

Neulich an der Bench (132):  
Fast Isogenic Mapping

# Zurück zu Mama und Papa

■ Ein Bioinformatik-Paper,  
ausdrücklich für Biologen ge-  
schrieben. Klingt interessant.

Franziska Turck gibt nicht nur als Geigen-  
spielerin in der hauseigenen Musikband des  
Max-Planck-Institutes für Pflanzenzüch-  
tungsforschung (MPIPZ) in Köln-Vogelsang  
den Ton vor. Seit 2006 leitet sie am MPIPZ  
auch die Arbeitsgruppe „Transcription  
Control in Flowering Time“ die sich un-  
ter anderem mit der Blühinduktion in der  
Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*  
beschäftigt.

Am MPIPZ scheinen jedoch nicht nur  
die Modellpflanzen hervorragend zu ge-  
deihen, im international geprägten Umfeld

des MPIPZ sprießen auch wissenschaftliche  
Ideen besonders gut. Turcks Gruppe ent-  
wickelte eine neue Methode, mit der man re-  
gulatorische Gene schneller und effektiver  
als bisher finden kann (Hartwig *et al.*, *Plant  
Physiology* 2012, 160:591-600).

## Viele Kollateralschäden

Bei der bisher gängigen Methode zur  
Identifizierung regulativer Gene erzeugt  
man mit Ethylmethansulfonat (EMS) Mu-  
tationen und sucht in der Nachkommen-  
schaft der F1- oder F2-Generation nach  
veränderten Phänotypen. Die EMS-Muta-  
genisierung hat jedoch den Nachteil, dass  
man mit vielen willkürlichen Mutationen  
rechnen muss, von denen die meisten gar  
nicht im Zusammenhang mit dem neuen

Phänotyp stehen. Erst durch Rückkreuzung  
zu einem anderen *Arabidopsis*-Ökotypen,  
und der anschließenden Kartierung der  
Nachkommen, die den Phänotyp zeigen,  
kann man die dazugehörigen Gendefekte  
identifizieren. Doch bei der Suche nach  
der „kausalen Mutation im Gen“, so betont  
Turck, „gab es in der Vergangenheit immer  
wieder das Problem, dass es ziemlich viel  
Variation gibt, wenn man zwei dieser Öko-  
typen kreuzt, und man die Mutanten nicht  
mehr klar erkennen kann.“

Fast Isogenic Mapping-by-Sequencing,  
lautet das Zauberwort, das die aufwendige  
Suche nach regulatorischen Genen und ih-  
ren kausalen Genmutationen um Wochen  
oder gar Monate abkürzt. Dieses neue Ver-  
fahren ist im Grunde eine beschleunigte  
Variante der Mapping-by-Sequencing-Me-



Beschleunigen und vereinfachen das EMS-Screening von *Arabidopsis* Mutanten: Franziska Turck (vierte v.l.) und ihre Mitarbeiter.

thoden, SHORE und SHOREmap (Short Read Analysis Pipeline) die Korbinian Schneebergers Gruppe, damals noch am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen, speziell für die Analyse von kurzen Sequenzier-Reads (~40 bp) von *Arabidopsis thaliana* entwickelte. Mit den beiden Programmen gelang es als Teil des „1001 Genomprojektes“ ([1001genomes.org](http://1001genomes.org)) die genetische Variabilität von 1001 *Arabidopsis*-Ökotypen aufzuklären (Ossowski *et al.*, *Genome Res.* 2008, 18(12):2024-33 und Schneeberger *et al.*, *Nature Methods* 2009,6:550-551).

### Rückkreuzen und sequenzieren

Um mit SHOREmap kausale Mutationen in einem Gen zu identifizieren, werden die Nachkommen der Rückkreuzungen, beispielsweise aus der F2-Generation mit Next Generation Sequencing-Verfahren sequenziert. SHOREmap filtert nach individuell festgelegten Kriterien Short-Reads heraus und gleicht diese mit dem vollständigen *Arabidopsis thaliana* Referenzgenom ab.

Fast Isogenic SHOREmap unterscheidet sich in einem wesentlichen Punkt von SHOREmap: Statt auf einen anderen Ökotypen kreuzt man auf die eigenen Eltern zurück oder wie es Turck formuliert: „isogen“. Und das funktioniert, so Turck, „außerordentlich gut, denn man erkenne die Mutanten viel besser.“

Außerdem werden in einem zweiten sogenannten dCARE-Schritt (deep candidate re-sequencing) Amplikons von allen Kandidatenmutationen aus einem DNA-Pool hochgezogen (der DNA von allen identifizierten Mutanten enthält) und mit großer Redundanz sequenziert. Die Gruppe setzte dafür die Ion Personal Genome Machine ein, die praktisch über Nacht Sequenzen im Hochdurchsatz liefert. Die Mutation mit der höchsten Sequenz war schließlich der Top-Kandidat für die kausale Mutation.

### Überzeugungsarbeit

„Unser Paper ist explizit nicht für Bioinformatiker geschrieben, sondern für Biologen“, betont Turck und erklärt weiter, „es soll alle, die ein EMS-Screening planen, davon überzeugen, dass sie besser nicht mehr mit einem anderen Ökotyp rückkreuzen, sondern einfach zu den Eltern.“ Zugleich erwähnt sie, dass inzwischen einige am Institut auf sie oder Korbinian

Schneeberger zukommen würden, wenn ein EMS-Screening anstehe – ihre Methode sei „doch einfacher und schneller.“

### Geschenk des Himmels

Auch gesteht sie, dass für das Paper und die Methodenentwicklung das Glück eine große Rolle spielte. Insbesondere der Umzug von Korbinian Schneeberger an das MPIPZ war, so Turck, „ein Geschenk des Himmels“ und führt weiter aus: „Korbinians Arbeitsgruppe hatte am Anfang noch nicht so viel zu tun. Wir hatten das Material, und dann ging alles ganz schnell. Für Korbinians Gruppe war es kein Problem, SHOREmap für unser isogenes Mappen umzuschreiben. Ein paar Skripte hier und dort – wie die alle funktionieren weiß ich aber auch nicht so genau.“ Muss sie auch nicht, denn das Paper beziehungsweise die Fast Isogenic Mapping-Methode ist ja in erster Linie für Biologen gedacht.

Turcks Team untersuchte mit der neuen Gen-Mapping-Methode Mutationen, die die Wirkweise des Proteins LHP1 (Like Heterochromatin Protein 1) verändern. LHP1 ist ein regulatorisches Gen des Polycomb Group-Proteinkomplexes (PcG). Polycomb Group-Proteinkomplexe sind wichtige Entwicklungsgene, die sowohl in Tieren als auch in Pflanzen genetisch konserviert sind und anderen Genen zu einem „Gedächtnis“ verhelfen.

### Fragen Sie Korbinian

Das isogene Rückkreuzen reduzierte hier die Anzahl der EMS-induzierten Mutations-Kandidaten auf drei. Zwei davon lagen in Exons (At3g57940 und At3g63270), der dritte in einem Intron (At3g61130). Die Mutation in At3g63270 war schließlich der Gewinner bei der dCARE Analyse und wurde auch durch andere Methoden als kausale Mutation bestätigt.

„Und wer wissen will, wie die dahinter steckende Bioinformatik funktioniert“, so Turck, „wendet sich am Besten an Korbinian, der auch korrespondierender Autor auf dem Paper ist.“

DANIELA KNOLL

**Sie wollen auch  
einen Beitrag für  
diese Rubrik verfassen?**

■ [hz@laborjournal.de](mailto:hz@laborjournal.de)