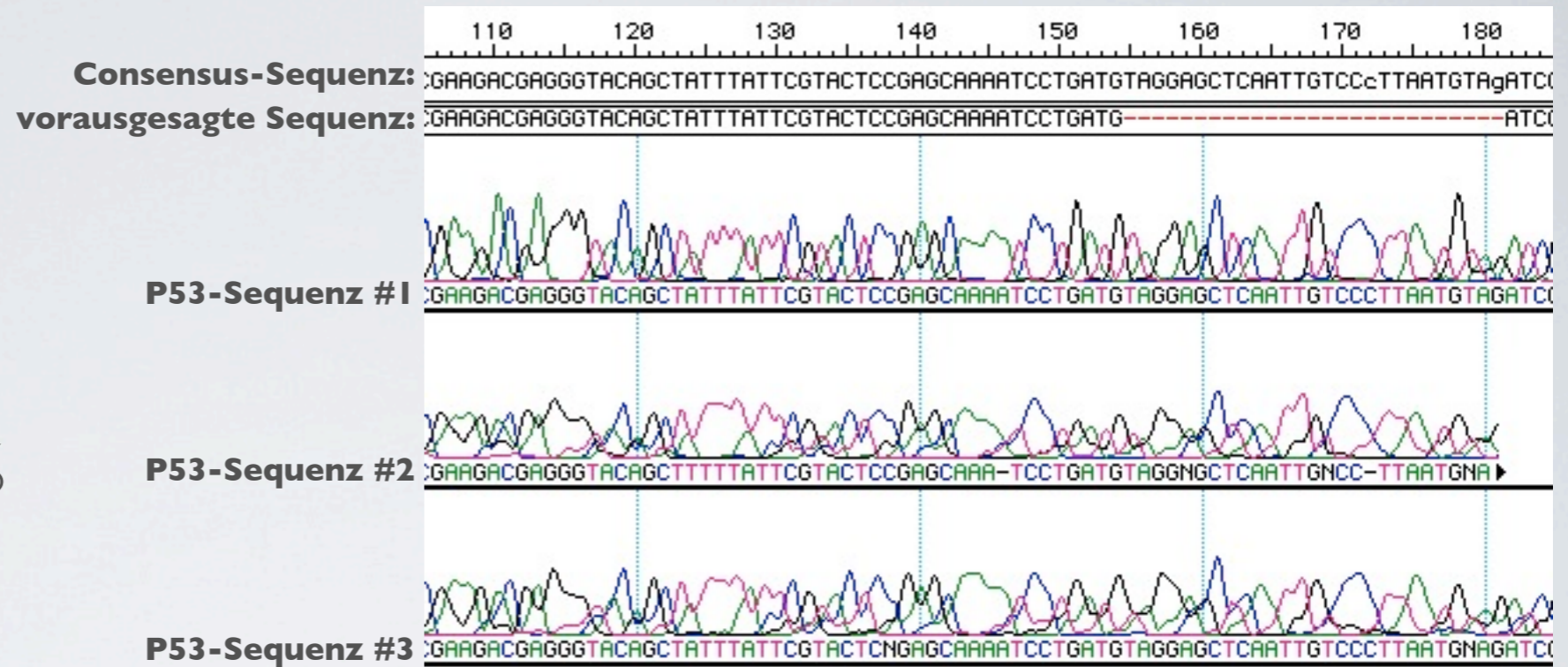
Cycle-Sequencing

# Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

## 4) Ergebnisse

### P53

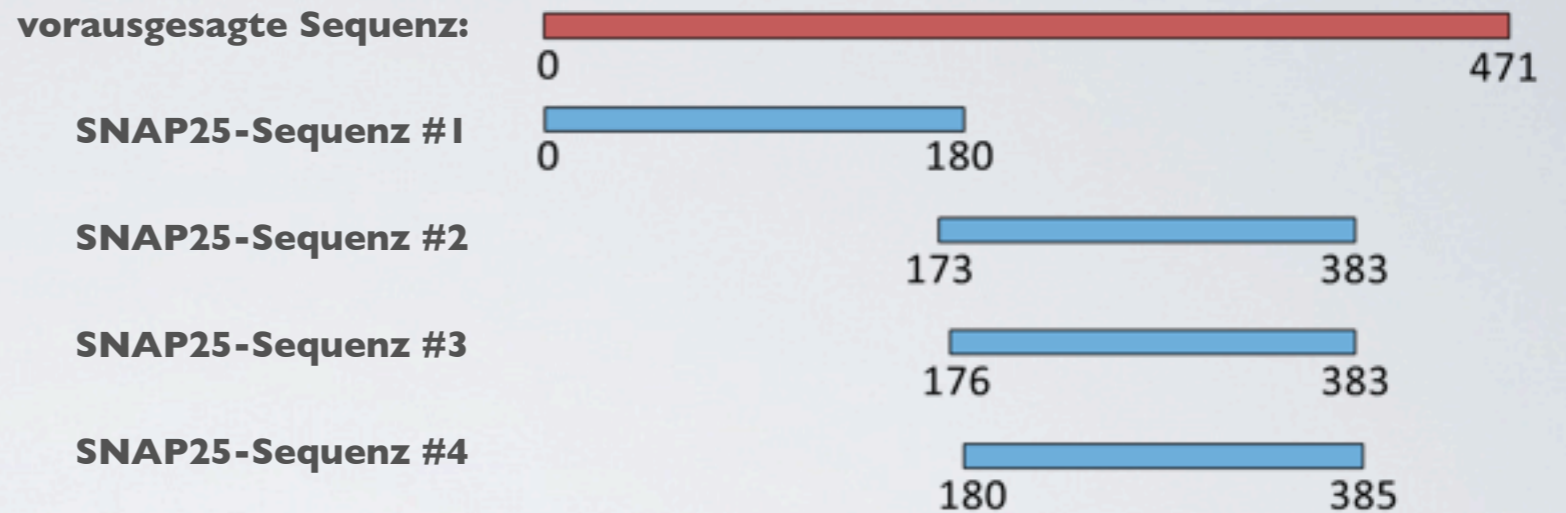
- Übereinstimmung der  
Consensus-Sequenz 98%



# Zellzyklus- und neuronale Gene in *Trichoplax adhaerens*

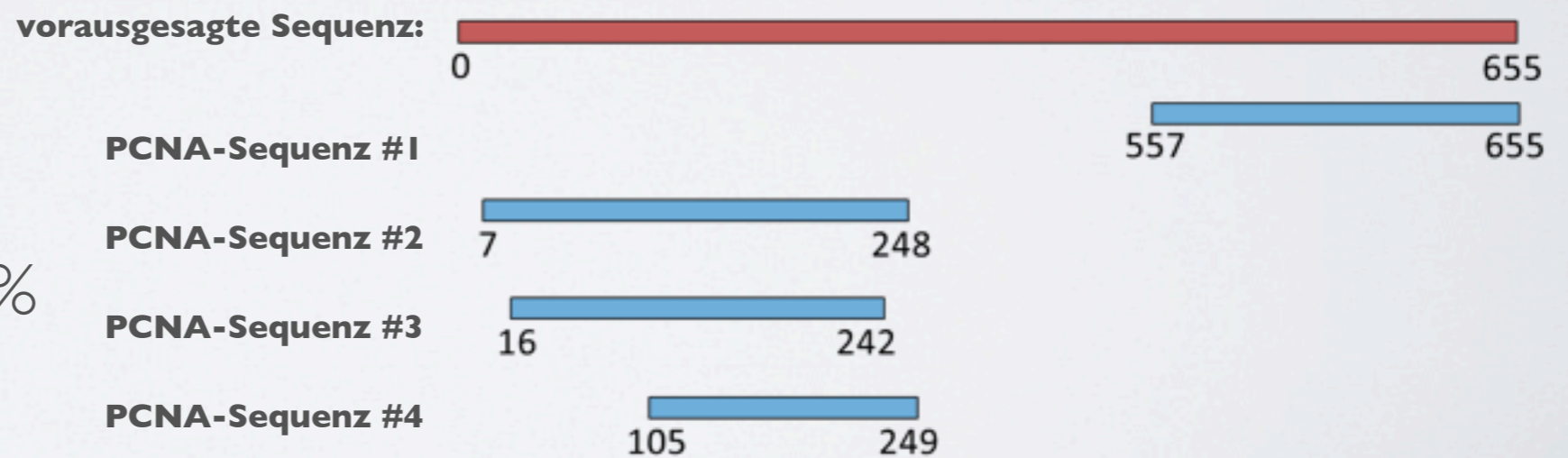
## SNAP25

- 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*

---