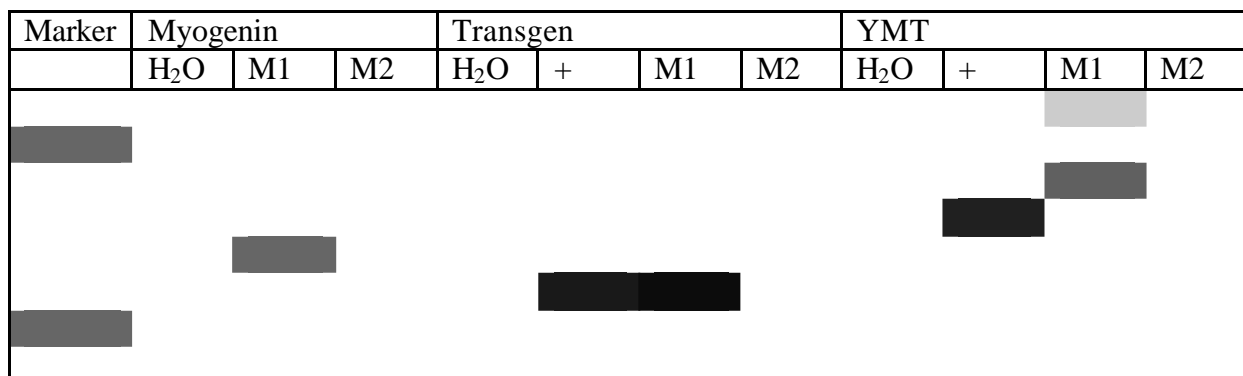


1. Sie präparieren Schwanz-DNA von zwei Mausembryonen, die aus einer Verpaarung eines C57BL/6 Weibchen mit einem homozygoten BxB transgenen Männchen hervorgegangen sind. Mit dieser DNA führen sie folgende PCR-Reaktionen durch:

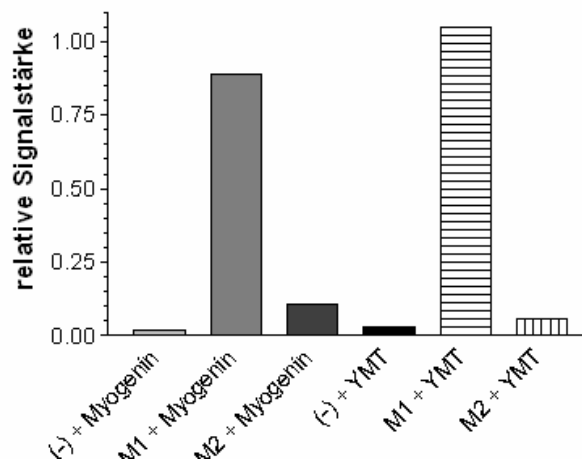
- Konventionelle PCR auf Transgenstatus
- Konventionelle PCR auf Geschlecht (spezifisch für Y-Chromosom)
- Konventionelle PCR auf Myogenin (Kontrolle auf DNA Integrität)
- Real Time PCR auf Myogenin
- Real Time PCR auf Geschlecht

dabei verwenden Sie für alle PCR Ansätze einen entsprechenden Mastermix, der die Primer, Puffer (mit allen notwendigen Komponenten und Cyber-Green im Falle der Real-Time PCR), Polymerase, Wasser und dNTPs enthalten soll.

Die Gelelektrophorese der konventionellen PCR ergibt folgendes Bild, wobei (H<sub>2</sub>O) der Negativkontrolle entspricht (Mastermix+Wasser) und + einer für die PCR geeigneten Positivkontrolle, M1, M2 entspricht der genomischen DNA von Maus 1 bzw. 2; im gezeigten Gel sind Banden von Positivkontrollen auf der korrekten Höhe:



Die Auswertung der Real-Time PCR (relatives Signal, bezogen auf die Positivkontrolle; 1 = 100% Signalstärke wie Positivkontrolle, 0 = kein Signal) ergibt folgendes Bild, sie können davon ausgehen, dass ein Signal über 0,5 einem spezifischen Signal entspricht:



(4 Punkte) Welche Aussagen sind möglich?

Bitte beachten Sie: „In zwei Wochen kann es regnen“ ist eine mögliche Aussage, „In zwei Wochen wird es sicher in Würzburg regnen“ ist dagegen nicht möglich!

✓ Maus 1 ist transgen.

Ja logisch. Schließlich ist DNA drin (Myogenin PCR bei Maus 1 positiv), und die BxB PCR zeigt eine Bande direkt auf der Höhe der Positivkontrolle.

(22/22)

○ Ihr Wasser war mit BxB-DNA kontaminiert.

Nö, warum auch - schließlich ist die Negativkontrolle clean.

(22/22)

○ Maus 2 ist sicher nicht transgen.

Auch nö: zwar gibt es hier kein BxB Signal, aber bei Myogenin zeigt sich auch kein Signal – wahrscheinlich ist da keine DNA drin (siehe nachher).

(22/22)

✓ Ihre DNA Präparation bei Maus 2 hat möglicherweise nicht richtig funktioniert.

Aber Hallo: kein Signal bei Myogenin konventionell + Real time: da ist wohl was mit der DNA Präparation schiefgelaufen (keine DNA, zuviel Ethanol ...)

(21/22)

○ Aus der konventionellen PCR ergibt sich, dass Maus 1 männlich ist.

Nö. Die konventionelle PCR ging wohl eher gründlich in die Hose und erlaubt überhaupt keine Aussage.

(21/22)

✓ Aus der Real-Time PCR ergibt sich, dass Maus 1 männlich ist.

Aber Hallo: Signal bei Myogenin, Signal bei YMT, und in der Aufgabe steht, dass man der Real – Time PCR ab einer Signalstärke von 0,5 auch trauen kann: die ist männlich.

(20/22)

✓ Wird die Real-Time PCR korrekt durchgeführt, so ergibt die YMT spezifische PCR bei einer weiblichen Maus kein Signal.

Richtig. Weil Weibchen trennt was ganz entscheidendes vom Männchen: das Y-Chromosom. Und das ist genau das, was durch die YMT PCR detektiert wird.

(22/22)

- Aus der Real-Time PCR ergibt sich, dass Maus 2 weiblich ist.

Nö. Das Signal fehlt zwar, aber leider fehlt auch das Myogenin Signal – wo wir wieder bei dem Problemchen mit der DNA Präparation wären.

(21/22)

- ✓ Die konventionelle PCR für die Geschlechtbestimmung sollte im Hinblick auf genomische DNA optimiert werden, da unspezifische Banden auftauchen.

Das will ich doch meinen. Bei so vielen unspezifischen Banden, obwohl offensichtlich DNA vorhanden ist, 3 andere PCR Reaktionen mit der gleichen DNA problemlos funktionieren, sollte man unbedingt nochmal die Bedingungen optimieren.

Hier gab es des öfteren Probleme (12/22). Offensichtlich traut kaum einer eine „etablierte“ PCR zu kritisieren. Aber offensichtlich stimmt ja was nicht, da Real-Time PCR glatt geht, die Kontrolle funktioniert, aber bei der DNA, die sowohl in der Real-Time, als auch konventionell für transgen funktioniert hat, klappt es nicht. Vielleicht war es ja eine Ausnahme. Aber nochmal die Bedingungen überprüfen schadet in einem solchen Fall sicher nichts. Übrigens: selbst wenn die positivkontrolle genomische DNA sein sollte: ist die Aufreinigung jetzt noch genau die gleiche? ist die Menge gleich... → auch dann sollte man nochmal überprüfen.

Primerdimere können es nicht sein, die würden wesentlich niedriger liegen (kleiner)!

2. (1 Punkt) Sie injizieren männliche Stammzellen in weibliche Embryonen. Welche YMT (= Y-Chromosom spezifische) quantitative PCR Methode (Real-Time oder konventionell) verwenden Sie, um den Anteil der männlichen Stammzellen zu bestimmen, die sich im weiblichen Embryo ansiedeln?

quantitativ + Anteil = Real time PCR. Issa logisch!

(22/22)

3. Sie sind weltberühmter Verhaltensforscher mit einem riesigen Tierstall und wollen dem Phänomen der Intelligenz auf die Spur kommen. Aus der Jackson Datenbank wissen Sie, dass sich C57BL/6 durch besondere Blödheit auszeichnen, während DBA/2 Mäuse fast schon Differentialgleichungen zweiter Ordnung lösen können. In ihrem Test messen Sie die Zeit, wie lange eine Maus durch ein Labyrinth braucht, nachdem sie schon zum zehnten Mal drin gewesen ist.

- a. (3 Punkte) Geben Sie eine experimentelle Vorgehensweise an, um das/die verantwortlichen Gene zumindest grob zu lokalisieren.

Das dürfte für Sie jetzt die leichteste Übung gewesen sein. Die "einfachste" Möglichkeit:

1. C57BL/6 mit DBA/2 Mäusen kreuzen und F2 Generation auf Intelligenz mit dem Labyrinthtest analysieren. Parallel für jede Maus Marker (beispielsweise Mikrosatellitenmarker) bestimmen und mit Intelligenz korrelieren.

Diese 2 Sätzchen würden schon die volle Punktzahl geben.

Sie können Gleiches natürlich auch mit RI strains, AIS, RI-AIS und kongenen Linien machen!

In allen Fällen muss enthalten sein

1. Sie kreuzen im ersten Schritt C57BL/6 mit DBA/2
2. Sie analysieren mindestens F2, kongen 10. Generation; bei kongen zusätzlich: sie verwenden vor jedem Kreuzungsschritt den schlauesten Stamm und kreuzen auf C57BL/6 zurück, oder sie verwenden vor jedem Kreuzungsschritt den dümmsten Stamm und kreuzen auf DBA/2 zurück (wer weiß, ob es Gene gibt die blöd oder gscheit machen...)
3. Sie bestimmen Intelligenz und Marker
4. Sie korrelieren Intelligenz und Marker.

Falsch ist alles, was über transgene oder knockout – Tiere läuft – sie kennen ja die Gene noch nicht!

Wie immer gab es auch hier wieder Leute, die F1 testen. Und das ist Mist.

Und wenn Sie kongene machen (das ist toll), dann sollten Sie schon sagen wie sie den Lokus eingrenzen (na klar, sie bestimmen Marker und kucken was von der blöden / klugen Maus übrig ist). Aber das sollten Sie schon sagen!

Und wer gleich das ganze Genom der Maus sequenziert schießt dann doch leicht über das Ziel hinaus.

Manche bestimmen Marker, die mit Intelligenz zu tun haben noch vor einer Kreuzung. Hm. Wenn ich wüsste, wie das geht, hätte ich den Nobelpreis, da man sich dann das ganze Kreuzungsgedöns sparen könnte. Bis dahin ist das leider falsch!

Und wer gar nicht kreuzt (dieses Wörtchen sollte halt schon auftauchen) kann noch so schöne Analysen machen, die nützen ihm aber nigs.

Ach ja, Preisfrage: was ist der genetische Unterschied zw. einer relativ schlauen und relativ blöden C57Bl/6 Maus? Genau. Keiner. Daher nützt es wenig, sich für die erste Kreuzung die blödste rauszusuchen. Die stand wahrscheinlich einfach neben dem Fernseher, auf dem DSDS lief...

In die gleiche Kerbe geht übrigens eine Transkriptionsanalyse von C57 und DBA Mäusen.

Woher wollen Sie denn wissen, dass der Unterschied nicht für die Fellfarbe, sondern Intelligenz ist?? (viel schlauer wäre es, das gleiche bei einer kongenen zu machen!)

Ach ja. Und eine konsomische Linie, mit einem ganzen Chromosom: wage zu bezweifeln ob bei einem quantitativen Merkmal dort unterschiede messbar sind. Die selbst machen ist übrigens mindestens genauso aufwändig wie gleich eine kongene generieren (sie müssen nämlich bei jeder Generation hunderte von Nachkommen kartieren!

Kleinigkeit: ein Backcross der F1 auf eine Parentallinie nennt sich N2 und nicht F2 (gibt natürlich keinen Fehler). Das sollte ich vielleicht nächstes mal erwähnen!?

Übrigens: das Wort Kartierung beinhaltet Bestimmung und Korrelation Phänotyp+Marker. Die Leute, die dies verwendet haben, haben Glück gehabt...

Wenn zumindest Vergleich Genotyp dranstand, habe ich ein Auge zuge drückt (nicht aber, wenn Sie dies bis zum Vergleich des Kompletengenoms trieben!)

Zur Beruhigung: 20/22 hatten hier zumindest 1,5 Punkte.

- b. (1 Punkt) Ihr sympathischer Kollege Hwang veröffentlicht in Science, natürlich ohne experimentellen Beweis, dass das Gen *dmb1* (Dumpfbacke 1) für die Blödheit der C57BL/6 Mäuse verantwortlich ist. Geben Sie eine Möglichkeit an, dies zu überprüfen.

Tja. Das sieht unserem Freund Hwang ähnlich. Wir knocken entweder *dmb1* in C57BL/6 Mäusen aus und kucken, ob die Maus jetzt zum Einstein mutierte, oder wir machen transgene DBA/2 und analysieren, ob der Intelligenzlevel von Daniel Kübelböck damit erreicht oder unterschritten wurde.

Die meisten meinten übrigens hier, ich solle mir den Kopf zerbrechen, welche Maus man für den k/o bzw. transgen nimmt.

Formal ist eine kongene Maus hier kein eindeutiger Beweis (schließlich könnte da ja noch was anderes dranhängen). Aber ich will mal nicht so sein!

Eine reine F2 ist als Beweis nicht wirklich hilfreich, da dies immer noch alles mögliche sein könnte!

(20/22)

- c. (1 Punkt) Leider ist Ihre TA für die nächsten 3 Jahre nicht da, die normalerweise in Ihrer „transgenic“ Einheit arbeitet. Sie finden den Marker D6Mit12, der neben *dmb1* liegt. Ist er für Sie hilfreich?

Marker	Allele	Fragments	Strains
<u>D6Mit12</u>	a	123bp	BALB/cJ, C3H/HeJ, AKR/J, A/J, LP/J, NON/Lt, C57BL/6J-Lep<ob>/+, NOD/MrkTac, DBA/2J, C57BL/6J
	b	147bp	CAST/EiJ
	c	170bp	SPRET/EiJ

Immer muss man alles alleine machen. Für C57BL/6 und DBA/2 nützt der Marker offensichtlich nix, da beide das gleiche Allel besitzen (sprich: kein Polymorphismus aufweisen) → ein schlichtes Nein gibt einen Punkt.

Leute, die hier Ja gesagt haben können trotzdem einen Punkt bekommen, wenn sie dazusagen, dass vorher die Intelligenz von CAST bzw. SPRET Mäusen bestimmt wurde, die An- oder Abwesenheit des Gens bestimmt wurde und diese dann, je nach Schlaueit mit C57 oder DBA verkreuzt werden. Weiter geht es dann wie bei a. Um bei ja einen vollen Punkt zu kriegen muss das dann aber schon genau ausgeführt werden!

(22/22)

**Insgesamt Teil Mausgenetik: alle > 5 Punkte; 19 > 7,5 Punkte!**