

Sarah Aurora Heß

**Analyse des Transkriptoms mutanter
Drosophila melanogaster Stämme des Gens
DmX**

Diplomarbeit

BEI GRIN MACHT SICH IHR WISSEN BEZAHLT



- Wir veröffentlichen Ihre Hausarbeit, Bachelor- und Masterarbeit
- Ihr eigenes eBook und Buch - weltweit in allen wichtigen Shops
- Verdienen Sie an jedem Verkauf

Jetzt bei www.GRIN.com hochladen
und kostenlos publizieren



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Impressum:

Copyright © 2012 GRIN Verlag
ISBN: 9783668938564

Dieses Buch bei GRIN:

<https://www.grin.com/document/464066>

Sarah Aurora Heß

Analyse des Transkriptoms mutanter *Drosophila melanogaster* Stämme des Gens DmX

GRIN - Your knowledge has value

Der GRIN Verlag publiziert seit 1998 wissenschaftliche Arbeiten von Studenten, Hochschullehrern und anderen Akademikern als eBook und gedrucktes Buch. Die Verlagswebsite www.grin.com ist die ideale Plattform zur Veröffentlichung von Hausarbeiten, Abschlussarbeiten, wissenschaftlichen Aufsätzen, Dissertationen und Fachbüchern.

Besuchen Sie uns im Internet:

<http://www.grin.com/>

<http://www.facebook.com/grincom>

http://www.twitter.com/grin_com

Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Fachbereich Biologie

Analyse des Transkriptoms mutanter *Drosophila melanogaster* Stämme des Gens *DmX*

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades: Diplom-Biologin

vorgelegt von

Sarah Heß

Mainz, Mai 2012

Institut für Molekulargenetik, gentechnologische
Sicherheitsforschung und Beratung

*Nothing has such power to broaden the mind as the ability to investigate systematically and truly
all that comes under thy observation in life.*

Marcus Aurelius

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i> (Taufliege).....	1
1.2 Das konservierte Gen <i>DmX</i> kodiert für ein WD-Repeat-Protein.....	2
1.2.1 Aufbau und Lokalisation des Gens <i>DmX</i>	2
1.2.2 Erzeugung <i>DmX</i> -mutanter <i>Drosophila</i> -Stämme	3
1.2.3 Die WD-Wiederholungseinheiten: eine einheitliche Architektur für diverse Funktionen	3
1.2.4 Das WD-Repeat-Protein DMX.....	4
1.2.5 DMX könnte in der Zellmembran eingelagert sein	5
1.2.6 Ist <i>DmX</i> ein maternales Effektgen?	5
1.2.7 Ist DMX am vesikulären Transport beteiligt?	7
1.3 Die Sequenzierung der nächsten Generation erweitert die Analyse kompletter Genome und Transkriptome.....	10
1.3.1 Methoden der Sequenzierung der nächsten Generation (NGS).....	10
1.3.2 Genexpressionsanalysen mittels <i>RNA-Seq</i>	11
1.3.3 Die Illumina (Solexa)-Technologie.....	11
1.4 Zielsetzung.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 Kreuzungen von <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.1.1 Fliegenhaltung.....	13
2.1.2 Fliegenkreuzungen.....	13
2.1.3 Umbalancierung des <i>DmX</i> -mutierten X-Chromosoms	13
2.1.4 Absammeln von Larven zur Gewinnung des Rohmaterials.....	14
2.2 Molekulargenetische Methoden.....	15
2.2.1 Primer-Design	15
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.3 Isolierung von Total-RNA.....	17
2.2.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA.....	18
2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	18
2.2.6 Gewinnung der DNA aus Agarose-Gelen	18
2.2.7 Exonuklease I/Alkalische Phosphatase- (Exo/SAP-) Behandlung	19
2.2.8 DNA-Sequenzierung	19
2.2.9 Auswertung der Sequenzdaten	19

2.2.10	Herstellung einer cDNA-Bibliothek für die Sequenzierung der nächsten Generation und Erstellung der Cluster	19
2.2.11	Illumina-Sequenzierung	20
2.3	Bioinformatische Methoden	20
2.3.1	Auswertung der Rohdaten.....	20
2.3.2	Zusammenstellung der Referenz-Genoms	22
2.3.3	Entfernung repetitiver Elemente aus den Sequenzdaten	22
2.3.4	Kartierung/ <i>Mapping</i> der Transkriptomdaten an Referenz-Sequenzen.....	22
2.3.5	Identifizierung putativer Exons und SNPs	23
2.3.6	Generierung von Listen differenziell exprimierter Gene und Transkriptvarianten der Expressionsanalyse.....	23
2.3.7	SVERWEIS-Formeln.....	24
2.3.8	Darstellungen differenzieller Genexpression mittels statistischer Analysen.....	25
2.3.9	Funktionelle Annotation.....	26
2.3.10	BLAST.....	26
2.4	Lösungen und Puffer	27
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Umbalancierung des <i>DmX</i> -mutierten X-Chromosoms	28
3.1.1	Geschlechter-Test.....	28
3.1.2	Referenzstamm.....	28
3.1.3	Kreuzungsergebnisse der Umbalancierung von <i>DmX</i>	29
3.1.4	Komplementationstest	32
3.2	Genotypische Untersuchung der Nachfolgegenerationen	32
3.3	<i>RNA-Seq</i>	34
3.3.1	Isolierung und Quantifizierung der Total-RNA.....	34
3.3.2	Überblick über die verwendete Auswertungsstrategie (<i>Pipeline</i>) der <i>RNA-Seq</i>	35
3.3.3	Zusammenstellung der Referenz-Genoms	37
3.3.4	<i>Trimming</i> und Analyse der RNA-Sequenzdaten.....	38
3.3.5	Kartierung der RNA-Sequenzdaten	41
3.4	Analyse des Gens <i>DmX</i> auf die erwartete Punktmutation	43
3.5	Identifizierung differenzieller Genexpression.....	44
3.5.1	Der RPKM-Wert.....	44
3.5.2	Hierarchisches <i>Clustern</i> der Datensätze durch <i>Heat Maps</i>	45
3.5.3	Der Fold Change-Wert.....	47
3.5.4	Der R_j -Wert ist ein Maß für signifikant differenziell exprimierte Gene	47
3.6	Transkriptomischer Vergleich von <i>DmX</i> -mutanten Stämmen zum Hintergrundstamm <i>ywf</i>	49
3.6.1	Analyse des <i>DmX</i> -Gens	49

3.6.2	Erstellung von Listen differenziell exprimierter Gene und Transkripte mittels des R _j -Werts	50
3.6.3	Ausschluss nicht-proteinkodierender Gene	50
3.6.4	Analyse der differenziell exprimierten Gene und Transkript-varianten.....	51
3.6.5	Funktionelle Annotation mit Hilfe von DAVID und GOEAST Gene Ontology	52
3.6.6	Erweiterte Analyse mit Hilfe der Gen Ontologie.....	56
3.6.7	Analyse der differenziell regulierten Gene in KEGG Pathway	57
3.6.8	Analyse der 50 am stärksten differenziell exprimierten Gene und Transkriptvarianten	60
3.6.9	Ergänzende Untersuchung mit Ausschluss repetitive Elemente.....	63
4	DISKUSSION	67
4.1	Umbalancierung und genotypische Untersuchung von <i>DmX</i> -mutanten Fliegen	67
4.2	RNA-Isolierung, -Aufarbeitung und Sequenzierung	67
4.3	<i>Trimming</i> und Kartierung der RNA-Sequenzdaten	69
4.4	Bewertung der Expressionsanalyse	71
4.5	Handelt es sich bei <i>DmX</i> um ein maternales Effektgen?.....	73
4.6	Expressionsanalyse des Gens <i>DmX</i>	73
4.7	Transkriptomischer Vergleich von <i>DmX</i> -mutanten Stämmen zum Hintergrundstamm <i>ywf</i>	74
4.7.1	Der Phosphatidylinositol-Metabolismus ist in <i>DmX</i> -Mutanten hoch-reguliert	74
4.7.2	Vermutlich ist DMX an endozytotischen Prozessen beteiligt	76
4.7.3	DMX könnte in der Regulation der terminalen Schritte der Exozytose beteiligt sein	81
4.7.4	Die Endo- und Exozytose bedingen sich gegenseitig.....	84
4.7.5	Apoptose.....	86
4.7.6	Notch und die V-ATPase	87
4.7.7	Einige Komponenten des Wnt-Signalwegs sind in <i>DmX</i> -mutanten Tieren hoch-reguliert.....	89
4.7.8	Die <i>DmX</i> -Mutation beeinflusst die Genexpression.....	91
4.7.9	Die Replikation wird von <i>DmX</i> beeinflusst.....	92
4.7.10	Nervensystem und Muskeln	92
4.7.11	Die <i>DmX</i> -Mutation wirkt sich auf die Zellatmung aus	93
4.7.12	Induktion von Stressantworten	99
4.8	Fazit: <i>DmX</i> -mutante Tiere scheinen zu verhungern	100
5	ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK	102
	ANHANG	104
5.1	Elektronischer Anhang.....	104
5.2	Verwendete Programme und Internetseiten	105
	LITERATURVERZEICHNIS	106
	DANKSAGUNG	119

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Organisation des Gens <i>DmX</i> bei <i>D. melanogaster</i>	2
Abbildung 1.2: Lokalisierung der vier eingeführten Punktmutationen im Gen <i>DmX</i>	3
Abbildung 1.3: Darstellung eines WD-Repeat-Propellers und der Organisation der WD-Repeat-Motive und potentieller Transmembrandomänen in DMX	5
Abbildung 1.4: Lokalisierung von <i>DmX</i> -mRNA und DMX-Protein in Eikammern und Eizellen von <i>D. melanogaster</i>	6
Abbildung 1.5: Übersicht über den vesikulären Transport und den Zusammenhang mit dem Zyklus der Rab-Proteine.....	8
Abbildung 3.1: Kreuzungsschema des Geschlechter-Tests	28
Abbildung 3.2: Kreuzungsschema um männlichen Larven des Referenzstamms <i>ywf</i> zu erhalten.	29
Abbildung 3.3: Vergleich der FM7c-GFP-getriebenen Fluoreszenz zu FM7a-YFP	30
Abbildung 3.4: Kreuzungsschema der Umbalancierung	31
Abbildung 3.5: Kreuzungsschema des Komplementationstests	32
Abbildung 3.6: Überprüfung der <i>DmX</i> -Mutation durch PCR.....	32
Abbildung 3.7: Darstellung der identifizierten Punktmutationen der Allele <i>DmX</i> ₆₅₄ (A), <i>DmX</i> ₁₁₀₂ (B), <i>DmX</i> ₂₁₀ (C) und <i>DmX</i> ₇₃₉ (D)	33
Abbildung 3.8: Quantifizierung der Total-RNA nach Isolierung aus <i>Drosophila</i> Larven.....	34
Abbildung 3.9: Übersicht über die angewandte <i>Pipeline</i> zur Auswertung der RNA-Sequenzdaten.	36
Abbildung 3.10: Qualitätswerte pro Base.	39
Abbildung 3.11: Graphische Darstellung der stringenten Kartierung der RNA-Sequenzdaten an das Referenz-Genom.....	42
Abbildung 3.12: Übersicht über die Kartierung der Sequenzen an das Gen <i>DmX</i>	43
Abbildung 3.13: Lage und Art der Punktmutationen vom <i>DmX</i>	44
Abbildung 3.14: Anhand der zehn Datensätze erstellte <i>Heat Map</i>	45
Abbildung 3.15: Darstellung der hierarchischen <i>Cluster</i> als <i>Heat Maps</i>	46
Abbildung 3.16: Berechnung des R _j -Werts anhand des Gens <i>Thor</i>	48
Abbildung 3.17: Graphische Darstellung der Kartierung nach dem Ausschluss repetitiver Elemente....	64
Abbildung 3.18: Darstellung der 100 differenziell exprimierten Gene als Streudiagramm.....	64
Abbildung 4.1: Ausschnitt aus der Darstellung des KEGG Pathways <i>Phosphatidylinositol signaling</i> <i>system</i>	76
Abbildung 4.2: Übersicht über exo- und endozytotische Prozesse.	84
Abbildung 4.3: Rab3A wird vom Calcium-Einstrom beeinflusst.....	84
Abbildung 4.4: Der Phosphatidylinositol-Weg wirkt sich auf den vesikulären Transport aus.....	86
Abbildung 4.5: Die duale Rolle der Rab3 GEP	87
Abbildung 4.6: Darstellung des Notch-Signaltransduktionswegs.	88
Abbildung 4.7: Darstellung des Wnt-Signalweges.....	90
Abbildung 4.8: Die <i>DmX</i> -Mutation führt zu einer Herabregulation der DNA-Replikation	92
Abbildung 4.9: Darstellung der beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung der <i>DmX</i> -mutanten Larven.	94
Abbildung 4.10: Darstellung des TCA-Zyklus und der damit assoziierten Stoffwechselwege in <i>DmX</i> - Mutanten.	96
Abbildung 4.11: Darstellung des Malat-Shuttle (A) und des Malat-Aspartat-Shuttle (B)	98

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Genotypen der verwendeten Fliegenstämme zum Zweck der Umbalancierung.	14
Tabelle 2.2: Verwendete Primer und entsprechende Länge der Amplifikate.	15
Tabelle 2.3: Verwendete Reagenzien zur Durchführung einer Direkt-PCR im 50 µl-Ansatz.	16
Tabelle 2.4: Variationen der Temperatur und Zeitspanne der verwendeten PCRs.	16
Tabelle 2.5: Einstellungen der verwendeten Touchdown-PCR.	17
Tabelle 3.1: Übersicht der Bioanalyzer-Elektropherogramme.	35
Tabelle 3.2: Statistische Auswertung des Referenz-Genoms von <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Tabelle 3.3: Vergleich der Rohdaten, die einem qualitativen <i>Trimmung</i> und einem <i>End-Trimming</i> unterzogen wurden.	40
Tabelle 3.4: Vergleich der RNA-Sequenzdaten, die an das Referenz-Genom und die mtDNA von <i>D. melanogaster</i> kartiert wurden.	42
Tabelle 3.5: Genetische Loci der vier untersuchten <i>DmX</i> -Mutationen.	43
Tabelle 3.6: R _j -Werte der Gene <i>DmX</i> (<i>Rbcn-3A</i>) und <i>Rbcn-3B</i> in den vier untersuchten <i>DmX</i> -Mutanten 25 und 50 Stunden nach Eiablage.	49
Tabelle 3.7: Anzahl der differenziell überexprimierten (UP) und unterexprimierten (DOWN) Gene und Transkriptvarianten 25 Stunden und 50 Stunden nach Eiablage.	50
Tabelle 3.8: Vergleich von Datensätzen vor und nach dem Entfernen nicht-proteinkodierender Gene. .	51
Tabelle 3.9: Funktionelle Annotation der wichtigsten GO-Terms.	53
Tabelle 3.10: Funktionelle Beteiligung von DMX anhand der The Gene Ontology-Analyse.	56
Tabelle 3.11: KEGG-Terms der UP Gene 25 Stunden nach Eiablage.	57
Tabelle 3.12: KEGG-Terms der DOWN Gene 25 Stunden nach Eiablage.	57
Tabelle 3.13: KEGG-Terms der am stärksten überexprimierten Gene 50 Stunden nach Eiablage.	58
Tabelle 3.14: KEGG-Terms der herabregulierten Gene 50 Stunden nach Eiablage.	59
Tabelle 3.15: Auflistung der zehn am stärksten differenziell überexprimierte Gene und Transkripte in den <i>DmX</i> -mutanten Larven (UP).	61
Tabelle 3.16: Auflistung der zehn am stärksten differenziell unterexprimierte Gene und Transkripte in den <i>DmX</i> -mutanten Larven (DOWN).	62
Tabelle 3.17: Statistische Auswertung der Kartierung nachdem repetitive Sequenzen entfernt wurden.	66

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Adapterprotein-Komplex
ASCII	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav	spannungsgesteuerter (<i>voltage-gated</i>) Calcium-Kanal
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
CCV	<i>Clathrin-Coated Vesicle</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	kodierende Region (<i>coding sequence</i>)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CpY	<i>Drosophila melanogaster</i> X chromosomales Gen
CRAC	<i>calcium release activated calcium</i>
C-Terminus	carboxyterminales Ende
d. h.	das heißt
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAG	Diacylglycerol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>DmX</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> X-chromosomales Gen
DMX	Gen-Produkt (Protein) des DmX-Gens
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
E-Puffer	Elektrophoresepuffer
E-Puffer	Elektrophoresepuffer
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
et al.	et alii
Exo/SAP	ExonukleaseI/Alkalischer Phosphatase (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
<i>f</i>	<i>forked</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FM7	<i>First Multiple 7</i>

FRET	Förster-Resonanzenergietransfer/ <i>fluorescenceresonance energy transfer</i>
G	Guanin
GAII	Genome Analyzer II
GAP	GTPase-aktivierendes Protein (<i>GTPase activating protein</i>)
Gb	Gigabasen
GDI	GDP-Dissoziations-Inhibitor (<i>GDP dissociation inhibitor</i>)
GEF	<i>Guanine-nucleotide Exchange Factor</i>
GEP	GDP/GTP Austausch-Protein (<i>GDP/GTP Exchange Protein</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GH	Glycin-Histidin-Dipeptid
GMR	Glass Multimer Reporter
GNRF	<i>Guanine Nucleotide Releasing Factor</i>
GO	Gen Ontologie
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
i. d. R	in der Regel
Indel	Insertion und Deletion
inkl.	inklusive
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JGU	Johannes Gutenberg-Universität Mainz
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
M	molar
mA	Milliampere
Mb	Megabase(n)
min.	Minute(n)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
MOPS	N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
Na ₂ EDTA	Dinatriummethylen-diamintetraessigsäure
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm	Nanometer
nt(s)	Nukleotid(e)
N-Terminus	aminoterminals Ende
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PA	Phosphatidsäure (Diacylglycerol-3-Phosphat)
PCK	Proteinkinase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion