

### **Experiment 1: Insertions/Deletions Polymorphismus in *D. melanogaster***

Eine der häufigsten Formen von molekularer Variabilität sind Insertionen bzw. Deletionen (abgekürzt: InDels). D.h. dass unterschiedliche Individuen an einem bestimmten Locus im Genom unterschiedlich lange DNA-Abschnitte besitzen. Ist die genaue Position dieses Polymorphismus bekannt und kennt man darüber hinaus die DNA-Sequenz in diesem Bereich des Genoms, so kann man durch ein einfaches PCR-Experiment das Vorhandensein eines InDels bestimmen.

In einer Studie wurde herausgefunden, dass eine ganz bestimmte Insertion dazu führt, dass *D. melanogaster* resistent gegen das Insektizid DDT werden. Die zusätzliche DNA ist ein „Transposable Element“, also mobile DNA die sich zufällig in das Genom integrieren kann. In diesem Fall handelte es sich um ein *Accord* Element, welches sich in die 5' regulatorische Region des Resistenz-Gens *Cyp6g1* inseriert hat. Dies hatte zur Folge, dass dieses Gen überexprimiert wurde und die Fliegen somit resistent wurden.

Im ersten Experiment vergleichen wir Fliegen aus zwei unterschiedlichen afrikanischen *D. melanogaster* Populationen: Eine stammt aus einer Region in der intensiv Landwirtschaft betrieben wird und DDT zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt wird. Fliegen aus dieser Region sind resistent gegen DDT. Die anderen Fliegen stammen aus einem nahe gelegenen Naturreservat. Sie zeigen keine Resistenz.

Wir wollen nun untersuchen, ob die beobachtete unterschiedliche Resistenz möglicherweise auf das Vorhandensein oder Fehlen des erwähnten *Accord* Elements zurück zu führen ist. Dazu führen wir eine PCR durch um die An- oder Abwesenheit des Elements zu testen. Zunächst muss dazu genomische DNA aus den Fliegen gewonnen werden. Jede Gruppe untersucht 4 Fliegen, 2 aus der landwirtschaftlichen Region und 2 aus dem Naturreservat.

#### **Extraktion von DNA aus einer einzelnen Fliege:**

Material:

- *D. melanogaster* (tot)
- „Squishing Buffer“ (SB):
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8
  - 1 mM EDTA
  - 25 mM NaCl
  - 200 µg/ml Proteinase K

Protokoll:

1. Jeweils eine Fliege befindet sich in einem 200 µl Röhrchen.
2. Ziehen Sie 50µl SB in eine gelbe Pipettenspitze.
3. Entfernen Sie die Pipettenspitze vorsichtig von der Pipette (der SB verbleibt in der Spitze).
4. Zerdrücken Sie die Fliege mit der Pipettenspitze. Während des Vorgangs tritt SB aus der Pipettenspitze aus.
5. Nachdem die Fliege (mehr oder weniger) homogenisiert worden ist, geben Sie den in der Pipettenspitze verbliebenen SB hinzu.
6. Das Homogenat wird bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.
7. Anschließend wird die Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 3 Minuten inaktiviert.
8. Der Überstand enthält nun genomische DNA, die für weitere Reaktionen verwendet werden kann.

**Ansetzen der PCR:**

Zum Pipettieren der einzelnen PCR Reaktionen wird zuerst ein „Master Mix“ angesetzt. Dieser enthält sämtliche Komponenten die bei allen Reaktionen gleich sind, in unserem Fall alles außer der genomischen DNA. Jede Gruppe testet die DNA von 4 verschiedenen Fliegen, wir setzen zur Sicherheit aber einen „Master Mix“ für insgesamt 5 Reaktionen in einem 1,5 ml Röhrchen an:

81,5 µl	Steriles H <sub>2</sub> O
12,5 µl	10x PCR Puffer
3,75 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1,25 µl	40 mM dNTP Mix
10 µl	10 µM Vorwärts-Primer (Acc +)
10 µl	10 µM Rückwärts-Primer (Acc -)
1 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U / µl)

Die *Taq* Polymerase sollte erst ganz zum Schluss hinzugefügt werden. Alle Reagenzien sollten die ganze Zeit über auf Eis gehalten werden!

Anschließend werden die einzelnen PCR Reaktionen zusammen pipettiert. In ein 200 µl PCR-Röhrchen eines 8er-Strips kommen 24 µl des „Master Mix“ und 1 µl der jeweiligen genomischen „template“ DNA. Da nur 4 Reaktionen durchzuführen sind, wird nur die Hälfte eines 8er-Stripp benötigt, die andere Hälfte kann abgeschnitten werden.

**Durchführung der PCR:**

Die PCR wird in einem „Thermocycler“ durchgeführt mit folgenden Parametern:

1.	Denaturierung	94°C	3 Minuten	
-----				
2.	Denaturierung	94°C	30 Sekunden	30 Zyklen
	Hybridisierung	57°C	30 Sekunden	
	Elongation	72°C	30 Sekunden	
-----				
3.	Elongation	72°C	3 Minuten	

**Visualisierung der PCR durch Gelelektrophorese:**

Abschließend wird die PCR auf einem 1,5% Agarose-Gel laufen gelassen. Dazu werden 5 µl der PCR zusammen mit 1 µl Ladepuffer auf einer Mikrotiterplatte zusammen pipettiert. Das gesamte Volumen wird anschließend auf das Gel aufgetragen (dabei das Schema an der Tafel beachten!). Das Gel enthält Roti-Safe (ein „ungiftiger“ Ersatz für Ethidiumbromid) welches mit der DNA interkaliert und die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar macht. Das Gel wird für ca. 30 Minuten unter 120V Spannung gesetzt. Dabei wandert die negativ geladene DNA abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Dadurch können unterschiedlich große PCR-Produkte durch ihre relative Position auf dem Gel auseinander gehalten werden. Um eine ungefähre Einschätzung der Größe in Basenpaaren zu ermöglichen läuft zudem eine „DNA Leiter“ mit.

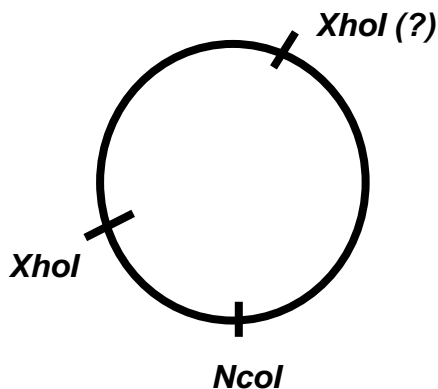
**Auswertung:**

Interpretieren Sie das Ergebnis des Experiments:

- Wie viele verschiedene Genotypen sehen Sie?
- Ist die Insertion in unterschiedlichen Frequenzen in den beiden Populationen vorhanden? Hat es sich fixiert?
- Besteht tatsächlich ein statistischer Zusammenhang zwischen der Herkunft der Fliegen und der Frequenz der Insertion? Führen Sie einen Fisher's-Exact-Test durch! (Online unter <http://graphpad.com/quickcalcs> unter „Categorical data“)
- Die Insertion des *Accord* Elements scheint einen großen Fitness-Vorteil mitzubringen. Woran kann es liegen, dass es sich nicht überall durchgesetzt hat?

**Experiment 2: SNP in einem Mitochondrium**

Im zweiten Experiment untersuchen wir die Verteilung eines mitochondrialen Polymorphismus in verschiedenen Sub-Populationen von Mäusen. Es wurde bereits festgestellt, dass in natürlichen Populationen von Mäusen ein SNP vorhanden ist, der eine *XhoI* Schnittstelle im mitochondrialen Genom verändert:



Des Weiteren befindet sich im Mitochondrium eine Schnittstelle für *NcoI* sowie eine zweite *XhoI* Schnittstelle. Diese beiden sind jedoch bei Mäusen monomorph, d.h. sie sind in allen Individuen vorhanden.

Getestet werden soll folgende Hypothese: Mäuse in Mitteleuropa bestehen aus zwei Populationen die bereits genetisch differenziert sind und geographisch in Ost/West-Richtung getrennt sind. D.h. Mäuse aus denselben geographischen Regionen sind sich genetisch ähnlicher als ihre Verwandten aus anderen Regionen.

Um dies zu untersuchen erhalten sie DNA von zwei Sub-Populationen aus West-Bayern und zwei Sub-Populationen aus Ost-Bayern. Benutzen Sie den Restriktionsschnittstellen-Polymorphismus als genetischen Marker um eine mögliche Ost/West Spaltung der Mäuse Population zu untersuchen!

**Ansetzen des Restriktionsverdaus:**

Sie erhalten bereits extrahierte mitochondriale DNA. Jede Gruppe testet 4 verschiedene Genome. Diese soll nun verdaut werden. Es wird wieder ein „Master Mix“ für 5 Reaktionen in einem 1,5 ml Röhren angesetzt:

- 83 µl Steriles H<sub>2</sub>O
- 10 µl 10x CutSmart Puffer
- 1 µl *XhoI* Enzym (20 U / µl)
- 1 µl *NcoI* Enzym (20 U / µl)

Die Enzyme sollten wieder ganz zum Schluss hinzugefügt werden. Alle Reagenzien sollten die ganze Zeit über auf Eis gehalten werden! Der zusätzliche Verdau mit *NcoI* ist nicht zwingend notwendig, wird jedoch durchgeführt um ein prägnanteres Bandenmuster zu erhalten.

Anschließend werden die einzelnen Reaktionen zusammen pipettiert. In das 200 µl PCR-Röhren das 1 µl der jeweiligen mitochondrialen DNA enthält kommen 19 µl des „Master Mix“

**Inkubieren des Verdaus:**

Der Ansatz wird in einem Thermocycler bei 37°C für mindestens 60 Minuten inkubiert.

**Visualisierung des Verdaus durch Gelelektrophorese:**

5 µl des Verdaus (6 µl inkl. Ladepuffer) werden auf ein 0,8% Agarose-Gel aufgetragen (Schema an der Tafel beachten!). Das Gel wird für ca. 30 Minuten unter 120V Spannung gesetzt und anschließend die Banden ausgewertet.

**Auswertung:**

Interpretieren Sie das Ergebnis des Experiments:

- Entstehen die erwarteten Bandenmuster?
- Wie hoch ist die Variabilität innerhalb der Sub-Populationen? Berechnen Sie  $\pi$ .
- Berechnen Sie die  $F_{ST}$  Werte aller paarweisen Vergleiche der Sub-Populationen und sammeln Sie diese in einer Tabelle (siehe unten).
- Führen Sie für alle paarweisen Vergleiche einen Fisher's-Exact-Test durch um zu sehen ob die Allele zwischen den Sub-Populationen gleich verteilt sind.
- Unterstützen Ihre Ergebnisse die Hypothese einer Ost/West-Spaltung der Mäuse Population?
- Genügt die Analyse eines einzelnen Polymorphismus bereits um gesicherte Aussagen bezüglich der Populationsspaltung machen zu können?

**Paarweise  $F_{ST}$  Werte:**

	Ost A	Ost B	West A	West B
Ost A				
Ost B				
West A				
West B				

**Experiment 3: Multi-Lokus DNA-Sequenzdaten aus drei *D. melanogaster* Populationen**

Im letzten Experiment wollen wir populationsgenetische Daten durch Sanger-Sequenzierung generieren. Wir werden insgesamt vier Loci in nicht-kodierenden Regionen auf dem X-Chromosom in einer Afrikanischen (Lake Kariba, Zimbabwe), einer Europäischen (Leiden, Niederlande) und einer Asiatischen (Kuala Lumpur, Malaysia) Population von *D. melanogaster* sequenzieren, sowie in einer Linie von *D. simulans* als „Outgroup“. Die produzierten DNA-Sequenzdaten und die darin enthaltenen Polymorphismen werden in der letzten Kurswoche populationsgenetisch ausgewertet. Die sequenzierten Loci und Linien werden wie folgt bezeichnet:

*Loci:* 55, 126, 530, 1435

*Afrikanische Linien:* A84, A95, A131, A145, A157, A186, A191, A229, A377, A384, A398

*Europäische Linien:* E1, E2, E11, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E18, E19, E20

*Asiatische Linien:* KL1, KL2, KL6, KL7, KL8, KL10, KL11, KL12, KL19, KL20, KL21, KL22

*D. Simulans Linie:* Sim

**Ansetzen der PCR:**

Zum Sequenzieren der Loci müssen diese zunächst mittels PCR in den einzelnen Linien amplifiziert werden. Zum Pipettieren der einzelnen PCR Reaktionen wird zuerst ein „Master Mix“ angesetzt. Dieser enthält alles außer der „template DNA“. Jede Gruppe amplifiziert einen Locus in jeweils 4 unterschiedlichen Linien (= 4 Reaktionen). Wir setzen zur Sicherheit einen „Master Mix“ für insgesamt 5 Reaktionen in einem 1,5 ml Röhrchen an:

81,5 µl	Steriles H <sub>2</sub> O
12,5 µl	10x PCR Puffer
3,75 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>
1,25 µl	40 mM dNTP Mix
10 µl	10 µM Vorwärts-Primer
10 µl	10 µM Rückwärts-Primer
1 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U / µl)

Die *Taq* Polymerase sollte erst ganz zum Schluss hinzugefügt werden. Alle Reagenzien sollten die ganze Zeit über auf Eis gehalten werden!

Anschließend werden die einzelnen PCR Reaktionen zusammen pipettiert. In 4 Röhrchen eines 8er-Strips kommen 24 µl des „Master Mix“ und dann jeweils 1 µl der genomischen „template“ DNA von 4 verschiedenen Fliegenlinien (Gesamt-Volumen 25 µl). Achten Sie dabei auf das Pipettierschema an der Tafel und beschriften Sie sorgfältig!

**Durchführung der 2-step PCR:**

Die PCR wird mit einem „2-step“ Protokoll durchgeführt, mit den folgenden Parametern:

1.	Denaturierung	94°C	3 Minuten	
-----				
2.	Denaturierung	94°C	30 Sekunden	
	Hybridisierung/Elongation	64°C	90 Sekunden	33 Zyklen
-----				
3.	Elongation	72°C	3 Minuten	

**Aufreinigen der PCR-Produkte mit ExoSAP:**

ExoSAP ist eine Enzymmischung, welche PCR-Reaktionen aufreinigt indem sie überschüssige Primer und nicht eingebaute dNTPs in der Lösung abbaut. Die PCR-Produkte sind danach als „Template“ für Sequenzierreaktionen geeignet.

Protokoll:

1. Fügen Sie 1 µl ExoSAP direkt zu Ihrer PCR-Reaktion hinzu.
2. Mischen Sie die Lösung durch mehrmaliges auf- und abpipettieren.
3. Der Ansatz wird bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.
4. Abschließend werden die Enzyme bei 80°C für 15 Minuten deaktiviert.

**Ansetzen der Sequenzierreaktion:**

Insgesamt führt jede Gruppe 8 Sequenzierreaktionen durch (4 verschiedene PCR-Produkte mit jeweils Vorwärts- und Rückwärtsprimer). Wir setzen einen „Master Mix“ für 10 Reaktionen an. Pipettieren Sie so exakt wie möglich, Sequenzierreagenzien sind sehr kostspielig! In ein 1,5 ml Röhrchen kommen:

30 µl	Steriles H <sub>2</sub> O
10 µl	Sequenzierpuffer
20 µl	Sequenzier-Mix (Rosa)

Pipettieren Sie jeweils 6 µl des „Master Mix“ in 8 Röhrchen eines 8er-Strips. Anschließend werden 2 µl der „template“ PCR hinzugefügt, sowie 2 µl eines einzelnen Primers (entweder Vorwärts oder Rückwärts). Achten Sie dabei auf das Pipettierschema an der Tafel und beschriften Sie sorgfältig!

**Durchführung der Sequenzierreaktion:**

Die Sequenzierreaktionen wird ähnlich wie die PCR im „Thermocycler“ durchgeführt:

1.	Denaturierung	96°C	60 Sekunden	
-----				
2.	Denaturierung	96°C	10 Sekunden	
	Hybridisierung	52°C	15 Sekunden	40 Zyklen
	Elongation	60°C	4 Minuten	

Die Sequenzierreaktion dauert ca. 4 Stunden und läuft über Nacht. Anschließend werden die Reaktionen auf unserem hauseigenen ABI 3730 Kapillarsequenzierer aufgetrennt. Die produzierten Chromatogramme sind Grundlage für die populationsgenetische Auswertung in der letzten Kurswoche.

**Zeitplan für den Kurs:**

	<b>Experiment 1</b>	<b>Experiment 2</b>	<b>Experiment 3</b>
<b>13:00</b>	DNA Extraktion		
<b>13:30</b>	Inkubation Extrakt		Ansatz PCR
<b>14:00</b>		Ansatz Verdau	Lauf PCR
<b>14:30</b>	Ansatz PCR	Inkubation Verdau	
<b>15:00</b>	Lauf PCR		
<b>15:30</b>		Beladen Gel	Ansatz/Lauf ExoSAP
<b>16:00</b>	Beladen Gel	Lauf Gel	
<b>16:30</b>	Lauf Gel		Ansatz Sequenzreaktion
<b>17:00</b>			
	Arbeiten		Warten