



CEITEC

Central European Institute of Technology  
BRNO | CZECH REPUBLIC

# MUTANTI A JEJICH VYUŽITÍ V GENOMICE

Metody v genomice a proteomice (CG080)  
Genomika – lekce 6  
jaro 2019

Mgr. Markéta Žďárská, Ph.D.



INVESTMENTS IN EDUCATION DEVELOPMENT



- Transgenní rostliny a funkční genomika
- Mutageneze, typy mutagenů
- Přístupy přímé genetiky
  - EMS mutageneze
  - Poziční klonování
  - Sekvenování
- Přístupy reverzní genetiky
  - Tilling
- Reportérové geny

- **transgen** – gen (genetický mat.) přenesen přirozeně nebo gen. inženýr. technik z jednoho organismu na druhý
- syntetické, modifikované nebo cizorodé geny mohou být vnášeny do živočichů a rostlin
- „non-native“ segment DNA
  - zachová si schopnost produkce RNA/proteinu v transgenním organismu
  - může změnit norm. funkci v genetickém kódu transgen. organismu
- transgenní organismy slouží ke studiu funkcí genů

# Transgenní organismy



- **GloFish** are a type of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) that have been modified through the insertion of a green fluorescent protein (*gfp*) gene.
- <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-zebrafish-in-research>

- ◎ cíl: hledání genů a určení jejich funkce v genomu
  
- ◎ 2 různé přístupy:
  - > **přímá genetika „forward genetics“**
    - fenotyp → gen
  - > **reverzní genetika „reverse genetics“**
    - sekvence DNA (gen) → fenotyp

- mutanti – nástrojem obou přístupů
- různé typy mutagenů
  - 1. chemické
  - 2. fyzikální (záření)
    - velký počet náhodných mutací, zasáhne všechny geny
  - 3. biologické
    - moderní
    - inzerční mutagenese, menší počet mutací, zanechávají molekulární značku

} klasické

☉ způsobují bodové mutace

## 1. při replikaci DNA ale i v nereplikující se DNA

> **alkylační látky** (vnáší alkylovou sk. na báze; náhodné)

- **yperit** (hořtičný plyn; Ch. Auerbach)
- **ethylnitrosomočovina (ENU)**
  - ethylová sk. ENU reaguje většinou s thyminem
  - Bill Russell (1951) myší kmen („T-test stock) pro testování různých mutagenů



- **ethylmethansulfonát (EMS)**

- ethylová sk. EMS reaguje s guaninem v DNA, vytvoří O-6-ethylguanin (místo G:C vznikají A:T)
- Maple J. & Moller SG, 2007 - Mutagenesis in *Arabidopsis*

> **HNO<sub>2</sub>** (deaminace aminoskupin)

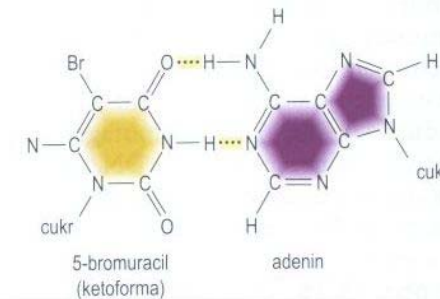
# Chemické mutageny



## 2. pouze při replikaci

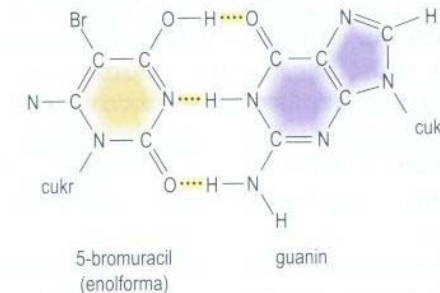
- > **analogy bází:** 5-bromuracil, 2-aminopurin
  - způsobují chybné párování
- > **akridinová barviva:** proflavin, akridinová oranž
  - způsobují adice či delece 1-více bází → změna čtecího rámce → nefunkční genové produkty
- > **hydroxylamin**
  - specifická – indukuje tranzice pouze ve směru G:C → A:T

5-bromuracil: párování s adeninem



(a)

5-bromuracil: párování s guaninem



(b)

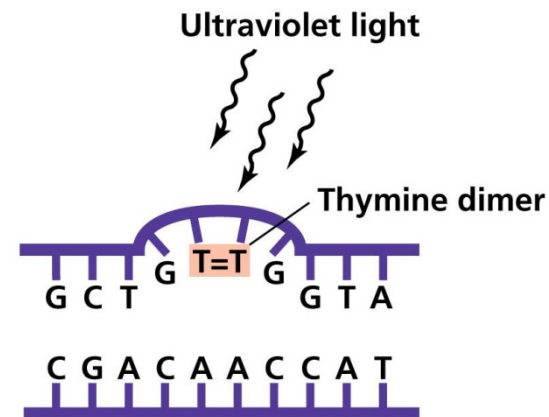
**Obr. 13.13** ▶ Párování mezi 5-bromuracilem a (a) adeninem nebo (b) guaninem.



# Fyzikální mutageny



- ① ionizující: RTG, gama záření, radioaktivní uhlík  $^{14}\text{C}$ 
  - > způsobují zlomy
- ① neionizující: UV záření 254nm je absorbováno bázemi → pyrimidinové dimery (naruší cukr-fosfátovou kostru)



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- ① způsobují rozsáhlejší inserce a přestavby chromozomů
- ① mohou odstranit i více genů nebo vnést nové regulační sekvence
- ① nevhodné pro přesnou mutagenezi

## ◎ inzerční mutageneze

### 1. T-DNA

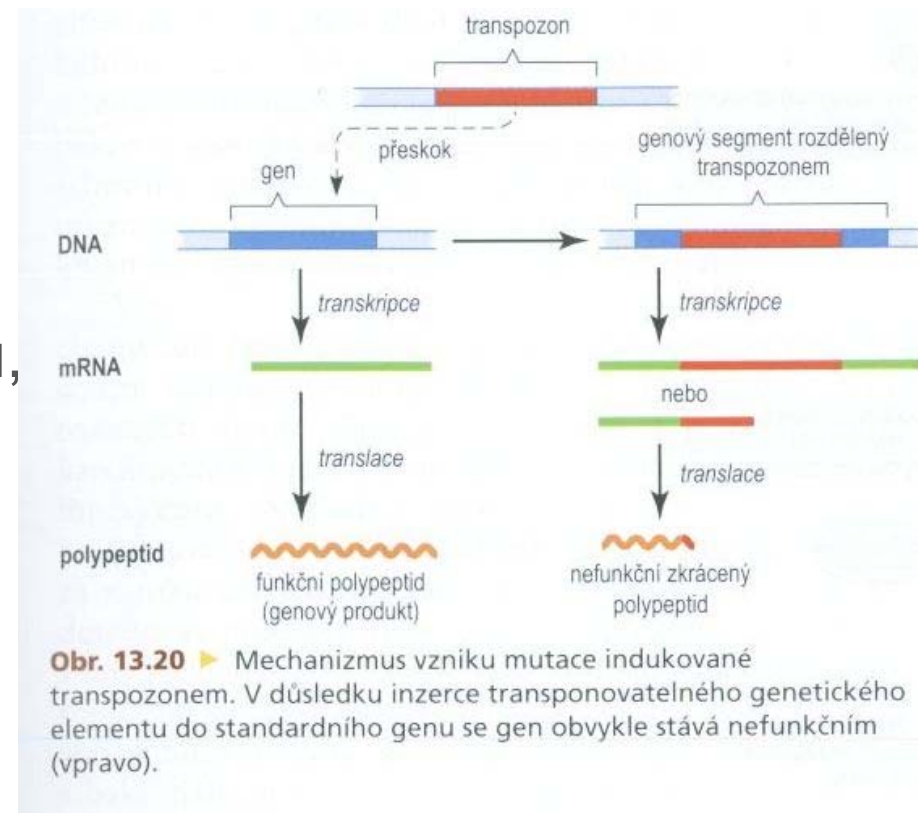
- › *Agrobacterium tumefaciens* je schopna vnést do rostlinného genomu část své DNA
- › důsledky začlenění T-DNA do genomu jsou různé, dáno povahou inzertu a místem, kde se integruje
- › způsobuje:
  - inaktivaci genu
  - aktivace (nese promotor, zesilovač)

### 2. Transpozony – transponovatelné genetické elementy

- › pohyblivé genetické elementy, nejsou tak stabilní jako T-DNA
- › mohou se přemístit z místa původní inzerce → obnovení normálního fenotypu
- › v místě inzerce zůstává stopa i po opuštění genomu, nevhodné pro rozsáhlou mutagenezi (Petersen et al, 2000)

# T-DNA a transpozony

- ① inzerční mutagenese
- ① inzerce do:
  - > kódující oblasti
  - > nekódující oblasti – ovlivnění sestřihu intronů, genové exprese
- ① 😊 výhody:
  - > reverzibilní mutace
  - > snadno se mapuje a region se lehce klonuje
- ① ☹️ nevýhody:
  - > inzerce není náhodná

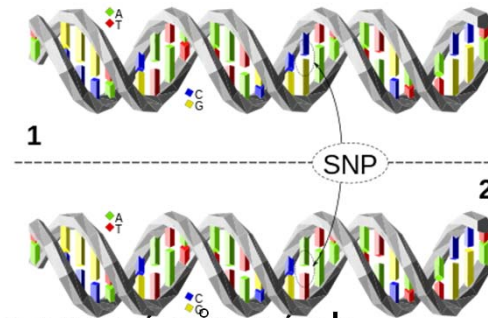


# Jak obecně hledat mutaci?



## 1. menší mutace

- nové **jednonukleotidové polymorfismy (SNP)** ve vytipované oblasti
- změněný transkripční profil

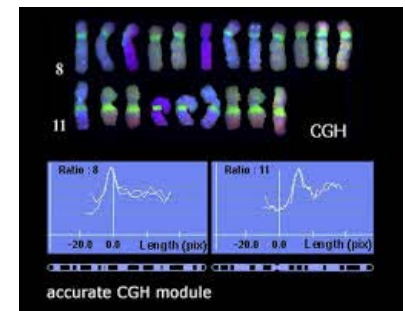


The upper DNA molecule differs from the lower DNA molecule at a single base-pair location (a C/A polymorphism).

- komplementace mutace transgenozí různých
- kandidátních genů ve WT formě

## 2. chromozomální přestavby

- přestavby rozsáhlé → *in situ* hybridizace na metafázních chromozomech – rozlišení 5 Mbp
- přestavby menší → komparativní genomová hybridizace (CGN)
  - „DNA microarrays“ se sondami pokrývající různé části genomu
  - hybridizace s genomickou DNA – rozlišení desítky Mbp



# Přímá „saturační“ genetika



- ◎ založena na saturační mutagenezi „saturation screen“
  - > působení mutagenu na organismus → analýza potomstva na určitý fenotyp
  - > identifikace mutantů → třídění do komplement. skupin
  - > mapování do obecných chromozomál. lokalizací pomocí známých markerů (značek) a klonování, sekvenování
  
- ◎ existuje mutace pro každý lokus → možnost určit skupinu genů odpovědných za daný znak
  
- ◎ cílem je dosažení saturačního bodu → odhalit všechny geny odpovědné za fenotyp
  
- ◎ mutageny (RTG, EMS, transpozony)
  - > Příklady:
  - > rostliny bez reakce na světlo
  - > neschopnost bakterií růst v přítomnosti určitých cukrů,...

# Identifikace mutovaného genu u mutantní linie vybrané na základě fenotypového projevu



## ◎ na základě genetické mapy

### 1. mapování - (ko)segregační analýza

- › nalezení přibližné pozice genu v genetické mapě, na základě genové vazby s **genetickými markery** (znaky, které vykazují polymorfismus = jsou rozdílné mezi rodičovskými genotypy)

### 2. nalezení konkrétní sekvence nesoucí mutaci

- › **chromosom „walking“**
- › **sekvenace**, srovnání s WT sekvencí

# Typy genetických markerů



= znak se známou (snadno dohledatelnou) polohou v genetické mapě, který vykazuje polymorfismus (je rozdílný mezi rodičovskými genotypy)

## 1. Morfologické

## 2. Molekulární

- DNA markery – detekovatelné rozdíly v sekvenci
  - DNA se známou či určitelnou polohou v genomu
  - dobře detekovatelné lokusy se známou pozicí na chromozomu
  - jednonukleotidové polymorfismy (SNP)
  - ideálně co nejvíce a rovnoměrně rozmístěny

# Přirozená morfologická variabilita *Arabidopsis* – ekotypy „accessions“

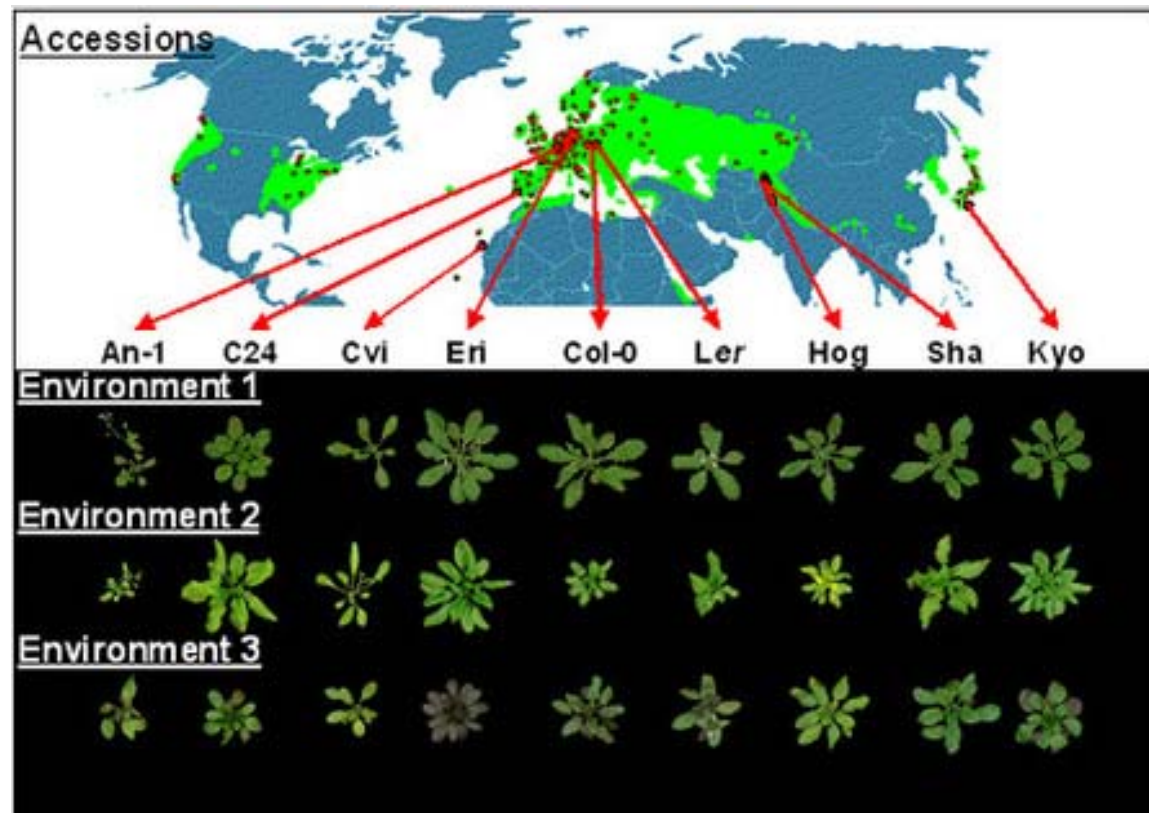


Fig. 1: Geographical distribution of *Arabidopsis thaliana* (green area on the world map) and overall phenotype of the rosette of a subset of accessions grown under 3 contrasted environment scenario.

<http://www.mpipz.mpg.de/102840/reymond>



# DNA molekulární markery (= proužek na elektroforéze či blotu)



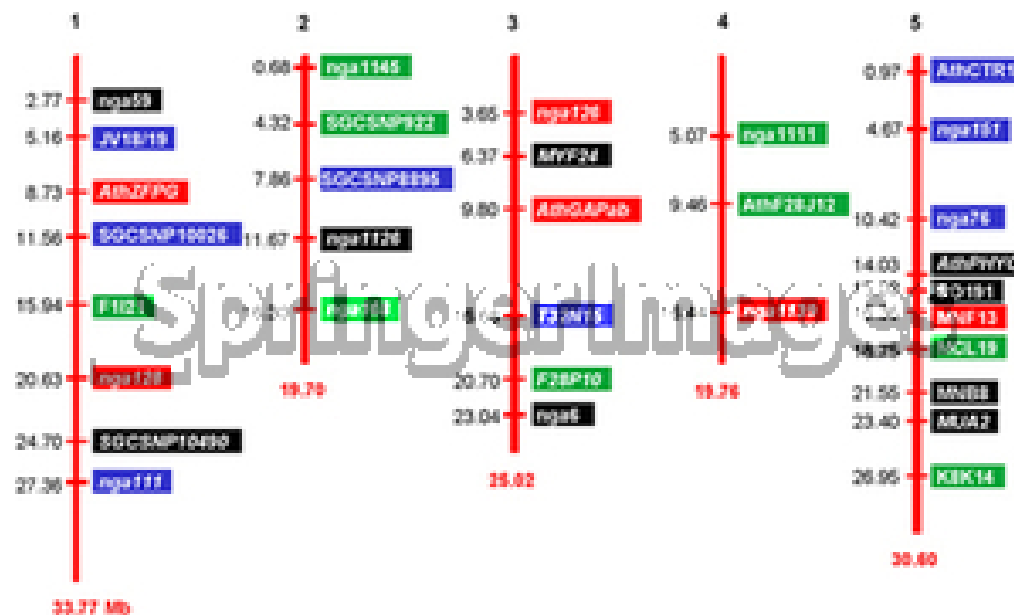
- ◎ SSLP (**S**imple **S**equence **L**ength **P**olymorphism)
  - > délka genu (PCR produktů) amplif. pomocí spec. primerů
- ◎ RFLP (**R**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism) + Southern
  - > délka restričních fragmentů úseku genu, PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů
- ◎ RAPD (**R**andom **a**mplified **p**olymorphism **d**etection)
  - > délka náhodně amplif. úseků genu (krátké primery 8-10bp)
- ◎ AFLP (**A**mplified **f**ragment **l**ength **p**olymorphism)
  - > délka fragmentů genu, PCR po naštěpení genomové DNA a ligaci adaptorů

Other Markers	Acronym
Variable Number Tandem Repeat	VNTR
Oligonucleotide Polymorphism	OP
Inverse Sequence-tagged Repeats	ISTR
Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism	IRAP

# DNA molekulární markery *Arabidopsis thaliana*



- křížení dvou jeho ekotypů: Columbia a Landsberg *erecta* (Col X Ler)
- rekombinační mapa obsahovala původně 67 markerů (Lister & Dean, 1993)
- dnes přes 1300 markerů (Hou et al, 2010)



*Arabidopsis thaliana* physical map with indication of the positions of the markers.

# Poziční klonování (*positional cloning, map-based cloning*)

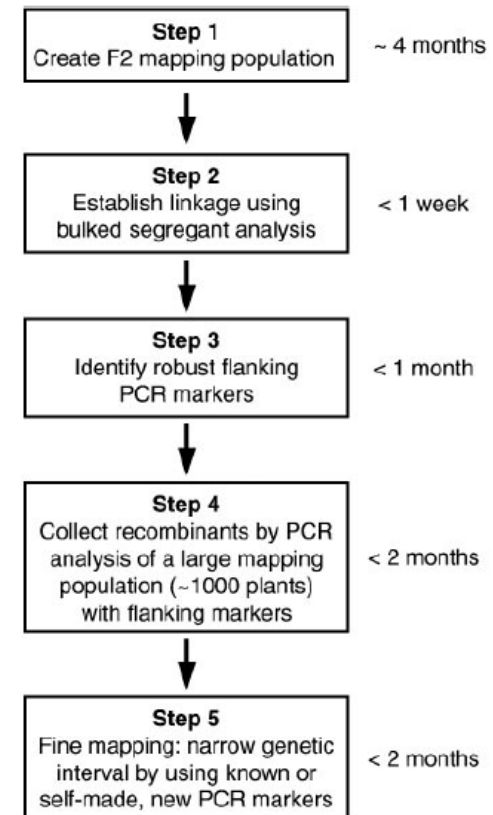


- izolace genu pouze na základě znalosti jeho **pozice na mapě**
- nemusí být známa funkce genu (mechanismus působení, biochemická, podstata produktu)
- mapování genu na základě jeho **genetické vazby s molekulárním markerem** a následnou izolaci tohoto genu díky známé pozici na chromozomu
- potřeba standardní linie, která je zkřížena s mutantní linií, aby mohla být provedena rekombinační analýza s markery
- **cíl pozičního klonování:**
  - gen s požadovanou mutací lokalizovaný v intervalu mezi dvěma nejbližšími markery
  - úsek dostatečně malý → vybrat kandidátní gen, v němž je pak možné různými způsoby identifikovat mutaci
  - obecně složité a časově náročné

# Poziční klonování - schéma



1. Křížení mutantní linie se standardní linií odlišného, genetického pozadí a vytvoření **segregující generace** (většinou F2) → mapovací populace
2. Přibližná lokalizace mutantního lokusu rekombinační analýzou s genetickými markery (20-30 rostlin)
  - > „bulk segregation analysis“
    - a) analýza směsi DNA všech vzorků z rostlin určitého fenotypu najednou pro jednotlivé markery → snížení množství potřebných PCR reakcí (Lukowitz et al., 2000)
    - b) stanovení vazby je multiplex PCR s použitím fluorescenčně značených primerů (všechny markery najednou u jednotlivých vzorků) (Ponce et al, 1999)

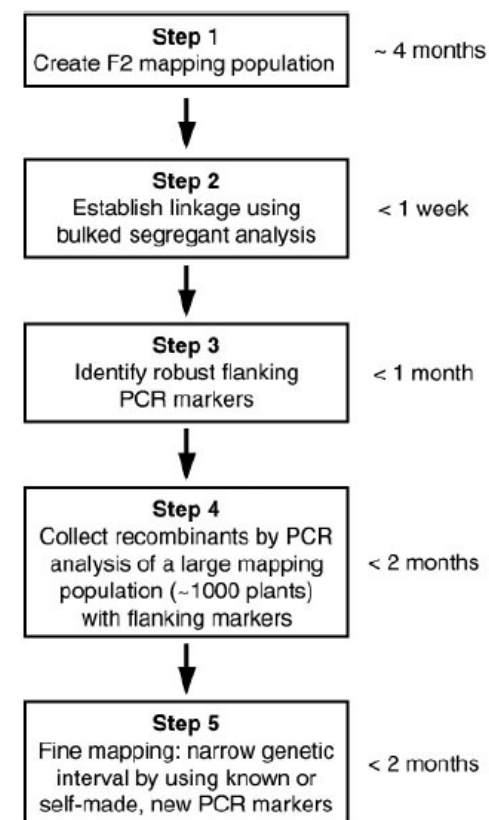


**Figure 2.** Procedure of a typical fine mapping experiment. The time that should be calculated to complete each of the steps, assuming no complications are encountered, is shown to the right.

# Poziční klonování - schéma



3. identifikace **dvou markerů** vzdálených od sebe **<10%** rekombinace a definující genetický interval obsahující mutaci (cca 100 rostlin)
  4. **rozšířená analýza markerů** (1000 rostlin) a selekce rostlin, kde došlo k rekombinaci
  5. rekombinační analýzy ke zúžení definované oblasti na interval **< 1%** rekombinace (250 kb)
- identifikace mutantního genu ve vymezené oblasti



**Figure 2.** Procedure of a typical fine mapping experiment. The time that should be calculated to complete each of the steps, assuming no complications are encountered, is shown to the right.

## ◎ **Arabidopsis**

- › mapa pozičně klonovaných genů obsahující 620 mutantních genů s fenotypovým projevem (Meinke et al, 2003)
- › počet genů *Arabidopsis* izolovaných metodou pozičního klonování každým rokem narůstá → objasnění dalších funkcí genů modelové rostliny

## ◎ **Pšenice (*Tritium aestivum*)- zemědělské plodiny**

- › molekulár.markery:
  - SSR (Simple Sequence Repeat)
  - SCAR (Sequence – Characterised Amplified Region)
- › izolování genů s markery komplikovanější – hexaploid
- › nedostatečná znalost genů kódujících zemědělsky užitečné znaky (zatím cca 20), např. plísňe a rezistence k nim

## ◎ **Geny chorob**

- › **Huntingtonova choroba** -je vzácné dědičné neurodegenerativní onemocnění mozku charakteristické nekoordinovanými trhavými pohyby těla a snížením mentálních schopností
- › **Cystická fibróza (CF)** je smrtelná lidská dědičná nemoc, která postihuje převážně dýchací a trávicí soustavu

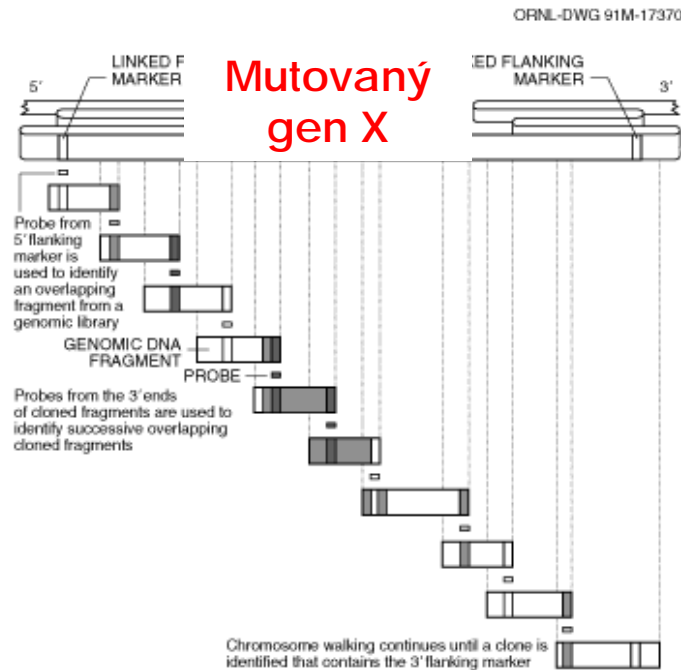
# Identifikace mutantního genu -

nalezení konkrétní sekvence nesoucí mutaci

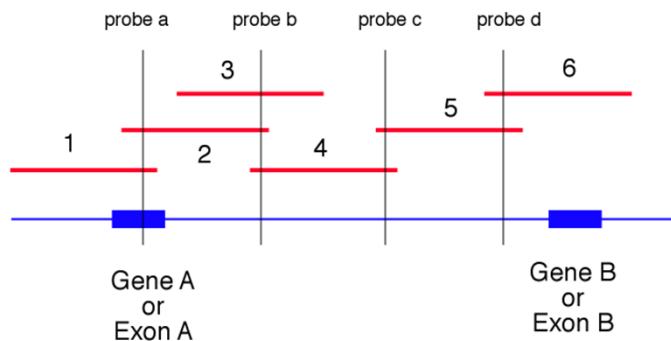


- ⊙ test na **alelismus**, tj. zkřížení testované mutantní linie s linií s „knock-out“ kandidátním genem a sledování, zda zůstane mutantní fenotyp
- ⊙ **molekulární komplementace** (u recesivních mutací)
  - > transformace mutantní rostliny sekvencemi standardní DNA z vymezeného úseku a určení, která obnoví standardní fenotyp
- ⊙ **analýza celé sekvence DNA vymezeného genetického intervalu** → hledat změny, které způsobily mutaci
  - > SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism)
  - > HMA (Heteroduplex Mobility Assay)
  - > DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
  - > dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography)
  - > hybridizace na čipech
  - > pyrosekvencování
  - > „chromosome walking“
- ⊙ **sekvenování**

# „Chromosome walking“



Walking from Gene A or Exon A to Gene B or Exon B



- nalezení optimálně dvou markerů obklopujících mutovaný gen
- knihovny velkých fragmentů genomové DNA (redundantní, náhodné):
  - YACs, BACs
  - = yeast (bacterial) arteficial chromosome, ~ 300 (100) kbp
- hledání překryvů na základě hybridizace koncové sekvence

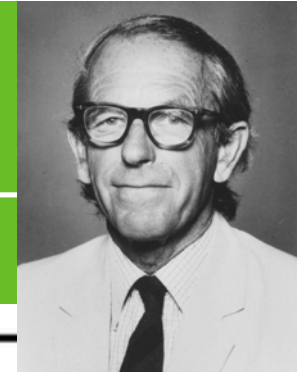
Genomic DNA is shown in blue. Selected clones from a library of cloned genomic DNA fragments are shown in red. The initial probe, probe a, is specific to gene A or exon A and allows identification of clones 1 and 2. A new probe, probe b, is prepared from one end of clone 2 and used to isolate new clones 3 and 4 from the genomic library. Probe c, prepared from clone 4 is used to identify clone 5, etc. The orientation of the clones is determined by restriction mapping of the clones. Clone 6 contains the desired gene B or exon B.



# Sekvenování - klasické - Sanger CEITEC

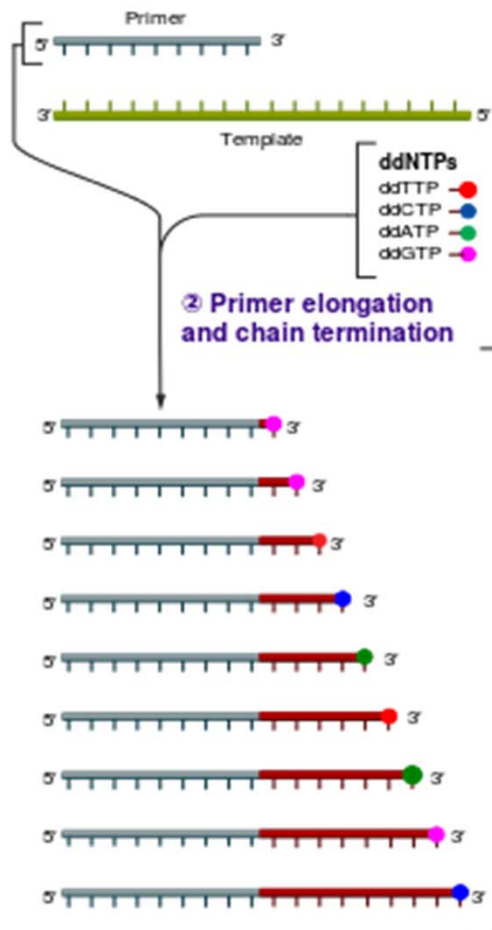
- ◎ enzymatická metoda je založena na sekvenaci pomocí **detekce ukončení prodlužujícího se vlákna DNA**
- ◎ sekvenaci předchází **příprava DNA knihovny**
  - > DNA sestřižena na kratší úseky
  - > naklonována do DNA vektorů
  - > amplifikována *in vivo* (v bakteriálních buňkách, ze kterých jsou plasmidy nesoucí klonované fragmenty následně extrahovány)
- ◎ sekvenace probíhá ve **čtyřech nezávislých reakcích**
- ◎ vznikají fragmenty DNA o různé délce zakončené značenými **dideoxynukleotidy**
- ◎ díky délce čtených úseků, které dosahují **700 až 800 bp** - stále **nejpoužívanější a nejpřesnější**

# Sekvenování - klasické - Sanger CEIT

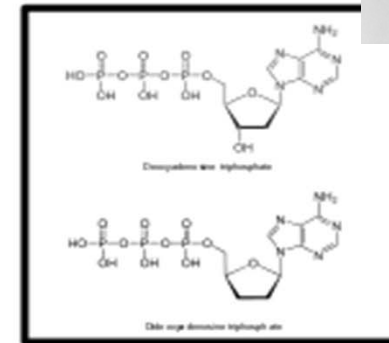


## ① Reaction mixture

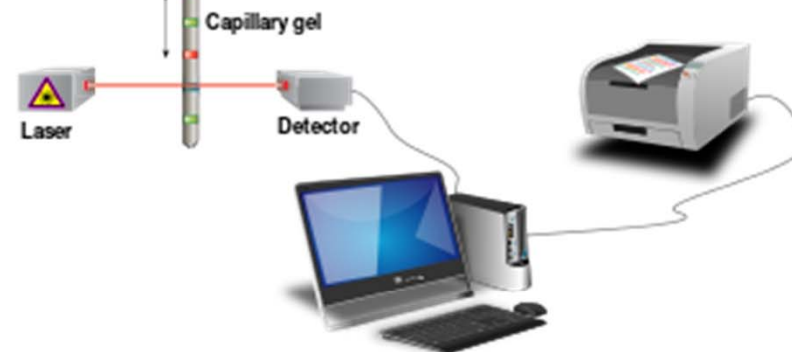
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



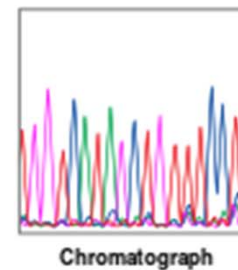
## ② Primer elongation and chain termination



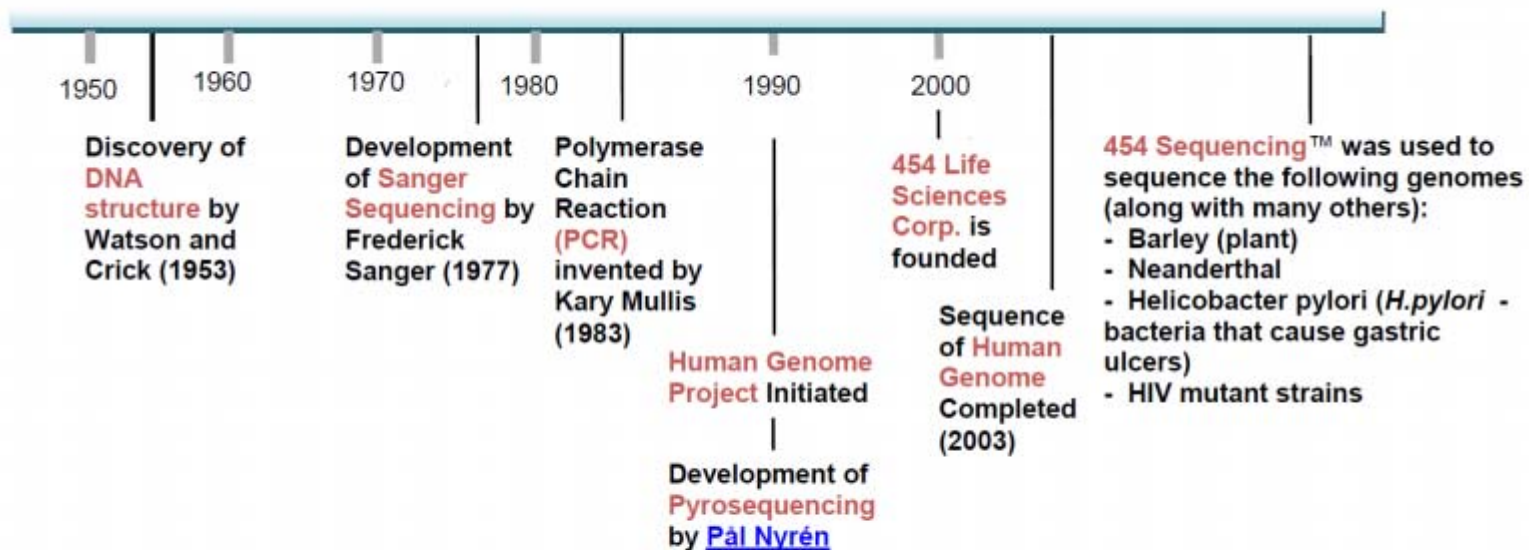
## ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



## ④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



## History of Genome Sequencing

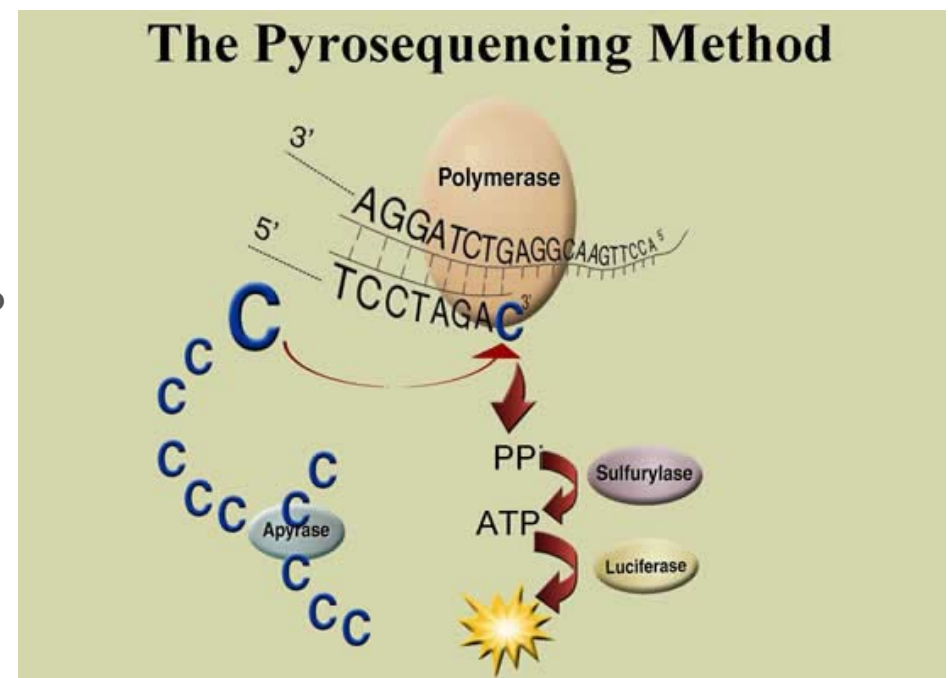


Source: U.S. Department of Energy Office of Science, Systems Biology for Energy and the Environment, Human Genome Project Information  
Base URL: <http://genomics.energy.gov/>

# Pyrosekvenace – „Next-generation sequencing“



- na sekvenaci syntézou komplementární DNA
- liší se způsobem, jak je **detekováno začlenění daného nukleotidu** -> nevyžaduje elfo
- vyvinul v roce 1996 ve Stockholmu profesor **Pål Nyrén** se svým studentem **Mostafou Ronaghi**
- Reakční směs:
  - DNA polymeráza, ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza;
  - substráty adenosinfosfosulfát a luciferin
  - do směsi jsou postupně vkládány nukleotidy různých typů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- **světelné záření** -> začlenění 1 nebo více nukleotidů do vznikajícího řetězce
  - světlo vzniká v důsledku enzymatické reakce, na jejímž začátku je uvolnění pyrofosfátu z nově začleněného nukleotidu a na jejímž konci je spotřeba vzniklého ATP luciferázou k oxidaci luciferinu
- před přidáním dalšího nukleotidu je původní nukleotid (již obsažený v roztoku) rozložen

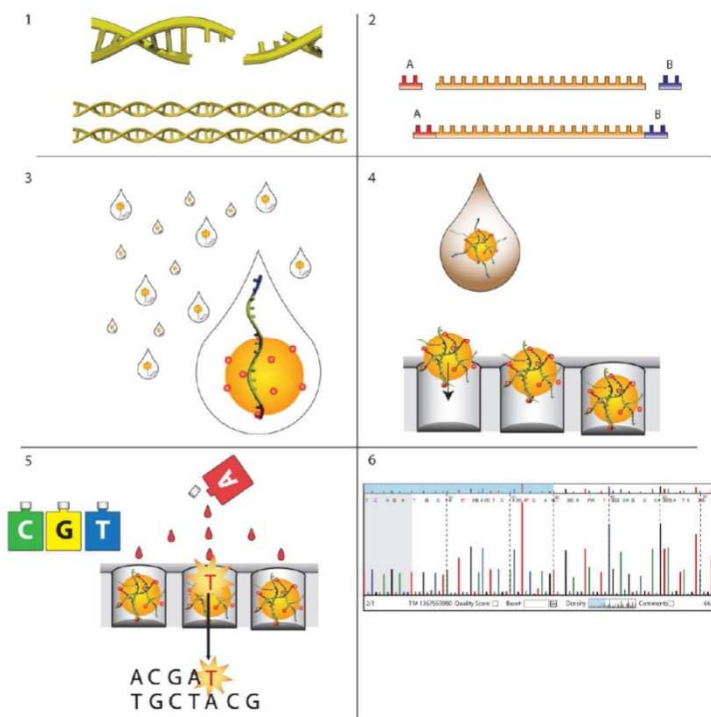


# „Next-generation sequencing“



## 454 - 2005

- emulzní PCR
- pyrosekvenování



## 454 Genome Sequencers

### FLX System

- 1 million of reads/run
- 400-650 bp/read
- 2 přístroje v ČR



### GS Junior

- 0.1 millions of reads/run
- 400 bp/read

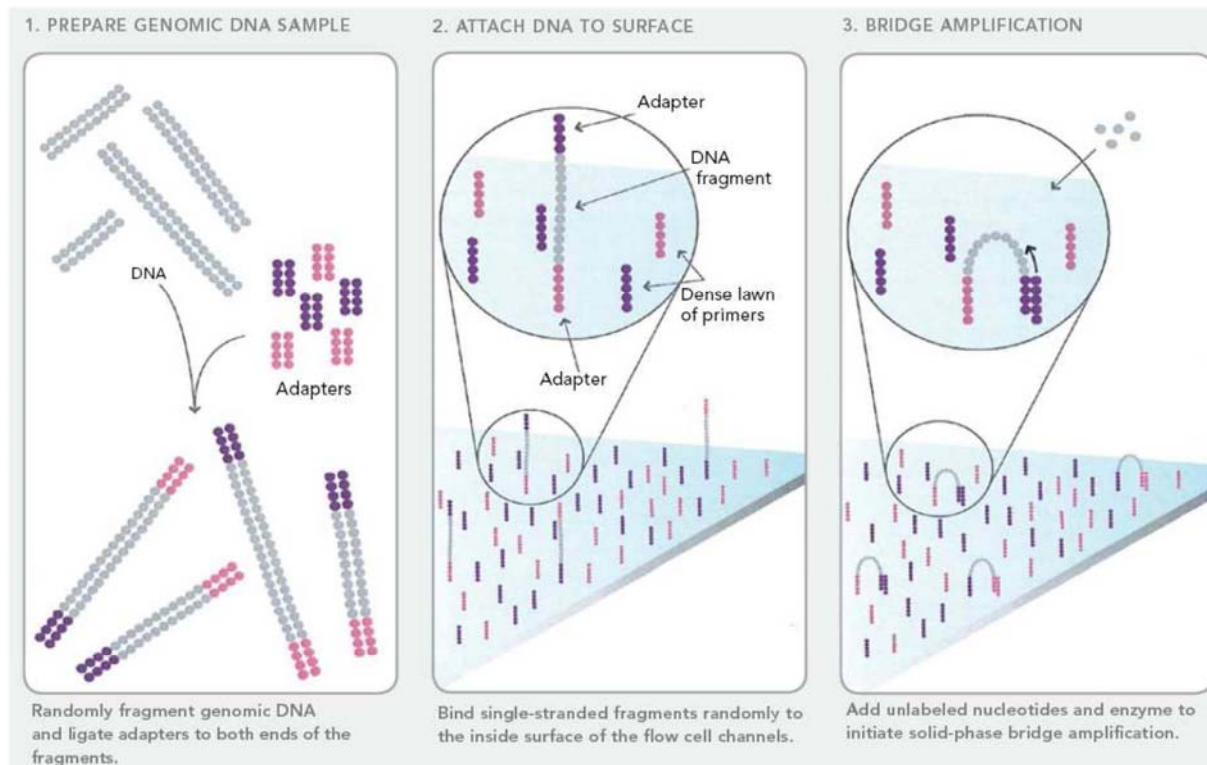
# „Next-generation sequencing“



## Solexa (Illumina) - 2007



- můstková „bridge“ PCR
- sekvenování pomocí DNA syntézy



# „Next-generation sequencing“

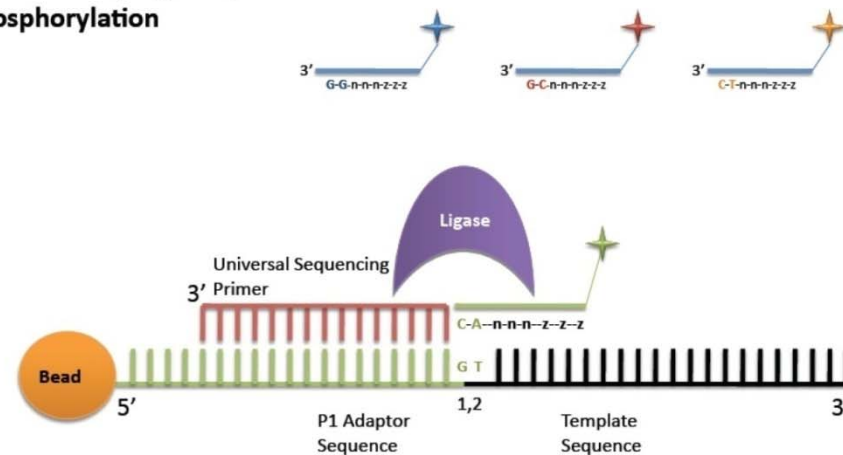


## SOLiD (2008)



- emulzní PCR,
- sekvenování pomocí ligace

First Cycle with primer 1-  
Hybridization, Ligation, de-  
Phosphorylation



# „Next-generation sequencing“



## Přehled současných metod sekvenování nové generace

Platform	Year	Sequencing Method	Amplification	Detection	Features
454	2005	Pyro-sequencing	Emulsion PCR	Light	First NGS
Illumina	2007	Synthesis	Bridge PCR	Light	90% of Market
SOLiD	2008	Ligation	Emulsion PCR	Light	Lowest Error Rate
Ion Torrent	2010	Synthesis	Emulsion PCR	Hydrogen Ion	Semiconductor Chip
Pacific Biosciences	2010	Synthesis	None = Single Molecule	Light	Anchored Polymerases
Oxford Nanopore	2012	Nanopore	None = Single Molecule	Electrical Conductivity	“Run Until” Sequencing

Modified from T. C. Glenn. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. Molecular Ecology Resources 11: 759-769.



# „Next-generation sequencing“



Instrument	Run time	Millions of Reads/run	Bases / read	Yield MB/run
3730xl (capillary)	2 hrs	0.000096	650	0.06
PacBio RS	2 hrs	0.01	860 – 1,500	5-10
454 GS Jr. Titanium	10 hrs	0.1	400	50
Ion Torrent – 314 chip	2.5 hrs	0.25	200	50
454 FLX Titanium	10 hrs	1	400	400
454 FLX+	20 hrs	1	650	650
Ion Torrent – 316 chip	3 hrs	1.6	200	320
Illumina MiSeq	26 hrs	4	150+150	1200
Ion Torrent – 318 chip	4.5 hrs	4	200	800
Illumina GAIIx	14 days	300	150+150	96,000
SOLiD – 5500xl	8 days	>1,410 <sup>d</sup>	75+35	155,100
Illumina HiSeq 1000	8.5 days	≤1500	100+100	≤300,000
Illumina HiSeq 2000	11.5 days	≤3000	100+100	≤600,000

2012. NGS Field Guide ([www.molecularecologist.com](http://www.molecularecologist.com))

# „Next-generation sequencing“



## Chybovost jednotlivých sekvenačních metod

Platform	Primary Errors	Single-pass Error Rate (%)	Final Error Rate (%)
3730xl (capillary)	Substitution	0.1-1	0.1-1
454	Indel	1	1
Illumina	Substitution	~0.1 (85% of reads)	~0.1 (85% of reads)
SOLiD	A-T bias	~5	≤0.1
Ion Torrent	Indel	~1	~1
PacBio RS	CG deletions	~15	≤15
Oxford Nanopore	Deletions	≥4	4

2012. NGS Field Guide ([www.molecularecologist.com](http://www.molecularecologist.com))

Mnohonásobné prosekvenování jednoho úseku DNA kompenzuje vyšší chybovost sekvenačních metod nové generace.

# Využití sekvenačních metod nové generace



## ◎ celé genomy

- › resekvenování → hledání sekvenčních variant v lidské populaci
- › *de novo* sekvenování → nemodelové organismy

## ◎ transkriptom (RNA-seq)

- › Identifikace dosud neznámých transkriptů
- › míra transkripce jednotlivých genů - přesnější než „microarrays“

## ◎ cílené → určitá část genomu, skupiny genů

- › náhodné oblasti genomu → na základě délky po restričním štěpení genomové DNA (RAD-seq)
- › hybridizace k cca 100bp prábám se vyberou fragmenty DNA, kt. se sekvenují (Hyb-seq)

# Využití sekvenačních metod nové generace

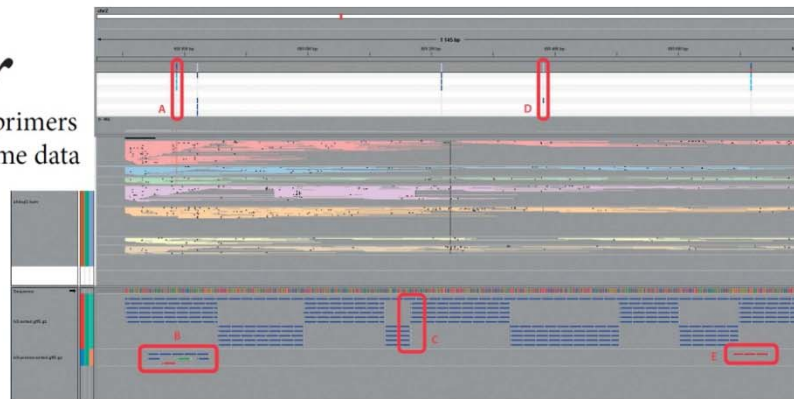


## Identifikace SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

- Sekvenování vzorků DNA pocházejících z mnoha jedinců.
- Vzorky lze individuálně tagovat - Multiplex Identifier Sequences (MIDs).
- Vhodné snížení komplexity
  - RNA-Seq (SNPs v kódujících oblastech)
  - RAD-Seq (SNPs v náhodných oblastech genomu, především nekódujících, větší variabilita)
  - Hyb-Seq (SNPs ve vybraných genech či genomové oblasti)



Libor Mořkovský,  
Katedra Zoologie, PřF UK



# Velkokapacitní náhodná mutageneze a „screening“



- systematická mutageneze –postupné
- EMS mutageneze
  - místo hledání urč. fenotypu (přímá), kdy se hledá gen zájmu se **změnami v nukleotidech**
  - běžně „screen“ 1000 nebo 10000 jedinců
  - využití PCR genu zájmu → hledání drobných změn v **migraci PCR produktu** na gelu či koloně
  - všechny změny nevyřadí („knockout“) gen, některé se neprojeví -„silent“, na neesenciálních AMK pozicích
  - metody běžně užívané:
    - **DHPLC** –“Denaturing High Performance Liquid Chromatography“
    - **DGGE** – „Denaturing Gradient Gel Electrophoresis“
    - **SSCP** – „Single-Stranded Conformation Polymorphism“

# Příklad využití EMS mutageneze (Feraru et al, 2010)



- A fluorescence imaging-based forward genetic screen“
  - As a tool for the screening to identify novel components of plant intracellular trafficking, they used a well characterized plant cargo, **the auxin efflux carrier PIN1** (Petrasek et al., 2006).
  - With this strategy, they aimed to identify novel regulators at different stages of subcellular protein trafficking.
  - **EMS-mutagenized PIN1pro:PIN1-GFP** (for green fluorescent protein) population using epifluorescent microscopy for seedlings displaying aberrant PIN1-GFP distribution in the root.
  - From 1500 M1 families, they identified several **protein affected trafficking (pat)** mutants defining three independent loci (mapping with simple sequence length polymorphism (SSLP) and cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS and dCAPS) markers
  - The At3G55480 candidate gene was sequenced and a point mutation that caused a stop codon was found at the position 705 downstream of ATG)

# Příklad využití EMS (Feraru et al, 2010)

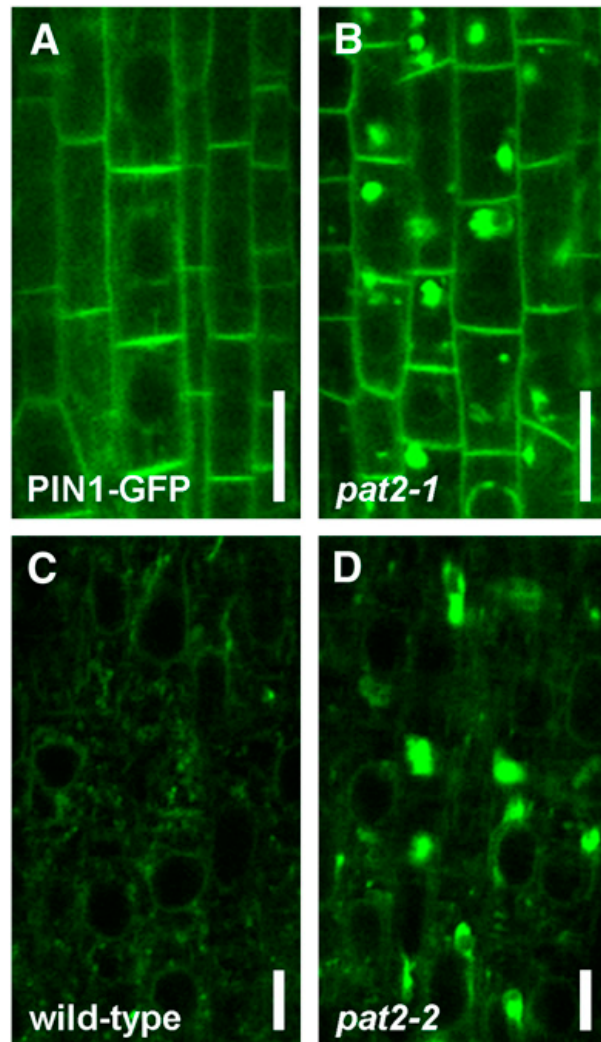


Figure 1. The *pat2* Mutant Displays Ectopic Intracellular Protein Accumulation.

(A) to (D) Both PIN1-GFP ([A] and [B]) and aleurain-GFP ([C] and [D]) accumulate intracellularly in *pat2-1* (B) or *pat2-2* (D) root cells compared with control ([A] and [C]).

- *pat2* mutant lytic vacuoles display altered morphology and accumulation of proteins
- unlike other mutants affecting the vacuole, *pat2* is specifically defective in the biogenesis, identity, and function of lytic vacuoles but shows normal sorting of proteins to storage vacuoles
- PAT2 encodes a putative b-subunit of adaptor protein complex 3 (AP-3)
- AP-3 b functions in mediating lytic vacuole performance and transition of storage into the lytic vacuoles independently of the main prevacuolar compartment-based trafficking route

# Nepřímá „reverse“ genetika



- dnes → post-genomická éra
- známe geny (sekvence)
- neznáme
  - funkce genů
    - většinou >50% predikovaných genů u eukaryot
  - fenotypy, které způsobí mutace v těchto genech



# TILLING

(Targeting induced local lesions in genomes)



- ◎ získání (nalezení) bodových mutací ve vybraném genu
- ◎ bodové mutace
  - > potenciální změny regulace, interakce, ...
- ◎ představena na ***Arabidopsis thaliana*** (McCallum et al, 2000)
- ◎ Princip
  - > náhodná indukce bodových mutací (EMS)
  - > následné hledání linií s mutací v cílovém genu pomocí PCR a heteroduplexní analýzy

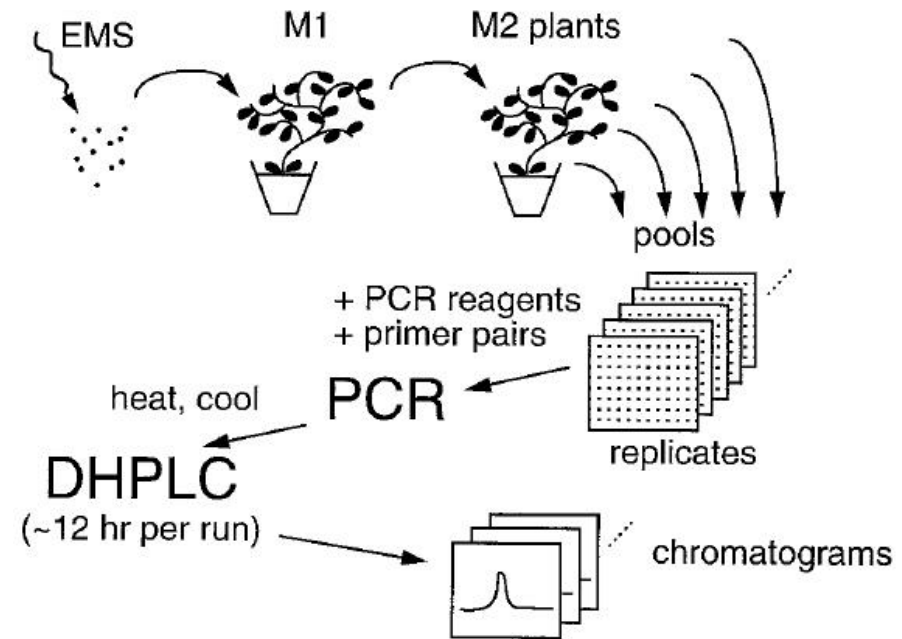


Figure 1. Schematic depicting the TILLING strategy applied to a plant such as *Arabidopsis*.

(McCallum et al, 2000)

# TILLING – detekce mutací, strategie

**1** Seeds are mutagenized to induce point mutations throughout the genome.



**2** A founder population is grown from mutagenized seeds.



**3** Founder population is self-fertilized to produce a crossed population.



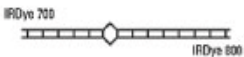
**4** Seeds from the crossed population are stored and DNA samples are collected in 96-well plates.



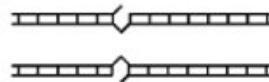
**5** Up to eight 96-well plates are pooled into one and the samples (768) subjected to PCR with two gene-specific primers labeled with different IRDye® infrared dyes.



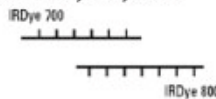
**6** Resulting amplicons are heated and cooled, resulting in heteroduplexes between wild type and mutant samples.



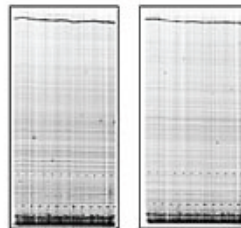
**7** CEL I nuclease is used to cleave at base mismatches.



**8** Samples are denatured and electrophoresed on a LI-COR 4300 DNA Analysis System.

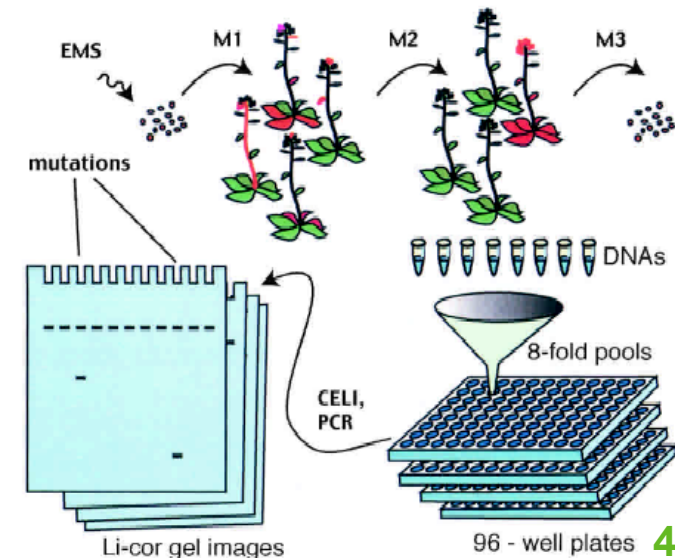


**9** In lanes that have a mutation in the pool, a band will be visible below the wild type band on the IRDye® 700 infrared dye image. A counterpart band will be visible in the same lane on the IRDye® 800 infrared dye image. This band is the cleavage product labeled with IRDye® 800 infrared dye from the complementary DNA strand. The sum of the length of the two counterpart bands is equal to the size of the amplicon, which makes it easy to distinguish mutations from amplification artifacts.



**10** After detection of a mutation in a pool (lane), the individual DNA samples in the pool are screened again to find out which of the eight pooled samples from the crossed population has the mutation.

- amplifikace cílového fragmentu (koncově značené primery)
- reasociace s wt DNA
- štěpení heteroduplexu (ss nuclease-CEL I)
- elektroforéza (separace podle velikosti na různých platformách; LI-COR)
- vizualizace koncově značených fragmentů



Metoda pracuje s amplifikovanými fragmenty o velikosti kolem 1 kb a mutaci je schopna analyzovat s přesností na 10 bp (Henikoff et al, 2004).

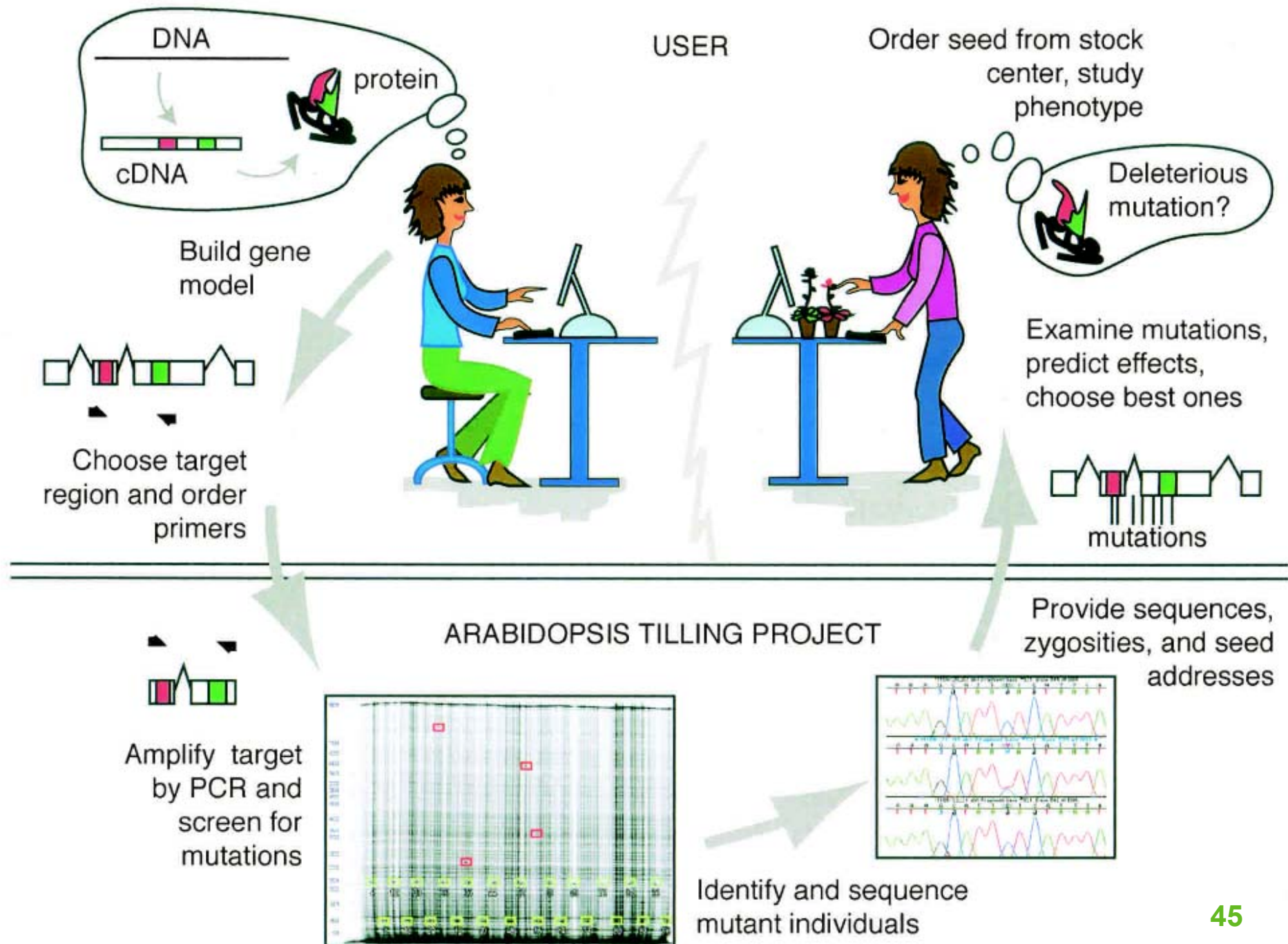
## ○ TILLING: A five step process

### 1. You decide whether your gene is worth TILLING.

- **"I have an insertion in my gene but the knockout phenotype is lethal."** ....TILLING can provide the sub-lethal phenotypes you want.
- ***"The knockout phenotype is interesting."***.....TILLING can provide an allelic series that may help you better ascertain the function of your gene.
- **"I have an insertion in my gene that knocks out gene function but my plants have no phenotype."**.....TILLING is not for you. In this scenario, a gain-of-function mutation is needed to investigate the potential *in vivo* role of this gene. The large majority of phenotypes arising from our populations will cause full or partial loss of function.
- ***"I have a candidate gene and I want to know the knockout phenotype."***....There are very good reasons why you should start by insertional mutagenesis rather than by TILLING. First, only a small percentage of EMS-induced mutations will yield a change likely to truncate the protein (~5%). Second, the Arabidopsis community has access to excellent insertional mutagenesis resources. Third, if a knockout mutation causes no phenotype, then the TILLING allelic series is not expected to either.

- TILLING: A five step process

2. You find the best the region to be targeted and place your order.
3. ATP screens the region for mutations.
4. ATP sequences the mutation and enters it in our public database.
5. ATP sends you a mutant report and you order seed.



# TILLING centres

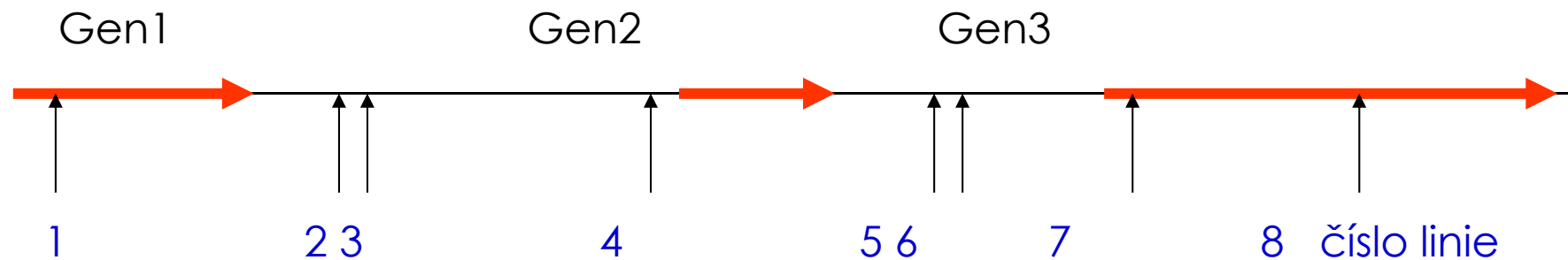


- Several TILLING centers exist over the world that focus on agriculturally important species:
  - Rice – UC Davis (USA)
  - Maize – Purdue University (USA)
  - *Brassica napus* – University of British Columbia (CA)
  - *Brassica rapa* – John Innes Centre (UK)
  - *Arabidopsis* – Fred Hutchinson Cancer Research
  - Soybean – Southern Illinois University (USA)
  - [Lotus and Medicago – John Innes Centre \(UK\)](#)
  - Wheat – UC Davis (USA)
  - Pea, Tomato - INRA (France)
  - Tomato - University of Hyderabad (India)

# Rostliny s inzercí v určitém genu



- veřejně dostupné kolekce mutantů na různých místech genomu
- inserce ve většině genů *Arabidopsis thaliana*
- výběr *in silico*, objednání semen rostlin s inzercí v určitém genu



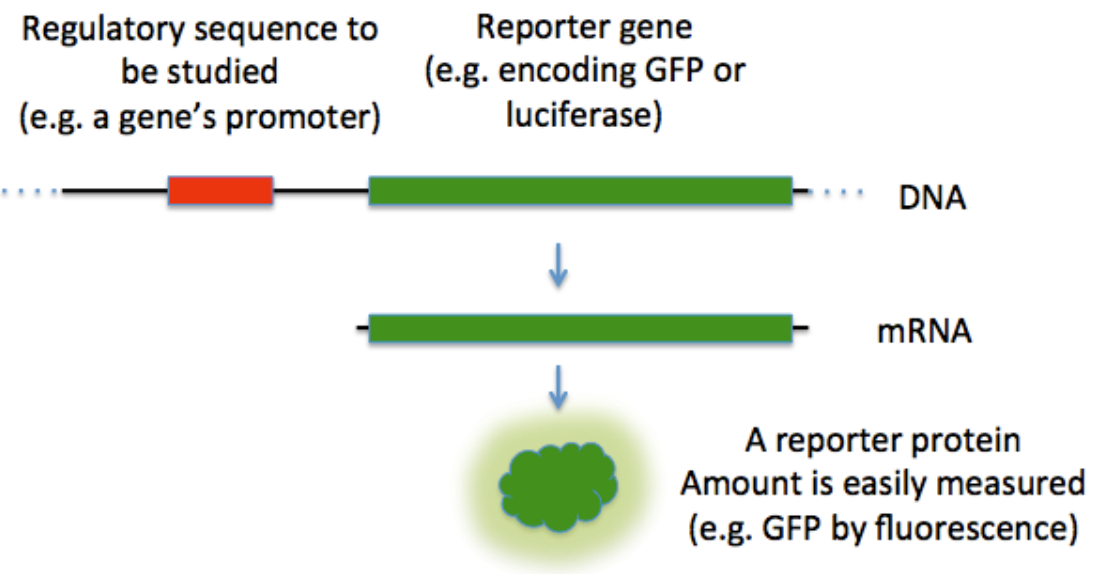
↑ = místa inserce T-DNA v jednotlivých mutantních liniích

# Reportérové geny



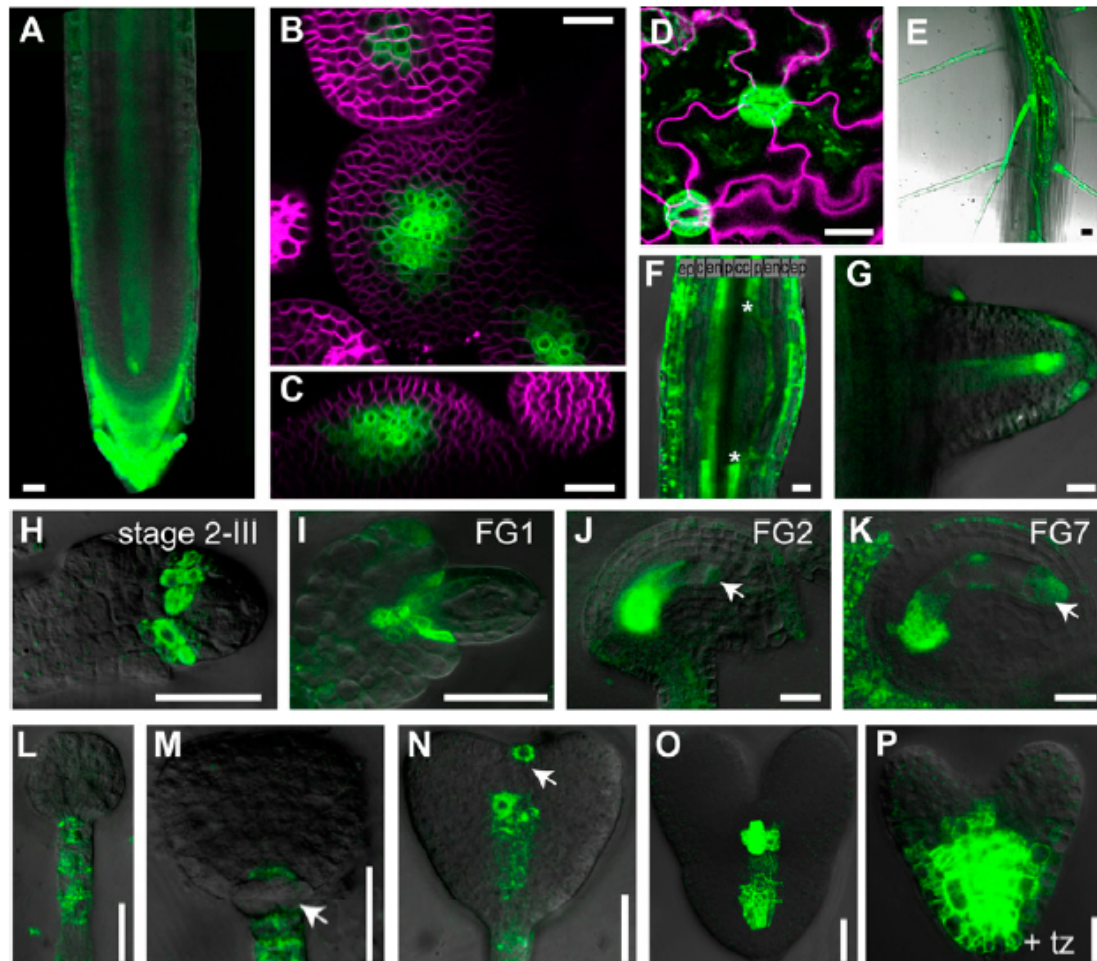
- gen připojený k regulač. sekvenci genu zájmu (bakterie, rostliny, živoč., buněč. kultury)
- reportéry – k detekci exprese genu v organismu, nemohou se přirozeně vyskytovat ve studovaném org.

- fluorescentní (GFP)
- $\beta$ -galactosidaza (GUS)



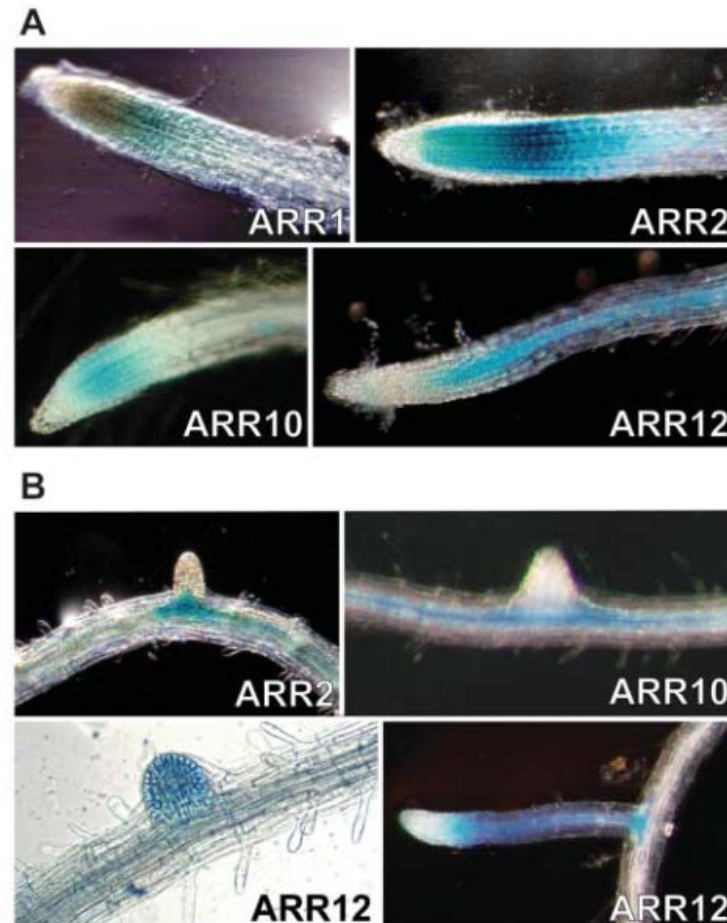


# TCS::GFP



**Figure 4.** *TCSn::GFP* expression in different developmental contexts. A, Primary root meristem of 5-d-old seedling. B, Top view of shoot apical meristem. C, Side view of shoot apical meristem. D, Pavement cells and guard cells. E, Primary seedling root with root hairs. F, Lateral root primordium, early stage. Asterisks delineate lateral root primordium founder cells of pericycle that down-regulate MSP output. G, Emerging lateral root primordium. H, Ovule primordium after first mitotic division of megaspore mother cell stages, according to Schneitz et al. (1995). I to K, Embryo sac, stages according to Christensen et al. (1997). Arrows denote faint GFP signal in nuclei of embryo sac. L to P, Embryos. L, Globular stage. M, Transition stage, arrow denotes down-regulation of GFP in basal cell lineage. N, Heart stage, arrow denotes transient signal in the prospective shoot meristem. O, Late heart stage. P, Late heart stage, overnight incubation with 10  $\mu$ M transzeatin. The signal from the membrane stain FM4-64 is shown in magenta. tz, Transzeatin; ep, epidermis; c, cortex; en, endodermis; p, pericycle cells; cc, central cylinder. Bars = 20  $\mu$ m.

# GUS systém



**Figure 5.** Histochemical localization of type-B ARRs in roots based on GUS reporter gene expression. **A**, Expression of ARR1, ARR2, ARR10, and ARR12 GUS-fusions in the root tip region. **B**, Expression of ARR2, ARR10, and ARR12 GUS-fusions at lateral root junctions.

(Mason et al, 2004)

# Děkuji za pozornost 😊



Central European Institute of Technology  
c/o Masaryk University  
Žerotínovo nám. 9  
601 77 Brno, Czech Republic

[www.ceitec.eu](http://www.ceitec.eu) | [info@ceitec.cz](mailto:info@ceitec.cz)



EUROPEAN UNION  
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND  
INVESTING IN YOUR FUTURE



OP Research and  
Development for Innovation

This work was supported by the Program of „Employment of Newly Graduated Doctors of Science for Scientific Excellence“ (grant number CZ.1.07/2.3.00/30.0009) co-financed from European Social Fund and the state budget of the Czech Republic.

