

12. Mutationen, Mutagenesen und Mutanten

Welche Typen von Mutationen gibt es?

Wie kann man sie finden oder erzeugen?

Warum tut man das?

Mutationen

Definition einer Mutation:

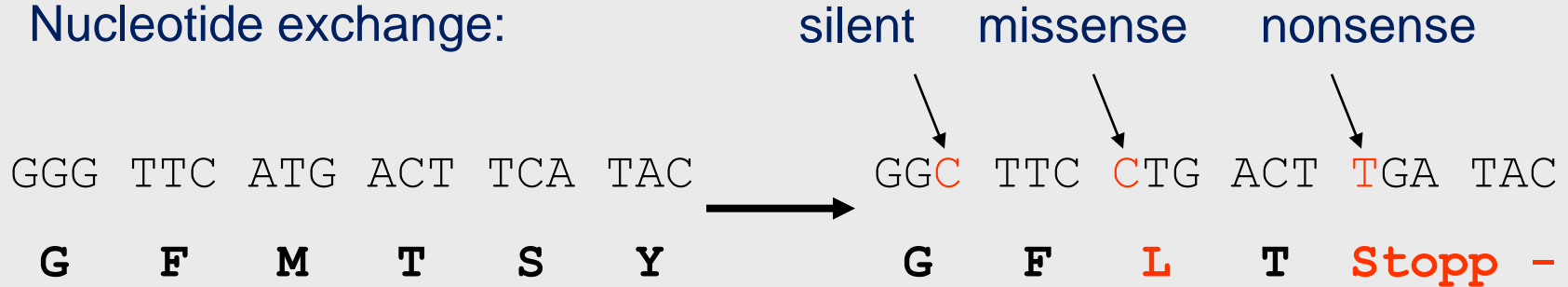
Eine vererbare Veränderung der genetischen Information (DNA) wird als Mutation bezeichnet (nach Knippers).

Cytogenetische/Molekulare Einteilung von Mutationen

1. Genommutationen
2. Chromosomenmutationen
3. Punktmutationen
4. Mutationen durch mobile Nukleinsäuren

Punktmutationen in proteinkodierenden Sequenzen

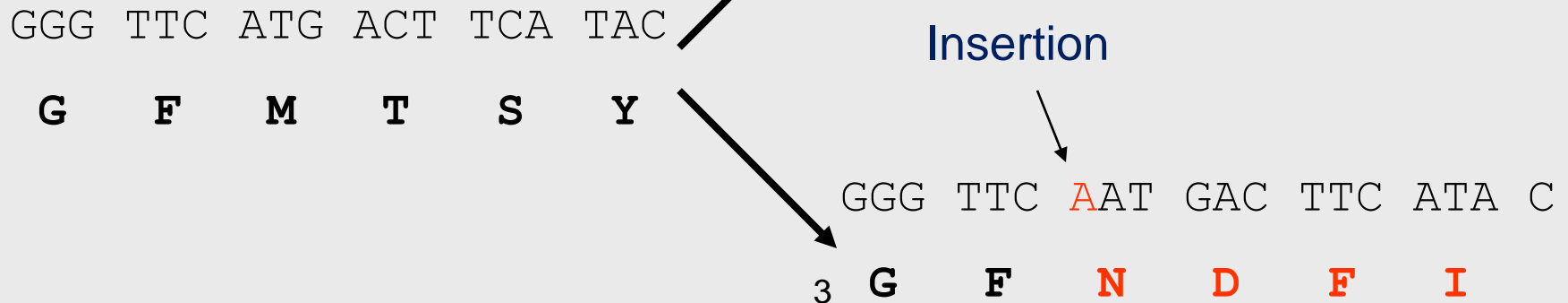
Nucleotide exchange:



Deletion



Insertion



Insertion in proteinkodierenden Sequenzen führt zum Stopp



Mutagenesen

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen

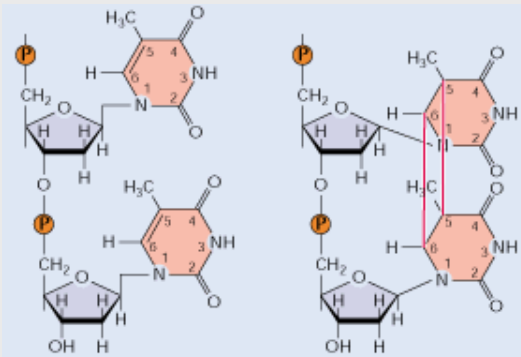
- a) spontanen Mutationen und
- b) induzierten Mutationen.

Mutagenesetypen

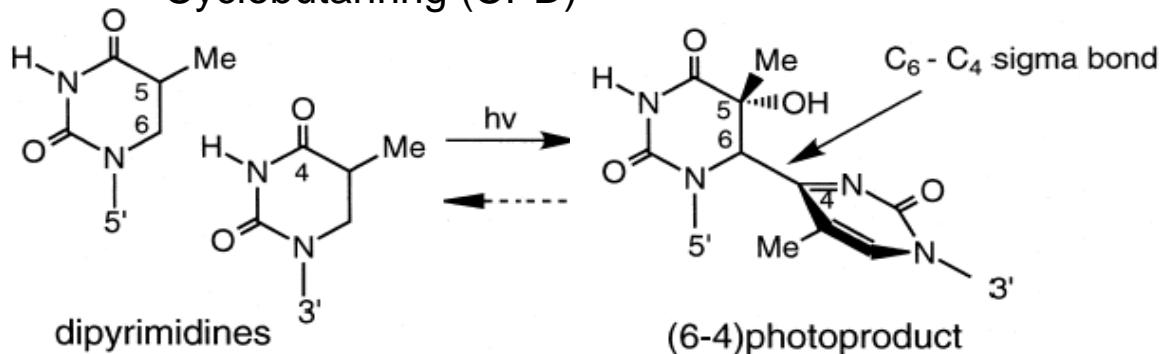
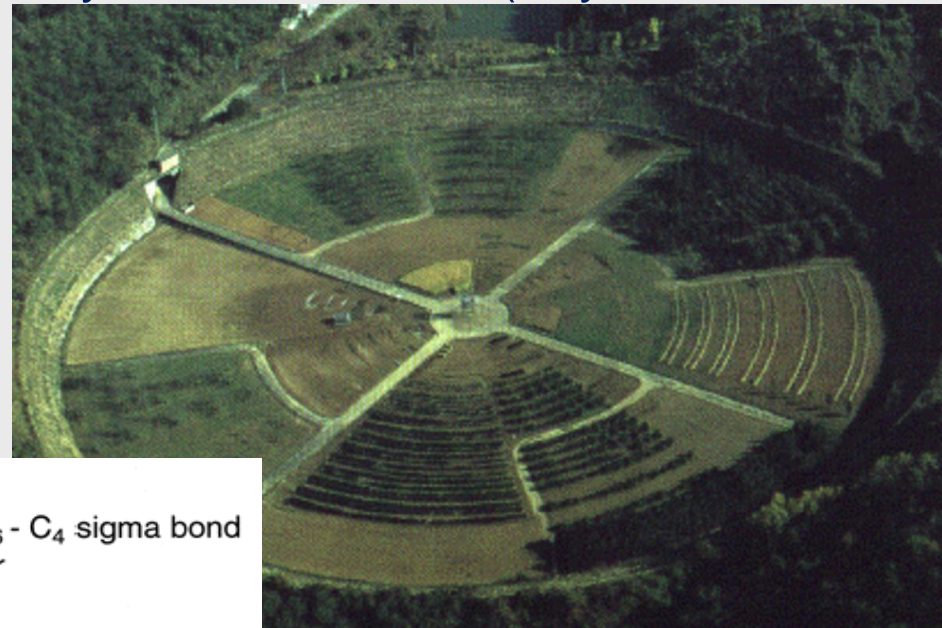
1. physikalische M.
2. chemische M.
3. molekularbiologische M.

1. Physikalische Mutagenese (viele Mut.!?)

- wird zumeist erzeugt durch ionisierende Strahlung (Röntgen-, γ -Strahlung oder Beschuss mit schnellen Neutronen) oder UV-Strahlung
- Bei ionisierender Strahlung kann es zu Basenschädigungen (Punktmutationen) und Doppelstrangbrüchen (Chromosomen- und Genommutationen) kommen.
- UV-Strahlung führt zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren (Thymin-Dimere oder T-C-6-4-Photoprodukte)



Cyclobutanring (CPD)

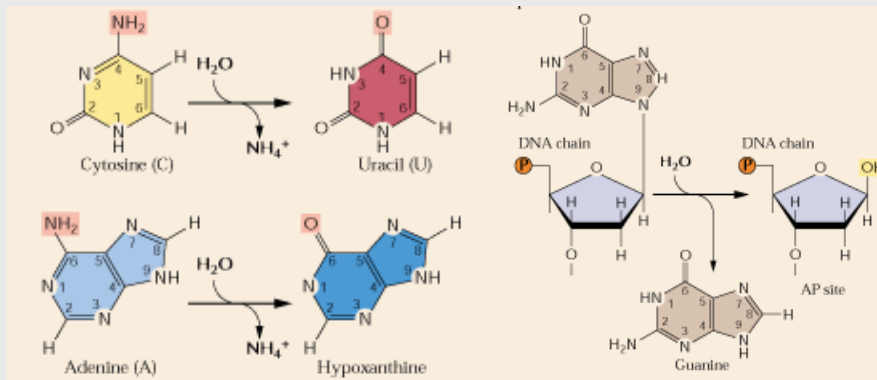


dipyrimidines

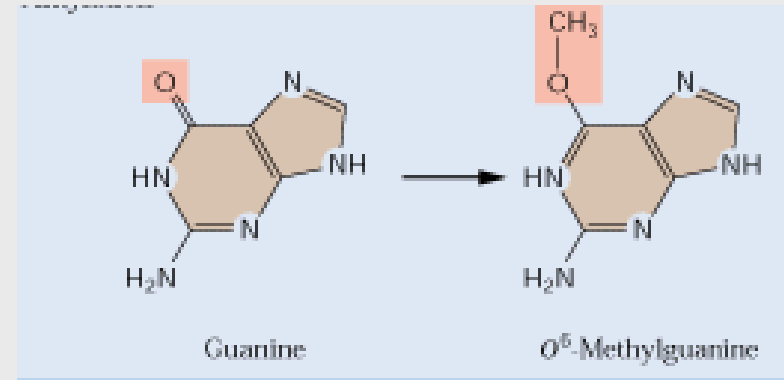
(6-4)photoproduct

2. Chemische Mutagenese (viele Mut.?!)

- Bei spontanen chemischen Mutationen durch Depurinierung und Deaminierung entstehen AP-Stellen oder Falschpaarungen.
- Durch chemische Mutagene kann es auch zu Doppelstrangbrüchen kommen.
- Zur chemischen Mutagenese werden häufig Alkyl-Sulfate, Nitroso-Verbindungen (alkylierende Substanzen) oder polycyclische Kohlenwasserstoffe eingesetzt.



Depurinierung und Deaminierung



Alkylierung

3. Molekularbiologische Mutagenese

- a) Gene targeting
- b) Insertionsmutagenese
- c) Transposonmutagenese

Vor- und Nachteile verschiedener Mutagenesen

	phys. M.	chem. M.	mobiol. M.
Mutationen	Chromosomenm., Del.	Del., Punktm.	Gene targeting
Effektivität	technisch aufwendig	einfach und billig	hoher Aufwand
Detektion der Mutation	Map-based cloning	Map-based cloning	TAIL, iPCR

Heute ist „next generation sequencing“ die Lösung!

Häufig eingesetzte Methoden der gerichteten Mutagenese

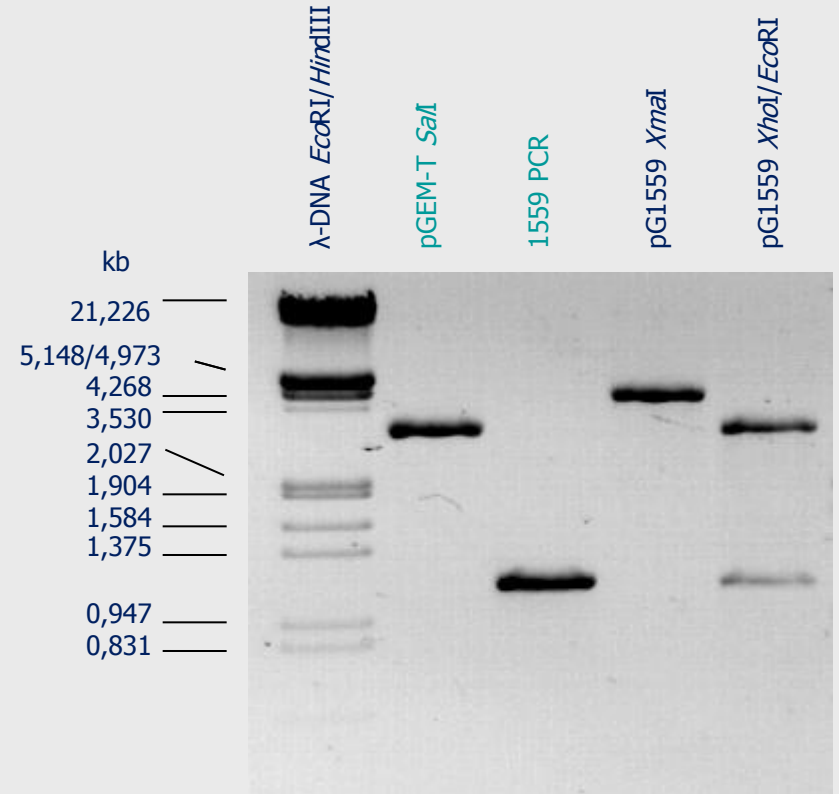
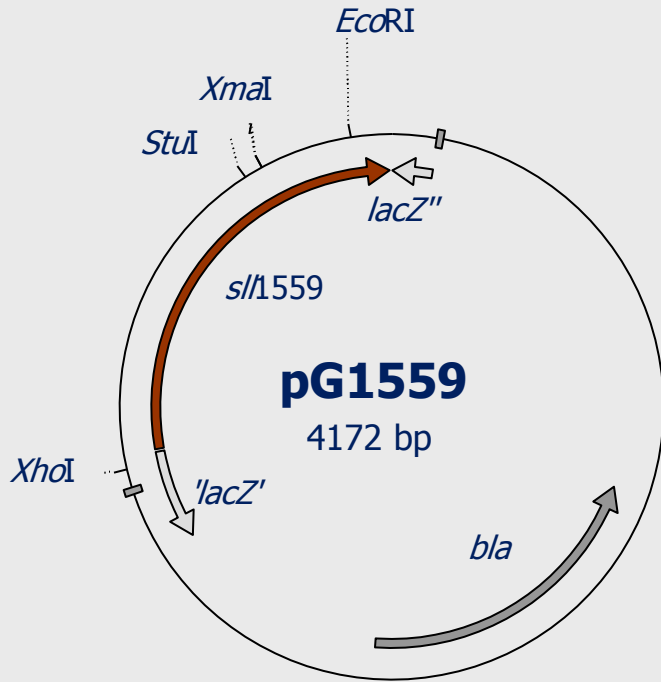
1. Insertionsmutagenese (targeted mutagenesis)
2. Site-directed mutagenesis
3. Antisense/RNAi-Technik
4. CRISPR Cas9

1. Insertionsmutagenese

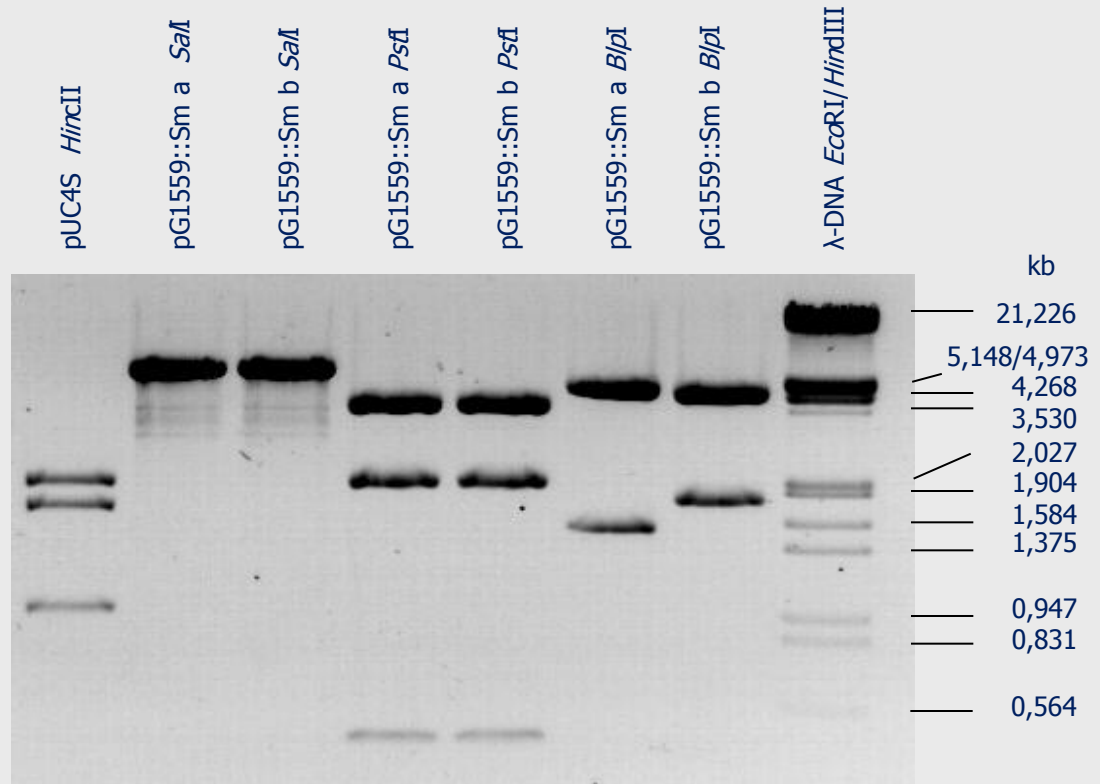
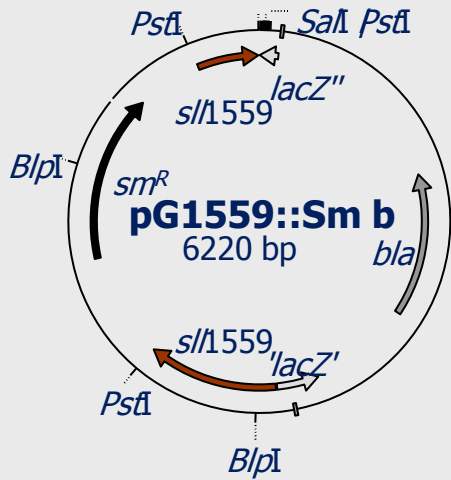
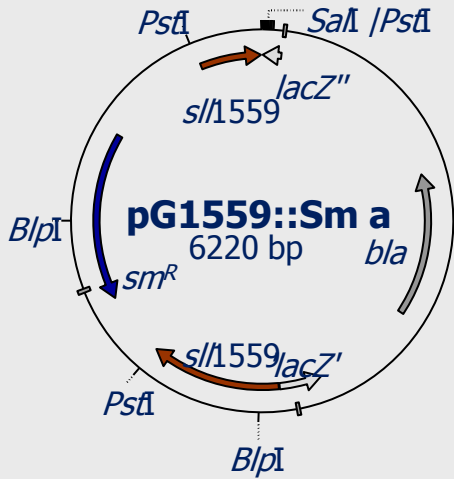
- Herstellung der codierenden Sequenz des Zielgens (PCR, Klon)
- Aufschneiden der Zielsequenz durch Restriktase (unikal oder doppelt)
- Insertion eines entsprechenden Markergens (Antibiotikaresistenz, Auxotrophie)
- **Transfer** des Konstrukts in den Zielorganismus (Transformation, Konjugation, Bioballistik u.ä.)
- **Homologe Rekombination** mit dem nativen Gen führt zum Austausch der intakten gegen die mutierte Kopie
- Selektion und Segregation der Mutanten auf Selektivmedien

- „Random mutagenesis“ durch tDNA-Insertion bei Pflanzen oder Transposons bei Bakterien

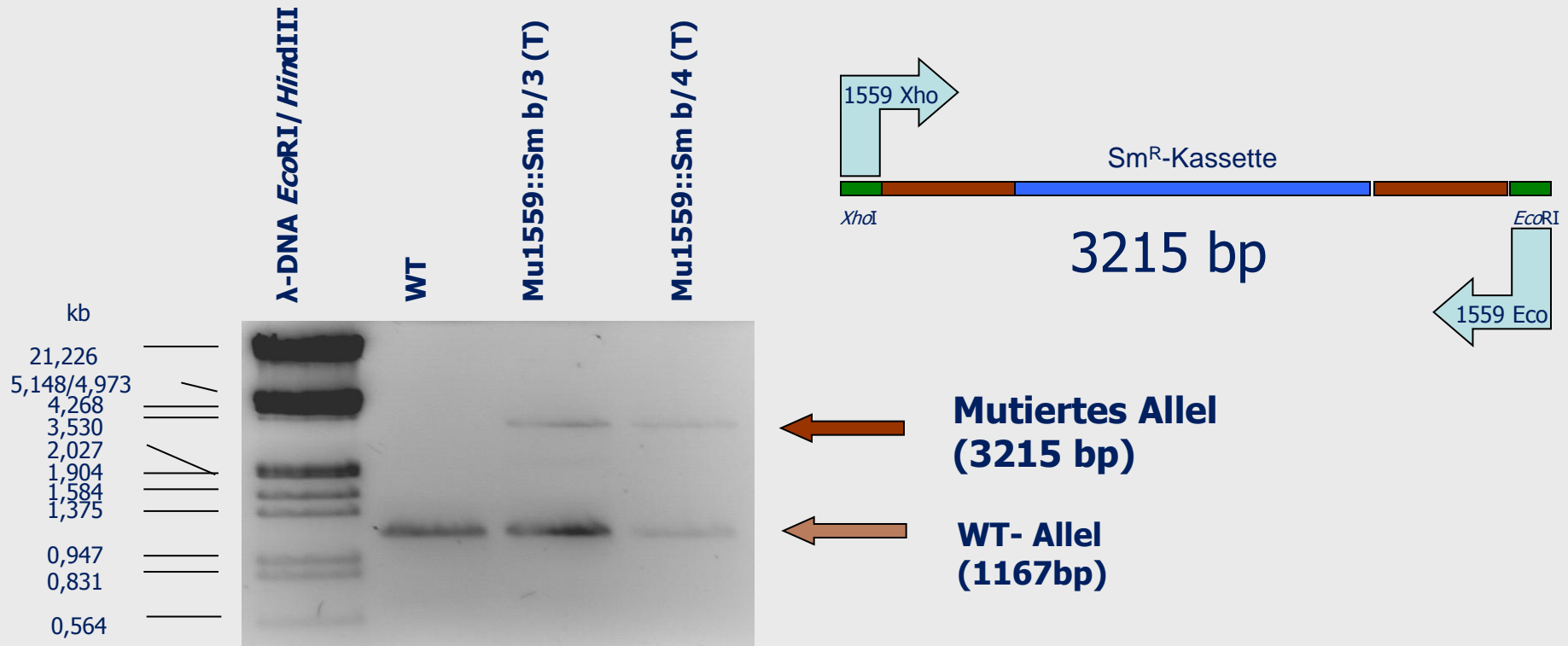
z.B. Herstellung der Knock-out Mutante für das Gen *sII1559* - PCR



Ko-Mutante für *sII1559* – Einbau Marker



Ko-Mutante für *s//1559* - Mutantenscreening



Mutante für *s//1559* liegt vor, aber nicht vollständig segregiert

→ *s//1559* = essentielles Gen!

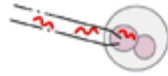
→ Phosphoserin-Transaminase 14

Herstellung transgener Mäuse

Neo^R u. H

a Standard transgenic approach

Transgene DNA is microinjected into the male pronucleus of a fertilised murine oocyte



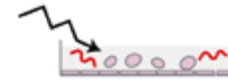
Injected oocytes are transferred to a 0.5-day pseudopregnant recipient mouse



Pron

b Gene-targeted transgenic approach

Isogenic transgene DNA is introduced into ES cells (e.g. by electroporation)

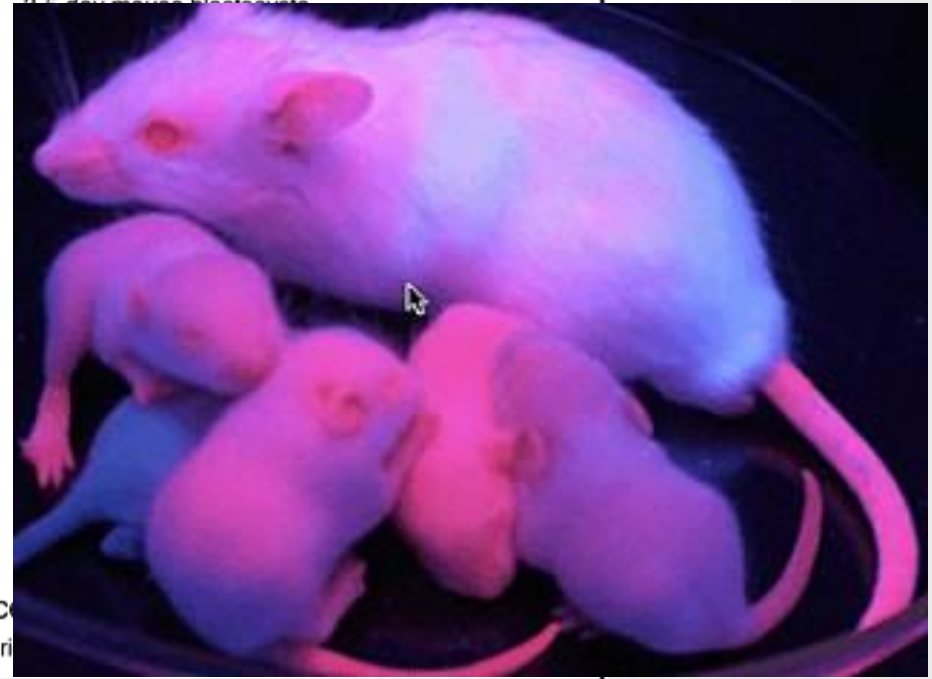
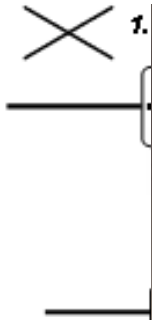


Drug selection is used and the surviving colonies are screened for the transgene



Characterised targeted cells are microinjected into 0.5-day mouse blastocysts

syltransferase



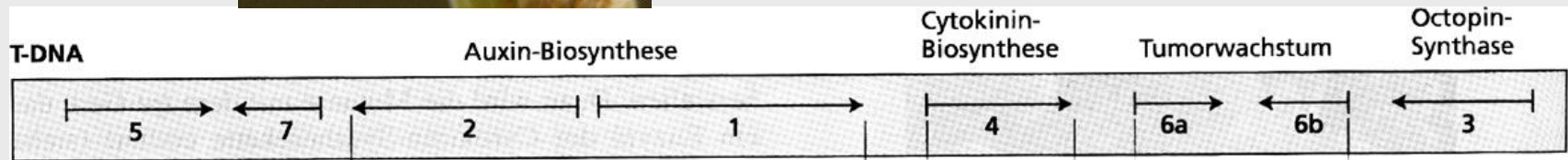
nic mic
1 Cambri

Agrobakterien können Phytohormone bilden – natürlicher horizontaler Gentransfer

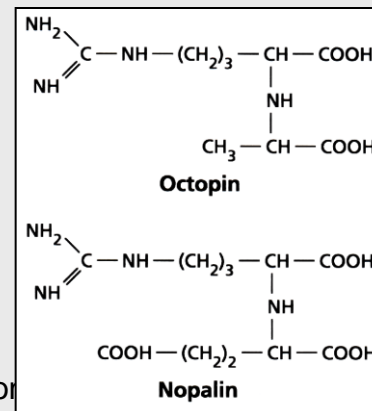


Virulente Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* besitzen ein großes Tumor-induzierendes Plasmid, das Ti-Plasmid. Ein kleiner Abschnitt davon, die T-DNA, wird in das Wirtsgenom eingebaut.

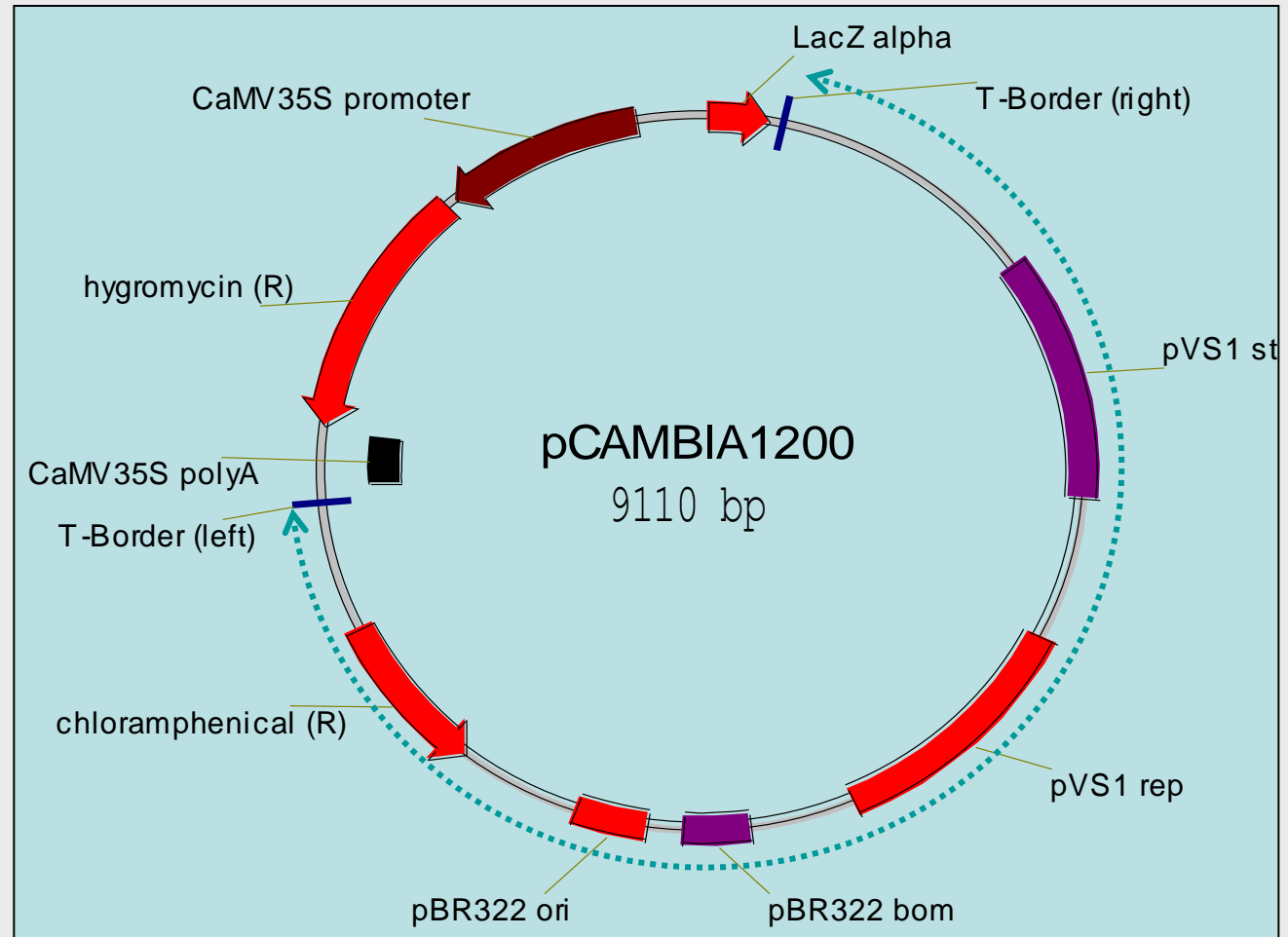
T-DNA trägt Gene für die Biosynthese von trans-Zeatin und Auxin sowie für Opine (natürlicher Vektor).



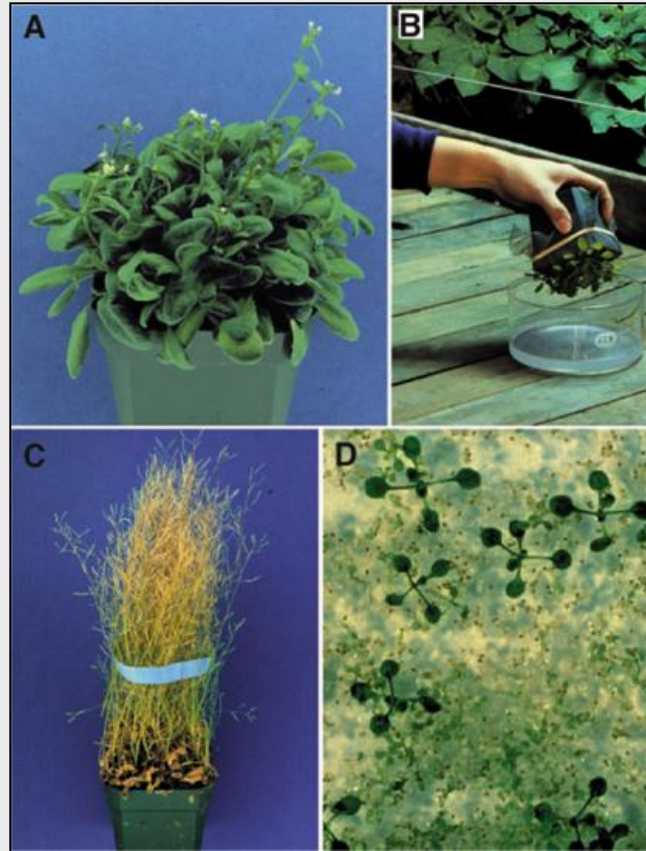
- Pflanze bildet über die bakteriellen Gene spezifische N-Verbindungen.
- Opine werden nur von den Bakterien verwertet und dienen diesen als N-Quelle im neu erworbenen Lebensraum.



„Entwaffnete“ Vektoren



Wie stellt man transgene *Arabidopsis* her?



„flower dip“
Transgene Samen
entstehen

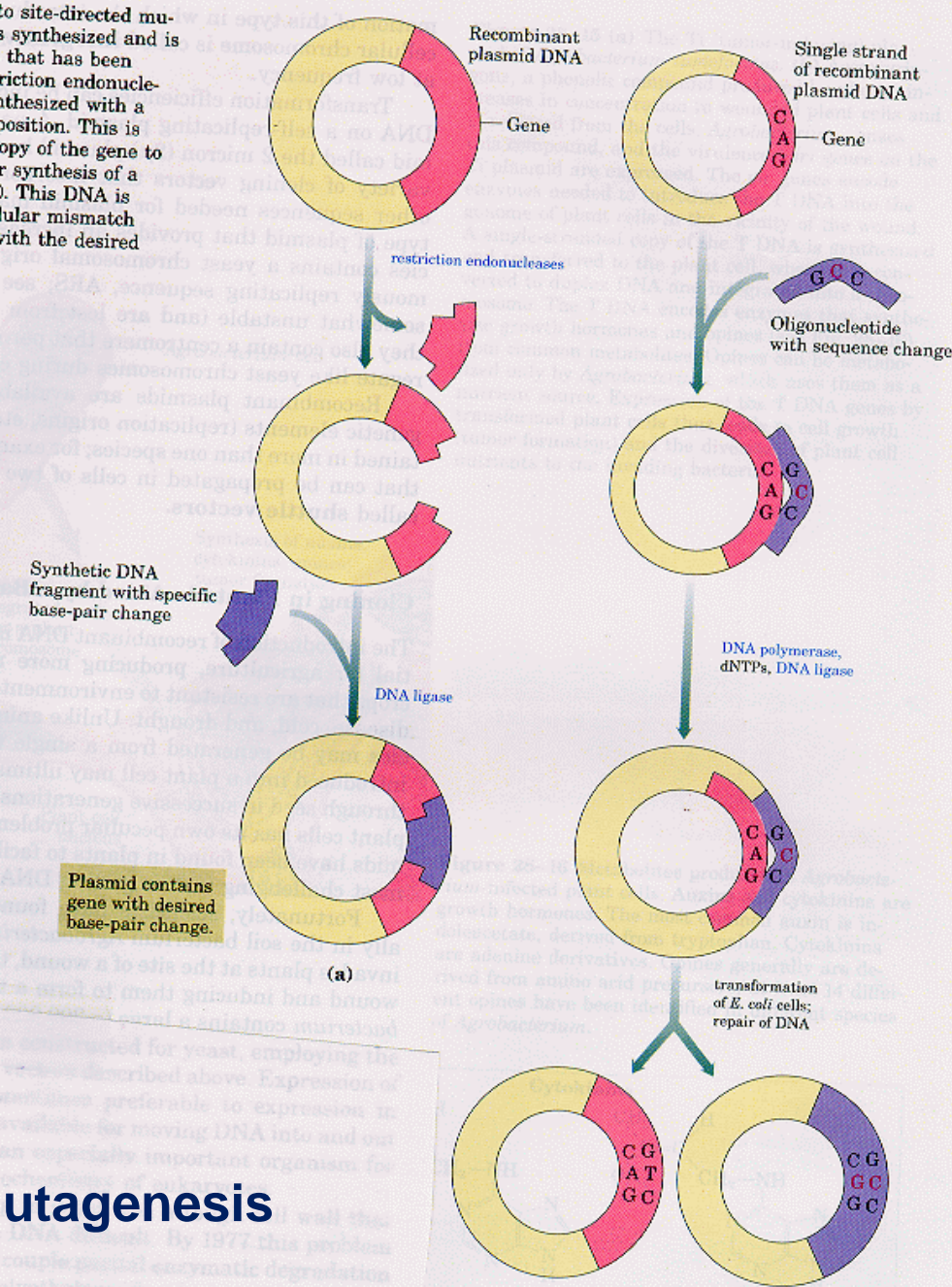
- Bei anderen Pflanzen werden Gewebe mit Agrobakterien inkubiert!
- Andere Pflanzen werden einfach mit nackter DNA beschossen!

2. Site directed mutagenesis

- Gezielter Austausch einer Aminosäure gegen eine andere, auch größere Umbauten möglich
- Herstellung der codierenden Sequenz des Zielgens (PCR, Klon)
- Herstellung von Primern mit Punktmutationen
- Nutzung der Primer zur PCR
- Klonierung der geänderten DNA
- Proteinexpression – Enzymaktivität
- Transformation – Phänotyp

- Heute bei genügend Geld – komplette Gensynthese

Figure 28-14 Two approaches to site-directed mutagenesis. (a) A DNA segment is synthesized and is used to replace a DNA fragment that has been removed by cleavage with a restriction endonuclease. (b) An oligonucleotide is synthesized with a desired sequence change at one position. This is hybridized to a single-stranded copy of the gene to be altered, and acts as primer for synthesis of a duplex DNA (with one mismatch). This DNA is then used to transform cells. Cellular mismatch repair will produce some clones with the desired sequence change.



Plasmid contains gene with desired base-pair change.

In *E. coli* cells, about half of plasmids will have gene with desired base-pair change.

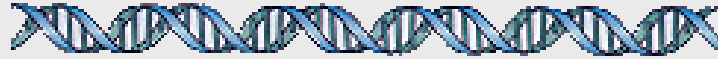
Kits für random Mutagenesis

3. Antisense RNA oder RNAi

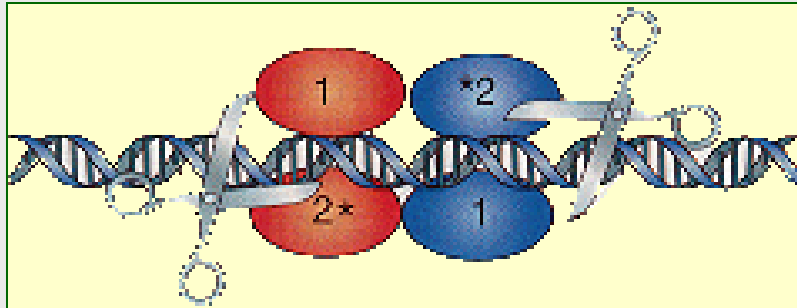
- Keine Mutation (knock out) im genetischen Sinne, sondern „phänotypische“ Mutation (knock down)
- In Organismen angewandt, die keine oder geringe homologe Rekombination zeigen
- Nachteil: meist kein vollständiger Ausfall des Gens
- Vorteil: Quantitativ abgestufte Reduzierung des Genproduktes erreichbar!
- Antisense RNA: Sequenz des Gens wird in entgegengesetzter Richtung hinter einen Promotor kloniert
- Expression der antisense RNA führt zu dsRNA-Molekülen und deren Abbau, Translationsinhibition oder RNAi
- Heute RNAi
- Geninaktivierungsbibliotheken, 17-30 bp lange dsRNAs gegen Zielgene

RNAi – RNA-Silencing

dsRNA

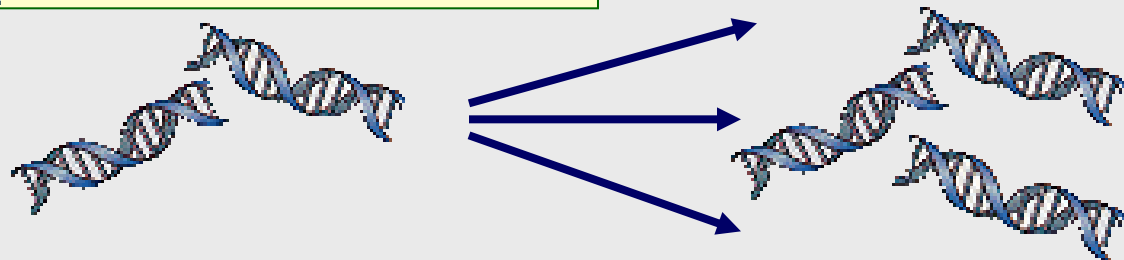


Dicer



systemisches Silencing

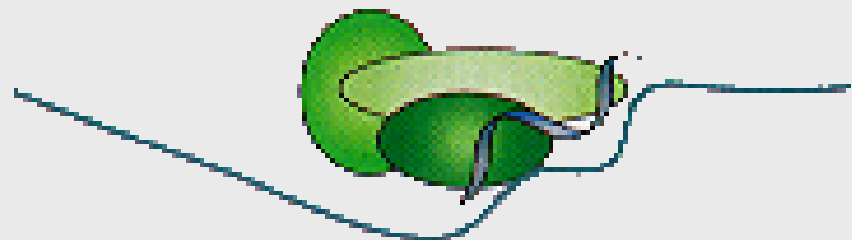
siRNAs



RISC

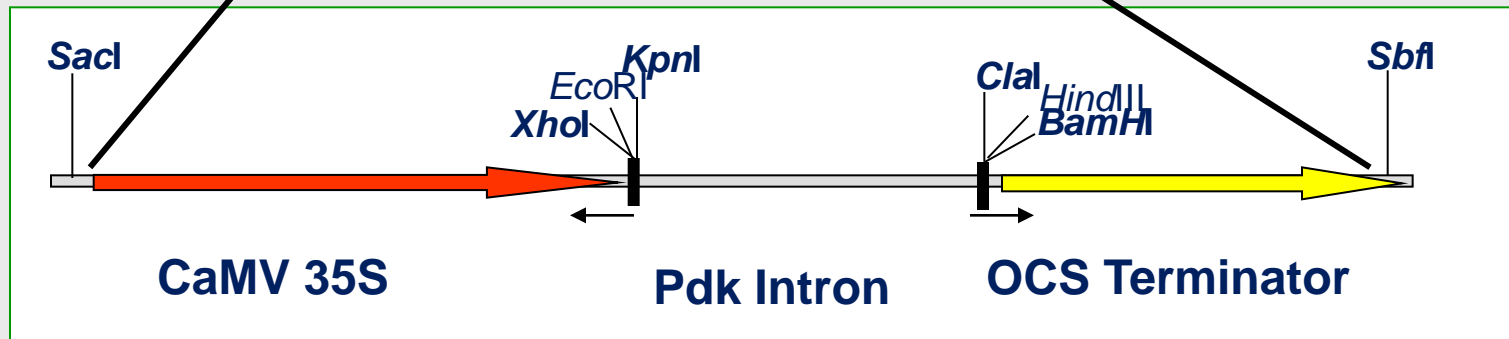
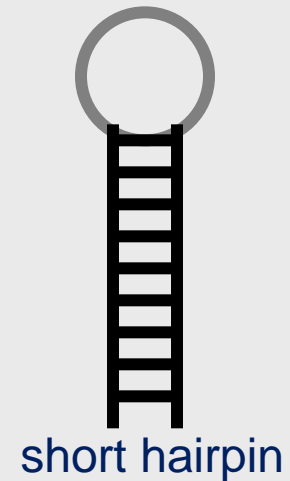
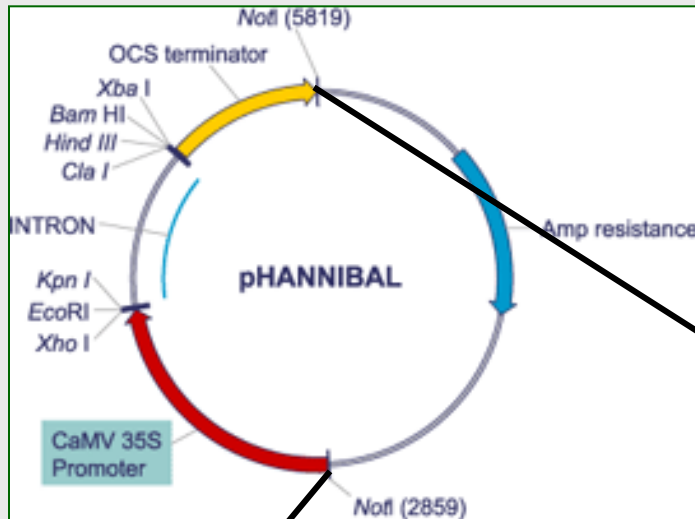


Abbau mRNA



Erstellung eines dsRNA-Konstruktes

RNA-Silencing über **direktes Einbringen von dsRNA** oder DNA-Konstrukte zur Ausbildung von dsRNA



DNA-Transfer durch Agrobakterien



Infiltration

K

2d

4d

6d

8d

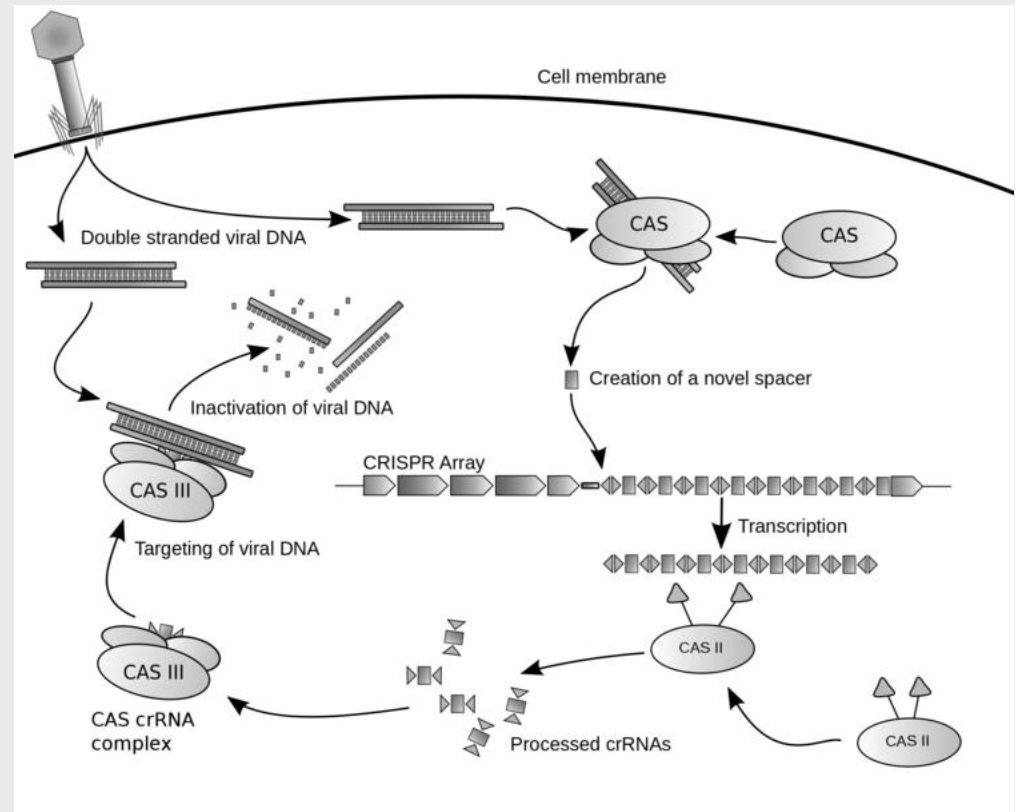
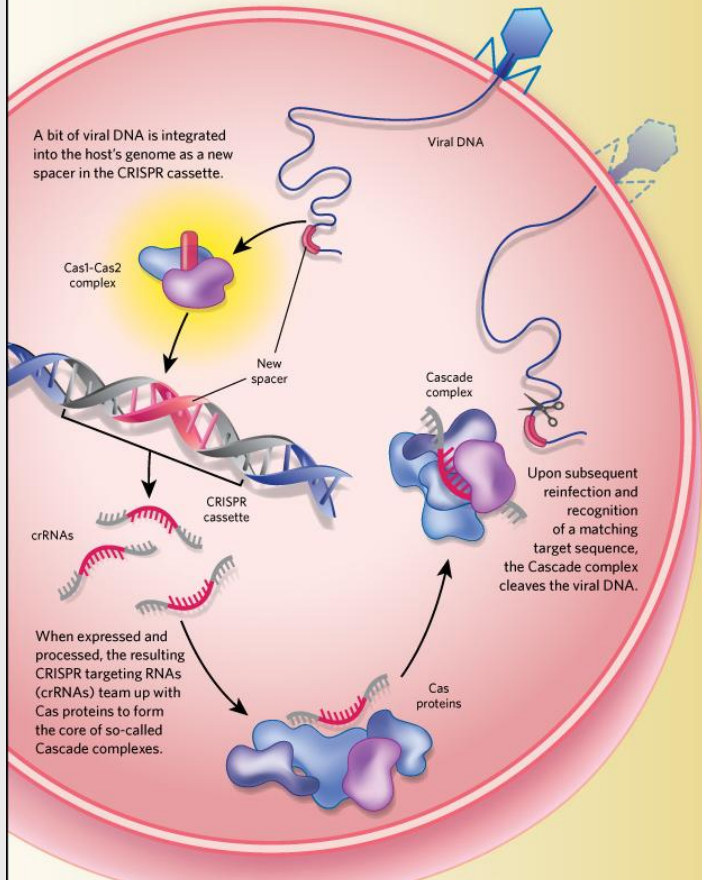
z.B. Gfp-Silencing

4. CRISPR-Cas Verfahren

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CAS - CRISPR associated proteins

PROKARYOTES

It turns out that prokaryotes can also remember previous pathogens they've encountered in what can be considered an analogous system to vertebrate adaptive immunity. The CRISPR-Cas system allows microbes to insert spacers, short bits of plasmid or virus DNA, into the CRISPR cassettes, clusters of spacers interspersed with short direct repeats. The expression of these sequences can be processed by the cell and used to guide the targeted destruction of plasmid or viral DNA.



TRANSPOSON CONNECTION: The function of Cas1, the key enzyme of CRISPR-Cas that is responsible for the acquisition of foreign DNA as spacers within CRISPR units, resembles the activity of MGE recombinases. In the recently discovered casposons, a distinct group of transposons, a Cas1 homolog is predicted to function as a recombinase.

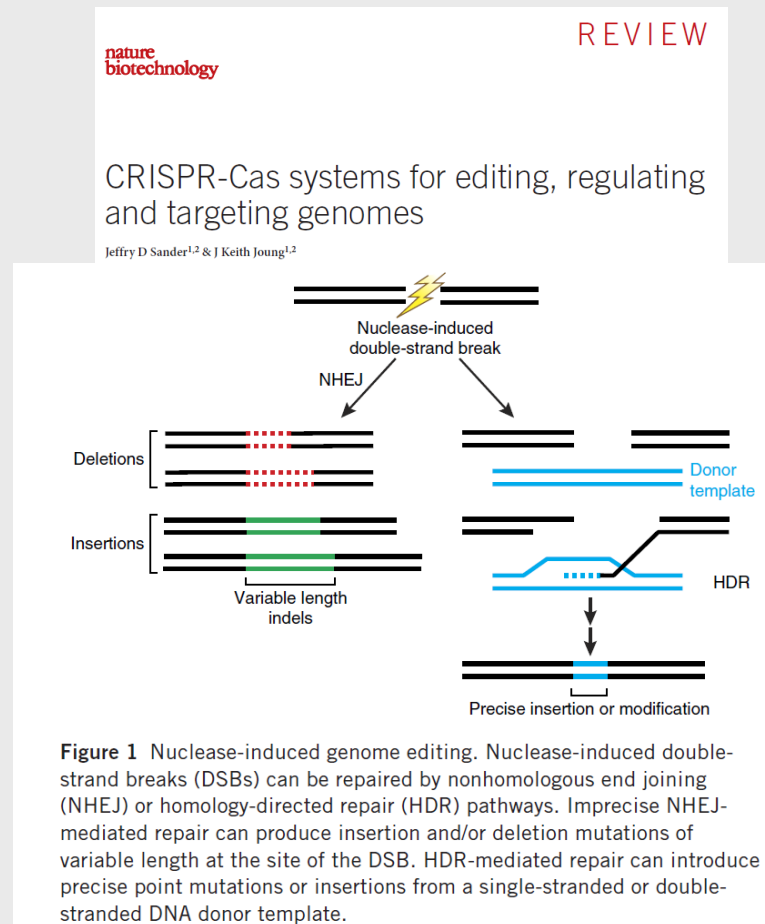
4. CRISPR-Cas9 Verfahren zur Mutation

WIKIPEDIA:

Die [Endonuklease](#) Cas9 (von *CRISPR-associated*) kann eine bestimmte RNA-Sequenz (*crRNA repeat*, Sequenz GUUUUAGAGCU(A/G)UG(C/U)UGUUUUG) binden. Diese *crRNA repeat*-Sequenz bildet eine RNA-[Sekundärstruktur](#) und wird dann von Cas9 gebunden. Als zweiten Teil besitzt die *crRNA* eine Sequenz, welche komplementär zur Ziel-DNA ist und an die Ziel-DNA bindet (*crRNA spacer*).

Wird an eine *crRNA repeat*-Sequenz anstatt der natürlich vorkommenden *crRNA spacer*-Sequenz eine andere, zu einer DNA-Zielsequenz komplementäre RNA-Sequenz angefügt und diese *crRNA* zu einer zur DNA-Sequenz analogen RNA (*tracrRNA*, von engl. *trans-acting CRISPR RNA*) hinzugegeben, schneidet Cas9 die DNA nahe der Zielsequenz. Die beiden RNA-Stränge der *crRNA* und der *tracrRNA* können auch in einem einzelnen, teilweise [selbsthybridisierenden](#) RNA-Strang untergebracht werden. Durch das Cas9 mit den entsprechenden RNA-Sequenzen kann sequenzspezifisch doppelsträngige, teilweise komplementäre DNA geschnitten werden, wodurch gezielte [Deletionen](#) erzeugt werden können.

4. CRISPR-Cas9 Verfahren zur Mutation nutzt einen natürlichen DNA-Reparaturprozess



Problem: sogenannte off targets

CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes

Jeffrey D Sander^{1,2} & J Keith Joung^{1,2}

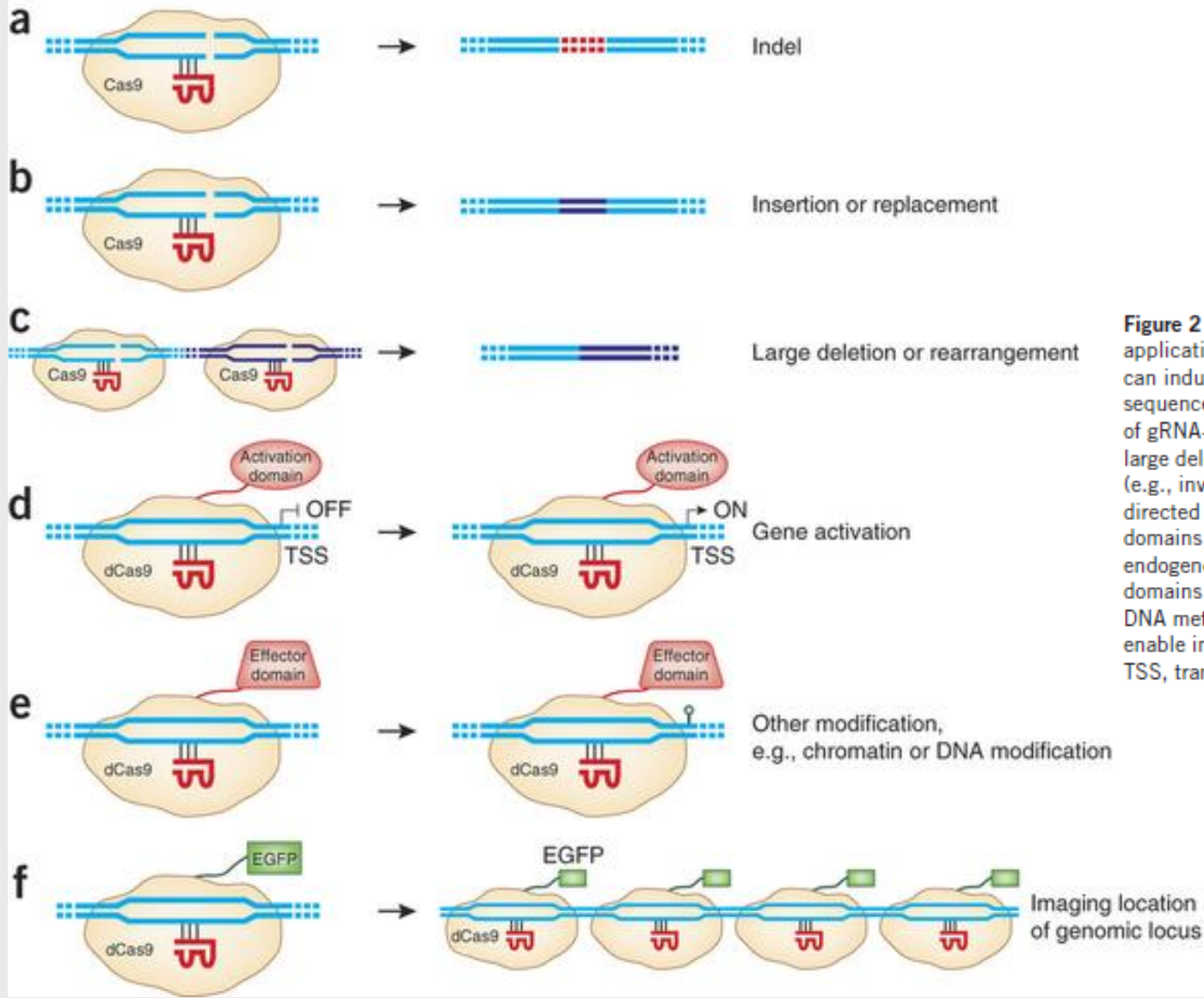


Figure 2 Overview of various Cas9-based applications. **(a,b)** gRNA-directed Cas9 nuclease can induce indel mutations **(a)** or specific sequence replacement or insertion **(b)**. **(c)** Pairs of gRNA-directed Cas9 nucleases can stimulate large deletions or genomic rearrangements (e.g., inversions or translocations). **(d-f)** gRNA-directed dCas9 can be fused to activation domains **(d)** to mediate upregulation of specific endogenous genes, heterologous effector domains **(e)** to alter histone modifications or DNA methylation, or fluorescent proteins **(f)** to enable imaging of specific genomic loci. TSS, transcription start site.

Untersuchung und Verifikation der Mutationen durch Komplementation

1. **Komplementation mit nativem Gen, essentielle Kontrolle**
2. Komplementation mit deletiertem/mutiertem Gen
3. Komplementation mit homologem (orthologem) Gen aus anderen Arten
4. Komplementation mit Gen, dessen Domänen (domain swapping) bzw. AS-Reste (site-directed) ausgetauscht worden sind
5. Untersuchungen mehrerer unabhängiger Mutanten im gleichen Gen