

MAŁGORZTA M. MROCZKOWSKA-SŁUPSKA

*Department of Immunology, Microbiology and Molecular Genetics,
University of California, Los Angeles,
1602 Molecular Sciences, Bld.,
405 Hilgard Ave.,
Los Angeles CA 90095, USA
e-mail: gosia@mbi.ucla.edu*

MUTATOROWE tRNA — ALTERNATYWNE DROGI MUTAGENEZY

WPROWADZENIE

Żywe komórki są nieustająco narażone na działanie różnych niszczących czynników pochodzenia egzo- lub endogennego. Działanie takie, jeśli mu się nie przeciwdziała, może prowadzić do dezintegracji komórek. Wszystkie żywe organizmy wykształciły więc najróżniejsze systemy ochronne przeciwdziałające procesom destrukcji. Jednym z najbardziej chronionych komponentów komórki jest DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy — nośnik kodu genetycznego. W nieustającym starciu pomiędzy czynnikami niszczącym i systemami obronnymi komórki, czasami dochodzi do uszkodzenia DNA i zmiany kodu genetycznego, czyli — mutacji. W zależności od tego, czy mutacja prowadzi do wymiany aminokwasu w białku kodowanym przez dany gen i na ile taka wymiana wpływa na funkcje białka, mamy do czynienia z mutacjami bardziej lub mniej groźnymi. Proces powstawania mutacji nazywa się mutagenezą, natomiast mutatorem nazywać będziemy w tym artykule komórki o podwyższonym poziomie częstości mutacji. W słownictwie naukowym mutatorami nazywa się często geny, których uszkodzenie prowadzi do zwiększonej częstości mutacji. Są to na ogół geny, których produkty zaangażowane są w naprawę uszkodzonego DNA lub też kontrolują wierność procesu replikacji, czyli powielania DNA. „Mutator” zdefiniowany jako komórka o powyższej częstości mutacji jest pojęciem szerszym od mutatora zdefiniowanego jako gen kodujący białko zaangażowane w naprawę DNA, ale jak zobaczymy poniżej do fenotypu mutatorowego prowadzi

także inne zmiany niż mutacje w genach, których białkowe produkty naprawiają DNA.

Mutatory, szczególnie mutatory bakteryjne, są od lat przedmiotem badań naukowych. Badania te doprowadziły do odkrycia wielu mechanizmów powstawania mutacji i naprawy uszkodzonego DNA. Niekiedy badania nad mutatorami bakteryjnymi przyczyniły się bezpośrednio do odkrycia homologicznych mechanizmów naprawy DNA u człowieka. Tak było na przykład w przypadku odkrycia przyczyn HNPCC, dziedzicznej podatności do zachorowania na raka okrężnicy, kiedy okazało się, że u podstaw tego zjawiska leżą mutacje w jednym z genów systemu będącego odpowiednikiem bakteryjnego „mismatch repair system” — naprawy błędnie sparowanych zasad (FISHEL i współaut. 1993, LEACH i współaut. 1993). Równocześnie coraz powszechniej przyjmuje się pogląd, że jednym z początkowych etapów onkogenezy (mechanizmu tworzenia się nowotworów) jest powstanie komórki mutatorowej, która poprzez dezaktywację jednego lub kilku systemów naprawy DNA, zaczyna szybko gromadzić mutacje (LOEB, 1991). Obecnie mutatory są w centrum badań dotyczących uszkodzeń DNA leżących u podstaw niektórych chorób, a także są przedmiotem badań dotyczących selekcji w populacji.

Badania nad mutatorami stale dostarczają wiadomości na temat nowych, nieznanych do tej pory dróg mutagenezy. Właśnie odkrycie nowej drogi mutagenezy, w której powodem zwiększenia częstości mutacji jest zmodyfikowane tRNA, będzie tematem tego artykułu. Za-

nim jednak przejdziemy do bardziej szczegółowego opisu tego odkrycia, omówmy pokrótce jak rozwijały się badania nad mutatorami, jakie

są metody ich znajdowania i co najczęściej prowadzi do powstania komórki mutatora.

METODY ZNAJDOWANIA MUTATORÓW

Mutatory bakteryjne badane są już od ponad 40 lat (MIYAKE 1960), a pierwsze doniesienie o organizmie z podwyższonym poziomem mutacji jest jeszcze starsze i dotyczy *Drosophila* (PLOUGH 1941). Pierwszym opisanym mutatorem bakteryjnym był szczep *Escherichia coli* z mutacją w genie *mutT* (Tabela 1). Litera „T” w nazwie *mutT* pochodzi od nazwiska odkrywcy (TREFFERS i współaut. 1964) i ta konwencja została zachowana w nazewnictwie wielu kolejno odkrywanych mutatorów. *mutT* i kilka następnych mutatorów znaleziono przypadkowo wśród szczepów laboratoryjnych, ale stosunkowo szybko opracowano systematyczne metody wykrywania, jak również selekcji szczepów mutatorowych. Metody te do dziś są udoskonalane.

Wczesne metody detekcji mutatorów polegały na tym, że wśród komórek poddanych działaniu czynnika indukującego powstawanie mutacji, poszukiwano takich, które częściej niż inne rewertowały od auksotrofii do prototrofii lub nabywały oporności na antybiotyki na przykład streptomycynę. Dużym ułatwieniem dla wykrywania mutatorów było zastosowanie metody „papilacji”. W metodzie tej szczep bakteryjny hoduje się na podłożu zawierającym przynajmniej dwa składniki odżywcze, z których jeden jest dostępny dla wszystkich komórek, a drugi może być wykorzystany tylko wtedy, gdy bakterie nabeżdą mutacje umożliwiającą jego utylizację. Na takim podłożu szczep bakteryjny tworzy początkowo normalne kolonie, które osiągają rozmiar limitowany przez ogólnie dostępny składnik odżywczy. Kiedy składnik limitujący ulegnie wyczerpaniu rosną jedynie te mutanty, które mogą wykorzystywać pozostałe składniki odżywcze. Mutanty te tworzą mikrokolonie (papille) wyrastające na powierzchni kolonii bakteryjnej. Dodatek wskaźnika, na przykład X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolo- β ,D-galaktozyd) barwiącego kolonię Lac^+ na niebiesko, sprawia, że z łatwością można znaleźć kolonię w której z wyższą częstością zachodzi mutacja od Lac^- do Lac^+ , o ile do doświadczeń użyto szczepu Lac^- .

Dalszym krokiem było opracowanie metod umożliwiających znajdowanie mutantów o określonej specyfice. Stało się to ważne od pewnego momentu, bowiem najczęściej znajdowanymi mutatorami są mutanty w genach kodu-

jących białka — naprawy błędnie sparowanych zasad „mismatch repair”. Mutatory „mismatch repair” prowadzą głównie do tranzycji. Ażeby znaleźć inne mutatory, na przykład powodujące transwersje, potrzebne były bardziej precyzyjne metody poszukiwania komórek o podwyższonym poziomie mutacji. Jedną z takich metod opracowano w laboratorium J.H. Millera. Skonstruowano tam zestaw szczepów bakteryjnych, z których każdy jest auksotrofem laktozowym Lac^- , ale rewertuje do Lac^+ poprzez inny rodzaj zamiany zasady w genie β -galaktozydazy *lacZ*, koniecznym do utylizacji laktozy jako jedynego źródła węgla. I tak używając różnych szczepów z tego samego kompletu, można monitorować częstość transwersji: A:T do C:G; G:C do C:G, G:C do T:A i A:T do T:A, a także ilość tranzycji G:C do A:T i A:T do G:C (CUPPLES i współaut. 1989). Częstość mutacji w tych szczepach można monitorować poprzez papilację. Zastosowanie tego systemu umożliwiło znalezienie mutatora *mutY*, co z kolei przyczyniło się do poznania systemu GO — mechanizmu obrony przed oksydacyjnie uszkodzoną — mutageną 8-oxo-G. Czytelnicy bardziej zainteresowani metodą papilacji mogą znaleźć więcej informacji w pracach przeglądowych MILLERA i MICHAELSA (1996) lub MILLERA (1996).

Oprócz prac nad detekcją mutatorów prowadzono też prace nad selekcją szczepów o podwyższonej ilości mutacji. W tym przypadku wysiewano bakterie, poddane chemicznej mutagenizacji, na podłoża selekcyjne. Zwykle okazywało się, że wśród wyselekcjonowanych komórek, poza tymi, które nabyły mutację umożliwiającą pokonanie bariery selekcyjnej, znajdowano zazwyczaj pewien procent komórek — mutatorów (HELLING 1968). Ostatnio pokazano, że u *E. coli*, w wyniku mutagenizacji połączonej z dwoma lub trzema selekcjami zastosowanymi kolejno, można uzyskać populację komórek złożoną wyłącznie z mutatorów (MAO i współaut. 1997), a nawet opracowano bezpośrednią metodę selekcji mutatorów na jednym podłożu (MILLER i współaut. 1999). Zwiększenie częstości powstawania mutatorów w populacji komórek obserwowano także w wyniku długotrwałej selekcji (ŚNIEGOWSKI i współaut. 1997 i literatura tamże).

Tabela 1¹. Bakteryjne mutatory.

Nazwa genu	Pozycja na mapie <i>E.coli</i> min	Główny typ mutacji	Siła mutatora	Product genu	Rola w zapobieganiu mutacji
<i>mutD</i> (<i>dnaQ</i>)	5	wszystkie substytucje pojedynczych zasad mutacje zmiany ramki odczytu	bardzo silny	Podjednostka epsilon III polimerazy DNA	odpowiedzialna za funkcje korekcyjne w czasie replikacji DNA, posiada aktywność 3'-5'-egzonukleolityczną i usuwa błędne zasady
<i>mutT</i>	2	transwersje A:T do G:C	silny	pyrofosfataza 8-oxodGTP	usuwa 8-oxodGTP zapobiega włączaniu 8-oxo- dGTP do DNA
<i>mutH</i>	61	tranzycje G:C do A:T i A:T do G:C, mutacje zmiany ramki odczytu	silny	endonukleaza	część systemu naprawy błędnie sparowanych par zasad
<i>mutL</i>	95	tranzycje G:C do A:T i A:T do G:C, mutacje zmiany ramki odczytu	silny	70-kD białko	część systemu naprawy błędnie sparowanych par zasad
<i>mutS</i>	59	tranzycje G:C do A:T i A:T do G:C, mutacje zmiany ramki odczytu	silny	białko wiążące się do DNA	część systemu naprawy błędnie sparowanych par zasad
<i>uvrD</i> (<i>mutU</i>) (<i>uvrE</i>)	86	tranzycje G:C do A:T i A:T do G:C, mutacje typu zmiany ramki odczytu	silny	helikaza DNA II	odsuwa przecięty kawałek nici w czasie naprawy błędnie sparowanych par zasad
<i>mutY</i> (<i>micA</i>)	64	transwersje G:C do T:A	średni	DNA-glikozylaza	usuwa A z pary 8-oxo-G:A i G:A
<i>mutM</i> (<i>fpg</i>)	82	transwersje G:C do T:A	slaby	DNA-glikozylaza FAPY	usuwa 8-oxoG z DNA
<i>mutA</i>	95	transwersje A:T do T:A i G:C do T:A	slaby	missensowne tRNA glicynowe (kodowane przez gen <i>glyV</i>) rozpoznające antykodon kwasu asparaginowego	możliwe że działa poprzez tworzenie mutatorowej podjednostki epsilon polimerazy III
<i>mutC</i>	42	transwersje A:T do T:A i G:C do T:A	slaby	missensowne tRNA glicynowe (kodowane przez gen <i>glyW</i>) rozpoznające antykodon kwasu asparaginowego	możliwe że działa poprzez tworzenie mutatorowej podjednostki epsilon III polimerazy DNA
<i>dam</i>	74	tranzycje G:C do A:T i A:T do G:C, mutacje zmiany ramki odczytu	średni	metylaza adenylowa DNA	brak produktu genu <i>dam</i> , powoduje błąd metylacji adeniny w sekwencji 5GATC3, co zaburza rozpoznawanie nowosyntetyzowanej nici i tym samym zaburza prace methyl-directed mismatch repair
<i>ung</i>	56	tranzycje G:C do A:T i A:T do G:C	slaby	DNA - glikozylaza uracylu	glikozylaza uracylu usuwa z DNA uracyl powstały po dezaminacji cytozyny
<i>sodA</i>	88	substytucje pojedynczych zasad	bardzo slaby	manganozależna dysmutaza ponadtlenkowa	usuwa endogenicznie wytworzone czasteczki O ₂ ⁻
<i>oxyR</i>	89	głównie A:T do T:A	bardzo slaby	białko regulacyjne	reguluje ekspresje genow indukowanych przez nadtlenuk wodoru
<i>polA</i>	87	mutacje zmiany ramki odczytu, delecje	slaby	polimeraza DNA I	syntetyzuje DNA w czasie „naprawy przez wycinanie”, „syntezy naprawczej”

<i>vsr</i>	44	tranzyccje G:C do A:T w miejscach 5-metyloC	słaby	endonukleaza	usuwa T z błędnej pary GT powstałej po dezaminacji 5-metyloC, część systemu "VSP"
<i>dnaE (polC)</i>	4	substytucje pojedynczych zasad, mutacje typu zmiany ramki odczytu	słaby	podjednostka alfa III polimerazy DNA	wpływa na aktywność edycyjną, bierze udział w selekcji zasad w czasie syntezy DNA
<i>ada</i> <i>ogt</i>	48 30	tranzyccje G:C do A:T	bardzo słaby (widoczny tylko w powójnym mutancie)	metylotransferazy	część systemu chroniącego DNA przed skutkami działania środków alkilujących
<i>xth</i>	38	substytucje pojedynczych zasad	słaby	exonukleaza III	bierze udział w naprawie miejsc AP
<i>nfo</i>	47	substytucje pojedynczych zasad	słaby	endonukleaza IV	bierze udział w naprawie miejsc AP
<i>nth</i>	36	tranzyccje G:C do A:T	słaby	endonukleaza III	usuwa pirymidyny uszkodzone przez działanie środków utleniających
<i>nei</i>	16	tranzyccje G:C do A:T	widoczny tylko w podwójnym mutancie <i>nth, nei</i>	endonukleaza VIII	usuwa pirymidyny uszkodzone przez działanie środków utleniających
<i>mia</i>	95	transwersje G:C do T:A	bardzo słaby	transferaza biorąca udział w modyfikacji tRNA	nieznany być może zbliżony do mechanizmu działania <i>mutA</i> i <i>mutC</i>

¹Odnosiłki literaturowe dotyczące poszczególnych genów można znaleźć w pracach MILLERA (1998), MILLERA i MICHAELSA (1996), FOWLERA i SCHAAPERA (1997) oraz WALLACEA (1998).

Mutatory, jak już wspomniano, powstają głównie po uszkodzeniu któregoś z mechanizmów utrzymujących niezmienną DNA. Poni-

żej zostaną przedstawione główne drogi powstawania mutatorów.

MUTATORY POWSTAŁE NA SKUTEK USZKODZENIA FUNKCJI EDYCYJNYCH POLIMERAZ DNA

Polimerazy DNA, poza zdolnością do przeprowadzania syntezy DNA, posiadają często aktywność edycyjną, która usuwa błędne pary zasad powstałe w trakcie syntezy DNA. Aktywność ta czasami występuje jednocześnie z aktywnością polimeryzacyjną na jednej cząsteczce białka, w innych przypadkach wyodrębniona jest samodzielna podjednostka korekcyjna polimerazy DNA (GOODMAN i FYGENSON 1998). Zmniejszenie aktywności edycyjnej prowadzi do powstania bardzo silnych mutatorów. I tak na

przykład mutacje uszkodzające gen *dnaQ* — kodujący podjednostkę epsilon polimerazy DNA III — prowadzą do powstania jednego z najsilniejszych bakteryjnych mutatorów zwanego *mutD*. Niektóre mutatory *mutD* mają 10^4 razy podwyższoną częstość występowania mutacji w stosunku do szczepu kontrolnego (COX i HORNER 1982), a są i takie, które są letalne, o ile nie są utrzymywane w szczepach o podwyższonej wierności replikacji (FIJAIKOWSKA i SCHAAPER 1996).

MUTATORY POWSTAŁE NA SKUTEK USZKODZENIA FUNKCJI „MISMATCH REPAIR” — NAPRAWY BŁĘDNIIE SPAROWANYCH ZASAD

Najczęściej znajdowanymi mutatorami są mutatory powstałe na skutek uszkodzenia jednego z genów kodujących białka należące do systemu naprawy (ang. mismatch repair). Żeby naprawić błędną parę zasad, która umknęła uwadze edycyjnej aktywności polimerazy, sy-

stem „mismatch repair” musi najpierw taką parę rozpoznać i zdecydować, która z zasad jest w tej parze właściwa (robi to poprzez rozpoznanie, która nie jest nowo zsyntetyzowana, a więc zawiera błąd). Następnie musi wyciąć błędną zasadę i odtworzyć właściwą sekwencję przy

pomocy syntezy reperacyjnej. System naprawy błędnie sparowanych zasad w *E. coli* rozpoznaje nowo zsyntetyzowaną nić sprawdzając, która z dwóch cząsteczek DNA ma zmetylowaną adeninę (8-metyloadeninę) w sekwencji 5'GATC3'. Adenina w sekwencji 5'GATC3' jest metylowana przez enzym — metylazę adeniny DNA i komórki, które nie posiadają tego enzymu (dam⁻), są mutatorami (GLICKMAN 1979). W procesie rozpoznawania i wycinania błędnej pary zasad biorą udział cztery główne białka „mismatch repair”: MutS, MutL, MutH i helikaza II kodowana przez gen *uvrD*. Białko MutS rozpoznaje i wiąże się do błędnej pary zasad i wspólnie z białkiem MutL, aktywuje endonukleazę MutH, która przecina nić nie zmetylowaną w sekwencji

5'GATC3'. Nić ta jest częściowo degradowana i następnie resyntetyzowana, tym razem już z prawidłową zasadą. Dokładniejszy opis mechanizmów „mismatch repair” można znaleźć w pracach MODRICHA i LAHUEA (1996), MODRICHA (1997) oraz FISHELA (1998).

Komórki, które mają defekt w jednym z czterech głównych genów „mismatch repair” (*mutH*, *mutL*, *mutS*, lub *uvrD*) są silnymi mutatorami, które mogą mieć 100 do 1000 razy wyższy poziom mutacji niż szczep kontrolny. Mutatory: *mutS*, *mutL*, *mutH* i *uvrD* stymulują tranzycje, transwersje, a także mutacje typu zmiany ramki odczytu — „frameshifts” (LEONG i współaut. 1986, SCHAPER i DUNN 1987).

MUTATORY ZWIĄZANE Z SYSTEMEM ZAPOBIEGANIA I USUWANIA USZKODZEŃ OKSYDACYJNYCH

Zasady azotowe w DNA są stale narażone na uszkodzenia w wyniku różnych procesów chemicznych takich jak: depurynacja, dezaminacja i oksydacja. Zmiany te mogą być powodowane przez promieniowanie jonizacyjne, jak też różne czynniki chemiczne, w tym, może najbardziej, przez produkty normalnego metabolizmu. Według jednego z szacunków przyjmuje się na przykład, że dziennie na jedną komórkę ludzką przypada około od 10 000–150 000 uszkodzeń DNA (BECKMAN i AMES 1997). W wyniku oksydacji powstają puryny z otwartym pierścieniem, glikole cytozyny i tyminy, a także 2-dezoksy-7,8, dihydro-8-oksoguanozyna (8-oxodG) i 5-hydroksy-2dezoksycytidyna (5-OH-dC). Czytelnicy zainteresowani rodzajami uszkodzeń oksydacyjnych mogą znaleźć więcej informacji w artykule przeglądowym WALLACE 1998. Zarówno 5-OH-dC jak i szczególnie 8-oxodG są uszkodzeniami prowadzącymi do powstania mutacji. 5-OH-dC powoduje tranzycje C do T (FEIG i współaut. 1994), a 8-oxodG na skutek możliwości łatwego tworzenia pary z A (KOUCHAKDIJIAN i współaut. 1991) powoduje transwersje G do T (WOOD i współaut. 1990, SHIBUTANI i współaut. 1991).

Aby przeciwdziałać uszkodzeniom oksydacyjnym, żywe komórki wykształciły systemy enzymatyczne, które neutralizują aktywne formy tlenu (takie jak: O₂⁻, H₂O₂) zanim zdążą one uszkodzić DNA, a także systemy odpowiedzialne za naprawę uszkodzonego DNA. Do enzymów neutralizujących należą dysmutazy ponadtlenkowe, przekształcające ponadtleki w H₂O₂ i katalazy, które zamieniają H₂O₂ w wodę. Regulacją tych funkcji u *E. coli* i *Salmonella typhimurium* zajmują się przynajmniej trzy

wielkie regulony: *oxyR*, *soxR* i *katF*. Uszkodzenia tych regulonów (np. delecja *oxyR* — pozytywnego regulatore dla wielu enzymów) prowadzi do fenotypu mutatorowego (STORZ i współaut. 1987). Mutacje w genach kodujących dysmutazy ponadtlenkowe mogą również prowadzić do fenotypu mutatorowego, jakkolwiek efekt mutacji w genie *sodB* jest widoczny jedynie w kombinacji z mutacją w genie *sodA* (FARR i współaut. 1986).

Naprawą uszkodzonego oksydacyjnie DNA zajmuje się system zwany BER (ang. base excision repair) — naprawa przez wycinanie zasad. Początkowym i krytycznym etapem tego procesu jest usunięcie uszkodzonej zasady. Zajmują się tym glikozylazy — enzymy hydrolizujące wiązanie glikozyłowe pomiędzy zasadą i dezoksyrybozą. W wyniku tej reakcji w DNA powstaje miejsce apurynowe lub apirymidynowe (AP). Miejsca te są cytotoksyczne i mutagenne i muszą być naprawione. Niektóre glikozylazy wykazują również aktywność AP-liazy i przecinają wiązanie fosfodwuestrowe pomiędzy miejscem AP i resztą DNA, inne wymagają współdziałania oddzielnych enzymów. Czytelnicy zainteresowani BER znajdą więcej informacji w pracach WALLACE (1998) oraz KROKANA i współaut. (1997). Geny kodujące glikozylazy takie jak: *ung* (glikozylaza uracylu), *nth* (endonukleaza III) i *nei* (endonukleaza VIII) zazwyczaj są genami mutatorowymi i ich uszkodzenie prowadzi do podwyższenia poziomu częstości mutacji.

Na specjalną uwagę czytelników zasługują dwie glikozylazy, które związane są z zapobieganiem mutacji do jakich prowadzi oksydacyjne uszkodzenie guaniny 8-oxodG. 8-OxodG może łatwo tworzyć parę z adeniną (KOUCHAKDIJIAN i

współaut. 1991), co prowadzi do transwersji G:C do A:T (WOOD i współaut. 1990). Białka kodowane przez geny *mutM* i *mutY* są glikozylazami i wspólnie z białkiem MutT stanowią system „GO”. MutM, białko początkowo odkryte jako glikozylaza usuwająca z DNA 2,6-diamino-4-hydroksy-5-N-metylformamidopirymidynę (fapy), i stąd zwana Fapy-glikozylazą, wycina 8-oxodG z dwuniciowego DNA. MutY natomiast jest białkiem dość nietypowym, gdyż usuwa z DNA nieuszkodzoną adeninę, o ile utworzy ona parę z 8-oxodG. Trzeci enzym systemu „GO” — białko MutT jest hydrolazą. Enzym ten hydrolizuje 8-oxodGTP i w ten sposób zapobiega inkorporacji 8-oxodG do DNA (MAKI i SKIGUCHI 1992). Czytelnicy zainteresowani systemem „GO” znaj-

dą więcej informacji (razem z odnośnikami literaturowymi) w pracach MICHAELSA i MILLERA (1992) lub MILLERA (1996), a więcej informacji dotyczących mutT można znaleźć w przeglądowym artykule FOWLERA i SCHAAPERA (1997).

Większość z bakteryjnych glikozylaz ma swoje homologii w wyższych organizmach, także u człowieka. Ostatnie lata przyniosły wiele doniesień o sklonowaniu ludzkich homologów bakteryjnych glikozylaz. W wielu laboratoriach prowadzone są badania nad potencjalnym udziałem tych enzymów (czy też ich brakiem) w różnych ludzkich schorzeniach. Więcej informacji na ten temat, można znaleźć w cytowanych już pracach KROKANA i współaut. (1997) oraz WALLACEA (1998).

INNE MUTATORY

Poza opisanymi powyżej genami, których uszkodzenie prowadzi do efektu mutatorowego, w komórce *E. coli* występują także inne geny kodujące białka zaangażowane w naprawę uszkodzonego DNA. Do nich należą geny *ogt* i *ada*, kodujące metylotransferazy, chroniące DNA przed skutkami działania środków alkilują-

cych. Większość z tych genów wymieniono w Tabeli 1. Pominięto natomiast w pracy geny, w których mutacje prowadzą do takich skutków jak większe delecje, inversje, czy duplikacje DNA. Więcej informacji na ten temat można znaleźć w pracach KOWALCZYKOWSKIEGO i współaut. (1994) i MILLERA (1998).

ALTERNATYWNE DROGI MUTAGENEZY — MUTATOROWE tRNA

Chociaż badania nad mutatorami prowadzone są już od ponad 30 lat i wydawać by się mogło, że w tak prostym organizmie jak *E. coli*, niewiele już można odkryć, mutatory stale dostarczają niespodzianek. Przykładem tego są badania nad mutatorami *mutA* i *mutC*. W 1990 MICHAELS i współpracownicy opisali dwa mutatory: *mutA* i *mutC* znalezione w komórkach *E. coli* poddanych mutagenizacji EMS (siarczan etylometanowy). Mutatory te charakteryzowały się podwyższonym poziomem transwersji G:C do T:A i A:T do T:A i były bardzo podobne do siebie, chociaż mapowały się na przeciwległych krańcach chromosomu *E. coli* (*mutA* na 94 minucie, a *mutC* na 42 MICHAELS i współaut. 1990). Pomimo wielokrotnych prób nie udało się uzyskać insercji transpozonu do żadnego z tych genów. Ciekawa była też obserwacja, że o ile pojedyncze mutanty *mutA* i *mutC* powodowały jedynie transwersje, w połączeniu z defektem w jednym z genów „mismatch repair”: *mutS* lub *mutL*, obserwowano dodatkowo podwyższenie poziomu tranzykcji, przekraczające znacznie poziomy charakterystyczne dla pojedynczych mutantów. Mutatory *mutA* i *mutC* zostały sklonowane i zsekwencjonowane i okazało się wtedy, że efekt mutatorowy związany był ze zmienionym antykodonem w jednej z czterech kopii

tego samego genu kodującego tRNA glicyny. Gen kodujący glicynowe tRNA oznaczony *gly3* występuje w 4 kopiach na 95 i 42 minucie mapy genetycznej *E. coli*. Trzy z nich tworzą locus *glyV* (95 minuta), a jedna locus *glyW* (42 minuta). Mutatorowy efekt obserwowany w szczepach *mutA* i *mutC* związany był ze zmianą antykodonu glicynowego tRNA w ten sposób, że tRNA rozpoznawało kodon dla kwasu asparaginowego, zamiast kodonu glicyny, co prowadziło w konsekwencji do powstania białka zawierającego zamiast kwasu asparaginowego, glicynę. Dwa szczepy *mutA* miały zmiany w dwóch różnych kopiach genu *gly3* w miejscu *glyV* (dla tego mutacja *mutA* zmapowana została na 95 minucie) natomiast *mutC* miał zmianę w genie *gly3* w miejscu *glyW* na 42 minucie (SŁUPSKA i współaut. 1996).

Missensowne supresorowe tRNA, które wstawia glicynę w miejsce kodonu dla kwasów asparaginowych, było już uprzednio opisane (MURGOLA 1988). W pracach tych nie ma wzmianki o mutatorowym efekcie tRNA, ale wykazano, że jego wydajność odpowiada 1–2% wydajności „normalnego” tRNA. Ta niska wydajność w translacji (czy też mistranslacji) jest wynikiem złego „ładowania” zmienionego tRNA przez glicynową syntetazę tRNA. Prowadzi to do

otrzymania małej ilości tRNA z antykodonem dla kwasu asparaginowego i glicyną na końcu aminokwasowym. W podwójnym mutancie *mutA*, *mutC*, rosnącym znacznie gorzej na pełnym podłożu, niż którykolwiek z pojedynczych mutantów, dwa z czterech genów *gly3* syntetyzują tRNA ze zmienionym antykodonem i szczep ten ma wyższy poziom częstości mutacji od szczepów z pojedynczą mutacją *mutA* lub *mutC*. Jednocześnie obserwuje się zjawisko komplementacji efektu mutatorowego, czyli zjawisko polegające na tym, że po wprowadzeniu dodatkowych kopii genu normalnego tRNA sklonowanego na plazmidzie, szczep przestaje być mutatorem. Dodatkowe kopie normalnego tRNA „rozcieńczają” niejako ilość missensownych tRNA.

W jaki sposób takie „miskodujące” tRNA może wywoływać efekt mutatorowy? Do tej pory zaproponowano dwie hipotezy. Autorzy jednej z nich (SŁUPSKA i współaut. 1996) uważają, że odpowiedzialna za mutacje jest zmieniona podjednostka epsilon III polimerazy DNA w której jedna (lub więcej) cząsteczka kwasu asparaginowego zastąpiona została przez glicynę. Jest to możliwe, gdyż w komórkach *E. coli*, w których obok normalnego tRNA występuje missensowne tRNA, powstaje w czasie translacji pewna ilość „nienormalnych” białek z glicyną zamiast kwasu asparaginowego. Ponieważ komórka posiada jeszcze 2 lub 3 kopie normalnego tRNA i ponieważ „miskodujące” tRNA działa z wydajnością około 1%, w komórce nie ma zbyt wielu takich białek. Co więcej, jedynie w małej ich frakcji, zamiana kwasu asparaginowego na glicynę powoduje zaburzenia funkcji, bo tylko niektóre mają kwas asparaginowy w centrum aktywnym i prawdopodobieństwo zamiany właśnie tego jednego kwasu asparaginowego nie jest zbyt wielkie.

Tak więc, białko, które mogłoby być odpowiedzialne za mutatorowy efekt miskodującego tRNA, powinno mieć w swoim centrum aktywnym kwas asparaginowy a ponadto jego inaktywacja powodowałaby silny efekt mutatorowy. Oba te warunki spełnia właśnie podjednostka DNA polimerazy III, kodowana przez gen *dnaQ/mutD*. Mutacje w genie *dnaQ* prowadzą do powstania jednego z najsilniejszych mutatorów bakteryjnych, z poziomem mutacji podwyższonym nawet do 10 000 razy w stosunku do szczepu kontrolnego (COX i HORNER 1982). W podjednostce znajduje się 16 kwasów asparaginowych, w tym 3 we fragmentach ewolucyjnie konserwowanych. Zamiana jednego z trzech kwasów asparaginowych na glicynę, powoduje efekt mutatorowy, przy czym w dwóch przypadkach szczep *E. coli*, do którego wprowadzono

gen *dnaQ* z zamienionym kodonem kwasu asparaginowego na kodon glicyny, ma 10^4 razy podwyższony poziom mutacji w stosunku do szczepu z normalnym genem *dnaQ* (SŁUPSKA i współaut. 1998). Za hipotezą zakładającą, że białkiem efektorowym w szczepach *mutA*, *mutC*, jest podjednostka ϵ , przemawia także i to, że spośród wielu innych missensownych tRNA, które skonstruowano, jedno tylko wykazywało słaby efekt mutatorowy. Było to również glicynowe tRNA, które wstawia glicynę w miejsce kodonu histydyny. Kiedy zaczęto badać histydyny w białku ϵ , okazało się, że dwie spośród 7 histydyń w białku, są krytyczne dla jego funkcji edycyjnych. Zamiana którejkolwiek z tych dwu histydyń na glicynę powoduje utratę funkcji korekcyjnych, co oznacza powstanie silnego mutatora. Efekt substytucji histydyń przez glicynę jest jednakże słabszy niż w przypadku substytucji kwasu asparaginowego przez glicynę (SŁUPSKA i współaut. 1998). Hipoteza przypisująca rolę podjednostce korekcyjnej III polimerazy DNA tłumaczy również dłacze w kombinacji z mutacjami w genach „mismatch repair” mutatory *mutA* i *mutC* miały podniesiony nie tylko poziom traswersji, ale również i tranzycji. Wiadomo, że czasami silne mutatory *mutD* wysycają system „mismatch repair” w ten sposób, że nie może on nadażyć z naprawą wszystkich błędów przepuszczonych w czasie replikacji przez wadliwą aktywność edycyjną. Obserwuje się wtedy zarówno tranzycje, jak i transwersje. W przypadku mniejszego efektu mutatorowego kiedy na przykład komórki mutatora hoduje się na minimalnym podłożu, system „mismatch repair” nie jest wysycony i nadaża z naprawą tranzycji, tak że obserwuje się wtedy jedynie transwersje (SCHAAPER i RADMAN 1989). W szczepach *mutA* i *mutC*, które są słabymi mutatorami, tranzycje które nie są skorygowane w czasie replikacji przez podjednostkę ϵ są naprawiane przez system „mismatch repair”. Dopiero gdy poza mutacją w genach tRNA, komórka ma także uszkodzony system naprawy błędnie sparowanych zasad, czyli w podwójnym mutancie na przykład *mutA*, *mutS* obserwuje się poza transwersjami także podwyższone częstości tranzycji.

Z powyższą hipotezą dyskutują MURPHY i HUMAYUN (1997). Uważają oni, że chociaż udział podjednostki epsilon w obserwowanym fenotypie mutatorowym szczepów *mutA* i *mutC*, jest atrakcyjną możliwością, to jednak może nie być on tak bezpośredni, jak to powyżej opisano. Być może zmiana w dokładności lub tempie translacji w szczepach *mutA* i *mutC*, może aktywować jakieś nieznanne jeszcze mechanizmy, które zmniejszają dokładność edycji w czasie replika-

cji we wszystkich komórkach, a nie tylko w małej ich frakcji. Autorzy ci opierają się na spostrzeżeniu, że w szczepach *mutA* i *mutC* obserwuje się zwiększoną mutagenność 3,N⁴-etenocytozyny i, że efekt ten jest na tyle duży, że trudno sobie wyobrazić, iż odpowiedzialna jest za niego tylko frakcja komórek (MURPHY i HUMAYUN 1997). Autorzy ci podali również, że w szczepach *recA*⁻ nie obserwuje się mutatorowego efektu *mutA* i *mutC*.

Jak widac z powyższych rozważań na pełne wyjaśnienie mechanizmu mutatorowych tRNA trzeba jeszcze poczekać, ale samo odkrycie mutatorowych tRNA jest zaskakujące i fascynujące.

UWAGI KOŃCOWE

Z powyższych rozważań wynika, że mutatory przyczyniły się znacznie do zrozumienia mechanizmów mutagenyzy i naprawy DNA. Wiadomo, że mutatory są izolowane, przechowywane i hodowane w warunkach laboratoryjnych. Na koniec można zadać pytanie: jak wygląda sytuacja w przyrodzie? Powszechnie przyjmuje się, że wysoki poziom częstości mutacji nie jest korzystny dla organizmów, a mutatory są eliminowane z populacji, ale jest to twierdzenie *apriori*, nie poparte danymi eksperymentalnymi. Na ile jest ono prawdziwe? Jak szybko mutatory akumulują mutacje? Czy istnieją sytuacje w których komórki będące mutatorami mają przewagę nad pozostałymi członkami populacji? Pytania tego typu można mnożyć.

Z dotychczasowych badań wynika, że poza wirusami, większość organizmów, utrzymuje niski poziom mutacji, a różnorodność osiąga poprzez inne mechanizmy (DEITSCH i współaut. 1997). Mutatory jednakże, jak już wspomniano, powstają w populacji pod wpływem silnej (MAO i współaut. 1997) lub długotrwałej selekcji (ŚNIEGOWSKI i współaut. 1997). W populacjach o wyższym poziomie mutacji, mutacje niekorzystne gromadzą się szybciej niż mutacje korzystne. Zjawisko takie w populacjach bakteryjnych postulował już MULLER w 1964 twierdząc, że przy nieobecności rekombinacji płciowej, która może skorygować mutacje, mutacje niekorzystne będą się gwałtownie gromadzić z powodu „efektu mechanizmu zapadkowego”, czyli wymuszonej zmiany w jednym kierunku. Przybliżone oszacowanie szybkości gromadzenia niekorzystnych mutacji można znaleźć w pracy FUNCHAINA i współpracowników (w druku). W populacji komórek z defektem w genie *mutS*,

ce. Wskazuje ono na nowe mechanizmy mutagenyzy, nie na poziomie replikacji, czy naprawy uszkodzonego DNA, ale w trakcie translacji (czy też transkrypcji). Uprzednio prowadzono już teoretyczne rozważania dotyczące przejściowych — „transient” mutatorów, czyli takich, które powstają i trwają tylko w czasie jednej rundy translacji, transkrypcji, czy replikacji (NINIO 1991) i być może są odpowiedzialne za obserwowany poziom spontanicznych mutacji. Jednakże do tej pory, zjawiska tego nie pokazano eksperymentalnie i opisane powyżej mutatorowe tRNA są pierwszym potwierdzeniem teorii o przejściowych — mutatorach.

monitorowano około 700 genów (co stanowi w przybliżeniu 15% genomu *E. coli*), w czasie 60 pasażów. Bakterie pasażowano, rozsiewając je z pojedynczej kolonii (jeden pasaż około 15–20 generacji). Okazało się, że już po 10 pasażach rozsiewania kolonii można było zaobserwować, że w 40% badanych komórek zaszła utrata którejś z badanych funkcji, czyli że przynajmniej jeden gen został zainaktywowany. Mutacje te narastały w sposób niemal liniowy. Po 60 pasażach każda komórka w populacji mutatora miała około 4–5 genów nieaktywnych, a ponieważ badano tylko część genów można oszacować, że w komórce mutatora po około 50 pasażach, od 20 do 30 genów ulega uszkodzeniu. Badania te wskazały też kilka miejsc szczególnie podatnych na mutacje, tak zwane „hotspots”. Przykładowo po 60 pasażach około 30% wszystkich komórek miało mutacje w genie *xytB*. Analiza sekwencji tego genu pokazała, że występuje tam seria 8 cytozyn (-CCCCCCCC-). Właśnie taka sekwencja jest szalenie podatna na mutacje w szczepach „mismatch repair”.

Badania te pokazały więc również ilościowo, że inaktywacja „mismatch repair” prowadzi w dalszej konsekwencji do destabilizacji genomu i choć w pewnych sytuacjach (takich jak ciągła selekcja) wzrost poziomu mutacji może być początkowo korzystny, dalsza akumulacja mutacji prowadzi do utraty wielu funkcji i cena płaconą za możliwość szybkiego dostosowania się do otoczenia jest zbyt wielka.

Autorka chciałaby serdecznie podziękować Prof. Celinie Janion, Dr. Łukaszowi Salwińskiemu i mężowi, Dr. Tadeuszowi Słupskiemu za krytyczne uwagi do rękopisu.

MUTATOR tRNA — ALTERNATIVE PATHWAYS OF MUTAGENESIS

Summary

Cloning and sequencing of two mutator loci: *mutA* and *mutC* has led to a discovery of a new pathway of mutagenesis. The mutator phenotypes *mutA* and *mutC* result from changes in the anticodon in one of four copies of the same glycine tRNA at either *glyV* or the *glyW* locus. To date, two models have been proposed for the explanation of the observed phenotype. According to the first one, the mutator tRNA effect is exerted by generating a mutator polymerase and that its most likely target is an epsilon subunit, which serves in a proofreading function for DNA polymerase III. In support of this notion is the finding that, when each of the 16 aspartic acids in the epsilon subunit is replaced by glycine (one replacement per experiment) three strong *mutD*-like mutators are generated, showing that the appro-

priate targets for *mutA* mediated misinsertion exist in the transcribed *dnaQ* gene. Further support for this model comes from experiments on the construction of an additional mutator tRNA that inserts glycine at histidine codons. Replacement of each histidine codon in the *dnaQ* gene, in series, by a glycine codon showed that two of the constructed mutants were strong mutators. Another model proposes that an alteration in the translation rate accuracy in *mutA* or *mutC* cells activates a pathway that ultimately suppresses the editing activity of the epsilon subunit. The description of the *mutA*, *mutC* phenomenon together with an overview of other *E. coli* mutators is the topic of this paper.

LITERATURA

- BECKMAN K. B., AMES B. N., 1997. *Oxidative decay of DNA*. J. Biol. Chem. 272, 19633–19636.
- COX E. C., HORNER D. L., 1982. *Dominant mutators in Escherichia coli*. Genetics 100, 7–18.
- CUPPLES C. G., CABERA M., CRUZ C., MILLER J. H., 1989. *A set of LacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of specific frameshift mutations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 5345–5349.
- DEITSCH K. W., MOXON E. R., WELLEMS T. E., 1997. *Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections*. Micro. Mol. Biol. Rev. 61, 1–13.
- FARR S. B., DARI R., TOUATI D., 1986. *Oxygen-dependent mutagenesis in Escherichia coli lacking superoxide dismutase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 8268–8272.
- FEIG D. I., SOWERS L. C., LOEB L. A., 1994. *Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 6609–6613.
- FJAJKOWSKA I. J., SCHAAPER R. M., 1996. *Mutants in the Exo I motif of Escherichia coli dnaQ: Defective proofreading and inviability due to error catastrophe*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2856–2861.
- FISHEL R., 1998. *Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction*. Genes Dev. 12, 2096–2101.
- FISHEL R., LESCOE M. K., RAO M. R. S., COPELAND N. G., JENKINS N. A., e. a. 1993. *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell. 75, 1027–1038.
- FOWLER R. G., SCHAAPER R. M., 1997. *The role of the mutT gene of Escherichia coli in maintaining replication fidelity*. FEMS Microbiology Rev. 21, 43–54.
- FUNCHAIN P., YEUNG A., LEE STEWART J., LIN R., SLUPSKA M. M., MILLER J. H. *The consequences of continuous growth of mutator strains of Escherichia coli as measured by loss of function among multiple gene targets*. Genetics (w druk).
- GLICKMAN B. W., 1979. *Spontaneous mutagenesis in Escherichia coli strains lacking 6-methyladenine residues in their DNA: an altered mutational spectrum dam⁺ mutants*. Mut. Res. 61, 153–162.
- GOODMAN M. F., FYGENSON K. D., 1998. *DNA polymerase fidelity: from genetics toward a biochemical understanding*. Genetics 148, 1475–1482.
- HELLING R. B., 1968. *Selection of a mutant of Escherichia coli which has high mutation rates*. J. Bacteriol. 96, 975–980.
- KOUCHAKDJIAN M., BODEPUDI V., SHIBUTANI S., EISENBERG M., JOHNSON F., et. al. 1991. *NMR structural studies of the ionizing-radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-oxo-7H-dG(syn) dA(anti)alignment at a lesion site*. Biochemistry 30, 1403–1412.
- KOWALCZYKOWSKI S. C., DIXON D. A., EGGLESTON, A. K., LAUDER S. D., REHRAUER W. M., 1994. *Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 58,, 401–465.
- KROKAN H. E., STANDAL R., SLUPPHAUG G., 1997. *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA*. Biochem J. 325, 1–16.
- LEACH F. S., NICOLAIDES N. C., PAPADOPOULOS N., LIU B., JEN J., PARSONS R., PELTOMAKI P., SISTONEN, P., AALTONEN L. A., NYSTROM-LAHTI M., GUAN X.-Y., ZHANG J., MELTZER P. S., YU J.-W., KAO F.-T., CHEN D. J., CARSALETTI K. M., FOURNIER R. E. K., TODD S., LEWIS T., LEACH R. J., NAYLOR S. L., WEISSENBACH J., MECKLIN J.-P., JAROVIEH H., PETERSEN G. M., HAMILTON S. R., GREEN J., JASS J., WATSON P., LYNCH H. T., TRENT J. M., DE LA CHAPELLE A., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. Cell. 75, 1215–1225.
- LEONG, P.-M., HSIA, H. C., MILLER J. H., 1986. *Analysis of spontaneous base substitutions generated in mismatch-repair-deficient strain of Escherichia coli*. J. Bacteriol. 168, 412–416.
- LOEB L. A., 1991. *Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis*. Cancer Res. 51, 3075–3079.
- MAKI H., SKIGUCHI M., 1992. *MutT protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA synthesis*. Nature. 355, 273–275.
- MAO E. F., LANE L., LEE J., MILLER J. H., 1997. *Proliferation of mutators in a cell population*. J. Bacteriol. 179, 417–422.
- MICHAELS M. L., CRUZ C. MILLER J. H., 1990. *mutA and mutC: Two mutator loci in Escherichia coli that stimulate transversions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9211–9215.
- MICHAELS M. L., MILLER J. H., 1992. *The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) J. Bacteriol. 174, 6321–6325*.
- MILLER J. H., 1996. *Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair*. Ann. Rev. Microbiol. 50, 625–643.
- MILLER J. H., 1998. *Mutators in Escherichia coli*. Mut. Res. 409, 99–106.

- MILLER J. H., MICHAELS M., 1996. *Finding new mutator strains of Escherichia coli — a review*. *Gene* 179, 129–132.
- MILLER J. H., SUTHAR A., TAI J., YEUNG A., TROUNG C., LEE J., 1999. *Direct selection for mutators in Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 1575–1584.
- MIYAKE T., 1960. *Mutator factor in Salmonella typhimurium*. *Genetics* 45, 11–14.
- MODRICH P., 1997. *Strand-specific mismatch repair in mammalian cells*. *J. Biol. Chem.* 272, 24727–24730.
- MODRICH P., LAHUE R., 1996. *Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology*. *Ann. Rev. Biochem.* 101–133.
- MULLER H. J., 1964. *The relation of recombination to mutational advance*. *Mut. Res.* 1, 2–9.
- MURGOLA E. J., 1988. *tRNA, suppression, and the code*. *Ann. Rev. Genet.* 19, 57–80.
- MURPHY H. S., HUMAYUN M. Z., 1997. *Escherichia coli cells expressing a mutant glyV (glycine tRNA) gene have a UVM-constitutive phenotype: implications for mechanism underlying the mutA or mutC mutator effect*. *J. Bacteriol.* 179, 7507–7514.
- NINIO J., 1991. *Transient mutators: a semiquantitative analysis of the influence of translation and transcription errors on mutation rates*. *Genetics* 129, 957–962.
- PLOUGH H. H., 1941. *Spontaneous mutability in Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 9, 127–137.
- SCHAAPER R. M., DUNN R. L., 1987. *Spektra of spontaneous mutations in Escherichia coli strains defective in mismatch correction: the nature of in vivo DNA replication errors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6220–6224.
- SCHAAPER R. M., RADMAN M., 1989. *The extreme mutator effect of Escherichia coli mutD5 results from saturation of mismatch repair by excessive DNA replication errors*. *EMBO J.* 8, 3511–3516.
- SHIBUTANI S., TAKESHITA M., GROLLMAN A. P., 1991. *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG*. *Nature* 349, 431–434.
- SLUPSKA M. M., BAIKALOV C., LLOYD R., MILLER J., 1996. *Mutator tRNAs are encoded by the Escherichia coli mutator genes mutA and mutC: A novel pathway for mutagenesis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 4380–4385.
- SLUPSKA M. M., KING A. G., LU L. I., LIN R. H., MAO E. F., LACKEY C. A., CHIANG J.-H., BAIKALOV C., MILLER J. H., 1998. *Examination of the role of DNA polymerase proofreading in the mutator effect of miscoding tRNAs*. *J. Bacteriol.* 180, 5712–5717.
- ŚNIEGOWSKI P. D., GERRISH P. J., LENSKI R. E., 1997. *Evolution of high mutation rates in experimental populations of E. coli*. *Nature* 387, 703–705.
- STORZ G., CHRISTMAN M. F., SIES H., AMES B. N., 1987. *Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4690–4694.
- TREFFERS H. P., SPINELLI V., BELSER N. O., 1964. *A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40, 1064–1071.
- WALLACE S. S., 1998. *Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA*. *Radiation Res.* 150 (suppl.), S60–S70.
- WOOD M. L., DIZDARGLU M., GAJEWSKI E., ESSIGMANN J. M., 1990. *Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine 7-hydro-8-oxyguanine residue inserted at a unique site in a viral genome*. *Biochemistry* 29, 7024–7032.