

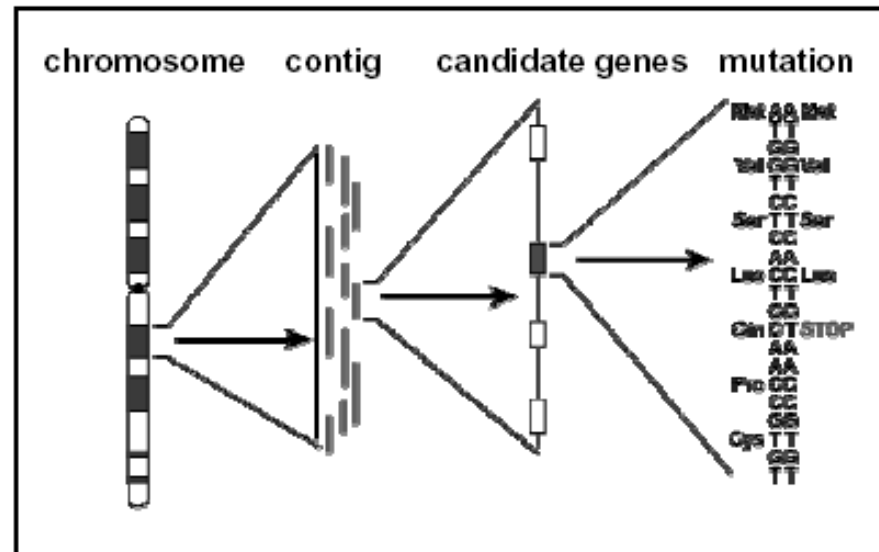
Lo studio della funzione dei geni

Forward and Reverse Genetics

- Forward genetics starts with identification of interesting mutants
 - Then aims to discover the function of genes defective in mutants
- Reverse genetics starts with a known gene and alters its function
 - Then aims to determine the role of the gene from the effects on the organism

From Phenotype to Gene

- Once an interesting mutant is found and characterized, we want to find the gene in which the mutation occurred
- Positional cloning
 - First use genetic mapping
 - Then use chromosome walking



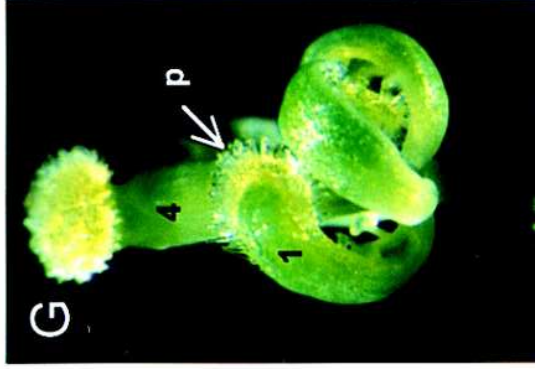
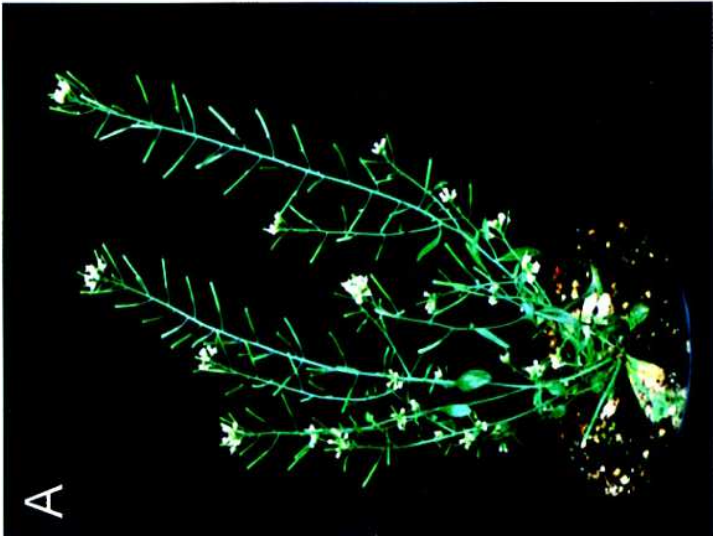
Buchanan et al: Cap 7 par. 7.1.5 , 7.2, 7.2.6

Basics of Forward Genetics

- Forward genetics usually starts with *mutagenesis* of an organism
 - Can use chemicals
 - e.g., ethyl methyl sulfonate (EMS)
 - often used in Arabidopsis
 - Can use radiation
 - e.g., X rays
 - Can use gene tagging
 - e.g., transposon tagging or T-DNA tagging
 - often used in Arabidopsis and maize
- Then *screen progeny* of mutagenized individuals for phenotypes of interest

6

Buchanan et al. 18.2.4 e Fig. 18.17

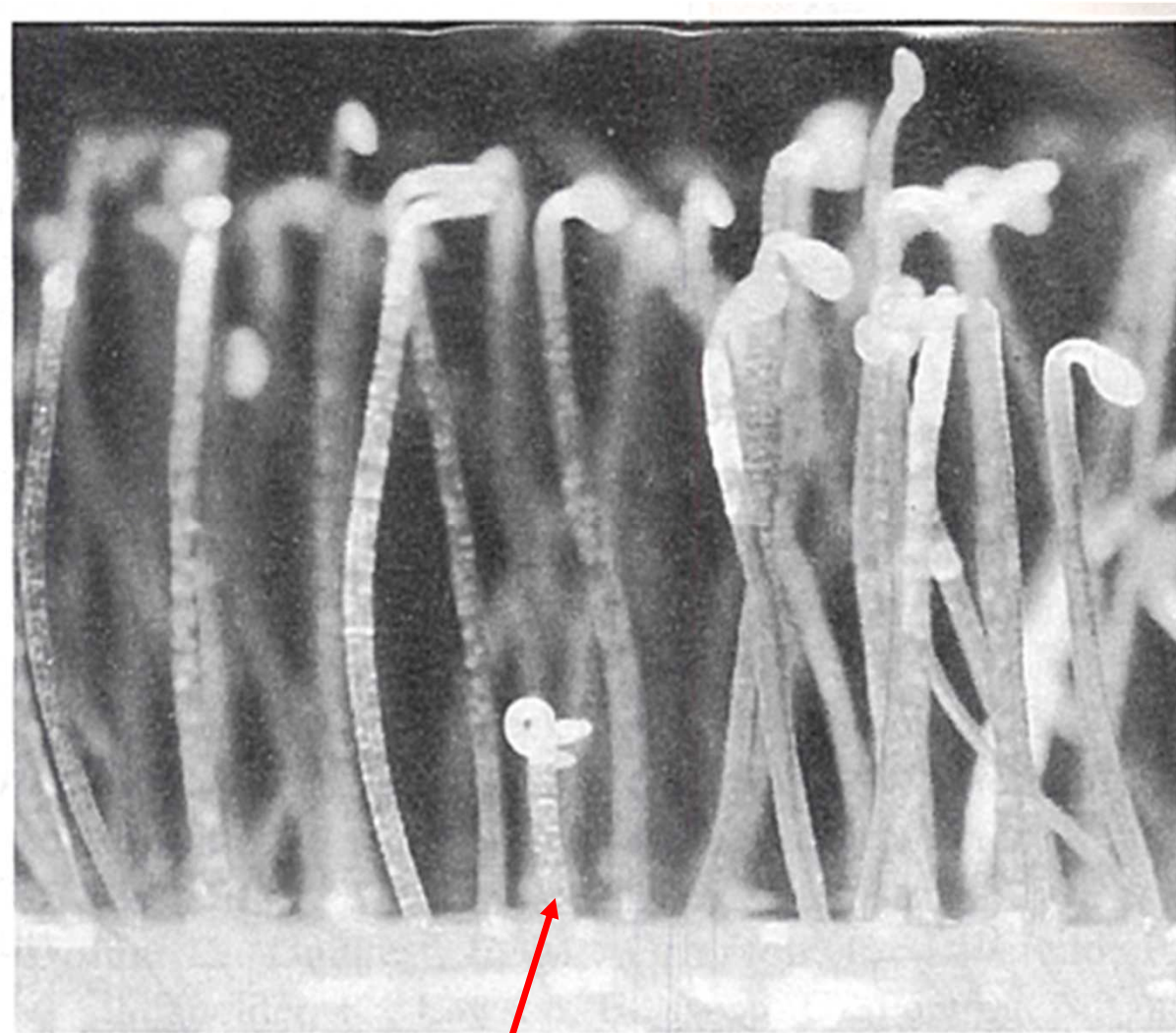


Recettori dell'etilene sono stati clonati per
isolamento di mutanti etilene -insensibili

(A)



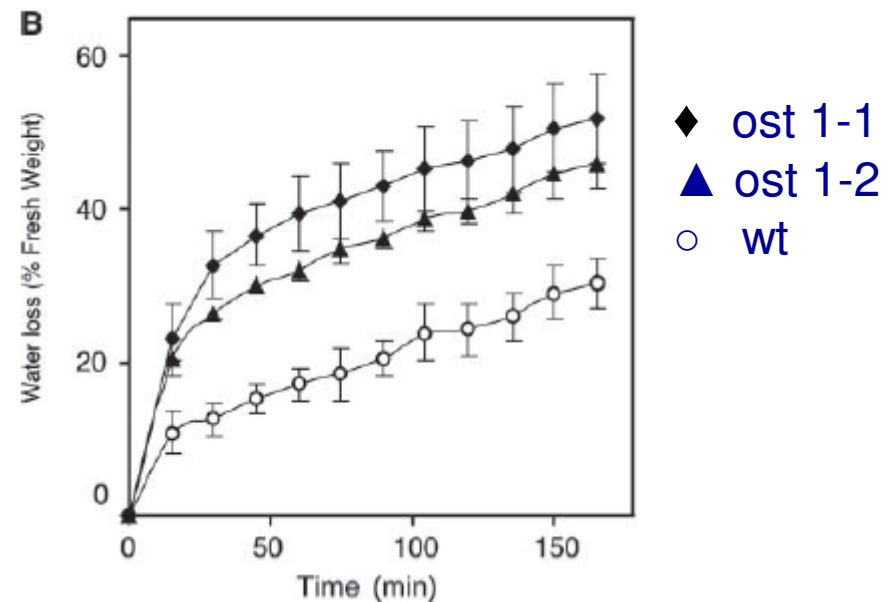
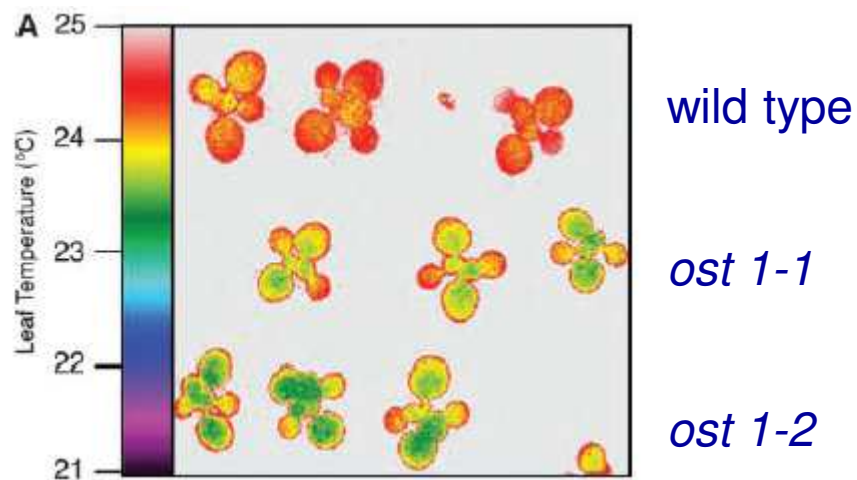
Isolamento di mutanti che presentano tripla risposta costitutiva (anche in assenza di etilene) ha permesso di identificare un regolatore negativo nella via di trasduzione



ctr1: constitutive triple response

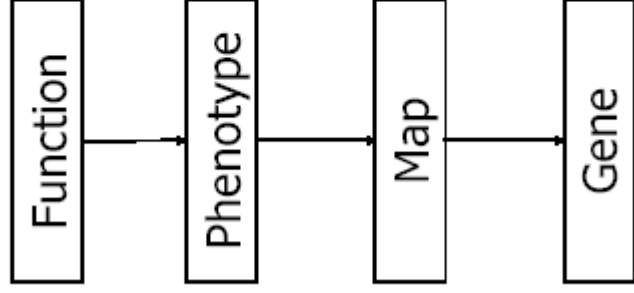
Un sistema per isolare mutanti (*ost1*)

- Popolazione mutagenizzata con etil metansulfonato
- Stress idrico
- Analisi mediante termografia infrarossa
- Selezione dei mutanti



I mutanti *ost1* sono difettivi nella regolazione della traspirazione sotto stress idrico

'Forward Genetics'

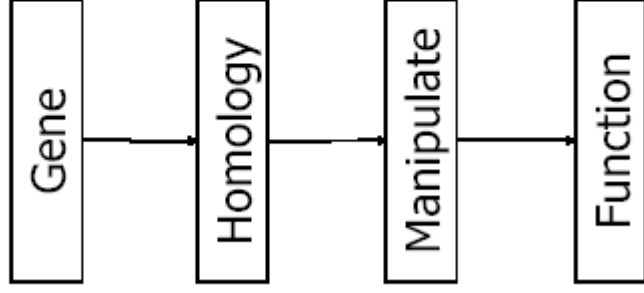


- Know a function, and want to find the gene
- Phenotype
 - mutants, ecotypes
- Find the gene
 - mapping with molecular markers, tagged mutants, positional cloning
- Clone the gene
- Manipulate the gene
 - overexpression, silencing, altered patterns of expression, complementation
- Transform plants (i.e. move genes into plants)
 - *Agrobacterium*
 - gene Gun
 - viruses

Drawbacks of Forward Genetics

- Breeding must be possible
- You need a screenable phenotype
 - Easy with visible phenotypes
 - growth, color, development
 - not easy with metabolism
 - impossible for „essential genes“ (defects of which would be lethal)
- You need a dense genetic map and markers closely associated with the phenotype
 - Good for Arabidopsis, Maize, Rice
 - Not established for many tropical plants, hops (*Humulus lupulus*) and other speciality crops
- Access to genomic library (YAC, BAC) required for cloning the gene

'Reverse Genetics'



- Know a gene
 - genome sequence, EST etc
 - and want to discover function
 - Manipulate the gene
 - and do as for forward genetics
- BUT
- Need to know roughly what to look for in phenotype (guess by homology)
 - But no idea of function of 30% of Arabidopsis genes
 - Need gene not to have function covered by another gene
 - Multigene families (37% of Arabidopsis genes in families of >5 genes)

FORWARD GENETICS

Quale gene mutato corrisponde ad un determinato fenotipo?

Fenotipo —————> Gene

REVERSE GENETICS

Quale fenotipo corrisponde ad un determinato gene?

Fenotipo <———— Gene






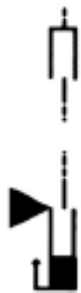
Per entrambi gli approcci è importante
generare una collezione di mutanti

Il T-DNA di *Agrobacterium* è stato utilizzato per generare collezioni di mutanti inserzionali

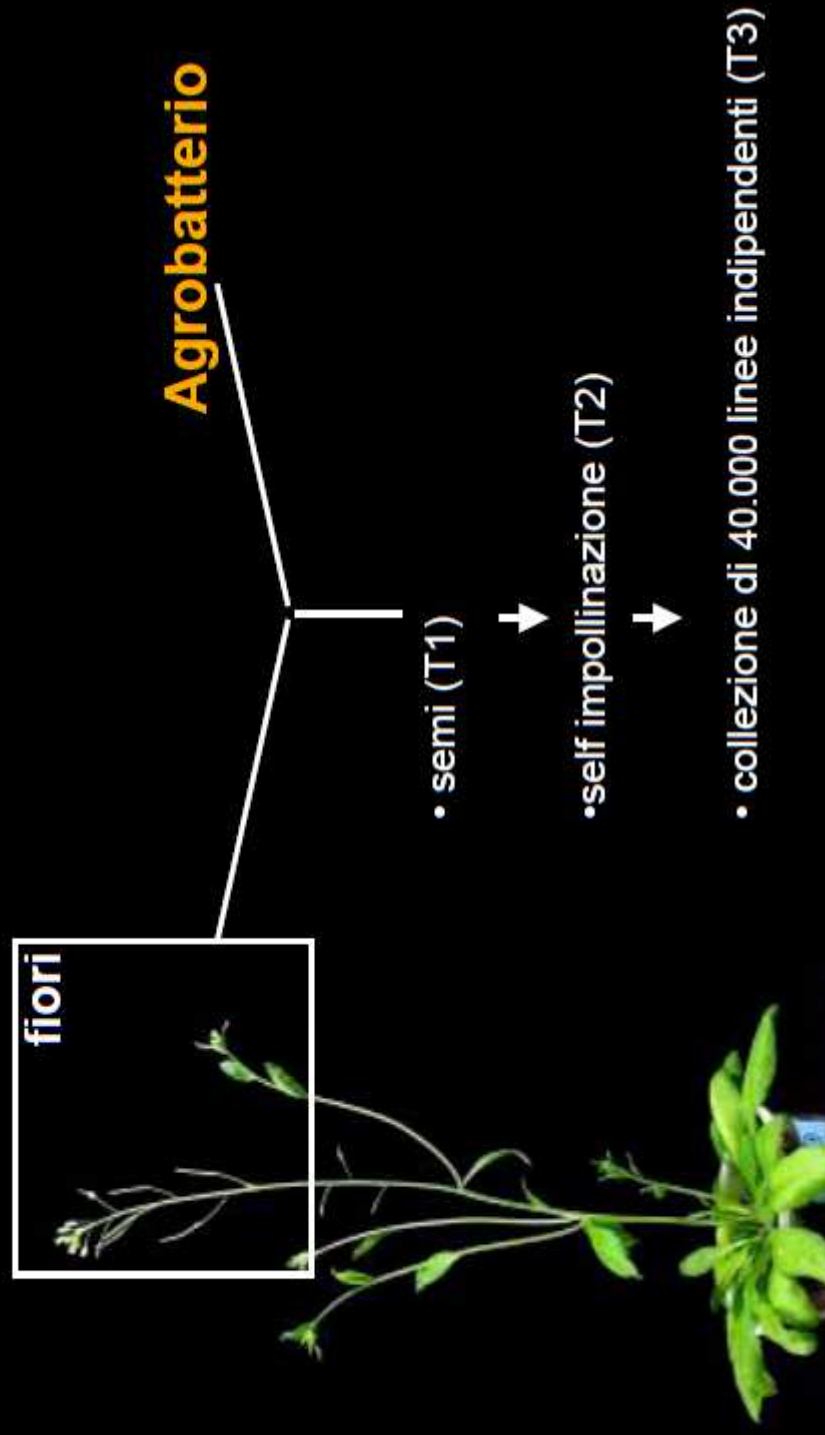
- Il T-DNA si integra in maniera **casuale** all'interno del genoma della cellula vegetale...
.. permettendo la generazione di knock-outs



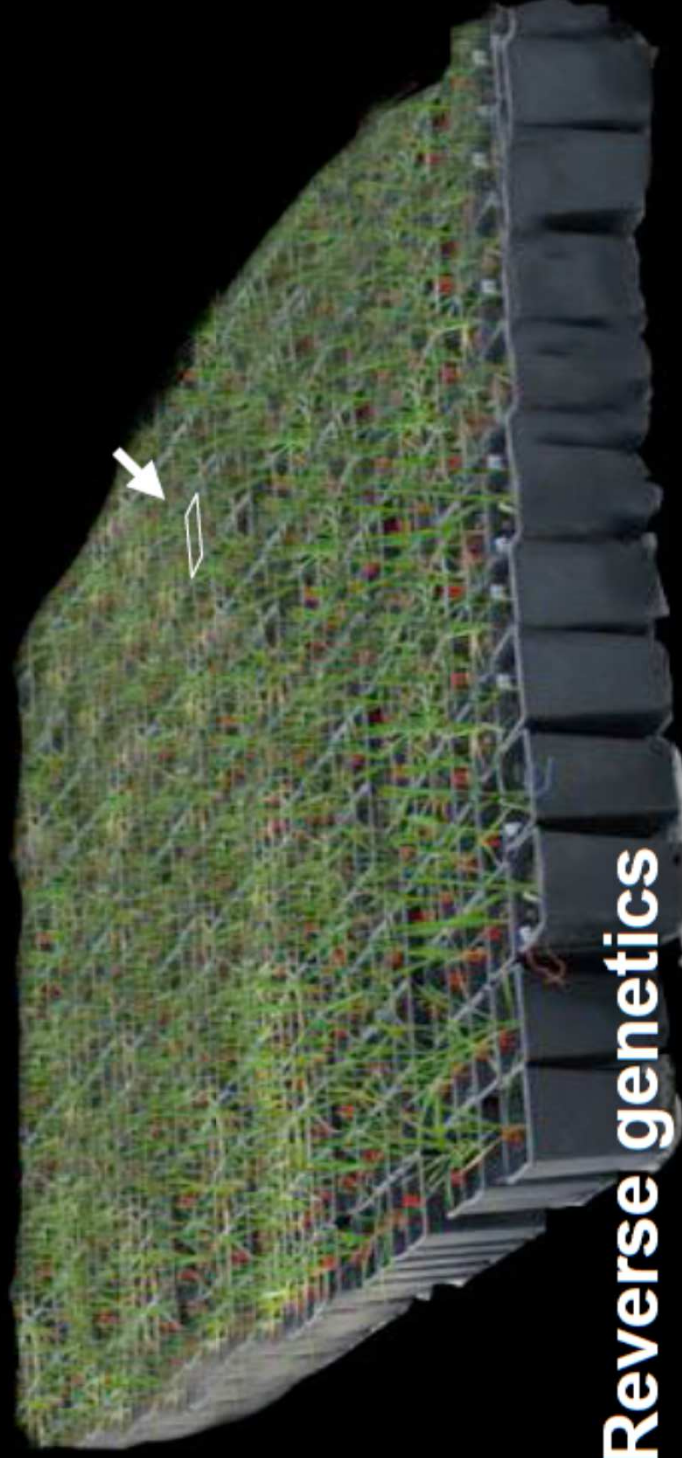
- L'**integrazione è stabile** per un buon numero di generazioni
- Inserzioni singole o più inserzioni (testa testa, testa coda o coda-coda)

Name	Location	Result
 <i>Knock-out</i>	coding region or promoter	null
 <i>Knock-down</i>	promoter or 3' UTR	reduced expression
^{35S}  <i>Knock-on</i>	promoter	increased expression
 <i>Knock-about</i>	coding region	not null
 <i>Knock-knock</i>	coding region or promoter	multiple KOs in one plant
 <i>Knock-worst</i>	coding region or promoter	chromosomal rearrangement

Cellule di **Agrobatterio** contenenti il **T-DNA** ingegnerizzato vengono utilizzate per generare una popolazione di piante transgeniche (floral dip)



Collezione di mutanti inserzionali



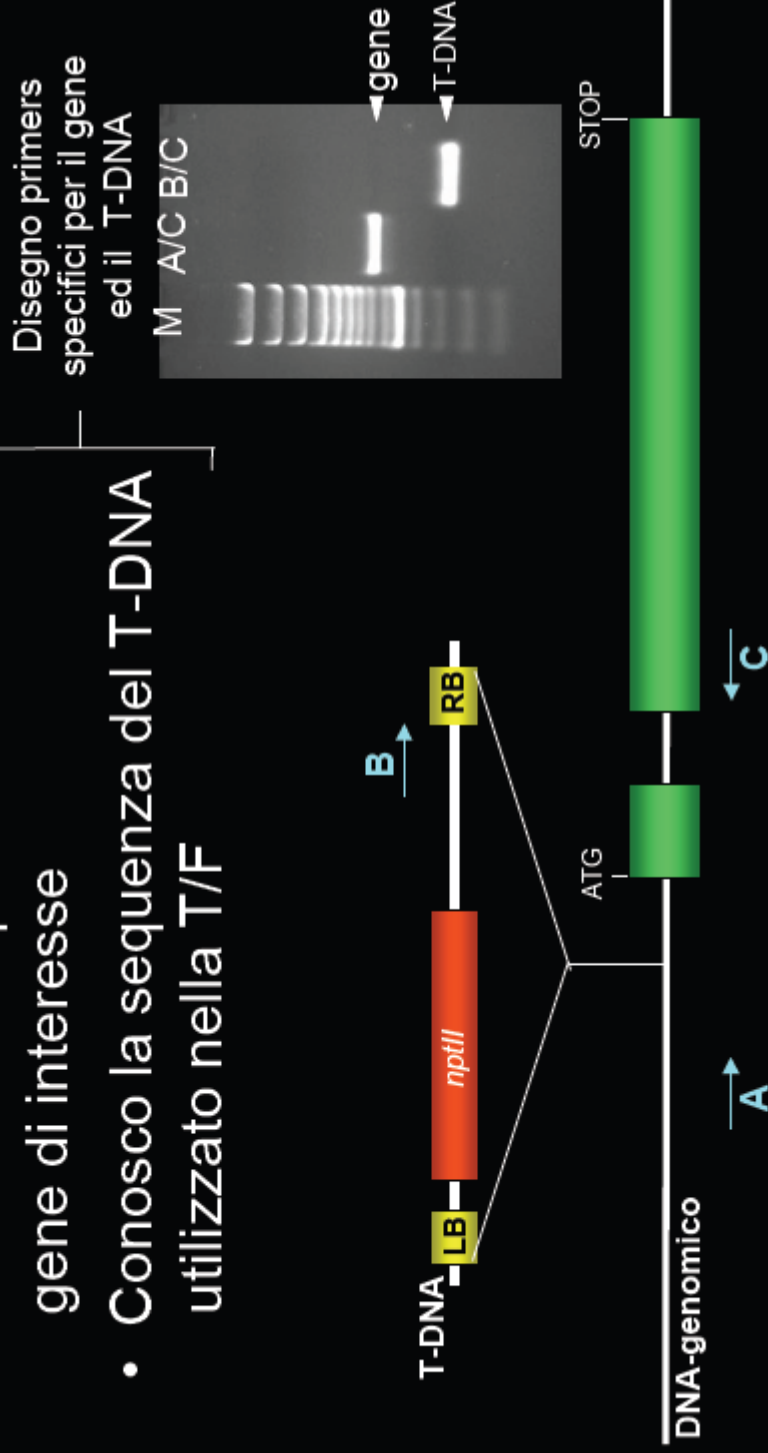
Reverse genetics

Qual'è il fenotipo associato ad un determinato gene?

ovvero devo identificare il mutante corrispondente
ad un determinato gene

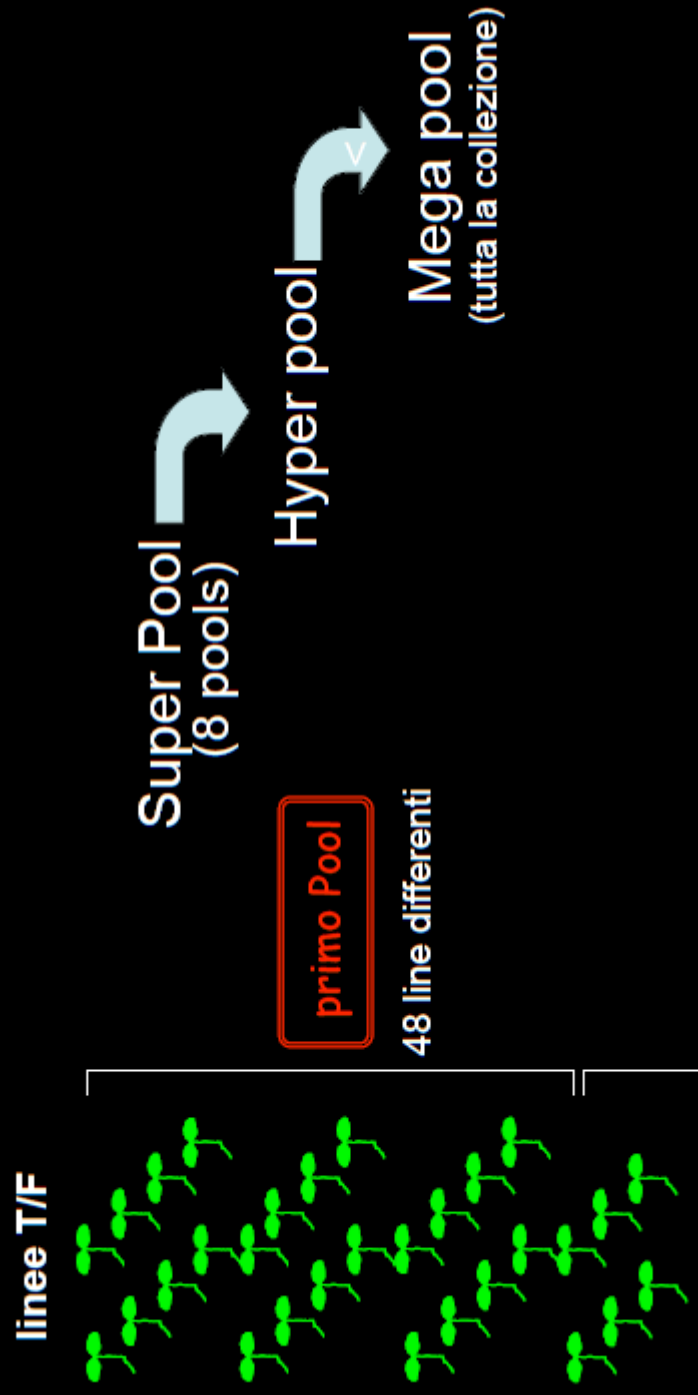
Approccio di Genetica Inversa:

- Conosco la sequenza del mio gene di interesse
- Conosco la sequenza del T-DNA utilizzato nella T/F



A+C = sequenza genomica B+C = sequenza T-DNA/genomica

Per facilitare lo screening per PCR la collezione di mutanti è stata suddivisa in pools (gruppi)



Si estrae il DNA dai pools e si analizza per PCR

prima PCR sul Mega pool

Risposta

SI

c'è una linea con
l'inserzione nel mio gene



PCR nei diversi ordini di pooling
fino ad identificare 1 tra le
48 linee del primo pool



NO

nessuna linea con
l'inserzione nel mio gene

Procedura utilizzata fino al 2000

La disponibilità della sequenza del genoma di *Arabidopsis* ha permesso di mappare sul genoma tutte le inserzioni



Tail-PCR e sequenziamento del DNA vicino al sito di inserzione



Ricerca omologia sul DNA genomico



Organizzazione in banche dati

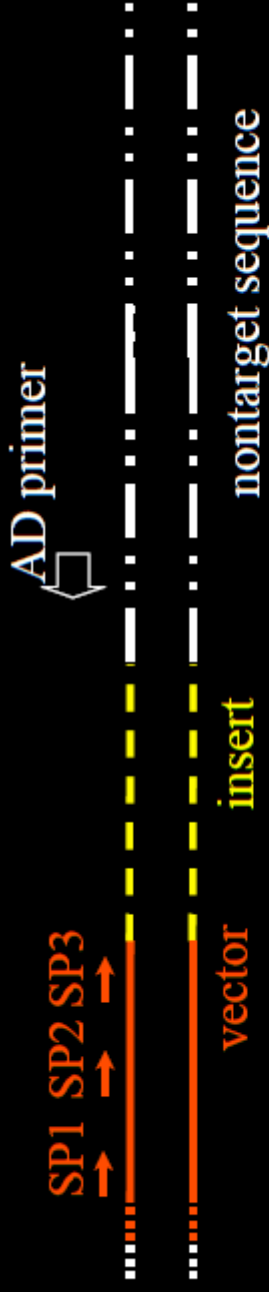
Per *Arabidopsis* il SALK raccoglie i risultati di più collezioni di mutanti (SAIL, Wisc) e la distribuzione è gratuita

<http://signal.salk.edu/about.html>

Primer Design for TAIL-PCR

- Specific primer (SP)
 - Nested sequence specific primer complementary to vector sequence
 - High melting temperature, $T_m = 58-63^\circ\text{C}$
- Arbitrary degenerate (AD) primer
 - Relatively shorter
 - Lower melting temperature, $T_m = 47-48^\circ\text{C}$

TAIL-PCR scheme



(A) Primary PCR with SP1 and AD

(B) Secondary PCR with SP2 and AD

(C) Tertiary PCR with SP3 and AD

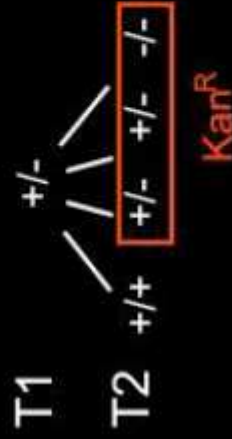


Agarose gel analysis

Direct sequencing

La T/F con *Agrobacterium* ha una efficienza media di 1,5 inserzioni di T-DNA per linea

Più inserzioni nella mia linea?

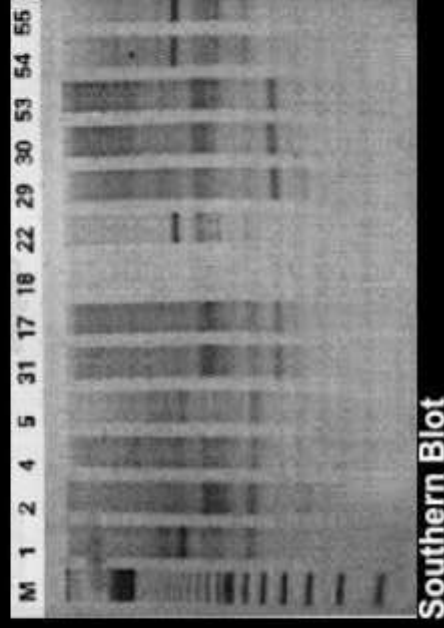


- = Allele selvatico
- = T-DNA

• in loci differenti

Rapporti di segregazione di linee eterozigoti sulla resistenza e Southern

• nello stesso locus Southern



➔ Analisi del pattern di bande

Southern Blot

Se ci sono più inserzioni in loci differenti si incrocia
la linea mutante con la rispettiva linea selvatica
(reincrocio)



Finchè non trovo un rapporto di segregazione di 3:1

**Un esempio:
un mutante inserzionale della
collezione del SALK**



SIGnAL

Salk Institute Genomic Analysis Laboratory

Funded by the National Science Foundation



T-DNA Express: Arabidopsis Gene Mapping Tool (May. 7, 2008)

1. Search : [?]

Type:	<input type="text" value="Gene"/>	Query:	<input type="text" value="At5g42350"/>
Chr:	<input type="text" value="chr1"/>	Posn:	<input type="text"/>
Display:	<input type="text" value="Graphy"/>	<input type="text" value="Search"/>	<input type="text" value="Clear"/>

2. iSect Tool : [?]

3. Data Source :

- a. [Data Source, Detail and Summary.](#)
- b. [Gene Expression Atlas Data Source.](#)
- c. [Data Release Policy.](#)
- d. [FAQs.](#)

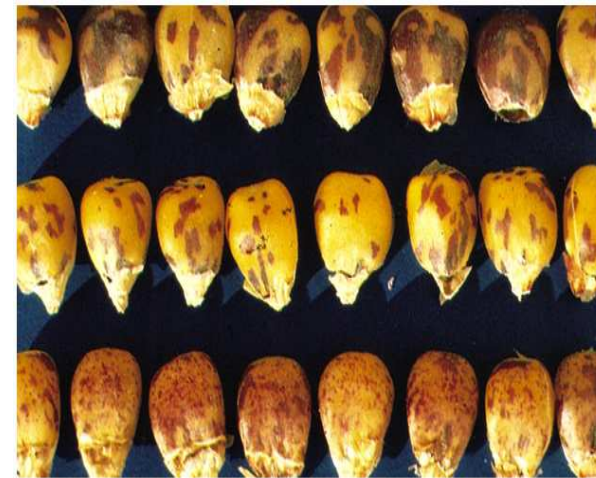
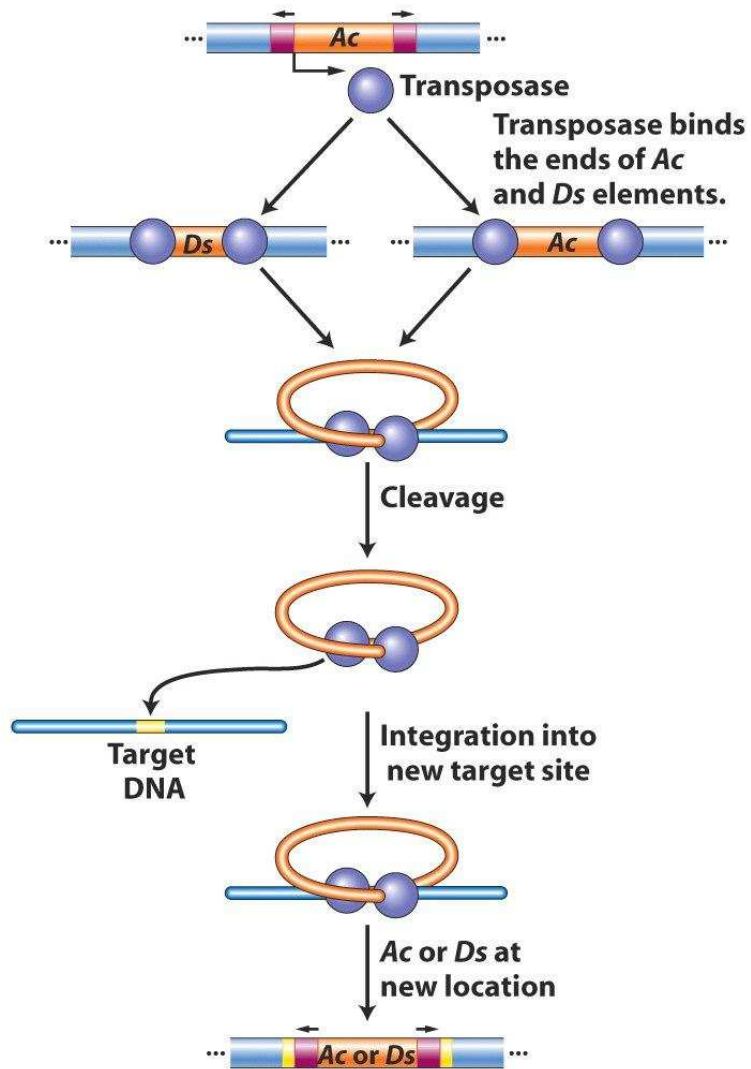
- Analisi del rapporto di segregazione
- Identificazione della linea omozigote per l'inserzione
- RT-PCR per determinare i livelli di trascrizione del gene
(K.O. ?)
- Analisi del fenotipo
- Ipotesi successiva

MUTAGENESI TRAMITE TRASPOSONI

Esempio: il sistema Ac/Ds
(Activator/Dissociator)

Due linee transgeniche, che recano una l'elemento Ac e l'altra l'elemento Ds vengono incrociate.

Nella progenie la TRASPOSASI Ac mobilizza l'elemento Ds, generando piante F1 che sono MOSAICI GENETICI (Barbara McClintock)



MUTAGENESI TRAMITE TRASPOSONI

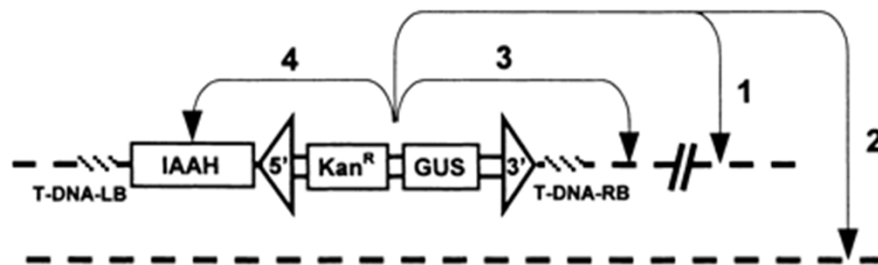
Gli elementi Ds traspongono preferibilmente in siti vicini al sito donatore, per cui le linee sono disegnate in modo da permettere:

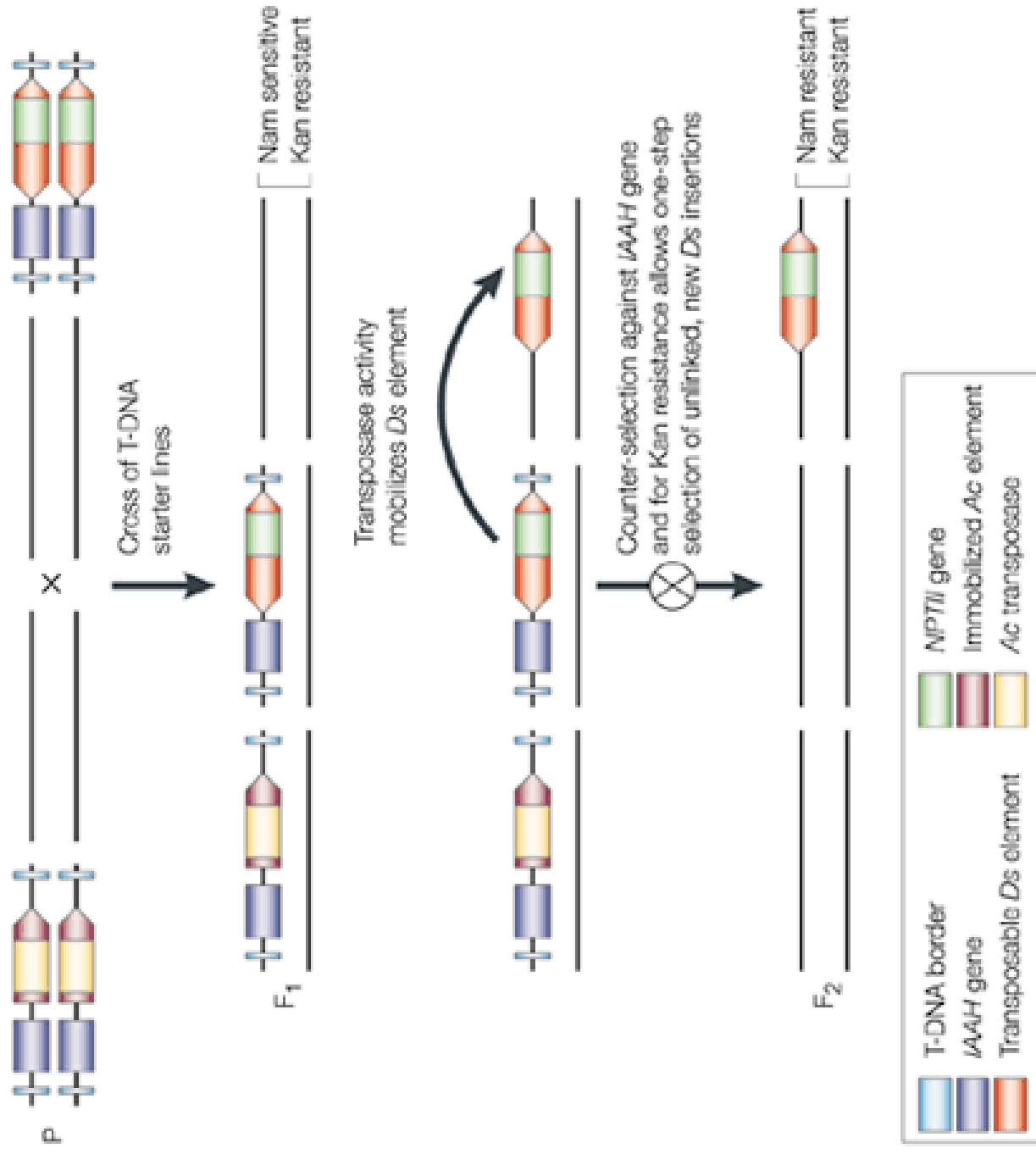
- a) la selezione positiva per la presenza di Ds originati da nuove trasposizioni
- b) la selezione negativa contro Ac e contro il locus Ds donatore.

Il T-DNA che contiene Ac reca anche il gene per l'indolacetammide idrolasi (IAAH), che conferisce sensibilità al naftalene acetammide (NAM).

L'elemento Ds porta il gene NPTII (resistenza alla kanamicina)

Il T-DNA per l'elemento Ds donatore porta anche il gene IAAH, in modo da selezionare contro la presenza del Ds trasposto vicino al Ds donatore.

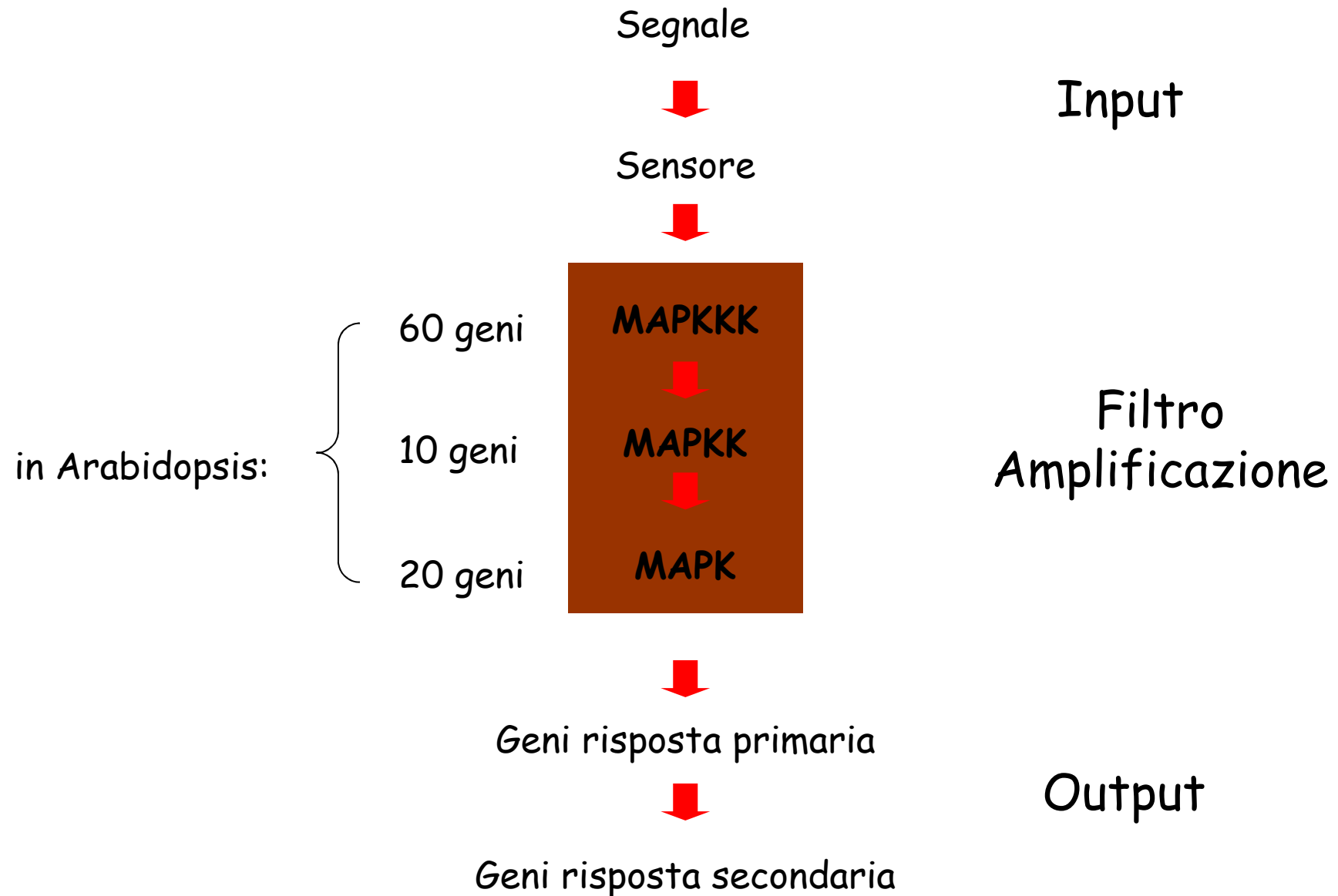




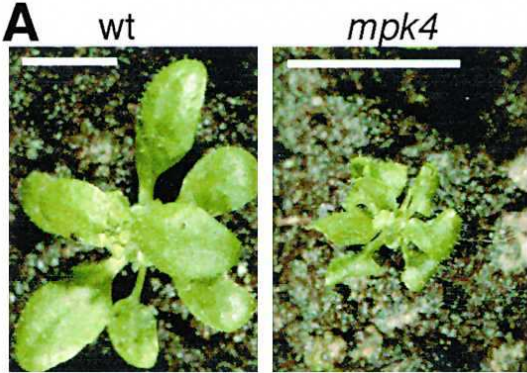
VANTAGGI DELLA MUTAGENESI TRAMITE TRASPOSONI

- 1) La mutazione è reversibile: in presenza della trasposasi, il trasposone può escindersi nuovamente dal locus mutagenizzato, ripristinando il locus WT e confermando che il fenotipo è legato all'inserzione
- 2) Poiché gli eventi di trasposizione avvengono preferibilmente vicino al sito donatore, si può utilizzare questa strategia per effettuare mutagenesi mirate su determinate regioni cromosomiche

Mitogen Activated Protein (MAP) chinasi



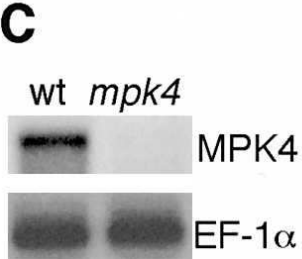
UNA MUTAZIONE NELLA MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE MPK4 DI ARABIDOPSIS



Petersen et al. Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell. 2000 Dec 22;103(7):1111-20

B

	6479		6458
<i>wt</i>	GTGTTGATAAT		TGTTGATCAGT
<i>mpk4</i>	GTGTTGATAAT	-Ds-	TTGATAATTGTTGATCAGT
Rev	GTGTTGATAA		ATGATAATTGTTGATCAGT



Ulteriori approcci in Reverse Genetics

Potrei avere informazioni sul profilo di espressione del gene mutato ?

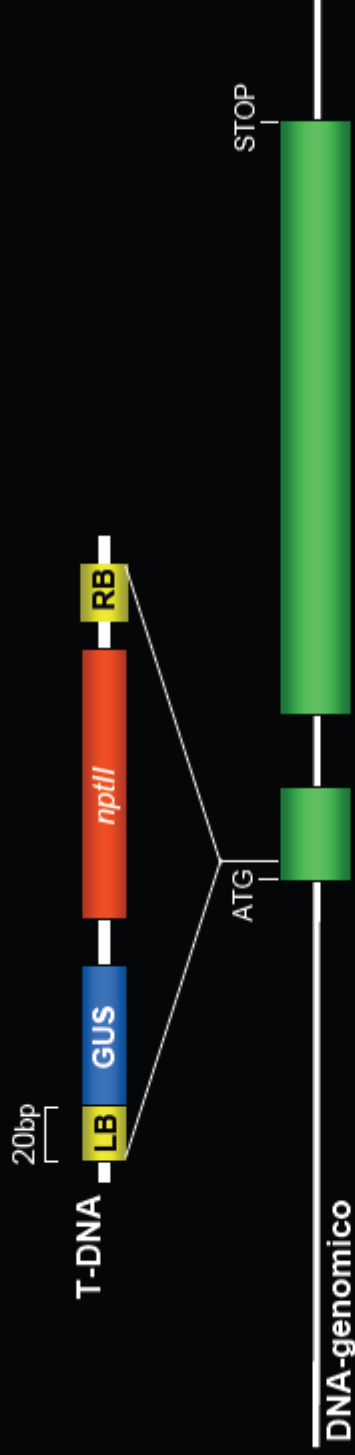
(Promoter ed Enhancer trap)

Potrei trovare un modo per studiare i geni funzionalmente ridondanti i cui mutanti corrispondenti non hanno fenotipo ?

(Activation tagging)

Che utilità ha mettere un gene reporter
(GUS) all'interno del T-DNA?

T-DNA modificato come promoter trap:



La regione del promotore regolerà
l'espressione del gene reporter

Le proteine codificate dal gene reporter non
sono tossiche per l'organismo

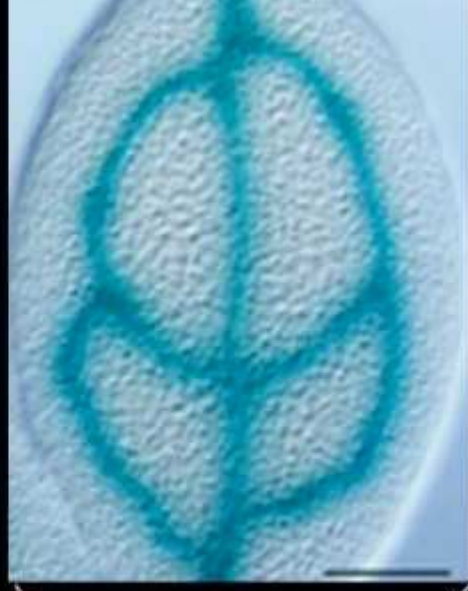
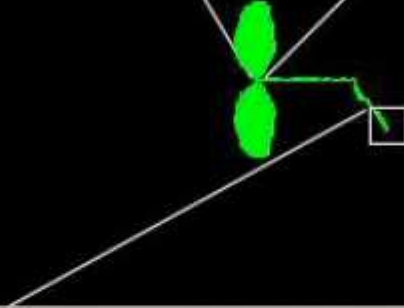
Meristema radicale



Tessuto vascolare

Esempi di linee **promoter trap**

- La linea è un mutante per il gene
- Conosco anche i tessuti in cui andare a cercare un fenotipo

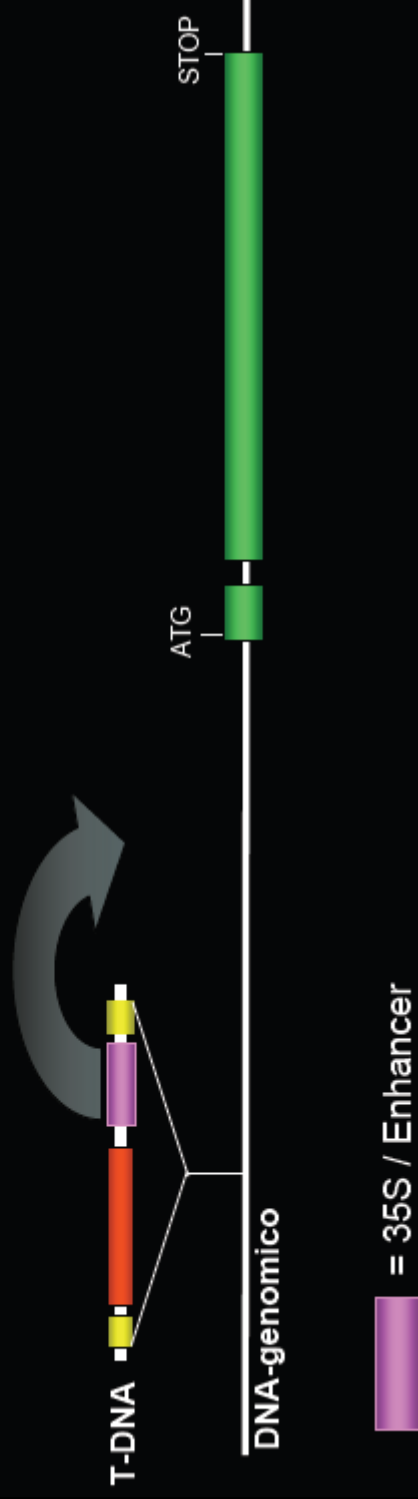


Cotiledone

Come studio i geni funzionalmente ridondanti i cui mutanti corrispondenti non hanno fenotipo ?

1. **incrocio i singoli mutanti loss-of -function tra loro**
2. **Activation tagging (il T-DNA come attivatore)**

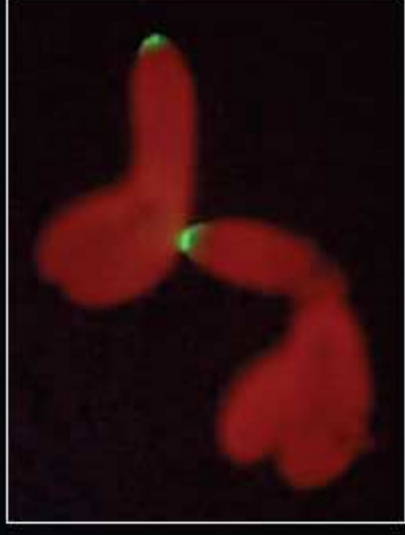
Le sequenze nel T-DNA agiscono in cis per alterare la trascrizione del gene a valle



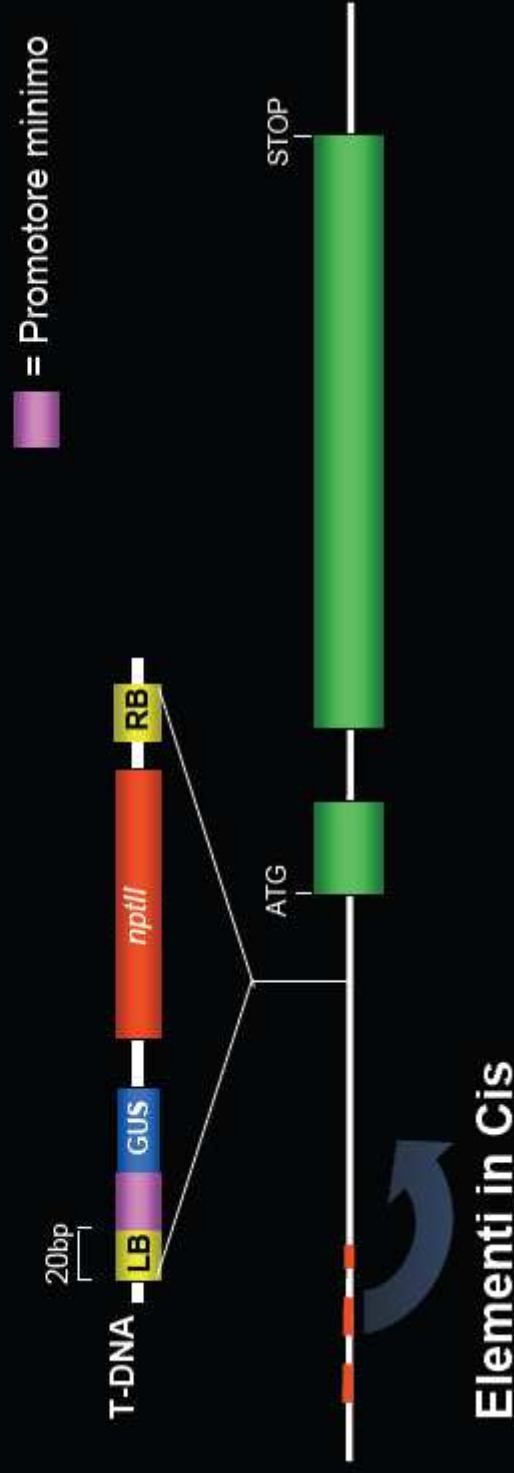
La linea mutante sarà un Gain-of-function !

Enhancer trap

Le sequenze in Cis alterano i livelli di trascrizione del gene reporter



Il gene reporter è sempre trascritto ed a bassissimi livelli



Elementi trasponibili (TE)

(Transposon tagging)

- si inserisce a caso come il T-DNA ma posso farlo "saltare" in una zona vicina al sito di inserzione
- Incrociando con una linea che esprime la trasposasi solo in un determinato tessuto avro' una mobilitazione del trasposone tessuto specifica



Linea mutagenizzata
con un trasposone

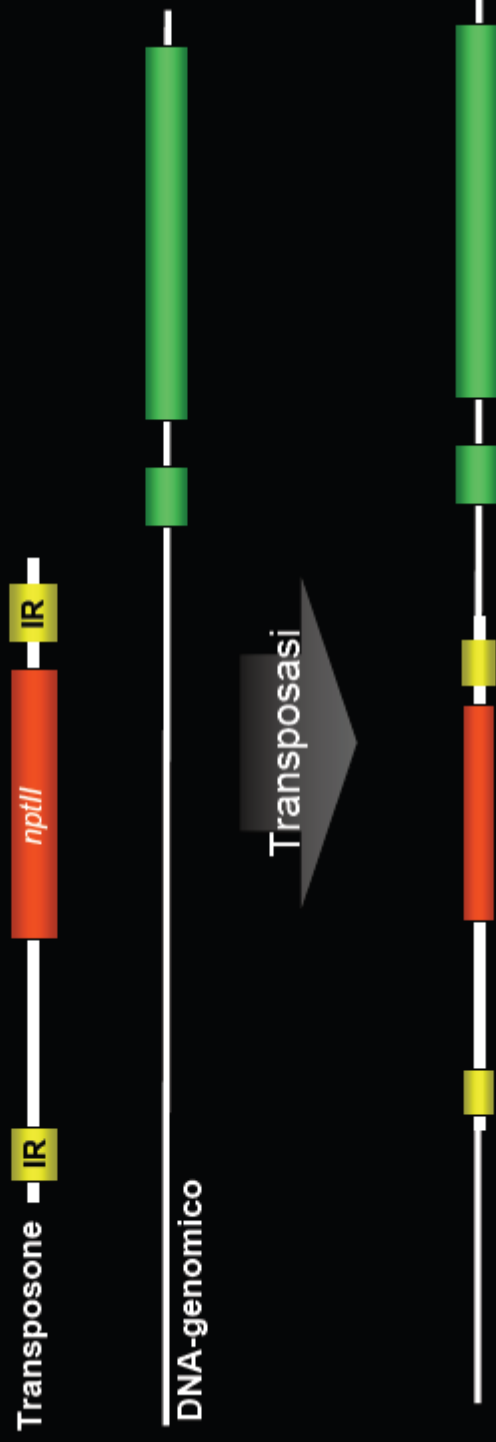
X



Eprime la trasposasi solo
nella radice
(¹"Revertanti"² tessuto specifici)

Sistema Ac/Ds

La mutagenesi con trasposoni è un sistema a due componenti (trasposasi (Ac) + l'elemento trasponibile (Ds))



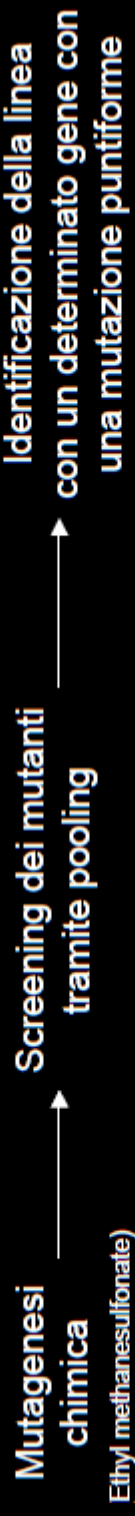
In alcuni casi è un metodo utile per avere un rapido sistema di reversione al wt

1. Come faccio a studiare i fenotipi letali?
2. Come posso studiare i fenotipi associati al mio gene di interesse se per questo non è ancora disponibile un mutante inserzionale?

- TILLING
- ANTISENSEN
- RNAi

Il **T-DNA** ed i trasposoni **NON** sono facilmente applicabili a tutte le specie vegetali

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes)



Vantaggi:

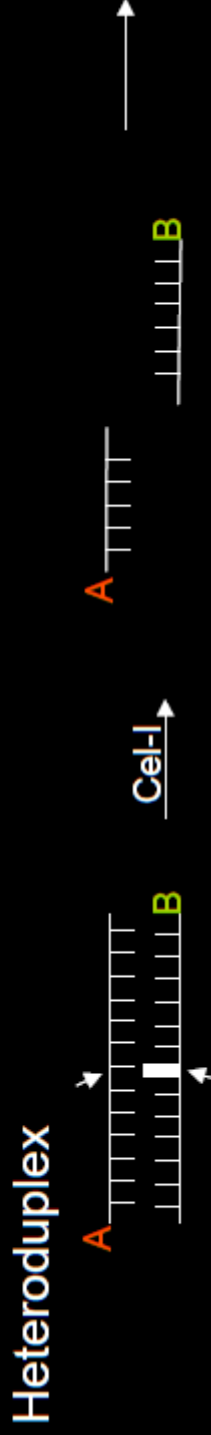
- E' una procedura semplice e più ampiamente utilizzabile
- Non necessita di colture cellulari e non genera linee transgeniche
- Produce **serie alleliche** con linee K.O. o solamente “attenuate”

L'endonucleasi Cel-I identifica i mismatch dell'appaiamento tra wt e mutante

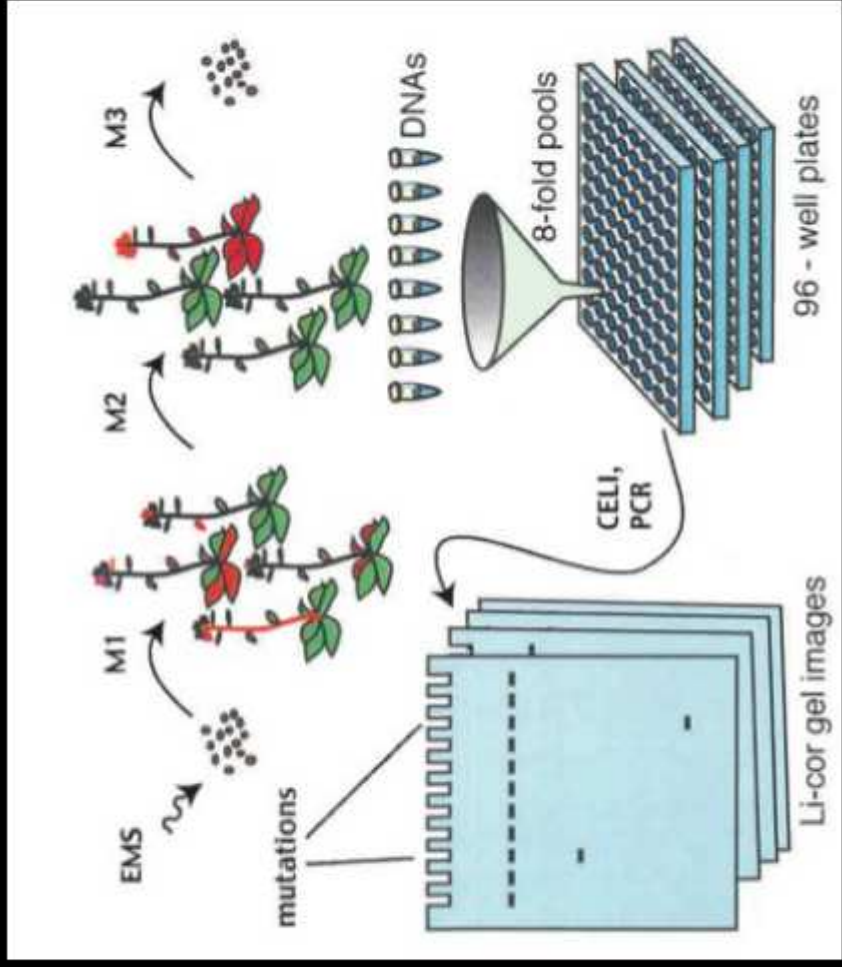
Primer gene **A** →
specifici ← **B**

A e B due marcatori differenti

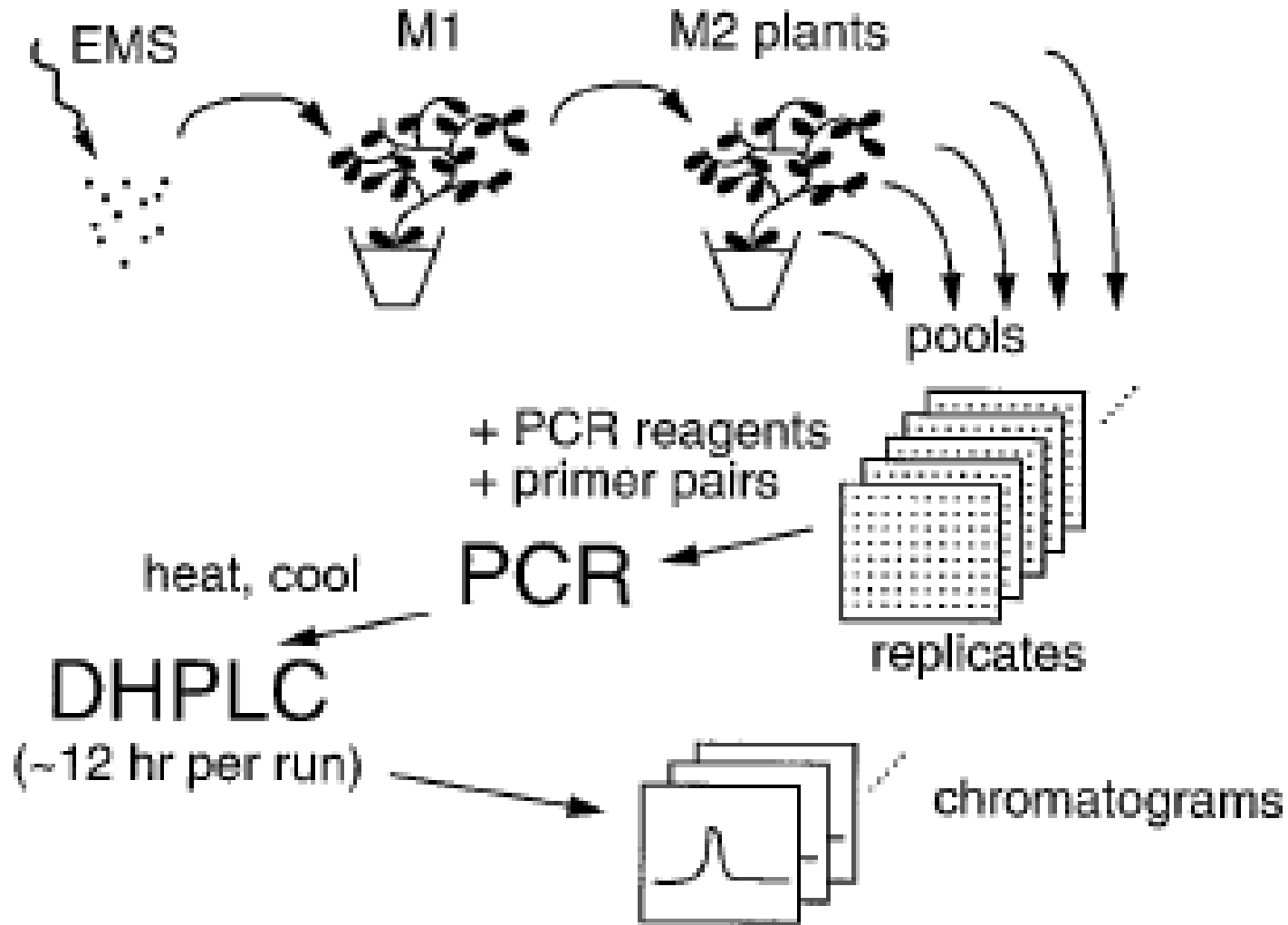
PCR sul wt e
nel mutante →
cicli di appaiamento dei
frammenti amplificati



high-throughput TILLING - how it works

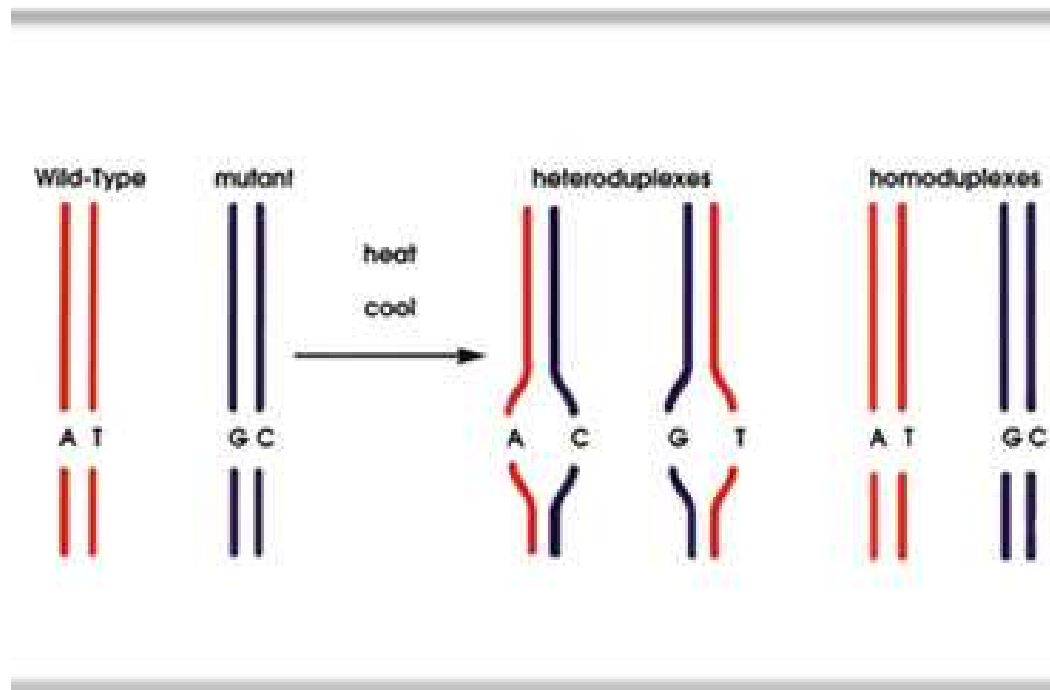


Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)

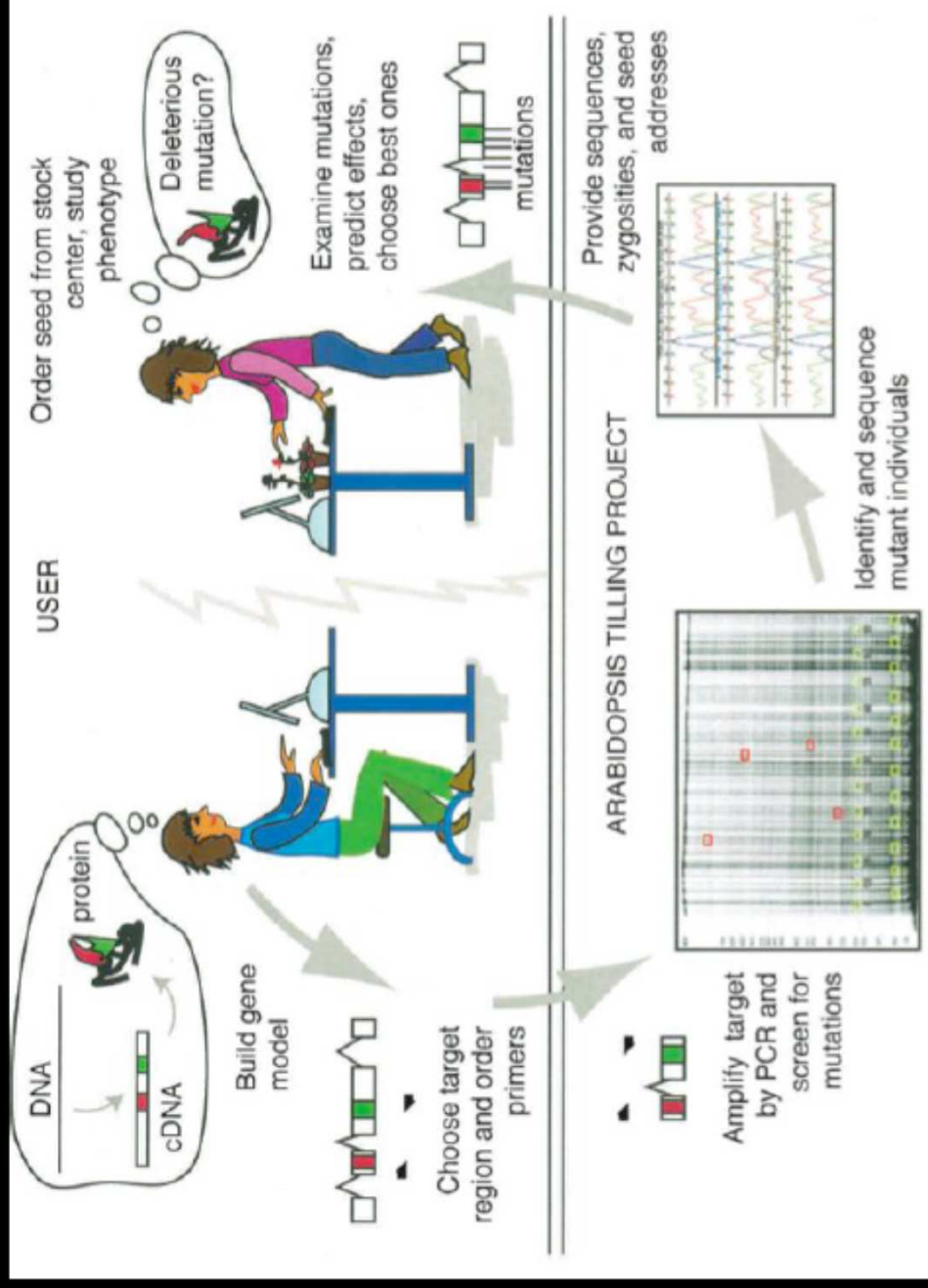


DHPLC= HPLC denaturante

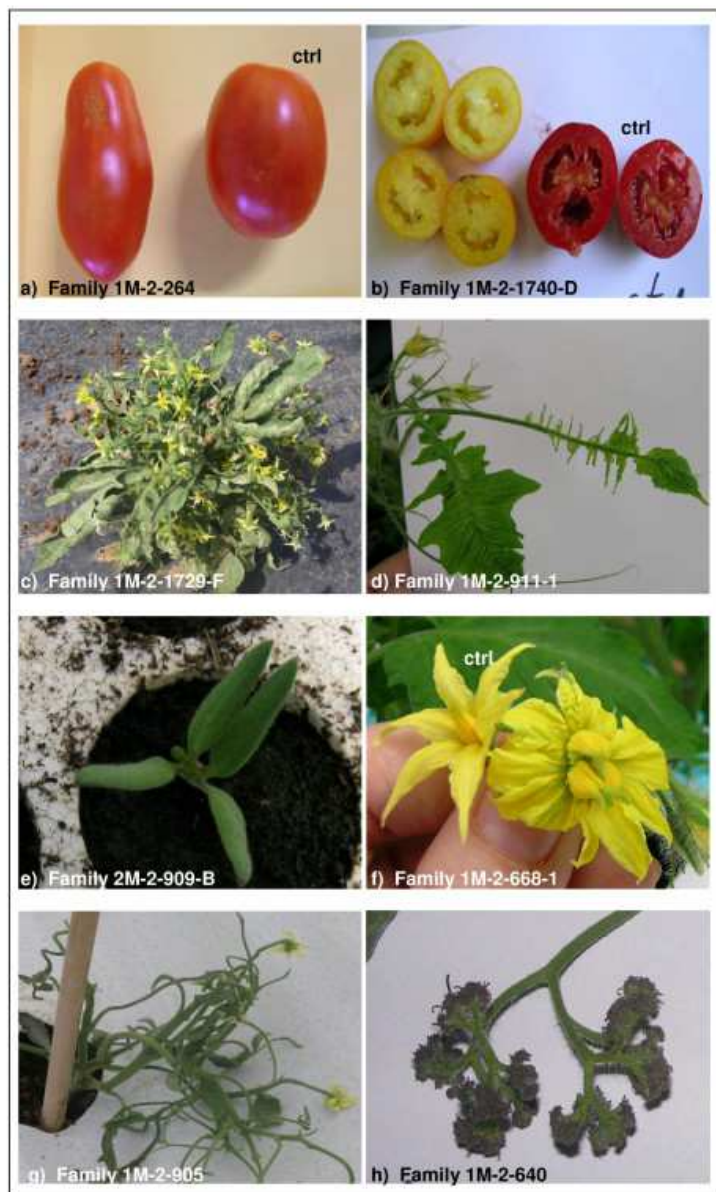
- Duplex si formano quando un frammento amplificato di DNA mutato ed uno non mutato vengono denaturati termicamente e lasciati ricombinare.
- Su una colonna cromatografica, l'eteroduplex è solitamente più veloce (meno trattenuto) dell'omoduplex
- Può essere impiegata per rilevare ogni tipo di mutazione (SNPs, inserzioni, delezioni e tandem repeat)



high-throughput TILLING - how it works



TILLING in pomodoro



Mutation density in 0.7% EMS and 1% EMS Red Setter populations

Target gene	No. of screened M3 families	No. of identified mutations		Overall mutation density			
		0.7% EMS	1% EMS	0.7% EMS	1% EMS		
Name	Amplicon size (kb)	0.7% EMS	1% EMS	0.7% EMS	1% EMS	0.7% EMS	1% EMS
<i>Rab11a</i>	0.407	1,373	713	1	3	1/559 kb	1/97 kb
<i>PG</i>	2.587	2,791	963	7	2	1/1031 kb	1/1246 kb
<i>Exp1</i>	1.025	3,885	1,284	14	6	1/284 kb	1/219 kb
<i>RIN</i>	1.331	3,885	1,284	4	8	1/1293 kb	1/214 kb
<i>Gr</i>	1.409	3,885	1,284	5	3	1/1095 kb	1/603 kb
<i>Lcy-b</i>	1.274	3,801	1,252	4	3	1/1211 kb	1/532 kb
<i>Lcy-e</i>	1.414	3,630	1,185	6	0	1/855 kb	-
Total/mean	9.447			41	25	1/574 kb	1/322 kb

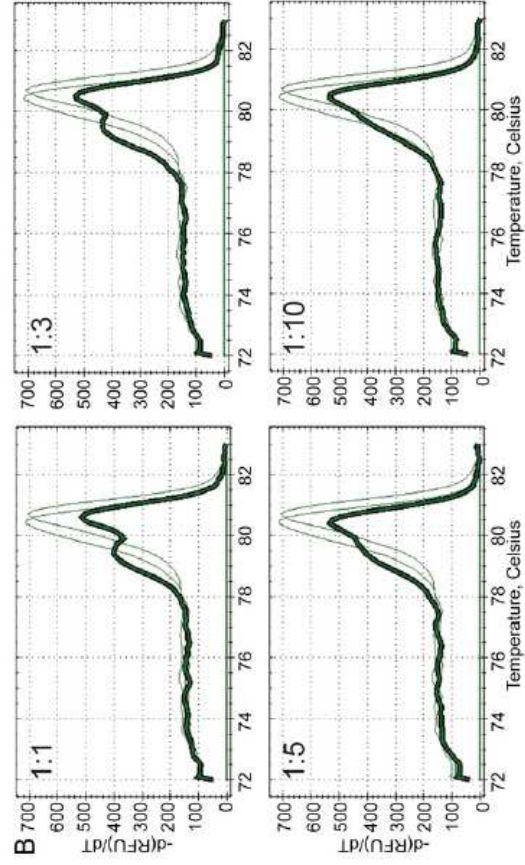
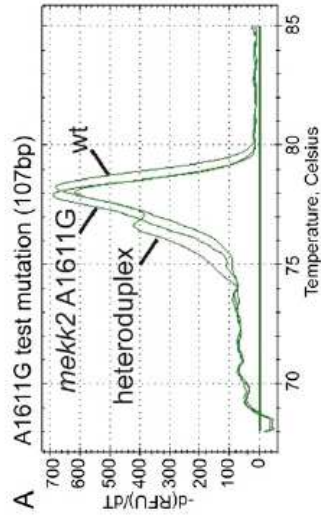
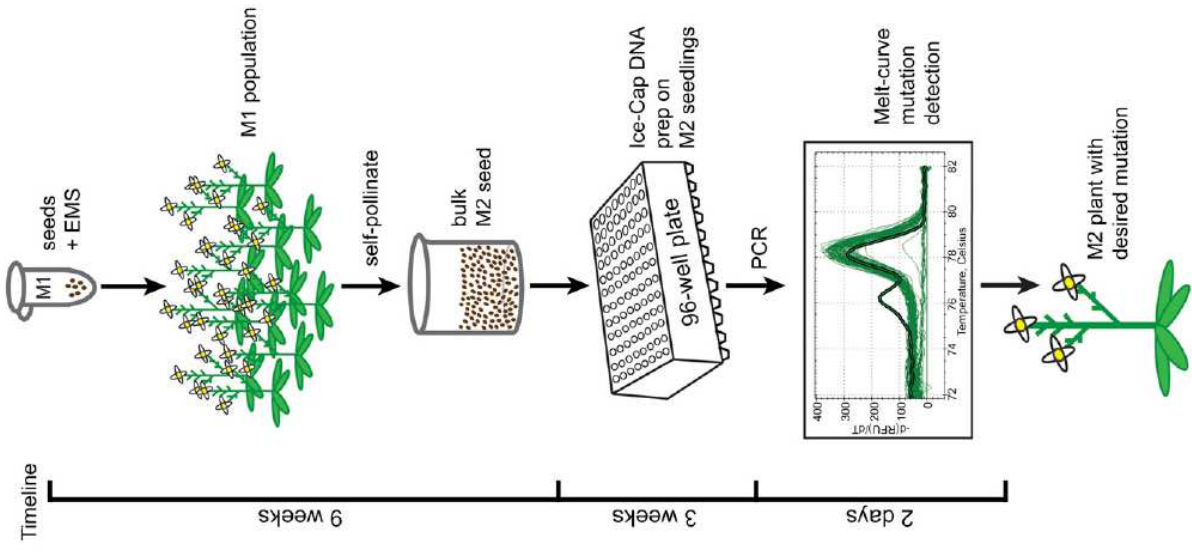
The accession numbers of the analyzed seven target genes are the following: *Rab11a* [GenBank:[AJ245570](#)], *PG* [GenBank:[M37304](#)], *Exp1* [GenBank:[AF548376](#)], *RIN* [GenBank:[AF448522](#)], *Gr* [GenBank:[DQ372897](#)], *Lcy-b* [GenBank:[CQ788383](#)], *Lcy-e* [GenBank:[Y14387](#)]. The number of screened M3 families, the number of identified mutations and the overall mutation density, estimated as described in Methods, are reported both for 0.7% and 1% EMS Red Setter populations.

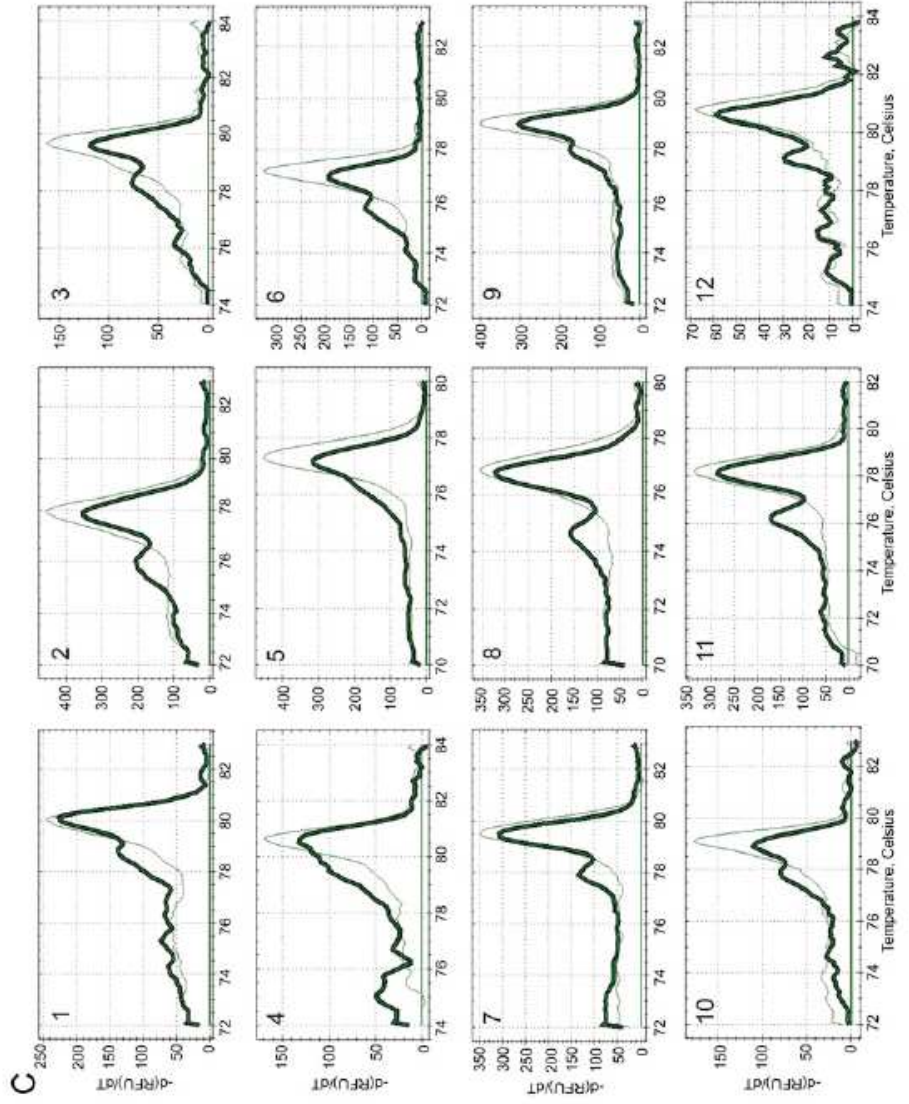
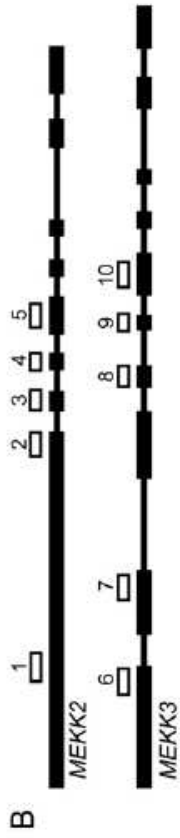
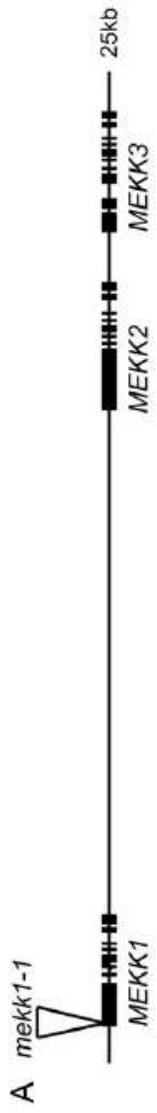
iTILLING: A Personalized Approach to the Identification of Induced Mutations in Arabidopsis ¹C110A1

Susan M. Bush and Patrick J. Krysan*

Department of Horticulture (S.M.B., P.J.K.) and Genome Center of Wisconsin (P.J.K.), University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706

Plant Physiology, September 2010, Vol. 154, pp. 25-35.





PTGS (Post transcriptional gene silencing):

Il gene viene trascritto ma NON viene tradotto

- **Antisenso**
All'interno della cellula c'è un mRNA complementare a quello endogeno che ne blocca la traduzione formando un dsRNA
- **RNAi**
Piccole molecole di dsRNA innescano un meccanismo di degradazione di uno mRNA specifico

Forward vs. Reverse Approaches

Forward Genetics

- Easy to do with visible traits
- No „essential“ genes targetable
- Breeding required
- Must have markers and maps available
- Access to BAC, YAC libraries required

Reverse Genetics

- Easy to do with differentially expressed genes
- Any trait accessible
- Functional assessment (usually in transgenic plants) difficult if no homologs are known
- No marker or sequence required