



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

TILLING: una herramienta para el estudio de la función de los genes y la generación de nueva variación

Apellidos, nombre	Esteras Gómez, Cristina (criesgo@upvnet.upv.es) Picó Sirvent, María Belén (mpicosi@btc.upv.es)
Departamento	Departamento de Biotecnología
Centro	Universidad Politécnica de Valencia



1. Resumen de las ideas clave

Las nuevas técnicas de secuenciación de alto rendimiento están incrementando de manera muy rápida el número de secuencias disponibles en un amplio rango de organismos. En muchos casos, no se dispone de información acerca de la función de las secuencias génicas. Por ello, existe una necesidad creciente de asociar la variación nucleotídica en una secuencia a cambios fenotípicos, determinando así la función del gen. En este artículo docente se describe una metodología de uso creciente, empleada para el estudio de la función génica, además de para la generación de nueva variación: TILLING. Esta herramienta se ha empleado con éxito en diversas especies. A continuación se describen los fundamentos de la técnica y sus aplicaciones prácticas. La explicación planteada facilitará el aprendizaje de esta nueva estrategia de análisis de la función génica al alumno de Ciencias de la vida (Agronomía, Forestales, Medio ambiente, Biología, Biotecnología..), tanto a nivel teórico como práctico.

2. Objetivos

Una vez que el alumno haya estudiado con detenimiento este documento y los recursos de apoyo asociados, será capaz de:

1. Describir y explicar los fundamentos básicos de la técnica de TILLING.
2. Dar ejemplos y aplicaciones de esta técnica en diversos campos.
3. Diseñar y desarrollar-aplicar un experimento de este tipo.
4. Analizar e interpretar los resultados obtenidos.

3. Introducción

La técnica a estudiar, TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*), es una herramienta de "genética reversa". A diferencia de la "genética directa", donde se parte de la identificación de un fenotipo variable y se trata de determinar la secuencia génica que da lugar al mismo, en la "genética reversa" se identifica variación en una secuencia concreta y se trata de asociar a la misma una función biológica o fenotipo. El conocimiento de la función del gen incrementa la posibilidad de aplicar la información básica generada con las nuevas tecnologías (análisis de transcriptomas completos, secuenciación masiva, clonaje posicional), tanto a nivel de estudio de enfermedades en humanos como para la mejora genética de especies vegetales y animales. El desarrollo de metodologías como el TILLING ha permitido incrementar los procesos de asociación secuencia-función.

El TILLING es una herramienta de alto rendimiento y bajo coste que permite asociar una secuencia génica a un fenotipo mediante la obtención de mutantes en dicha secuencia. Se basa en la estrategia de generación de nueva variación por mutación, ya muy utilizada en la genética clásica. La novedad radica en la realización de la mutación a gran escala, con el objeto de generar mutantes en todos los genes de una determinada especie, y en el empleo de técnicas de "screening" (cribado) masivo de mutaciones.



El proceso se inicia generando una colección de individuos mutantes con etilmetanosulfonato (EMS) u otros mutágenos. Posteriormente, se analizan de forma sistemática para identificar mutaciones puntuales en genes-diana seleccionados. Al no requerirse la secuenciación de cada individuo mutante, pues las mutaciones se detectan mediante la generación de moléculas híbridas (heterodúplex) y su posterior digestión con endonucleasas que reconocen apareamientos anómalos en la secuencia ("mismatches"), esta metodología resulta más económica que la secuenciación directa. Es decir, la detección se hace a gran escala en toda la colección, pero sólo se secuencian al final del proceso un ejemplar portador de cada mutación. La función del gen se esclarece después relacionando la mutación identificada con el fenotipo mostrado por el individuo en cuestión.

Esta técnica se empleó por primera vez en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*^{1,2} en el año 2000. Ya en 2003, el proyecto de TILLING para *Arabidopsis* contaba con casi 1900 mutaciones detectadas en 192 amplicones analizados³. Además de aplicarse a otras especies modelo, como la leguminosa *Lotus japonicus* (para el estudio de genes implicados en la simbiosis a nivel de raíz y en la fijación de nitrógeno^{4,5}), pronto se aplicó a otras especies vegetales con interés agronómico como guisante, maíz, cebada, trigo, arroz o soja. Aunque los animales requieren de diferentes técnicas para establecer y mantener las poblaciones de mutantes, esta estrategia también ha sido aplicada a diferentes especies modelo: *Drosophila melanogaster*, pez zebra (*Danio rerio*), ratas (*Rattus norvegicus*) o el nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

El empleo del TILLING presenta ciertas ventajas respecto a otras aproximaciones de genética reversa: potencial de alto rendimiento, fiabilidad e irreversibilidad de la mutagénesis química, provisión de diferentes alelos en un mismo gen, capacidad de estudiar diferentes regiones diana, eficiencia en relación con el estudio de genes pequeños, aplicabilidad a todo tipo de genes (esenciales y no esenciales); además de no requerir la obtención de transgénicos o metodologías sofisticadas de cultivo *in vitro*.

4. Desarrollo

Los avances en Genética y Genómica de los últimos años están siendo muy rápidos. Para entender y aplicar la estrategia de TILLING es necesario tener conocimientos previos de Genética, Genómica y técnicas de Genética Molecular (PCR, electroforesis, secuenciación). El contenido que se va a presentar facilitará que el alumno utilice estos conocimientos previos para el desarrollo de una nueva estrategia de análisis de la función génica.

El contenido se ha estructurado utilizando un caso práctico de TILLING desarrollado por el grupo de Genética Vegetal del IRTA (Centre de Recerca Agrigenomica, CSIC, IRTA-UAB), junto con el grupo de Mejora Genética de Cucurbitáceas del COMAV- UPV. El objetivo de este estudio era la creación de una plataforma de TILLING para melón (*C. melo* L.), en el marco de un proyecto de genómica funcional.

A continuación se describen los fundamentos básicos de cada paso, planteándose una cuestión relevante al final de cada uno para validar lo aprendido. Al final se presenta un esquema resumen que permite confirmar el aprendizaje de la globalidad del proceso.

Recomendamos que tras el estudio de este artículo se visualicen dos paneles donde se describen dos aplicaciones prácticas de TILLING en melón (TILLINGENMELON.PDF) y tomate (TILLINGENTOMATE.PDF), que van asociados al mismo y se incluyen como material de apoyo. Así mismo, para reforzar lo aprendido y lograr una visión actualizada de las aplicaciones en vegetales y animales se recomienda leer la revisión de 2008 de Barkley y Wang “*Application of TILLING and EcoTILLING as Reverse Genetic Approaches to Elucidate the Function of Genes in Plants and Animals*” (Current Genomics 2008).

PASO 1. Generación de la colección de mutantes

Para la generación de la colección de mutantes hay varios aspectos clave. Suele elegirse como **genotipo para mutagenizar** una línea (debe ser homocigota para todos sus genes), que tenga características de interés científico o comercial, para que las mutaciones generadas se encuentren en este fondo genético de interés. El **agente mutagénico** empleado con mayor frecuencia es el EMS, un agente alquilante que añade radicales etilo, frecuentemente en los residuos de Guanina, forzando un emparejamiento anómalo de ésta con la Timina, causando así mayoritariamente mutaciones puntuales de tipo transición G:C a A:T. Como el objetivo final es lograr una colección de mutantes con mutaciones en todos los genes de la especie, el tamaño adecuado de la población obtenida dependerá de la **eficiencia en el proceso de mutación**. Así pues, para cada especie hay que establecer protocolos con una concentración de mutágeno y tiempo de tratamiento adecuados, teniendo en cuenta que el exceso bajará mucho la tasa de germinación de las semillas mutagenizadas y la fertilidad de las plantas producidas, pero también las dosis bajas implicarán pocas mutaciones y la necesidad de una población de mayor tamaño. Tras mutagenizar las semillas, éstas se germinan (generación M1) y cada planta obtenida se autofecunda para obtener la generación M2. Las mutaciones en M1 ocurren en heterocigosis y en la M2 pueden encontrarse individuos homocigotos.

Ejemplo: En el caso del melón se mutagenizó una línea doble haploide (lo que asegura su homocigosis), representante de la variedad *inodorus* mas importante a nivel comercial (Piel de Sapo, PS), y que además es el parental del mapa genético de la especie y el tipo elegido para la secuenciación del genoma. Se obtuvieron los mejores resultados con un 1% de EMS (Figura 1).

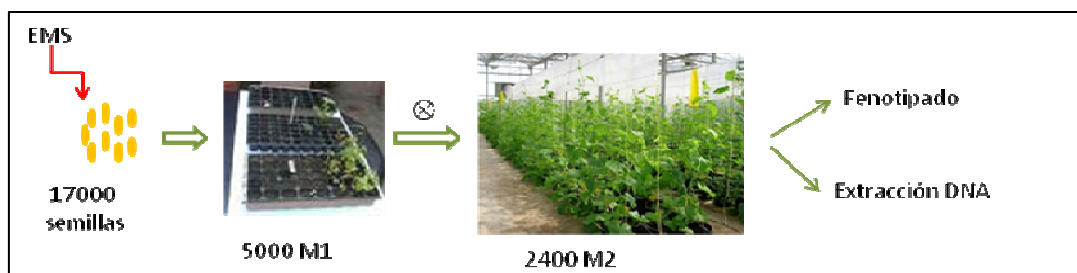


Figura 1. Esquema de la obtención de la población de mutantes M2. De las 17000 semillas de PS mutagenizadas se obtuvieron 2.400 familias M2 para ser estudiadas.



¿Cuáles son los aspectos clave para la obtención de la población de mutantes? ¿Qué tipo de mutaciones causa el EMS? ¿Porqué es necesario autofecundar las plantas de la generación M1 para el análisis?

PASO 2. Extracción del DNA y construcción de "pools"

El DNA se extrae de las familias M2 a partir, por ejemplo, de un "pool" de tejido de varias plantas individuales. Puesto que el número de familias es muy elevado, se procede a la construcción de nuevos "pools" juntando el DNA de varias familias M2 para acelerar el proceso de "screening". La utilización de "pools" de familias reduce el número de muestras a analizar de miles a cientos, pero por otra parte requiere una optimización del proceso de amplificación. Por lo tanto, el factor de "pooling" debe ser seleccionado para minimizar el número de ensayos necesarios para localizar una mutación. Tras la detección de una mutación en un pool será necesario llevar a cabo la amplificación individual del DNA de cada una de las familias implicadas, para seleccionar la familia mutante, y de los individuos portadores de la mutación dentro de familia.

Ejemplo: En el caso de la plataforma de TILLING de melón se emplearon pools de 10 plantas por familia M2, formándose posteriormente unos 600 pools de 4 familias ("fourfold pools") (Figura 2).

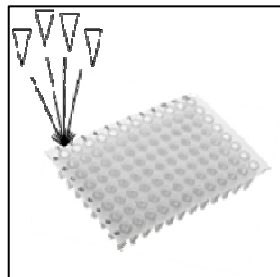


Figura 2. Generación de "pools" de DNA procedente de 4 familias ("fourfold pools"). De esta forma se analizan por placa 384 familias en lugar de 96.

¿Por qué es conveniente trabajar con pools? ¿Por qué esta estrategia implica una optimización del proceso de PCR?

PASO 3. Amplificación del gen o fragmento del gen de interés

Actualmente se dispone de muchas secuencias de genes candidatos involucrados en procesos metabólicos de interés, en resistencia a enfermedades, factores de transcripción, etc, cuya secuencia puede obtenerse a partir de las bases de datos como la del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A partir de la secuencia del gen diana elegido se diseñan cebadores específicos para amplificar la región deseada (Figura 3). Es conveniente que el gen diana tenga sólo una copia en el genoma, para facilitar la amplificación e interpretación de resultados, aunque el TILLING también se ha llevado a cabo en especies poliploides como el trigo. Muchas veces se han de estudiar varios amplicones solapantes para analizar el gen completo. Existe programas que facilitan la selección de los amplicones a inspeccionar, determinando aquellas regiones del gen que son más susceptibles de presentar mutaciones de interés (CODDLE, Codons Optimized to Deliver Deleterious Lesions, <http://www.proweb.org/coddle/>). La



amplificación se realizará para toda la colección de mutantes y para el wild type (wt), línea original mutagenizada. El hecho de emplear cebadores marcados con fluorescencia suele rebajar la eficiencia de la amplificación, existiendo varias estrategias para solucionarlo:

-Amplificar por un lado con el cebador directo marcado (CD-IRD700) y por otro con el reverso marcado (CR-IRD800), de forma que al mezclarlos se obtengan fragmentos marcados por ambos extremos 5'.

-Hacer 2 amplificaciones ("nested" PCR) utilizando unos cebadores externos y otros internos (marcados).

Ejemplo: En melón se empleó un gen que codifica para la fitoeno desaturasa, (CmPDS, implicada en la síntesis de carotenos) y un amplicón que permite la identificación de mutaciones en la región comprendida entre los exones 5 y 7 (Figura 3).

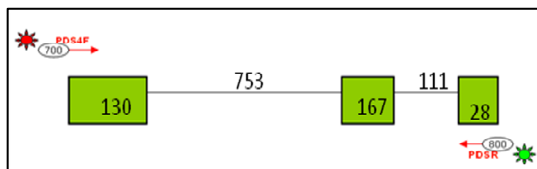


Figura 3. Estructura del amplicón que incluye los exones 5, 6 y 7 de CmPDS. Los exones son las cajas y los intrones las líneas, indicándose el tamaño en pb. La amplificación se realiza con cebadores marcados con dos fluoróforos (IRD-700 Y IRD-800), lo que permite la posterior visualización de los fragmentos digeridos y el análisis de su tamaño.

¿Por qué se emplean cebadores marcados con fluorescencia? ¿Qué problemas puede ocasionar esto?

PASO 4. Obtención de heterodúplex, digestión con la endonucleasa y purificación o precipitación

Tras la amplificación, se mezclan cantidades iguales del amplicón de cada "pool" (correspondiente a individuos de 4 familias M2 en nuestro ejemplo) con el amplicón de referencia (wt). Esta mezcla se desnaturalizará, renaturalizándose después lentamente, para que no sólo se formen homodúplex (wtwt o M2M2), sino también heterodúplex o moléculas híbridas (wtM2) (Figura 4). Aunque en los primeros trabajos de TILLING se empleó la técnica de dHPLC (*denaturing high performance liquid cromatography*) para detectar las mutaciones, pronto comenzaron a emplearse diversas nucleasas que reconocen los emparejamientos anómalos puntuales (tipo SNP, Single nucleotide Polymorphism o indels, pequeñas inserciones-delecciones) entre dos cadenas complementarias. Son las denominadas nucleasas específicas de cadena simple, que se emplean para detectar los "mismatches" en los heterodúplex (debidos a mutaciones puntuales generadas por el mutágeno). La enzima corta en ese punto la cadena, obteniéndose fragmentos de diferente tamaño que informan de la localización en el amplicón de la mutación generada (Figura 5a y b). Siempre se deben incluir estos controles: la línea wt desnaturalizada y renaturalizada consigo mismo (para comprobar que es homocigota), la línea wt no desnaturalizada-renaturalizada pero sí digerida (para comprobar que la endonucleasa no corta cuando no hay moléculas híbridas) y el producto de PCR de este wt (cualquier banda presente se tomará como ruido de fondo).

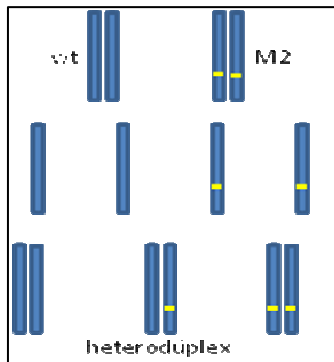


Figura 4. Esquema de la obtención de heterodúplex. Se muestra la mezcla del amplicón de la línea wt con el amplicón de un individuo M2. Se desnaturaliza y renaturaliza de forma que algunas hebras wt se emparejan con las de M2 (heterodúplex). En amarillo se indica la posición de una mutación generada tras el tratamiento con EMS.

**¿Qué procedimiento se utiliza para detectar polimorfismos puntuales entre amplicones?
¿Cómo explicarías la aparición de fragmentos en la carrera del control wt desnaturalizado y renaturalizado consigo mismo?**

PASO 5. Electroforesis y visualización en el analizador de fragmentos LI-COR.

La visualización de los fragmentos generados, que nos indica la posición de la mutación, se realiza vía electroforesis en un gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes (en un analizador de fragmentos LI-COR). Las bandas visualizadas corresponden a los fragmentos del amplicón marcados con fluorescencia IRD. Se obtiene una imagen para el canal IRD-700 y otra para el IRD-800 (Figura 5). Sería posible visualizar 2 mutaciones debido a que la enzima no es eficiente al 100%, sin embargo, no es muy probable que el mutágeno haya afectado en 2 puntos el mismo amplicón en el mismo individuo. Una vez se tienen los diferentes gels con todas las familias M2 (o pools), se analizan en busca de bandas consistentes (mutaciones) (Figura 6a y b).

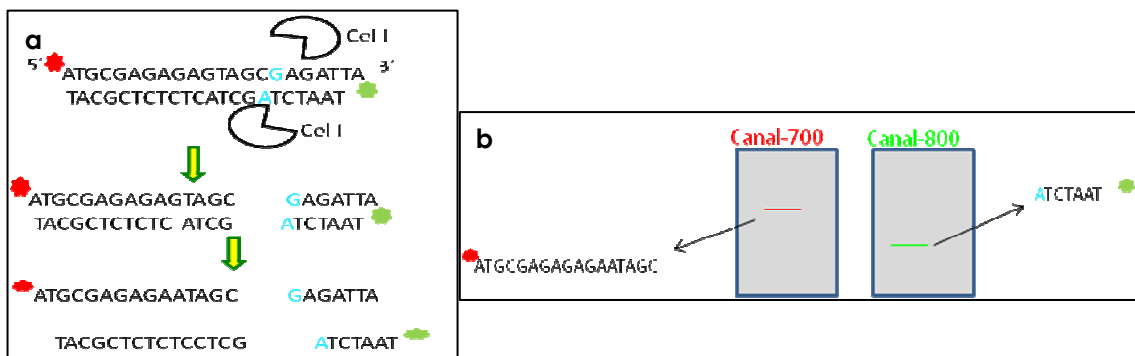


Figura 5. Esquema de la detección de mutaciones mediante TILLING. a) Ejemplo de amplicón con un "mismatch" (azul) y con los extremos marcados con IRD-700 (rojo) e IRD-800 (verde). La Cel I corta cada hebra de forma independiente al reconocer este mal apareamiento. Al final, tras desnaturalizar para cargar el gel, se obtiene un conjunto de fragmentos marcados en 5' que se visualizarán en un analizador de fragmentos LICOR. b) Imagen que se vería al cargar las muestras de a), tanto en el canal de IRD-700 como en el IRD-800. Se puede observar que son complementarios los tamaños, lo que supone una comprobación.

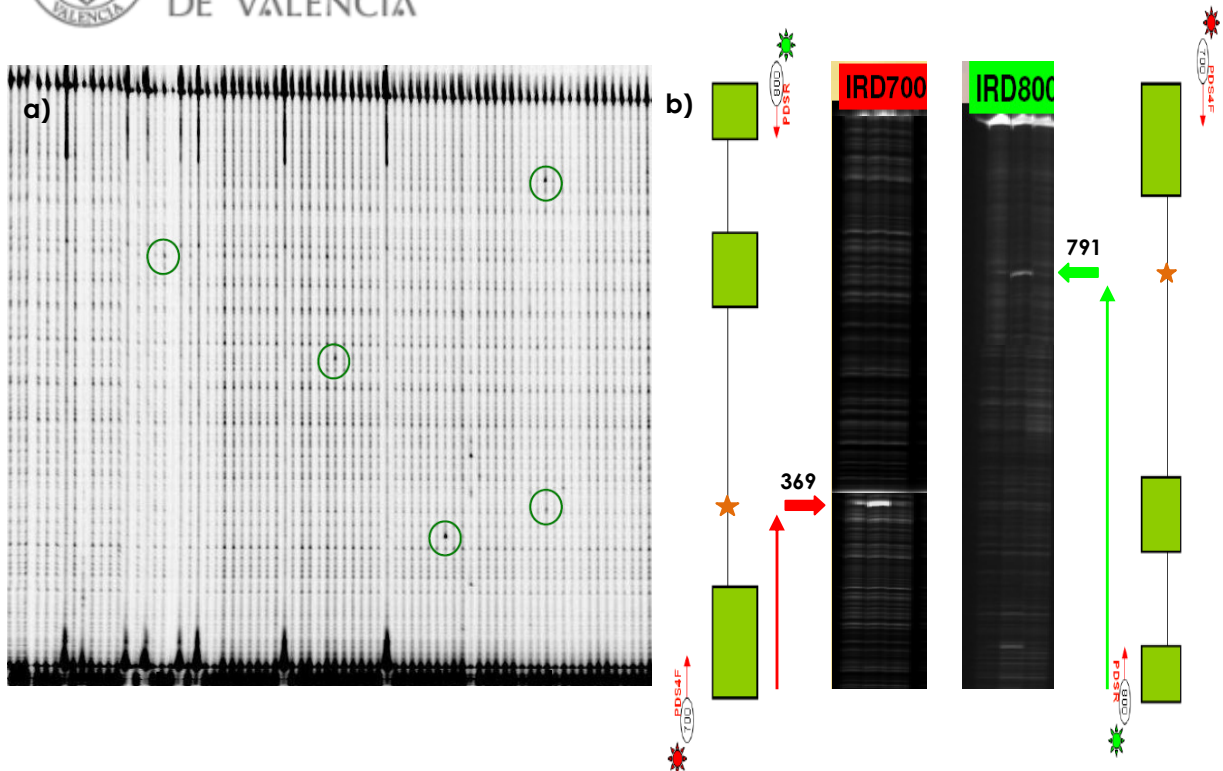


Figura 6. Imagen obtenida con el analizador de fragmentos LICOR para el amplicón CmPDS. a) Marcadas con círculos verdes se indican las mutaciones (bandas) encontradas en 5 pools de familias M2, frente al control, para uno de los canales (IRD-700 o IRD-800). b) Detalle de la mutación encontrada en un pool con los fragmentos de tamaño complementario visualizados en los dos canales y dispuestos sobre un esquema del gen analizado (la estrella indica la posición de la mutación). Se indica el tamaño de la banda en ambos canales (369 y 791 pb, que suponen las 1160 pb del amplicón).

PASO 6. Análisis de las mutaciones y asociación mutación- fenotipo

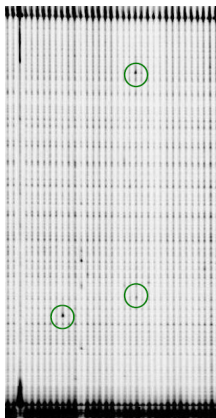
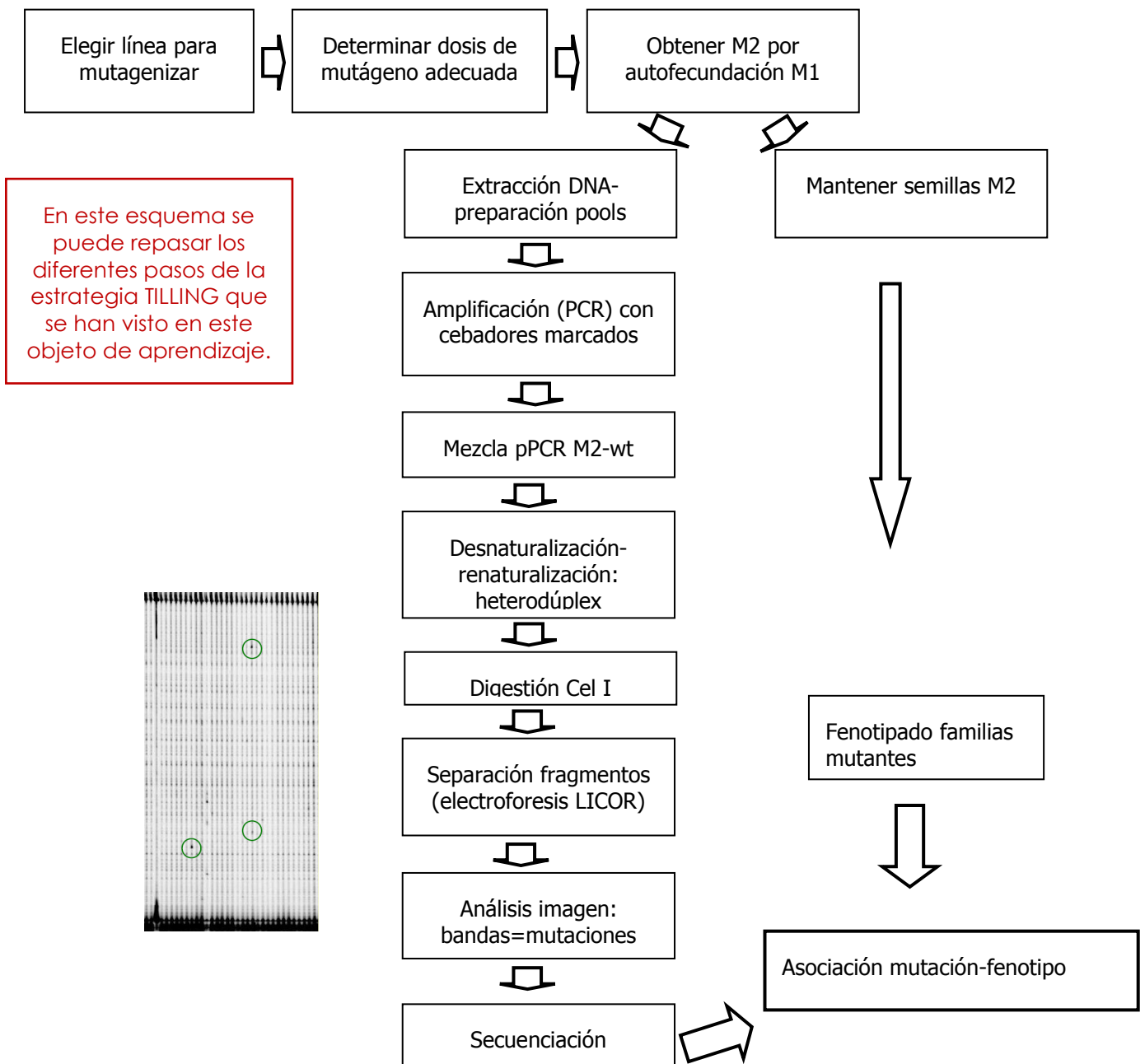
Las mutaciones deben ser confirmadas por secuenciación, de forma que conozcamos la posición exacta y el tipo de cambio que implican. El alineamiento de secuencias se puede realizar mediante programas *on line* como blast2seq (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Otro programa (SIFT, http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT_seq_submit2.html), resulta de interés por predecir si cierto cambio aminoacídico puede o no afectar a la funcionalidad de la proteína. Por último, habría que realizar un fenotipado de esas familias M2 (o M3, empleando individuos homocigotos para la mutación), en comparación con el wt. De esta forma, se podría relacionar esa mutación puntual con cierto fenotipo concreto. Es esencial poder distinguir efectos causados por la mutación en nuestro gen de efectos fenotípicos causados por mutaciones en genes no relacionados (mutación de fondo) (Figura 7).



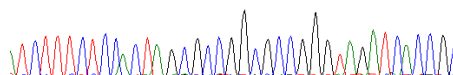
Figura 7. Algunos de los cambios fenotípicos observados en la colección de TILLING de melón: en plántula (curvaturas de hipocotilo, deficiencias en clorofila, enanismos, filimorfismos), en planta adulta (clorosis, deformaciones) o en fruto (deformaciones, cambio de color o de forma, en comparación con el control PS).



PASO 7. REPASA LA ESTRATEGIA DE TILLING CON EL ESQUEMA SIGUIENTE



500 550 600 650 700 750 800 850 900
T C T T T C T C C A C T A G C G C C G G C G C C G G G T A G A T C A C C G C





6. Bibliografía

6.1. Citas en texto:

1 McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol.* 2000 Apr;18(4):455-7.

2 Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henicoff S. 2001. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol*, 126: 480-484.

3 Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE, Henikoff JG, Comai L, Henikoff S. 2003. Large-scalediscovery of induced point mutationswith high-throughput TILLING. *Genome Res.* 13: 524-530.

4 Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M. 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus* . *Plant Physiol.* 131: 866-871.

5 Horst I, Welham T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL. 2007. TILLING mutants of *Lotus japonicas* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol.* 144: 806-820.

6.2. No citados en texto:

Libros: Meksem K, Liu S, Liu XH, Jamai A, Mitchum MG, Bendahmane A, El-Mellouki T. 2008. TILLING: A reverse genetics and a functional genomics tool in soybean. En: Kahl G, Meksem K. 2008. *The handbook of plant functional genomics: concepts and protocols.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Artículos: Barkley NA, Wang ML. 2008. Application of TILLING and EcoTILLING as Reverse Genetic Approaches to Elucidate the Function of Genes in Plants and Animals. *Current Genomics.* 9: 212-226.

Henikoff S, Comai L. 2003. Single-Nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:375-401.