

Sarah Heß

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

Diplomarbeit

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

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.

Copyright © 2012 Diplom.de
ISBN: 9783961163014

Sarah Heß

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

*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 Nachfolgenerationen.....	32
3.3	<i>RNA-Seq</i>	35
3.3.1	Isolierung und Quantifizierung der Total-RNA.....	35
3.3.2	Überblick über die verwendete Auswertungsstrategie (<i>Pipeline</i>) der <i>RNA-Seq</i>	36
3.3.3	Zusammenstellung der Referenz-Genoms.....	38
3.3.4	<i>Trimming</i> und Analyse der RNA-Sequenzdaten.....	39
3.3.5	Kartierung der RNA-Sequenzdaten.....	42
3.4	Analyse des Gens <i>DmX</i> auf die erwartete Punktmutation.....	44
3.5	Identifizierung differenzieller Genexpression.....	45
3.5.1	Der RPKM-Wert.....	45
3.5.2	Hierarchisches <i>Clustern</i> der Datensätze durch <i>Heat Maps</i>	46
3.5.3	Der Fold Change-Wert.....	48
3.5.4	Der R_j -Wert ist ein Maß für signifikant differenziell exprimierte Gene.....	48
3.6	Transkriptomischer Vergleich von <i>DmX</i> -mutanten Stämmen zum Hintergrundstamm <i>ywf</i>	50
3.6.1	Analyse des <i>DmX</i> -Gens.....	50

3.6.2	Erstellung von Listen differenziell exprimierter Gene und Transkripte mittels des R _f -Werts	51
3.6.3	Ausschluss nicht-proteinkodierender Gene	51
3.6.4	Analyse der differenziell exprimierten Gene und Transkript-varianten	52
3.6.5	Funktionelle Annotation mit Hilfe von DAVID und GOEAST Gene Ontology	53
3.6.6	Erweiterte Analyse mit Hilfe der Gen Ontologie	57
3.6.7	Analyse der differenziell regulierten Gene in KEGG Pathway	58
3.6.8	Analyse der 50 am stärksten differenziell exprimierten Gene und Transkriptvarianten	61
3.6.9	Ergänzende Untersuchung mit Ausschluss repetitive Elemente	64
4	DISKUSSION	68
4.1	Umbalancierung und genotypische Untersuchung von <i>DmX</i> -mutanten Fliegen	68
4.2	RNA-Isolierung, -Aufarbeitung und Sequenzierung	68
4.3	<i>Trimming</i> und Kartierung der RNA-Sequenzdaten	70
4.4	Bewertung der Expressionsanalyse	72
4.5	Handelt es sich bei <i>DmX</i> um ein maternales Effektgen?	74
4.6	Expressionsanalyse des Gens <i>DmX</i>	74
4.7	Transkriptomischer Vergleich von <i>DmX</i> -mutanten Stämmen zum Hintergrundstamm <i>ywf</i>	75
4.7.1	Der Phosphatidylinositol-Metabolismus ist in <i>DmX</i> -Mutanten hoch-reguliert	75
4.7.2	Vermutlich ist DMX an endozytotischen Prozessen beteiligt	77
4.7.3	DMX könnte in der Regulation der terminalen Schritte der Exozytose beteiligt sein	82
4.7.4	Die Endo- und Exozytose bedingen sich gegenseitig	85
4.7.5	Apoptose	87
4.7.6	Notch und die V-ATPase	88
4.7.7	Einige Komponenten des Wnt-Signalwegs sind in <i>DmX</i> -mutanten Tieren hoch-reguliert	90
4.7.8	Die <i>DmX</i> -Mutation beeinflusst die Genexpression	92
4.7.9	Die Replikation wird von <i>DmX</i> beeinflusst	93
4.7.10	Nervensystem und Muskeln	93
4.7.11	Die <i>DmX</i> -Mutation wirkt sich auf die Zellatmung aus	94
4.7.12	Induktion von Stressantworten	100
4.8	Fazit: <i>DmX</i> -mutante Tiere scheinen zu verhungern	101
5	ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK	103
	ANHANG	105
5.1	Elektronischer Anhang	105
5.2	Verwendete Programme und Internetseiten	106
	LITERATURVERZEICHNIS	107

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.....	33
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)	34
Abbildung 3.8: Quantifizierung der Total-RNA nach Isolierung aus <i>Drosophila</i> Larven.....	35
Abbildung 3.9: Übersicht über die angewandte <i>Pipeline</i> zur Auswertung der RNA-Sequenzdaten.....	37
Abbildung 3.10: Qualitätswerte pro Base.....	40
Abbildung 3.11: Graphische Darstellung der stringenten Kartierung der RNA-Sequenzdaten an das Referenz-Genom.....	43
Abbildung 3.12: Übersicht über die Kartierung der Sequenzen an das Gen <i>DmX</i>	44
Abbildung 3.13: Lage und Art der Punktmutationen vom <i>DmX</i>	45
Abbildung 3.14: Anhand der zehn Datensätze erstellte <i>Heat Map</i>	46
Abbildung 3.15: Darstellung der hierarchischen <i>Cluster</i> als <i>Heat Maps</i>	47
Abbildung 3.16: Berechnung des R _f -Werts anhand des Gens <i>Thor</i>	49
Abbildung 3.17: Graphische Darstellung der Kartierung nach dem Ausschluss repetitiver Elemente.....	65
Abbildung 3.18: Darstellung der 100 differenziell exprimierten Gene als Streudiagramm.....	65
Abbildung 4.1: Ausschnitt aus der Darstellung des KEGG Pathways <i>Phosphatidylinositol signaling system</i>	77
Abbildung 4.2: Übersicht über exo- und endozytotische Prozesse.	85
Abbildung 4.3: Rab3A wird vom Calcium-Einstrom beeinflusst.....	85
Abbildung 4.4: Der Phosphatidylinositol-Weg wirkt sich auf den vesikulären Transport aus.....	87
Abbildung 4.5: Die duale Rolle der Rab3 GEP	88
Abbildung 4.6: Darstellung des Notch-Signaltransduktionswegs.....	89
Abbildung 4.7: Darstellung des Wnt-Signalweges.	91
Abbildung 4.8: Die <i>DmX</i> -Mutation führt zu einer Herabregulation der DNA-Replikation.....	93
Abbildung 4.9: Darstellung der beeinträchtigten oxidativen Phosphorylierung der <i>DmX</i> -mutanten Larven.....	95
Abbildung 4.10: Darstellung des TCA-Zyklus und der damit assoziierten Stoffwechselwege in <i>DmX</i> -Mutanten.	97
Abbildung 4.11: Darstellung des Malat-Shuttle (A) und des Malat-Aspartat-Shuttle (B)	99

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.....	36
Tabelle 3.2: Statistische Auswertung des Referenz-Genoms von <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Tabelle 3.3: Vergleich der Rohdaten, die einem qualitativen <i>Trimmung</i> und einem End- <i>Trimming</i> unterzogen wurden.....	41
Tabelle 3.4: Vergleich der RNA-Sequenzdaten, die an das Referenz-Genom und die mtDNA von <i>D. melanogaster</i> kartiert wurden.....	43
Tabelle 3.5: Genetische Loci der vier untersuchten <i>DmX</i> -Mutationen.....	44
Tabelle 3.6: R _j -Werte der Gene <i>DmX (Rbcn-3A)</i> und <i>Rbcn-3B</i> in den vier untersuchten <i>DmX</i> -Mutanten 25 und 50 Stunden nach Eiablage.....	50
Tabelle 3.7: Anzahl der differenziell überexprimierten (UP) und unterexprimierten (DOWN) Gene und Transkriptvarianten 25 Stunden und 50 Stunden nach Eiablage.....	51
Tabelle 3.8: Vergleich von Datensätzen vor und nach dem Entfernen nicht-proteinkodierender Gene..	52
Tabelle 3.9: Funktionelle Annotation der wichtigsten GO- <i>Terms</i>	54
Tabelle 3.10: Funktionelle Beteiligung von DMX anhand der The Gene Ontology-Analyse.....	57
Tabelle 3.11: KEGG- <i>Terms</i> der UP Gene 25 Stunden nach Eiablage.....	58
Tabelle 3.12: KEGG- <i>Terms</i> der DOWN Gene 25 Stunden nach Eiablage.....	58
Tabelle 3.13: KEGG- <i>Terms</i> der am stärksten überexprimierten Gene 50 Stunden nach Eiablage.....	59
Tabelle 3.14: KEGG- <i>Terms</i> der herabregulierten Gene 50 Stunden nach Eiablage.....	60
Tabelle 3.15: Auflistung der zehn am stärksten differenziell überexprimierte Gene und Transkripte in den <i>DmX</i> -mutanten Larven (UP).....	62
Tabelle 3.16: Auflistung der zehn am stärksten differenziell unterexprimierte Gene und Transkripte in den <i>DmX</i> -mutanten Larven (DOWN).....	63
Tabelle 3.17: Statistische Auswertung der Kartierung nachdem repetitive Sequenzen entfernt wurden.....	67

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
GAI	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
G NRF	<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	Dinatriumethylendiamintetraessigsäure
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	aminoterminases Ende
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PA	Phosphatidsäure (Diacylglycerol-3-Phosphat)
PCK	Proteinkinase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pers.	persönliche
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat [PI(4,5)P ₂]
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
Rbcn	Rabconnectin
RefSeq	Referenzsequenz
RIN	RNA <i>Integrity Number</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RPKM	<i>Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads</i>
rRNA	ribosomale RNA
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SAGE	seriellen Analyse der Genexpression (<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>)
SI	Supporting Information
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SOC	<i>store-operated-channel</i>
sog.	sogenannte(r/s/n)
T	Thymin
TIRF	total internal reflection fluorescence
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
U	Unit
u. a.	unter anderem
URL	einheitlicher Quellenanzeiger (<i>Uniform Resource Locator</i>)
UTR	untranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i>
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
V-ATPase	<i>Vacuolar H^[+]-ATPase</i> ()
Vol.	Volumen
w	<i>white</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WD	Tryptophan-Aspartat-Dipeptid
WGS	<i>Whole-Genome-Shotgun</i>
y	<i>yellow</i>
Y	Y-Chromosom
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
z. Z.	zur Zeit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter