

BRYN A. BRIDGES¹

University of Sussex
MRC Cell Mutation Unit,
Falmer, Brighton BN1 9RR, Anglia
e-mail: b.a.bridges@sussex.ac.uk

ROLA USZKODZEŃ W DNA PRZY POWSTAWANIU MUTACJI FAZY STACJONARNEJ („ADAPTACYJNYCH”)¹

WSTĘP

W przyrodzie istnieje wiele sytuacji, w których komórki nie dzielą się aktywnie. W rzeczywistości może być tak, że znakomita większość komórek, żyjących wolno lub wchodzących w skład organizmów wielokomórkowych, przez dłuższy czas występuje w stanie „spoczynkowym”. Jest więc to dziwne, a nawet przewrotne, że prawie wszystkie doświadczenia nad mutagenizacją były przeprowadzane na komórkach rosnących, a wyniki tych doświadczeń były uogólniane i odnoszone do rzeczywistego świata ewolucji i karcynogenezy. Obecnie wiemy, że procesy mutagenne mogą istnieć w komórkach „spoczynkowych” i mogą być różne od tych, jakie zachodzą w tych samych komórkach, ale znajdujących się w stanie aktywnego wzrostu. Aktywnie rosnące komórki mają tę przewagę, że szybkość (ang. rate) mutacji na jednostkę czasu jest o wiele wyższa niż w komórkach w stanie spoczynkowym, co stanowi dużą korzyść dla eksperymentatora. Jednakże czas spędzony przez większość komórek w stanie spoczynkowym jest o wiele dłuższy, niż czas w jakim komórki są w stanie aktywnego wzrostu; tak więc w efekcie, nawet bardzo niska szybkość

mutacji na jednostkę czasu, może prowadzić do wysokiej częstości (ang. frequency) mutacji na komórkę.

Jest również zupełnie oczywiste, że równowaga między różnymi procesami biorącymi udział w mutagenizie, takimi jak uszkodzanie DNA, różne typy replikacji DNA, błędna i bezbłędna naprawa DNA, aktywacja metaboliczna, czy detoksykacja (nie mówiąc o presji selekcyjnej), w komórkach spoczynkowych może być zupełnie inna. Jak dotychczas istnieje niewiele doniesień na ten temat odnoszących się do komórek ssaków, chociaż istnieją dowody *in vivo* które świadczą o występowaniu mutacji w nie dzielących się komórkach neuronów (EVANS i współaut. 1995) i o występowaniu różnego wzoru aktywności mutatorowej w spoczynkowych i rosnących kulturach tkankowych (RICHARDS i współaut. 1997). Niniejsza praca przeglądowa omawia głównie różne drogi powstawania mutacji spontanicznych zachodzących w bakteriach w warunkach ograniczonego wzrostu, a takie warunki były stosowane w większości publikacji z tego zakresu.

MUTACJE ADAPTACYJNE

Dowody na istnienie mutacji spontanicznych w komórkach spoczynkowych przedstawił RYAN i współpracownicy około 40 lat temu po stwierdzeniu, że mutacje mogą powstawać w

bakteriach, które ani nie ulegają podziałom, ani nie zachodzi w nich w sposób wykrywalny synteza kwasów nukleinowych (RYAN 1955, RYAN i współaut. 1961, 1963). Trzy dekady później

¹ Tytuł oryginału: *The role of DNA damage in stationary phase („adaptive”) mutation*. (Mutation Res. 408, 1-9, 1998), tłumaczyła Celina Janion

CAIRNS i współaut. (1988) oraz HALL (1988) w ślad za wcześniejszą publikacją SHAPIRO (1984), wykazali, że w bakteriiach *Escherichia coli* hodowanych na płytkach w warunkach, w których utworzenie kolonii byłoby możliwe tylko w wyniku mutacji (warunki selekcyjne), mutacje rzeczywiście zachodziły w nieobecności zauważalnego wzrostu i jedynie te mutacje mogły być wykryte, które doprowadziły do odzyskania zdolności do wzrostu. Nie obserwowano występowania mutacji nieselekcyjnych. „Jest tak, jak gdyby komórki w fazie stacjonarnej ciągle produkowały zmiany w sekwencji, które zostają zachowane jeśli komórka zaczyna dzielić się, ale w innym przypadku, być może w wyniku destrukcji, naprawy sekwencji zmutowanej lub śmierci komórki, są one odrzucane” (CAIRNS i FOSTER 1991). Ten „adaptacyjny” aspekt mutacji okazał się być wysoce kontrowersyjny i spowodował ożywienie badań w całym obszarze zagadnień związanych z mutacją komórek w fazie stacjonarnej. W zasadzie, chociaż nie ma powodów dla których bakterie nie miałyby mieć mechanizmu pozwalającego na utrwalenie tylko mutacji potencjalnie korzystnych, istnieje mało przekonujących dowodów, że tak istotnie jest. Jak ostatnio wykazano najczęściej badany system okazał się być nieadaptacyjny i gdy zostaną zastosowane odpowiednie metody badawcze, można wówczas znaleźć wiele mutacji w miejscach nie ulegających selekcji (FOSTER 1997, TORKELSON i współaut. 1997). (Jeszcze innym zarzutem do systemu o którym wspomniano a który dotyczy bakterii *E. coli* FC40 jest to, że bardziej odzwierciedla on metabolizm znajdującego się w komórce plazmidowego DNA, aniżeli chromosomalnego DNA bakterii, C. J.).

Istnieją dwa, przeciwstawne poglądy, co do umieszczenia mutacji adaptacyjnych w schemacie Natury. Niektórzy sądzą, że sens ewolucyjny jest w tym, że jednokomórkowe organizmy, gdy są w stresie i nie są zdolne do wzrostu,

mogą tworzyć różnorodność genetyczną w nadziei, że utworzy się jakaś odmiana wykazująca przewagę selekcyjną. Inni wychodzą z założenia, że większość dowodów wskazuje, że to uszkodzenia DNA akumulują się w nie dzielących się komórkach, a powstające mutacje są odpowiedzią komórki na to uszkodzenie. Ponieważ poglądy te nie są ustabilizowane, a zagadnienie jest przedmiotem dalszych prac, byłoby przedwczesnym opowiadanie się po którejś ze stron. Tym bardziej, że obydwa poglądy mogą być słuszne i wskazywać jedynie na różne aspekty tego samego zjawiska. Jednym z celów tej pracy jest zastanowienie się w jakim stopniu powstawanie mutacji w komórkach nie dzielących się można przypisać uszkodzeniom w DNA i czy proces ten może funkcjonować w sposób adaptacyjny.

Ażeby uniknąć niejednoznaczności słowa „adaptacyjny” stosowano też inne określenia jak: mutacje indukowane selekcyjnie (co sugeruje mechanizm) lub połączone z głodem (nie sugerujące mechanizmu). W pracy tej powrócę do dawnej nazwy, mutacje fazy stacjonarnej (ang. stationary phase mutation, SPM) (GRIGG i STUCKEY 1966). Nazwa jest dość swobodna, obejmuje różne badane systemy i nie wyklucza niskiego poziomu podziału komórek i obrotu DNA, które to w wielu przypadkach wydają się zachodzić².

Jak wykazała FOSTER (1993), jedną z właściwości SPM jest to, że szybkość mutacji na jednostkę czasu w niektórych systemach jest wielokrotnie wyższa aniżeli można byłoby się spodziewać na podstawie ilości DNA i podziałów komórkowych. Przypuszczenia te oparte są na obserwacji, że szybkość mutacji w koloniach bakteryjnych połączona jest z replikacją DNA i na założeniu, że taka synteza DNA przebiega w całym genomie, a nie jest ograniczona do genu w którym obserwowane są mutacje. Innymi słowy, przypuszcza się, że SPM jest przejawem hipermutabilności komórki.

WSKAŹNIKI USZKODZENIA DNA

Wiemy dobrze, że spontaniczne uszkodzenia DNA zachodzą ciągle w wyniku degradacji termicznej i hydrolitycznej. Procesy metaboliczne przebiegające w komórkach także powo-

dują ciągle pojawianie się różnorodnych związków o potencjalnych właściwościach uszkadzania DNA. Słusznymi są więc rozważania czy takie uszkodzenia mogą być źródłem mutacji

² Istnieje ogromna różnorodność w nazewnictwie tego typu mutacji, niektóre inne nazwy to mutacje CAIRNSA, ukierunkowane (ang. directed), połączone z selekcją (ang. selection-induced mutation), lub z głodem (ang. starvation-associated mutations), połączone ze stylem życia (ang. life-style associate mutations). Mimo wszelkich zastrzeżeń do tego terminu, najczęściej używaną nazwą jest jednak mutacja adaptacyjna; C. J.

fazy stacjonarnej — SPM. Fakt, że SPM są zależne od czasu jest absolutnie zgodny z taką hipotezą. Już bardzo wcześnie stwierdzono, że mutacje fazy stacjonarnej powodujące rewersje od wymagania histydyny dla wzrostu — do prototrofii, były hamowane po podaniu kafeiny (GRIGG i STACKEY 1966). To doświadczenie było wykonane w celu sprawdzenia hipotezy czy procesy naprawy przeciwdziałają powstawaniu SPM. Kafeina była wtedy dobrze znana jako silny inhibitor naprawy nukleotydów poprzez ich wycinanie (ang. nucleotide excision repair, naprawa NER) i na tej podstawie spodziewano się, że szybkość SPM zostanie zwiększona. Otrzymano wynik przeciwny. Przemawiało to za tym, że uszkodzenia, które w tym systemie nie były wycinane, nie były powodem SPM. Kafeina, jak zostało to w późniejszym czasie wyjaśnione, jest również zdolna do częściowej inhibicji post-replikacyjnej drogi naprawy, na której produkty

działania promieniowania ultrafioletowego powodują mutacje (WITKIN i FARQUHARSON 1969). Istnieje więc możliwość, że SPM i mutageneza indukowana promieniowaniem ultrafioletowym mają wspólny etap wrażliwy na działanie kafeiny.

W dalszym ciągu badań dla sprawdzenia hipotezy czy uszkodzenie DNA jest odpowiedzialne za mutacje SPM, stosowano trzy podejścia: (i) charakteryzowano typy indukowanych mutacji; (ii) sprawdzano czy defekty na drodze zapobiegania uszkodzeniom DNA lub ich naprawy zwiększają szybkość SPM (co wskazuje czy odpowiednie uszkodzenie może prowadzić do SPM oraz (iii) sprawdzano czy nadprodukcja białek, które biorą udział w zapobieganiu lub naprawie DNA, redukuje SPM (co świadczy, że dane uszkodzenie bierze prawdopodobnie udział w powstawaniu SPM).

SYSTEM FC40

Prace o najszerszym zakresie i przypuszczalnie najbardziej stymulujące, chociaż nie koniecznie najbardziej typowe, dotyczą szczepu *E. coli* FC40. Szczep ten zawiera w chromosomie delecje w rejonie genu *lac* i niesie na epizomie F' allel genu *lacI33*, który poprzez delecje jednego z nukleotydów (mutacja typu przesunięcia ramki odczytu -1) występujących w krótkiej, powtarzającej się sekwencji G, ulega rewersji do Lac⁺. Bakterie, po inkubacji na płytkach minimalnych rewertują do Lac⁺ w sposób zależny od czasu (CAIRNS i FOSTER 1991). Ten szczególny system różni się od wszystkich dotąd stosowanych tym, że SPM zależy od funkcjonalnych genów *recA, B, C* (CAIRNS i FOSTER 1991, HARRIS i współaut. 1994) i od potencji seksualnej bakterii (FOSTER i TRIMARCHI 1995, RADICELLA i współaut. 1995, GALITSKI i ROTH 1995). Oznacza to, że wymaga on aktywności koniugacyjnej syntezy DNA (choć sam proces koniugacji nie jest konieczny). Gdy *lacI33* jest na chromosomie, a nie na plazmidzie F', SPM zachodzi w tempie o wiele wolniejszym i wtedy nie jest uzależniona od obecności genu *recA*. System ten został już opisany (ROSENBERG 1996, FOSTER 1998) i w tej pracy nie będzie szczegółowo rozważany.

Istnieją jednak dwa aspekty związane z tym systemem, które zasługują na szczególną uwagę. W dwóch ostatnich publikacjach (FOSTER 1997, TORKELSON i współaut. 1997) wykazano, że w warunkach selekcji laktozą mutacja zachodzi w wielu innych genach poza genem *lac*

(choć nie we wszystkich). Pośrednie dowody wykazują, że te mutacje wydają się tworzyć w niewielkiej sub-populacji komórek o wysokiej mutabilności, u których DNA ulega aktywnej rekombinacji. Mutacjami były albo przesunięcia ramki odczytu (-1), albo nie scharakteryzowane mutacje, które mogą obejmować zarówno przesunięcia ramki odczytu, jak i małe delecje. Nie obserwowano żadnych mutacji w genie *rpoB*, który mutuje i staje się odporny na rifampicynę tylko w wyniku mutacji typu podstawienia par zasad (FOSTER 1994). Pomysł, że tylko mała sub-populacja może ulegać mutacji jest ważny, gdy rozpatrywane są mutacje fazy spoczynkowej. Po raz pierwszy wprowadził go HALL (1990), który zaproponował, że w komórkach krańcowo chorych w wyniku głodzenia mógłby zostać zaindukowany przejściowy stan nadmutagenności. Gdyby powstała mutacja korzystna, to zaistniałaby ona jako mutacja adaptacyjna, w przeciwnym przypadku komórka musiałaby zginąć. Podczas gdy ostatnie eksperymenty z bakteriami FC40 wskazują, na istnienie frakcji populacji w stanie hypermutabilności, fakt ten nie znaczy, że jeśli mutacja nie jest korzystna to musi nastąpić śmierć komórki.

Innym aspektem systemu FC40, o którym powinno się wspomnieć jest to, że może on wymagać do zapoczątkowania procesu indukcji mutacji uszkodzonego DNA. Modele rekombinacyjne, takie jak opisane przez grupy ROSENBERG i FOSTER, wymagają wolnych końców w dupleksowym DNA i, jak sugerowano, takie

zakończenia w rzeczywistości mogą stanowić dwuniciowe pęknięcia w DNA (HARRIS i współaut. 1994). Jednym z możliwych ich źródeł mogły być spontaniczne uszkodzenia DNA pojawiające się w wyniku działania mutagenów egzogennych (DEMPLE i HARRISON 1994). Ta

sprawa zasługuje na dalsze badania, szczególnie, gdy stwierdzono, że tlen singletowy w pojedynczo-łańcuchowym, fagowym DNA wywołuje przeważnie mutacje typu przesunięcia ramki odczytu, -G (VAN DER EKKER i współaut. 1994).

ENDOGENNE CZYNNIKI ALKILUJĄCE

Istnieje kilka endogennych czynników o potencjalnych zdolnościach do alkilacji takim najbardziej oczywistym jest S-adenozylometionina. Pod uwagę należy brać również rodniki alkilowe powstające w procesie utleniania lipidów oraz endogennie nitrozowane amidy. Najsilniejszymi mutagenami są te, które alkilują tlen w pozycji O-6 guaniny lub O-4 tyminy, ponieważ tak alkilowane zasady podczas replikacji DNA są zdolne spowodować błędy w kodowaniu i tworzyć mutacje typu tranzycji. Komórki są dobrze wyposażone w alkilotransferazy, produkty genów *ada* i *ogt*, które w reakcji stechiometrycznej i samobójczej, usuwają grupy alkilowe. Unieszkodliwienie któregośkolwiek z tych genów ma niewielki lub żaden wpływ na SPM, ale inaktywacja obydwu wywołuje u komórek głodzonych, ale nie komórek w fazie wzrostu, efekt fenotypu mutatorowego (REBECK i SAMSON 1991, FOSTER i CAIRNS 1992, VIDAL i współaut. 1998). W doświadczeniach z użyciem testowych szczepów Cupples i Millera, u których zdolność do fermentacji laktozy zależy od specyficznej mutacji na epizomie F⁺ (CUPPLES i MILLER 1989) wykazano, że mutacje produkowane w szczepach *ada ogt* powstają głównie poprzez tranzycje G do A, czego należałoby się spodziewać w przypadku alkilacji O-6G (FOSTER i CAIRNS 1992).

REBECK i SAMSON (1991) w pracy, która prawdopodobnie jako pierwsza wskazuje na udział uszkodzenia DNA przy powstawaniu SPM, doszli do wniosku, że w komórkach nie dzielących się istnieje czynnik, który powoduje powstawanie O-6-alkiloguaniny i O-4-alkilotyminy. Następnie zwrócili uwagę, że gdy taka alkilacja spowoduje nieprawidłową transkrypcję, a produkt transkryptu umożliwi wzrost komórki, to taka mutacja zostanie utrwalona. W zasadzie może to być słuszne, jednakże FOSTER i CAIRNS (1992) zauważyli, że w szczepie wykazującym tranzycje G do A, reszta G jest na nici nietranskrybowanej, tak więc utrwalenie mutacji musi nastąpić później, czyli po syntezie DNA, co w tych warunkach przypuszczalnie jest przypadkiem rzadkim (ale patrz rozdział: „Znaczenie

syntezy DNA” str. 299). Ostatnio VIDAL i współaut. (1998) nie stwierdzili, aby w mutantach bakteryjnych *ada ogt* w warunkach SPM następowało przesunięcie mutacji na jedną nici DNA, co wskazywałoby, że uszkodzenia na nici transkrybowanej nie powodują preferencji do mutacji.

Widmo mutacji typu podstawienia zasad w mutantach *ada ogt*, jak wykazali MACKEY i współaut. (1994), zawiera wiele zmian, a w tym tranzycje A do G, transwersje G do C, A do C oraz A do T, czego nie należałoby się spodziewać po działaniu prostych czynników metylujących lub etylujących. Transwersje mają tendencje do pojawiania się na płytkach SPM w późniejszym okresie inkubacji. Ostatnio doniesiono, że zniesienie NER poprzez mutację w genie *uvrB* zwiększa tempo SPM w szczepach *ada ogt* o 70%, a rozmieszczenie miejsc tranzycji G do A było podobne do tych, jakie uzyskuje się poprzez działanie czynnikami prowadzącymi do otrzymania adduktów propylo, butylowych lub chloroetylowych, co przemawia, że tego typu uszkodzenia, powodujące znaczne zwiększenie objętości uszkodzonej zasady, biorą udział w powstawaniu SPM (VIDAL i współaut. 1998). Dalszym kluczem do zrozumienia mechanizmu powstawania SPM była obserwacja TAVERNA i SEDGWICK (1996), że w bakteriiach *moa*, u których został uszkodzony proces nitrozacji amidów i związków pokrewnych, większość SPM zostaje zniesiona. Autorzy sugerują, że wytwarzanie przez bakterie związki nitrozowe, a nie S-adenozylometionina, są odpowiedzialne za powstawanie SPM w szczepach *ada ogt*.

Jest sprawą oczywistą, że endogenne czynniki alkilujące mogą prowadzić do mutacji bakterii w fazie stacjonarnej, ale czy rzeczywiście ma to miejsce? Komórki szczepu dzikiego wyposażone są w enzymy NER i transferazy grup alkilowych; wszystkie te enzymy wydają się być aktywne w komórkach głodzonych i obecnie nie ma dowodów na to, że znaczna części alkilowanych zasad unika ich działania. Jeśli tak jest, to najprawdopodobniej dzieje się to po wyczerpaniu puli transferaz (VIDAL i współaut 1998).

PRODUKTY UTLENIEŃ GUANINY

Doniesienie REBECK i SAMSON (1991), że alkilacja może doprowadzić do mutacji u bakterii w fazie stacjonarnej ukazało się po stwierdzeniu, że SPM w szczepie WP2 ochre, wymagającym do wzrostu tryptofanu, nie ulegały zmianom po podstawieniu kilku uszkodzonych genów uwikłanych w naprawę DNA, takich jak *umuC122*, *lexA102*, *polA1* i trzech defektywnych alleli genu *recA* (BRIDGES 1994). Sugerowało to, że SPM w tym systemie mogło być wynikiem pojawiania się niezbyt wielkich uszkodzeń, które prowadziły do zmian w specyficzności parowania par zasad. Jednak mutanty jakie powstawały nie były mutantami szybko rosnącymi, takimi jak rewertanty supresorowe tRNA, czy prawdziwe reweranty genowe, jakie otrzymuje się w rosnących kulturach tego szczepu, ale były to mutanty wolno rosnące. Podobne, wolno rosnące supresorowe mutanty otrzymano i w innych szczepach ochre (PRIVAL i CEBULA 1992, BRIDGES 1994). Ponieważ transwersja w pozycjach AT i wszystkie tranzycje prowadzą do otrzymania szybko rosnących rewertantów, te które rosną wolno mogą zawierać transwersje w miejscach GC (BRIDGES 1994).

Ten ostatni wniosek był zgodny z wynikami doświadczeń na szczepach testowych opracowanych przez CUPPLES i MILLERA (1989). Stwierdzono, że transwersje G do T powstawały ze znacznie większą szybkością, niż inne mutacyjne zmiany zasad (HALL 1991, MACKAY i współaut. 1994). Przewagę transwersji G do T obserwowano wśród mutantów SPM (ale nie wśród mutantów fazy wzrostu) u *Pseudomonas putida* (KASAK i współaut 1997).

Już wiele lat wcześniej stwierdzono, że transwersje G do T akumulujące się u faga T4 przechowywanego poza komórkami bakteryjnymi w temperaturze 37°C, prawdopodobnie powstają w wyniku uszkodzenia zasad, które nagromadzają się w czasie przechowywania (DRAKE 1966, BALTZ i współaut. 1976, BINGHAM i współaut. 1976, KRICKER i DRAKE 1990). Obecnie szeroko akceptowany jest pogląd (DRAKE, informacja ustna), że uszkodzoną zasadą jest produkt utlenienia guaniny, najprawdopodobniej 8-oksyo-dihydrodeoksyguanina (8-oksyoG). Jest to powszechnie znana modyfikacja, która zachodzi w wielu organizmach i jest powiązana z procesami starzenia się i karcynogenezy (AMES i GOLD 1991, SHIGENAGA i współaut. 1994),

8-oksyoG jest podatna na błędy odczytu w czasie replikacji (KUCHINO i współaut. 1987), co często powoduje włączenie adeniny zamiast cytozyny (WOOD i współaut. 1990, SHIBUTANI i współaut. 1991, MORIYA i GROLLMAN 1993, CHENG i współaut. 1992) i prowadzi do transwersji G do T.

Obecnie stało się jasne, że 8-oksyoG rzeczywiście może prowadzić do mutacji w bakteriach głodzonych, gdyż szybkość mutacji SPM jest nieco podwyższona w mutantach bakteryjnych *mutM*, znacznie zwiększona w mutantach *mutY*, i bardzo znacznie zwiększona w podwójnym mutancie *mutM mutY* (BRIDGES 1995a, BRIDGES i współaut. 1996). Białka MutY i MutM są glikozylazami, enzymami specyficznymi usuwającymi adeninę błędnie sparowaną z 8-oksyoG, względnie 8-oksyoG sparowaną z cytozyną. Nadprodukcja tych białek, gdy ich geny umieszczone są na plazmidach multikopijnych, redukuje szybkość SPM do około połowy; wskazuje to, że 8-oksyoG jest faktycznie wytwarzana i bierze udział w SPM, gdy enzymy te są obecne w normalnych ilościach.

Zaskoczeniem dla badaczy było, że wśród rewerantów SPM *trpA23* występują nie tylko spodziewane transwersje G do T, ale też, i to w wysokiej proporcji, małe delecje nie zmieniające odczytu dalszych ramek, które ze względu na istniejący skręt w strukturze białka TrpA, pozwały na wytworzenie się aktywnego enzymu (BRIDGES i TIMMS 1997). Sugerowało to, że delecje te mogłyby być zapoczątkowane obecnością błędnych par zasad 8-oksyoG: A. Dalsze badania wykazały, że delecje pojawiają się z wysoką częstością wśród mutantów SPM, w szczepach z uszkodzonym, kierowanym metylem systemem korekcyjnym, naprawiającym błędnie sparowane pary zasad (ang. methyl-directed mismatch correction) u których spodziewa się występowania niedopasowanych par zasad w DNA. Ponieważ te małe „in frame” delecje, nie zmieniające ramek odczytu dalszych kodonów, nie były wykrywane u mutantów powstających w bakteriach rosnących, wydaje się prawdopodobne, że w komórkach głodzonych drogi naprawy atakujące błędne pary zasad prowadzą do delecji. Wystąpienie takiego procesu może być przypadkiem dość rzadkim, maskowanym przez inne procesy zachodzące w komórkach rosnących, ale ujawniają się w komórkach głodzonych kiedy okres życia komórki jest dłuższy.

AKTYWNE RODZAJE TLENU (AOS)³

Zupełnie odrębny dowód wskazujący na udział 8-oksyG pochodzi z obserwacji, że poziom SPM w szczepie *his ochre* w warunkach anaerobowych ulegał obniżeniu (BENOV i FRIDOVICH 1996), co jest zgodne z udziałem AOS w tym procesie. Brak jednak wyraźnych przesłanek wskazujących na formę aktywnego tlenu biorącego udział w powstawaniu 8-oksyG. Aktywne związki tlenowe takie jak ponadtlenek, nadttlenek wodoru i rodnik hydroksylowy łączy sieć relacji chemicznych. Tlen singletowy znajduje się poza tą grupą, gdyż nie jest wolnym rodnikiem. Wszystkie te związki, w różnych warunkach, są w stanie generować 8-oksyG. Brak dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) znacznie podwyższa szybkość SPM w szczepie *his ochre* (BENOV i FRIDOVICH 1996). Ponieważ SOD katalizuje wytwarzanie tlenu i nadttlenku wodoru z ponadtlenku, wskazuje to, że nadttlenek wodoru jest o wiele mniej aktywny niż ponadtlenek. Ponadto, gdy dodaje się mangano-porfirynę, która ma aktywność dysmutazy nadttlenkowej, szybkość SPM w szczepie posiadającym aktywność SOD uległa 2-krotnemu zmniejszeniu, co wskazuje, że nawet w takim szczepie (dziki dla SOD) ilość ponadtlenku jest wystarczająca, aby mógł on brać udział w SPM.

Nadtlenek wodoru ma najdłuższy czas życia spośród cząstek AOS i w zasadzie mógłby dyfundować z jednej komórki do drugiej. Jednakże dodanie katalazy do medium z agarem wydaje się nie mieć wpływu na redukcję SPM w auksotrofach *ochre*. W rzeczywistości szybkość SPM wydaje się być nawet wyższa, ale tylko dlatego, że szybkość utraty przeżywalności jest zredukowana (BRIDGES i współaut. 1996). Tak więc, chociaż nadttlenek wodoru może być przyczyną śmierci niektórych komórek, nie wydaje się żeby brał udział przy powstawaniu SPM. Zgodnym z tym jest fakt, że mutacja w genie *rpoS*, która inaktywuje czynnik transkrypcyjny stacjonarnej fazy wzrostu (sigma-38), nie wywiera wykrywalnego wpływu na poziom SPM (BRIDGES i TIMMS 1998). Czynnik RpoS kontroluje indukcję kilku genów, których produkty biorą udział w protekcji przeciw uszkodzeniom oksydacyjnym w komórkach nie dzielących się

(patrz praca przeglądowa EISENSTARK i współaut. 1996). Produkty tych genów obejmują peroksydazy wodorowe I i II oraz białka DSP, które wyraźnie tworzą niezwykle trwałe kompleksy z DNA (ALMIRON i współaut. 1992) i zdecydowanie chronią reszty guaniny przed uszkodzeniem nadttlenkiem wodoru (MARTINEZ i KOLTER 1997). Brak udziału nadttlenku wodoru wpływa również na pomniejszenie potencjalnej roli rodników hydroksylowych, których wzrost może on powodować.

Jedno z podejść badawczych mające na celu stwierdzenie udziału AOS polega na dodawaniu specyficznych zmiataczy aktywnych form tlenu. Niestety większość z nich po dłuższym czasie wymaganym dla przeprowadzenia doświadczeń z SPM albo jest metabolizowana, albo cytotoksyczna. Wyjątek stanowi grupa karotenoidów. Geny produkujące karotenoidy z *Erwina herbiicola* zostały sklonowane i wprowadzone do wielu szczepów bakteryjnych, u których SPM mogłoby być wynikiem tworzenia się 8-oksyG. Stwierdzono, że jasno-pomarańczowe bakterie wytwarzające karotenoidy mają o około połowę mniejszą szybkość SPM aniżeli ich bezbarwne formy rodzicielskie (BRIDGES i TIMMS 1998). Karotenoidy niewątpliwie są dobrymi zmiataczami singletowego tlenu *in vitro* (BURTON i INGOLD 1984), a także wewnątrz bakterii działają bardziej jako zmiatacze singletowego tlenu, niż absorbenty wolnych rodników (TUVESON i SANDMANN 1993, BECKERPAK i współaut. 1997). Genotoksyczność singletowego tlenu została przedstawiona w pracach przeglądowych (PIETTE 1990, JOENIE i współaut. 1991). Tlen singletowy ma drogę dyfuzji 1-2 μ (LINDING i ROGERS 1981) i połowiczny okres trwałości około 10^{-6} sekund, w porównaniu do 10^{-9} sekund dla rodników hydroksylowych (PRYOR 1986). Reaktywność karotenoidów jest jednak sprawą złożoną (patrz np. artykuł przeglądowy BURTON i INGOLD 1984), a ich specyficzność do singletowego tlenu może nie być absolutna. Można tak jednak sądzić, gdyż dostępne dane to sugerują, że tlen singletowy, podobnie jak ponadtlenek, może być również ważny jeśli chodzi o jego udział w indukowaniu SPM.

³AOS — ang. active oxygen species

INNE USZKODZENIA DNA

Dotychczas rozważaliśmy uszkodzenia w DNA, które potencjalnie mogą powodować błędy w kodowaniu. Jednakże wiele typów uszkodzeń nie wykazują żadnych właściwości kodujących, a kiedy znajdują się na nici matrycowej, mają tendencje do blokowania syntezy DNA. Z takimi uszkodzeniami *E. coli* radzi sobie na drodze działającej jako część systemu SOS. W ogólnym ujęciu, mutacje jakie wtedy powstają zależą od genów *umuC* i *umuD*, które są pod kontrolą genów *recA* i *lexA* (patrz praca przeglądowa FRIEDBERGA i współaut. 1995). Ponieważ geny SOS są indukowane i zależą od syntezy białka, jest sprawą oczywistą, że nie mogą one brać udziału w wielu badanych przypadkach SPM, a szczególnie wtedy, kiedy wzrost bakterii jest ograniczony na skutek braku wymaganego aminokwasu. Tak więc, jak można się było spodziewać, mutacje *recA* i *lexA102* nie zmieniają SPM w szczepach *E. coli* WP2 (BRIDGES 1993). I rzeczywiście, systemem, w którym *recA* wyraźnie bierze udział jest system FC40 (patrz wyżej), powodujący mutacje typu przesunięcia ramki odczytu. Nie ma to jednak nic wspólnego z zależną od SOS indukcją *umuDC*, ponieważ SPM nie zmienia się w bakteriach z defektywnym allelem genu *umuC* (CAIRNS i FOSTER 1991). Nie mniej jednak, gdy w bakteriach WP2 w wyniku mutacji *recA441* i *lexA* (Def) system SOS wyrażany był w sposób konstytutywny, w 3-ech spośród 4-ech doświadczeń badających rewersję mutacji zależnej od tryptofanu obserwowano zwiększenie szybkości SPM (BRIDGES 1993). Tak więc, indukcja SOS nie była konieczna, gdy synteza białek była ograniczona, ale gdy te ograniczenia, dzięki uprzednim wytworzeniu białek RecA* i UmuD, zostały usunięte, naprawa uszkodzenia przez system SOS mogła mieć swój udział w powstawaniu SPM.

Z pracy TADDEI i współaut. (19550), w której autorzy badali starzejące się kolonie bakteryjne na powierzchni płytek agarowych widać wyraźnie, że może to być odbiciem bardziej ogólnego zjawiska. W starzejących się komórkach zachodził rozpad represora CI faga lambda, czemu towarzyszyło zwiększenie szybkości

mutacji oporności na rifampicynę. Obydwa procesy zależały od obecności cyklicznego AMP. Obecnie istnieją jedynie ograniczone przesłanki sugerujące, że procesy SOS działając na niekodujące uszkodzenia DNA mogą odgrywać ważniejszą rolę w powstawaniu SPM aniżeli się dotychczas o tym sądziło. Należałoby więc opracować dodatkowe systemy, w których procesy te mogłyby być badane.

Jeżeli uszkodzenia nie kodujące biorą udział w SPM, to powstaje pytanie jakie są to uszkodzenia? Takimi oczywistymi kandydatami są miejsca apurynowe i apirymidynowe w DNA, gdyż jest wiadomo, że mogą być one wytwarzane *in vitro* po działaniu aktywnymi związkami tlenu (DEMPLE i HARRISON 1994). Inne, większe objętościowo uszkodzenia, są często usuwane przez system naprawy wycinania nukleotydów (NER). Mutacje blokujące NER, takie jak *uvrA* lub *uvrB*, na ogół nie miały wcale, lub miały niewielki wpływ, na szybkość SPM (FOSTER 1992, BRIDGES 1993). Wyjątek stanowi doniesienie HALLA (1995), stwierdzające, że szybkość rewersji w warunkach głodu tryptofanowego w bakteriach *trpA46* jest aż 300-krotnie wyższa, gdy bakterie są defektywne w NER. Sugerowano, że przyczyną tego mogą być uszkodzone reszty adeniny lub tyminy, które są naprawiane przez system NER (BRIDGES 1996b), ponieważ w warunkach wzrostu rewersja *trpA46* zachodzi niemal wyłącznie w miejscach A:T. W przeciwieństwie do tych wyników stwierdziliśmy, że szybkość SPM w bakteriach *trpA23* defektywnych w NER (które również rewertują w miejscach A:T) jest porównywalna z szybkością występującą w bakteriach *trpA46* z nieuszkodzonym systemem NER; ponadto, istniały nieznaczne różnice w szybkości mutacji w bakteriach *trpA23* defektywnych w NER i w bakteriach *trpA23 Uvr⁺* (BRIDGES i TIMMS 1997 i dane niepublikowane). Chociaż nie byłoby w tym nic dziwnego, gdyby w komórkach spoczynkowych były wytwarzane uszkodzenia podatne na system naprawy NER, to niewątpliwie dla wyjaśnienia tej sytuacji potrzebne jest więcej doświadczeń.

ZNACZENIE SYNTEZY DNA

Warunki w jakich komórki spoczynkowe są badane, przynajmniej w odniesieniu do mutacji, są takie, że określenie „spoczynkowe” może

być mylące. Bakterie wchodząc w stan fazy stacjonarnej i zmieniają swój metabolizm (KOLTER i współaut. 1993) na bardziej oszczędny,

umożliwiający utrzymanie ich przy życiu oraz, co teraz jest jasne, umożliwiający utworzenie nowych genetycznych różnicowań, pomocnych w odzyskaniu zdolności do wzrostu. W wielu przypadkach liczba komórek zwiększa się. Na przykład, w systemie FC40, w wyniku zanieczyszczeń składnikami pokarmowymi na płytkach agarowych, liczba bakterii często zwiększa się dwukrotnie. Taka sytuacja może istnieć nawet po dodaniu bakterii czyszcicieli. Natomiast przeciwnie, gdy auktotrofy pozbawione wymaganych aminokwasów są wysiewane w dużej gęstości (3×10^8 /na płytkę), wtedy ilość żywych bakterii może przez kilka pierwszych dni zmniejszać się, ale przez następne dni znów wzrasta (BRIDGES 1995b).

Przy małej gęstości bakterii w szczepach *mutT* obserwuje się duże zwiększenie szybkości powstawania SPM (BRIDGES 1996a). Ponieważ bakterie te w wyniku inkorporacji 8-oksyGTP z puli nukleotydowej do DNA mają właściwości mutatorowe (MAKI i SIKIGUCHI 1992), stanowi to *prima facie* dowód, że w tych warunkach synteza DNA zachodzi bardziej intensywnie niż uprzednio sądzono. W późniejszej pracy ustalono, że przy gęstości bakterii około 10^7 na płytkę wiele auktotrofów, w wyniku śladowych zanieczyszczeń (BRIDGES i EREIRA 1998) lub endogennej pojemności metabolicznej (TIMMS i BRIDGES 1998), jest zdolnych do ulegania podziałom komórkowym. Podziały komórkowe, mogą być zminimalizowane poprzez dodanie bakterii czyszcicieli, ale nawet wtedy efekt mutatorowy *mutT* ciągle utrzymuje się. Wskazuje to, że synteza DNA zachodzi nawet przy braku jakiegokolwiek wzrostu całkowitej masy bakterii, a nawet w okresie, gdy masa ich maleje. Jakakolwiek byłaby natura tego obrotu DNA, wydaje się on być wystarczający do utrwalenia nowopowstałej mutacji.

Badania SPM w wielu bakteriach auktotroficznych, różniących się wrodzonym stopniem szczelności (ang. leakiness) mutacji, doprowadziło do ogólnych wniosków, że mutacje „ściśle” nie wykazują: lub w małym stopniu wykazują, SPM, podczas gdy nieszczelne wykazują SPM nawet wówczas gdy szybkość SPM nie odnosi się bezpośrednio do stopnia szczelności mutacji (JAYARAMAN 1995, GALITSKI i ROTH 1996). Synteza DNA zachodząca w wyniku nieszczelności mutacji, nawet jeśli nie jest istotna dla SPM, to jest jednak szeroko rozpowszechniona i z pewnością powoduje promowanie powstawania SPM.

Jedną z konsekwencji wynikających z powyższych faktów jest to, że poza uszkodzeniami

DNA, błędy w replikacji, mogą być również przyczyną SPM, a liczba tych błędów może w sposób oczywisty wzrosnąć w wyniku indukcji przez system SOS alleli mutatorowych, takich jak na przykład *dinB* (patrz KIM i współaut. 1997). Fakt, że SPM jest podwyższona w wyniku mutacji blokujących kierowaną metylem naprawę błędnych par zasad (BOE 1990, FOSTER i CAIRNS 1992, REDDY i GOWRISHANKAR 1997) jest nie tylko z tym zgodny, ale również dowodzi, że korekcja błędnych par zasad funkcjonuje efektywnie. Stanowi to dalszą, dobrą przesłankę wniosku, że w warunkach głodzenia zachodzi półzachowawcza replikacja DNA. Podczas, gdy ten dowód to umożliwia, nie musi on oznaczać, że tak rzeczywiście jest.

Aby dowieść, że błędy replikacyjne rzeczywiście biorą udział w powstawaniu SPM, trzeba byłoby wykazać, że ich redukcja poniżej normalnego poziomu spowoduje dalszą redukcję SPM. Jak dotychczas, było to wykazane tylko dla systemu FC40 i stąd pochodzą dwa przekonywujące dowody. Pierwszy, że nadprodukcja białek uczestniczących w naprawie niedopasowanych zasad w DNA redukuje wydajność mutantów spontanicznych powstających w komórkach znajdujących się w warunkach selekcji (FOSTER i współaut. 1995, 1996, HARRIS i współaut. 1997b). Drugi, że anty-mutatorowy allel DNA polimerazy III, *dnaE915* znacznie redukuje szybkość SPM zarówno w dzikim, jak i w pozbawionym naprawy błędnie sparowanych zasad szczepie FC40 (FOSTER i współaut. 1995, HARRIS i współaut. 1997a).

Reasumując, większość istniejących dowodów wskazuje na to, że obrót DNA w komórkach znajdujących się w fazie stacjonarnej jest istotnym czynnikiem dla większości typów SPM. Jednakże, żaden z nich nie pozwala na odrzucenie hipotezy, że syntezę DNA może zapoczątkować błędna transkrypcja uszkodzonej zasady (patrz REBECK i SAMSON 1991, FOSTER i CAIRNS 1992, BRIDGES 1994) lub hipotezy, że błędy replikacyjne są wynikiem uszkodzenia DNA. Rzeczywistość jest prawdopodobnie mieszaniną tych wszystkich możliwości.

Dziękuję Patrycji Foster, Carmen Pueyo i Susan Rosenberg za udostępnienie ich nieopublikowanych prac, a Patrycji Foster za komentarze do tej pracy przeglądowej.

C. J. składa serdeczne podziękowania Profesorowi Bryn Bridges i Redakcji Mutation Research za wyrażenie zgody na tłumaczenie i przedruk tego artykułu.

THE ROLE OF DNA DAMAGE IN STATIONARY PHASE („ADAPTIVE”) MUTATION

Summary

The rate of mutation in non-growing (starved) bacteria may be much higher than that in growing bacteria when expressed per unit of DNA replication and the spectrum of mutations is different. Often the mutations that are seen are those that lead to a resumption of growth. This has been referred to as „adaptive” or directed mutation although the occurrence of mutations at other, non-advantageous, sites has never been rigorously excluded. The present paper reviews the evidence for the involvement of DNA damage in the process of mutation in non-growing cells. It is concluded that endogenously produced mutagens including alkylating agents and, particularly, active oxygen species are import-

ant. There is little direct evidence to support the notion that the high mutation rate reflects a cellular attempt to generate high variability under stressful conditions although this remains a formal possibility. However, many experiments involve amino acid deprivation which would tend to prevent induction of the SOS system and there is recent evidence that SOS induction and the associated mutator activity may occur under different conditions of growth restriction. Strict inhibition of growth seems to prevent „adaptive” mutation and the best response occurs when there is significant residual growth and DNA synthesis.

LITERATURA

- ALMIRON M., LINK A. J., FURLONG D., KOLTER R., 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Gen. Dev.* 6, 2646-2654.
- AMES B. N., GOLD L. S., 1991. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutation Res.* 250, 3-16.
- BALTZ R. H., BINGHAM P. M., DRAKE J. W., 1976. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: the transition pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1269-1273.
- BECKER-HAPAK M., TROXTL E., HOERTER J., EISENSTARK A., 1997. RpoS dependent overexpression of carotenoids from *Erwinia herbicola* in OxyR deficient *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239, 305-309.
- BENOV L., FRIDOVICH I., 1996. The rate of adaptive mutagenesis in *Escherichia coli* is enhanced by oxygen (superoxide). *Mutation Res.* 357, 231-236.
- BINGHAM P. M., BALTZ R. H., RIPLEY L. S., DRAKE J. W., 1976. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: the transversion pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4159-4163.
- BOE L., 1990. Mechanism for induction of adaptive mutations in *Escherichia coli*. *Molec. Mikrobiol.* 4, 597-601.
- BRIDGES B. A., 1993. Spontaneous mutation in stationary-phase *Escherichia coli* WP2 carrying various DNA repair alleles. *Mutation Res.* 302, 173-176.
- BRIDGES B. A., 1994. Starvation-associated mutation in *Escherichia coli*: a spontaneous lesion hypothesis for „directed” mutation. *Mutation Res.* 307, 149-156.
- BRIDGES B. A., 1995a. *mutY* „directs” mutation? *Nature*. 375, 741-741.
- BRIDGES B. A., 1995b. Starvation-associated mutation in *Escherichia coli* strains defective in transcription repair coupling factor. *Mutation Research*. 329, 49-56.
- BRIDGES B. A., 1996a. Elevated mutation rate in *mutT* bacteria during starvation: evidence of DNA turnover? *Journal of Bacteriology*. 178, 2709-2711.
- BRIDGES B. A., 1996b. Mutation in resting cells: the role of endogenous DNA damage. [W:] *Genetic instability in cancer*. LINDHAL T. (red.), ICRF/Cold Spring Harbor Press, str. 155-167.
- BRIDGES B. A., SEKIGUCHI M., TAJIRI T., 1996. Effect of *mutY* and *mutM/fpg-I* mutations on starvation-associated mutation in *Escherichia coli*: implications for the role of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Mol. Gen. Genet.* 251, 352-357.
- BRIDGES B. A., TIMMS A. R., 1997. Mutation in *Escherichia coli* under starvation conditions: a new pathway leading to small deletions in strains defective in mismatch correction. *EMBO J.* 16, 3349-3356.
- BRIDGES B. A., EREIRA S., 1998. DNA synthesis and viability of a *mutT* derivative of *Escherichia coli* WP2 under conditions of amino acid starvation and relation to stationary-phase (adaptive) mutation. *J. Bacteriol.* 180, 2906-2910.
- BRIDGES B. A., TIMMS A. R., 1998. Effect of endogenous carotenoids and defective RpoS sigma factor on spontaneous mutation under starvation conditions in *Escherichia coli*: evidence for the possible involvement of singlet oxygen. *Mutation Res.* 403, 21-28.
- BURTON G. W., INGOLD K. U., 1984. *b-carotene*: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224, 569-573.
- CAIRNS J., FOSTER P. L., 1991. Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*. 128, 695-701.
- CAIRNS J., OVERBAUGH J., MILLER S., 1998. The origin of mutants. *Nature*. 335, 142-145.
- CHENG K. C., CAHILL D. S., KASAI H., LOEB L. A., NISHIMURA S., 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G to T and A to C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267, 166-172.
- CUPPLES C., MILLER J., 1989. A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 5345-5349.
- DEMPLE B., HARRISON L., 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 915-948.
- DRAKE J. W., 1966. Spontaneous mutations accumulating in bacteriophage T4 in the complete absence of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 55, 506-512.
- EISENSTARK A., CALCUTT M. J., BECKER-HAPAK M., IVANOVA A., 1996. Role of *Escherichia coli* rpoS and associated genes in defense against oxidative damage. *Free Radical Biol. Med.* 21, 975-993.
- EVANS D. A. P., BURBACH J. P. H., VAN LEEUWEN F. W., Somatic mutations in the brain relationship to aging? *Mutation Res.* 338, 173-182.
- FOSTER P. L., 1992. Directed mutation between unicorns and goats. *J. Bacteriol.* 174, 1711-1716.
- FOSTER P. L., 1993. Adaptive mutation: the uses of adversity. *Ann. Rev. Microbiol.* 47, 467-504.
- FOSTER P. L., 1994. Population dynamics of a *lac*⁻ strain of *Escherichia coli* during selection for lactose utilization. *Genetics* 138, 253-261.
- FOSTER P. L., 1997. Nonadaptive mutations occur on the F episome during adaptive mutation conditions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 1550-1554.
- FOSTER P. L., 1998. Adaptive mutation: Has the unicorn landed? *Genetics* 148, 1453-1459.
- FOSTER P. L., CAIRNS J., 1992. Mechanism of directed mutation. *Genetics*. 131, 783-789.

- FOSTER P. L., GUDMUNDSSON G., TRIMARCHI J. M., CAI H., GOODMAN M. F., 1995. Proofreading-defective DNA polymerase II increases adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7951–7955.
- FOSTER P. L., TRIMARCHI J. M., 1995. Adaptive reversion of a episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5487–5490.
- FOSTER P. L., TRIMARCHI J. M., MAURER R. A., 1996. Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* 142, 25–37.
- FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SIEDE W., 1995. DNA repair and Mutagenesis. Washington, USA, ASM Press.
- GALITSKI T., ROTH J. R., 1995. Evidence that *F* plasmid transfer replication underlies apparent adaptive mutation. *Science* 268, 421–423.
- GALITSKI T., ROTH J. R., 1996. A search for a general phenomenon of adaptive mutability. *Genetics* 143, 645–659.
- GRIGG G. W., STUCKEY J., 1996. The reversible suppression of stationary phase mutation in *Escherichia coli* by caffeine. *Genetics* 153, 823–834.
- HALL B. G., 1988. Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence. *Genetics* 120, 887–897.
- HALL B. G., 1990. Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics* 126, 5–16.
- HALL B. G., 1991. Spectrum of mutations that occur under selective and non-selective conditions in *E. coli*. *Genetics* 84, 73–76.
- HALL B. G., 1995. Genetics of selection-induced mutations: *I* *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* and *uvrD* are selection-induced specific mutator loci. *J. Mol. Evolution* 40, 86–93.
- HARRIS R. S., LONGERICH S., ROSENBERG S. M., 1994. Recombination in adaptive mutation. *Science* 264, 258–260.
- HARRIS R. S., BULL H. J., ROSENBERG S. M., 1997a. A direct role of DNA polymerase III in adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Mutation Res.* 375, 19–24.
- HARRIS R. S., FENG G., ROSS K. J., SIDHU R., THULIN C., LONGERICH S., SZIGETY S. K., WINKLER M. E., ROSENBERG S. M., 1997b. Mismatch repair protein MutL becomes limiting during stationary-phase mutation. *Genes Dev.* 11, 2426–2437.
- JAYARAMAN R., 1995. Leakiness of genetic markers and susceptibility to post-plating mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Genet.* 74, 85–97.
- JOENJE H., LAFLEUR V. M., RETEL J., 1991. Biological consequences of oxidative DNA damage. [W:] *Membrane lipid oxidation*. VIGO-PELFREY C. (red.). Boca Raton. CRC Press str. 87–113.
- KASAK L., HORAK R., KIVISAAR M., 1997. Promotor-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3134–3139.
- KIM S.-R., MAENHAUT-MICHEL G., YAMADA M., YAMAMOTO Y., MATSUI K., SOFUNI T., NOHMI T., OHMORI H., 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: An overexpression of *dinB/dinP* results strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13792–13797.
- KOLTER R., SIEGELE D. A., TORMO A., 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Am. Rev. Microbiol.* 47, 855–874.
- KRICKER M. C., DRAKE J. W., 1990. Heat mutagenesis in bacteriophage T4: another walk down the transversion pathway. *J. Bacteriol.* 172, 3037–3039.
- KUCHINO Y., MORI F., KASAI H., INOUE H., IWAI S., MIURA K., OHTSUKA E., NISHIMURA S., 1987. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327, 77–79.
- LINDIG B. A., RODGERS M. A. J., 1981. Rate parameters for the quenching of singlet oxygen by water-soluble and lipid-soluble substrates in aqueous and micellar system. *Photochem. Photobiol.* 33, 627–634.
- MACKAY W. J., HAN S., SAMSON L. D., 1994. DNA alkylation repair limits spontaneous base substitution mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 3224–3230.
- MAKI H., SEKIGUCHI M., 1992. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355, 273–275.
- MARTINEZ A., KOLTER R., 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* 179, 5188–5194.
- MORIYA M., GROLLMAN A. P., 1993. Mutations in the *mutY* gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C/T:A transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Molec. Gen. Genet.* 239, 72–76.
- PIETTE J., 1990. Mutagenic and genotoxic properties of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 4, 335–339.
- PRIVAL M. J., CEBULA T. A., 1992. Sequence analysis of mutations arising during prolonged starvation of *Salmonella typhimurium*. *Genetics* 132, 303–310.
- PRYOR W. A., 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48, 657–667.
- RADICELLA J. P., PARK P. U., FOX M. S., 1995. Adaptive mutation in *Escherichia coli*: a role for conjugation. *Science* 268, 418–420.
- REBECK G. W., SAMSON L., 1991. Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the *ogt* *O*⁶-methyltransferase. *J. Bacteriol.* 173, 2068–2076.
- REDDY M., GOWRISHANKAR J., 1997. A genetic strategy to demonstrate the occurrence of spontaneous mutations in the non-dividing cells within colonies of *Escherichia coli*. *Genetics* 147, 991–1001.
- RICHARDS B., ZHANG H., PHEAR G., MEUYH M., 1997. Conditional mutator phenotypes in hMSH2-deficient tumor cell lines. *Science* 277, 1523–1526.
- ROSENBERG S. M., HARRIS R. S., LONGERICH S., GALLOWAY A. M., 1996. Recombination-dependent mutation in non-dividing cells. *Mutation Res.* 350, 69–76.
- RYAN F. J., 1955. Spontaneous mutation in non-dividing bacteria. *Genetics* 40, 726–738.
- RYAN F. J., NKADA D., SCHNEIDER M. J., 1961. Is DNA replication a necessary condition for spontaneous mutation? *Z. Vererbungsl. 92*, 38–41.
- RYAN F. J., OKADA T., NAGATA T., 1963. Spontaneous mutation in spheroplasts of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 30, 193–199.
- SHAPIRO J. A., 1984. Observation on the formation of clones containing *araB-lacZ* cistron fusions. *Molec. Gen. Genet.* 194, 79–90.
- SHIBUTANI S., TAKESHITA M., GROLLMAN A. P., 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxoG. *Nature* 349, 431–434.
- SHIGENAGA M. K., HAGEN T. M., AMES B. N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10771–10778.
- TADDEI F., MATIC I., RADMAN M., 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11736–11740.
- TAVERNA P., SEDGWICK B., 1996. Generation of an endogenous DNA-methylating agent by nitrosation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 5105–5111.
- TIMMS A. R., BRIDGES B. A., 1998. Reversion of the tyrosine ochre strain *Escherichia coli* WU3610 under starvation

- conditions depends on a new gene *tas*. *Genetics* 148, 1627-1635.
- TORKELSON J., HARRIS R. S., LOMBARDO M. -J., NAGENDRAN J., THULIN C., ROSENBERG S. M., 1997. Genome-wide hypermutation in a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation. *EMBO j.* 16, 3303-3311.
- TUVESON R. W., SANDMANN G., 1993. Protection by cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* against phototoxic molecules activated by near-ultraviolet light. *Meth. Enzymol.* 214, 323-330.
- VAN DER AKKER E., LUTGERINK J. T., LAFLEUR M. V. M., JOENJE H., RETEL J., 1994. The formation of one-G deletions as a consequence of singlet-oxygen-induced DNA damage. *Mutation Res.* 309, 45-52.
- VIDAL A., ABRIL N., PUEYO C., 1998. DNA sequence analysis of spontaneous *lacI^d* mutations in *O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase-proficient and deficient Escherichia coli*. *Mutagenesis* 13, 367-373.
- WITKIN E. M., FAEGUJARSON E. I., 1969. Enhancement and diminution of ultraviolet light-initiated mutagenesis by post-treatment with caffeine in *Escherichia coli*. [W:] *Mutation as Cellular Process*. WOLSTENHOLME G. E. W., O'CONNOR M. (red.). London, Churchill. str 36-49.
- WOOD M. L., DIZDAROGLU M., GJEWSKI J. M., 1990. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: Genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29, 7024-7032.