

Hintergrund: Mutationen – Mutagenese

Eine Mutation ist im biologischen Sinne allgemein jede Veränderung der DNA, die nicht durch die Kreuzung zweier Organismen entsteht. Sie kann spontan auftreten oder durch bestimmte Reize ausgelöst werden. Dabei handelt es sich um einen Vorgang, der natürlicherweise innerhalb der Zellen stattfindet. Mutationen können in allen Zellen des Körpers auftreten.

In diesem Hintergrundpapier wird auf die Auswirkung von Punktmutationen auf die betroffene Zelle bzw. den ganzen Organismus eingegangen und wie sie die Evolution von Arten vorantreiben. Mutationen werden auch in der Pflanzenzüchtung genutzt, um Pflanzen mit „verbesserten“ Eigenschaften zu erzeugen. Daher wird abschließend allgemein auf Mutagenese-Verfahren und deren Anwendung in der Pflanzenzucht eingegangen.

Spontane Mutationen treten natürlicherweise auf

Mutationen der DNA treten natürlicherweise bei allen Lebewesen auf und können durch äußere Umwelteinflüsse wie Strahlung (z.B. UV-Licht) oder durch schädliche Substanzen (z.B. Umweltgifte) ausgelöst werden. Auch durch Fehler innerhalb der Zelle können Mutationen entstehen, wie zum Beispiel bei der Verdopplung der DNA (Replikation) nach einer vorangegangenen Zellteilung. Nicht alle neu entstandenen Mutationen bleiben erhalten, da es zelluläre Reparaturmechanismen gibt, die eine falsche Base oder einen Schaden an der DNA erkennen und reparieren können.

Diese Mechanismen der spontanen Mutationen werden auch in der Pflanzenzucht genutzt, wenn zum Beispiel Substanzen wie Chemikalien mit den Zellen in Kontakt gebracht werden, um die Mutationsprozesse in den Zellen zu beschleunigen. Man spricht dann von Mutagenese (siehe unten).

Welche Art von Mutationen können auftreten?

Grundsätzlich lassen sich Mutationen in mehrere Arten untergliedern: in Genommutationen, Chromosomenmutationen und Genmutationen.

- a) Genommutationen bezeichnet die Veränderung der Anzahl der Chromosomen insgesamt. Dies ist in der Pflanzenzüchtung wichtig, da hierdurch der Ertrag einzelner Sorten erhöht werden kann (Sattler, Carvalho, & Clarindo, 2016). Ein Beispiel hierfür ist der Saatweizen mit insgesamt 6 Chromosomensätzen.

- b) Unter Chromosomenmutationen werden Veränderungen zusammengefasst, welche die Struktur der Chromosomen betreffen. Das sind strukturelle Veränderungen, wenn sich zum Beispiel Bereiche der DNA verdoppeln oder gelöscht werden oder große Abschnitte eines Chromosoms auf ein anderes Chromosom übertragen werden.
- c) Der Fokus in diesem Hintergrundpapier liegt auf Genmutationen, bei denen Veränderungen der DNA auf einzelne oder mehrere Basen (also die Bausteine der DNA) begrenzt sind. Dabei werden einzelne oder mehrere Basenpaare ausgetauscht, eingeführt oder auch gelöscht. Von Punktmutationen spricht man in diesem Zusammenhang dann, wenn nur einzelne Basenpaare betroffen sind. Der Grund für die Eingrenzung auf diese Art von Mutationen ist, dass derartige Veränderungen vielfach im Rahmen der herkömmlichen Mutationszüchtung genutzt werden. Deren Wirkung wird oft mit den Veränderungen des Erbgutes verglichen, die auch durch Genom-Editierung herbeigeführt werden.

Auch Transposons verursachen Mutationen

Mutationen können auch durch sogenannte Transposons entstehen. Transposons („springende Gene“) sind DNA-Sequenzen, die innerhalb des Genoms an eine andere Stelle kopiert werden können. Transposons kommen in allen Organismen vor und sie können mehrere Gene beinhalten. Diese Gene kodieren für Enzyme, die für das „Springen“ des Transposons notwendig sind.

Es gibt unterschiedliche Arten von Transposons: Klasse-I-Transposons und Klasse-II-Transposons. Bei DNA-Transposons (Klasse-II-Transposons) wird das Transposon durch Enzyme an angrenzenden DNA-Sequenzen herausgeschnitten und an einer anderen Region der DNA wieder eingefügt. Bei dem Herausschneiden des Transposons entsteht eine Lücke in der DNA durch versetzte DNA-Enden, die nicht zueinander passen. Diese Lücke kann durch ein zelleigenes DNA-Reparatursystem repariert werden, welches fehleranfällig ist und zu einer Entstehung von Mutationen führen kann.

Bei RNA-Transposons (Klasse-I-Transposon) wird das Transposon vereinfacht gesagt kopiert und an einer anderen Stelle des Erbgutes wieder eingefügt. Es kommt dann an der Ausgangsposition und an der neuen Position im Genom vor. Bei der Integration des Transposons an neuer Stelle im Genom (das gilt sowohl bei Klasse-I- als auch Klasse-II-Transposons) können Gensequenzen unterbrochen, die Genexpression gestört werden oder neue Protein-Varianten entstehen (J. Huang et al., 2015; Munoz-Lopez & Garcia-Perez, 2010). Dabei ist der Ort des Einbaus von Transposons nicht rein zufällig. Dieser ereignet sich - auch in Abhängigkeit vom jeweiligen Transposon - in bestimmten Gen-Abschnitten häufiger als in anderen (Capel, Montero, Martinez-Zapater, & Salinas, 1993; Vicient & Casacuberta, 2017; Wicker et al., 2016; Wilson, Coates, & George, 2007; Yoshida et al., 2017).

Welche Zellen können betroffen sein?

Mutationen können alle Zellen eines Organismus betreffen. Treten sie in Körperzellen auf, die nichts mit der Fortpflanzung zu tun haben, können sie nicht an nachfolgende Generationen vererbt werden (somatische Mutation). Mutationen in solchen Zellen haben nur einen direkten Einfluss auf die individuell betroffene Zelle und auf mögliche nachfolgende Zellen des eigenen Körpers. Dies kann sich in einer Änderung des Wachstums oder der Funktion der Zelle niederschlagen.

Treten Mutationen in Zellen der Keimbahn auf, so werden diese an die Nachkommen weitergegeben und können in der nächsten Generation zur Ausprägung kommen (Clancy, 2008). Bei Tieren findet die Abgrenzung der Keimbahnzellen von den restlichen Körperzellen während der frühen embryonalen Entwicklung statt. Im Gegensatz dazu entwickeln sich in Blütenpflanzen die pflanzlichen Keimbahnzellen aus somatischen Körperzellen, während die Reproduktionsorgane der adulten Pflanze ausgebildet werden. Mutationen, die in diesen somatischen Zellen auftreten, können also weitergegeben werden.

Auswirkung von Punktmutationen

Punktmutationen können sich sehr stark auf die Zelle beziehungsweise auf den gesamten Organismus auswirken. Es gibt essenzielle Gene im Erbgut, welche das Überleben einer Zelle sicherstellen. Manifestieren sich Punktmutationen in solchen Genen, kann das zu einem Absterben der Zelle bzw. des Organismus führen, man spricht von einer letalen Mutation. Es ist auch möglich, dass eine Punktmutation die Bildung des entsprechenden Proteins verhindert oder die Funktion des Genprodukts zerstört wird. Dies wird als Loss-of-function-Mutation bezeichnet. In einigen Fällen kann es dazu kommen, dass ein Genprodukt durch eine Punktmutation eine neue Eigenschaft wie etwa eine erhöhte enzymatische Aktivität dazugewinnt, man spricht dann von einer Gain-of-function-Mutation. Werden durch eine Punktmutation keine Veränderungen in der Bildung oder Funktion des Genprodukts hervorgerufen, spricht man von einer neutralen Mutation, die keine Auswirkung auf den Organismus hat. Punktmutationen können einzelne Gene betreffen, aber auch in regulativen Abschnitten auftreten, was einen Einfluss auf die Genexpression haben kann.

In bestimmten Bereichen der DNA treten weniger häufig Mutationen auf als in anderen

Bei der Entstehung von neuen, lokalen Mutationen spielen viele Faktoren eine Rolle - vor allem zelleigene Reparaturmechanismen, die lokale Zusammensetzung der DNA-Sequenz und die Beschaffenheit des Chromatins. Im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wurde bereits gezeigt, dass natürliche Reparaturmechanismen innerhalb der Zellen bestimmte Bereiche des Erbguts (Bereiche, die für Gene kodieren) vor dem

Entstehen neuer Punktmutationen schützen können (Belfield et al., 2018). So werden Schäden an der DNA in Bereichen, die für Gene kodieren, häufiger durch ein Reparatursystem namens *DNA Mismatch Repair* (MMR) repariert als in anderen. Wird dieses Reparatursystem ausgeschaltet, führt das zu einer Anhäufung von Mutationen in diesen Sequenzen.

Ähnliches wurde auch in menschlichen Zellen gefunden und die Verbindung mit epigenetischen Markern gezeigt (Y. Huang, Gu, & Li, 2018).

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass auch Chromatin Auswirkung auf die Entstehung von Mutationen hat. Sie treten in Abhängigkeit von der strukturellen Beschaffenheit der DNA des jeweiligen Gen-Ortes mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit auf (Makova & Hardison, 2015).

Das Entstehen von Punktmutationen ist also nicht rein zufällig, sondern unterliegt natürlichen Mechanismen der Zelle, obwohl sie im Einzelfall auch nicht vorhergesagt werden können. Insgesamt besteht noch Forschungsbedarf, diese Mechanismen in Bezug auf das Entstehen von lokalen Mutationen (vor allem in Pflanzen) weiter zu charakterisieren.

Mutationen treiben die Evolution voran

Durch Mutationen können in einem Individuum neue Eigenschaften entstehen, die negativ oder positiv für den Organismus sein können. So haben manche Mutationen eine krankmachende Wirkung und führen in ihrer Summe zum Beispiel zur Bildung von Tumoren. Treten durch Mutationen jedoch neue, positive Eigenschaften für den Organismus auf, so können diese dem Individuum einen Vorteil verschaffen und sich dieses Merkmal in einer Population durchsetzen. Mutationen sind also die primäre Quelle von genetischer Variation innerhalb einer Population und unterliegen der natürlichen Selektion. Sie wirken, indem der Phänotyp des Organismus mit seiner Umwelt interagiert. Mutationen bilden die genetische Grundlage für die Anpassungsfähigkeit von Organismen. Mutationen sind somit einer von mehreren Faktoren, die die Evolution antreiben und im Zusammenspiel mit diversen Umweltbedingungen die Artenvielfalt erhöhen. Dabei wird die genetische Information und biologische Eigenschaften oft schrittweise verändert: Viele Geninformationen liegen mehrfach vor. Treten Mutationen auf, können neue Varianten erprobt werden, ohne dass die alte Gen-Funktion vollständig verschwindet. So wird beispielsweise erklärt, wie durch Mutationen das Farbenspektrum des menschlichen Auges nach und nach erweitert wurde (Shichida & Matsuyama, 2009).

Punktmutationen führen zur Erhöhung der genetischen Variation innerhalb einer Art

Individuen einer Art unterscheiden sich natürlicherweise untereinander in einzelnen Basen des Erbguts (sogenannte Polymorphismen), was die genetische Variation innerhalb einer Population erhöht.

Diese Polymorphismen gehen auf ursprüngliche Punktmutationen zurück, die sich zum Teil innerhalb des Genpools einer Population durchgesetzt haben und somit vererbare genetische Varianten darstellen. Diese genetische Variation bewirkt, dass Individuen einer Art unterschiedlich auf äußere Einflüsse reagieren können. Wenn die genetische Variation innerhalb einer Art limitiert ist, besteht die Möglichkeit, dass Gene mit weniger erwünschten Eigenschaften weitergegeben und ausgeprägt werden. Genvarianten erlauben es dagegen, dass die Organismen in Interaktion mit der Umwelt neue Eigenschaften „testen“. Bringen diese Varianten evolutive Vorteile, können sie sich in den Populationen ausbreiten, ohne dass die ursprünglichen Genkombinationen dabei verloren gehen müssen.

Mutationen werden in der Pflanzenzucht genutzt

In der Pflanzenzüchtung sind Mutationen im Erbgut oft erwünscht, denn mit ihrer Hilfe werden genetische Varianten erzeugt, die den Pflanzen als positiv angesehene Eigenschaften verleihen können. Diese Pflanzen können zum Beispiel durch besonderen Wuchs, größere Früchte oder Resistenzen gegen Umwelteinflüsse einen erhöhten Ertrag einbringen. Natürliche Populationen und gezüchtete Sorten werden hierfür nach wünschenswerten Mutationen durchsucht, vermehrt und miteinander gekreuzt, um eine optimale Kombination der Erbinformation zu erreichen.

Manche Züchter beschleunigen das Auftreten von Mutationen durch den Einsatz von ionisierenden Strahlen oder chemischen Stoffen (Parry et al., 2009). Diese Verfahren wurden Ende der 1920er Jahre für die Pflanzenzucht entwickelt (Stadler, 1928). Das Ziel dieser Mutagenese-Verfahren ist die Erhöhung der genetischen Vielfalt innerhalb kürzerer Zeiträume, als sie natürlicherweise zu erwarten sind. Pflanzen, die dadurch in ihrer Entwicklung gestört sind bzw. unerwünschte Resultate aufweisen, werden aussortiert. Ein Beispiel dafür, welche biologische Vielfalt durch züchterische Nutzung von Mutationen entstehen kann, sind Kohlgewächse wie Kohlrabi, Blumenhohl und Brokkoli.

Heutzutage wird häufig eine Screening-Methode namens TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) verwendet, die gezielt in einem Hochdurchsatz-Verfahren in einem bestimmten Genbereich im Erbgut der Pflanzen nach Punktmutationen an der DNA sucht. Die Pflanzen werden anschließend mit ertragreichen, unbehandelten Pflanzensorten verpaart, um ungewünschte

Veränderungen der DNA auszukreuzen und neue ertragreiche Sorten zu erhalten (Kurowska et al., 2011).

Es können auch einzelne Zellen im Labor verwendet werden, aus denen dann später wieder ganze Pflanzen gezüchtet werden. Man spricht in diesen Fällen von *In-vitro*-Mutagenese. Diese Zellen können durch das Verfahren „gestresst“ werden und z.B. Veränderungen in der Epigenetik aufweisen.

Definition: Mutagenese

Eine klare absolute, biologische Definition von Mutagenese ist nicht möglich und sollte am ehesten im historischen Kontext betrachtet werden. So kam der Begriff durch die Charakterisierung physikalischer und chemischer Mutagenese Anfang des 20. Jahrhunderts durch die Arbeiten von Hermann Muller und Charlotte Auerbach auf (Auerbach, 1949; Muller, 1947). Mutagenese ist die Erzeugung von Mutationen am Erbgut von Lebewesen, wobei es jedoch wichtig ist zu unterscheiden, wie diese Mutationen entstanden sind: auf der einen Seite stehen die weiter oben beschriebenen Mutationen, die auf natürliche Weise auftreten; auf der anderen Seite Mutationen, die für Forschungs- oder Züchtungszwecke induziert werden.

Mutagenese Züchtung

Mutagenese lässt sich physikalisch durch Strahlen oder chemisch durch bestimmte Substanzen induzieren. Dies erhöht die Mutationsrate innerhalb eines Organismus. Es lässt sich nicht vorhersagen, wo genau im Erbgut die Mutationen auftreten und wie viele.

Chemische Mutagene, wie sogenannte Basenanaloga, können fälschlicherweise in die Basensequenz der DNA eingebaut werden und damit zu Punktmutationen führen. Bestimmte chemische Substanzen bewirken biochemische Veränderungen der Basen; wenn dadurch eine „Lücke“ im DNA-Strang entsteht, kann diese dann durch eine falsche Base gefüllt werden. Physikalische Mutagene sind zum Beispiel UV-Licht oder Röntgen-Strahlung. Hierbei können Basen miteinander verschmelzen und beschädigt werden, so dass die Struktur und die Sequenz der DNA verändert werden.

Je nach Wahl des mutagenen Stoffes (chemisch oder physikalisch) lassen sich verschiedene Arten von Mutationen bewirken. So kann die Chemikalie EMS (Ethylmethansulfonat) zum Beispiel vorwiegend die Änderung der Base Cytosin in ein Thymin bewirken und Guanin in Adenin (Caldwell et al., 2004; Greene et al., 2003).

Bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen werden vorwiegend kleine Sequenzen der DNA gelöscht und DNA-Strangbrüche induziert (Morita et al., 2009; Naito et al., 2005). All diese Schäden beziehungsweise Veränderungen aktivieren zelleigene Reparaturmechanismen, welche schnellstmöglich versuchen, die DNA wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückzubringen. Diese Systeme sind jedoch fehleranfällig und können dabei falsche Basen in die DNA-Sequenz einbauen. Grundsätzlich wirken diese Reize unspezifisch und zielen auf eine Beschleunigung natürlicher Vorgänge, wie sie u.a. durch UV-Licht ausgelöst werden.

Genom-Editierungs-Verfahren

Mit Hilfe von Genom-Editierungs-Verfahren werden gezieltere Veränderungen am Erbgut möglich. Dabei werden Moleküle in die zu verändernde Zelle eingebracht, welche dann zielgerichtet eine bestimmte Sequenz im Erbgut verändern sollen. Zu diesen Verfahren zählen Techniken wie die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese (ODM, siehe Hintergrund: ODM) und die Genom-Editierung durch Nukleasen wie z.B. CRISPR/Cas (siehe Hintegrund-Papiere zu CRISPR/Cas). Häufig werden diese Verfahren als zielgerichtete Mutagenese bezeichnet. Dies ist jedoch teilweise irreführend, da Mutationen nach bisherigem Verständnis durch unspezifische Reize ausgelöst und daher als zufällig und ungerichtet angesehen werden¹, wohingegen bei den Genome-Editing-Verfahren klar definierte Orte auf dem Genom gezielt verändert werden sollen. Da der fortwährende Gebrauch des Wortes „Mutagenese“ hier dazu führen kann, dass insbesondere in der Öffentlichkeit der zielgerichteten Mutagenese eine Natürlichkeit zugedacht wird, die nicht vorbehaltlos zutrifft bzw. zu diskutieren ist, scheint es hilfreich, das Wort Mutagenese vor allem im Kontext der herkömmlichen Züchtung zu verwenden und bei den neuen Verfahren eher von Genome Editing zu sprechen.

Stand Juli 2018

¹

<http://www.biologie-schule.de/evolutionsfaktor-mutation.php>

Referenzen

- Auerbach, C. (1949). Chemical mutagenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 24(3), 355-391.
- Belfield, E. J., Ding, Z. J., Jamieson, F. J. C., Visscher, A. M., Zheng, S. J., Mithani, A., & Harberd, N. P. (2018). DNA mismatch repair preferentially protects genes from mutation. *Genome Res*, 28(1), 66-74. doi: 10.1101/gr.219303.116
- Caldwell, D. G., McCallum, N., Shaw, P., Muehlbauer, G. J., Marshall, D. F., & Waugh, R. (2004). A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J*, 40(1), 143-150. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02190.x
- Capel, J., Montero, L. M., Martinez-Zapater, J. M., & Salinas, J. (1993). Non-random distribution of transposable elements in the nuclear genome of plants. *Nucleic Acids Res*, 21(10), 2369-2373.
- Clancy, S. (2008). Genetic Mutations. *Nature Education*.
- Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., . . . Henikoff, S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*, 164(2), 731-740.
- Huang, J., Gao, Y., Jia, H., Liu, L., Zhang, D., & Zhang, Z. (2015). Comparative transcriptomics uncovers alternative splicing changes and signatures of selection from maize improvement. *BMC Genomics*, 16, 363. doi: 10.1186/s12864-015-1582-5
- Huang, Y., Gu, L., & Li, G. M. (2018). H3K36me3-mediated mismatch repair preferentially protects actively transcribed genes from mutation. *J Biol Chem*, 293(20), 7811-7823. doi: 10.1074/jbc.RA118.002839
- Kurowska, M., Daszkowska-Golec, A., Gruszka, D., Marzec, M., Szurman, M., Szarejko, I., & Maluszynski, M. (2011). TILLING: a shortcut in functional genomics. *J Appl Genet*, 52(4), 371-390. doi: 10.1007/s13353-011-0061-1
- Morita, R., Kusaba, M., Iida, S., Yamaguchi, H., Nishio, T., & Nishimura, M. (2009). Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice. *Genes Genet Syst*, 84(5), 361-370.
- Muller, H. J. (1947). The production of mutations. *J Hered*, 38(9), 258-270.
- Munoz-Lopez, M., & Garcia-Perez, J. L. (2010). DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics*, 11(2), 115-128. doi: 10.2174/138920210790886871
- Naito, K., Kusaba, M., Shikazono, N., Takano, T., Tanaka, A., Tanisaka, T., & Nishimura, M. (2005). Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with gamma-rays and carbon ions. *Genetics*, 169(2), 881-889. doi: 10.1534/genetics.104.033654
- Parry, M. A., Madgwick, P. J., Bayon, C., Tearall, K., Hernandez-Lopez, A., Baudo, M., . . . Phillips, A. L. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *J Exp Bot*, 60(10), 2817-2825. doi: 10.1093/jxb/erp189

- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, *243*(2), 281-296. doi: 10.1007/s00425-015-2450-x
- Shichida, Y., & Matsuyama, T. (2009). Evolution of opsins and phototransduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *364*(1531), 2881-2895. doi: 10.1098/rstb.2009.0051
- Stadler, L. J. (1928). Genetic Effects of X-Rays in Maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *14*(1), 69-75.
- Vicient, C. M., & Casacuberta, J. M. (2017). Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. *Ann Bot*, *120*(2), 195-207. doi: 10.1093/aob/mcx078
- Wicker, T., Yu, Y., Haberer, G., Mayer, K. F., Marri, P. R., Rounsley, S., . . . Roffler, S. (2016). DNA transposon activity is associated with increased mutation rates in genes of rice and other grasses. *Nat Commun*, *7*, 12790. doi: 10.1038/ncomms12790
- Wilson, M. H., Coates, C. J., & George, A. L., Jr. (2007). PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther*, *15*(1), 139-145. doi: 10.1038/sj.mt.6300028
- Yoshida, J., Akagi, K., Misawa, R., Kokubu, C., Takeda, J., & Horie, K. (2017). Chromatin states shape insertion profiles of the piggyBac, Tol2 and Sleeping Beauty transposons and murine leukemia virus. *Sci Rep*, *7*, 43613. doi: 10.1038/srep43613