



“LA MUTACIÓN ADAPTATIVA”. POLÉMICAS Y MECANISMOS

Rosa Nagel*

INAME-ANMAT, Ministerio de Salud, Caseros 2161, Buenos Aires C1264AAB, Argentina

E-mail: rnagel@anmat.gov.ar; ronagel@mail.retina.ar

* Investigadora Principal de CONICET

ABSTRACT

Genomic variation plays an essential role in evolution. Some of the processes underlying genomic variability are being analyzed, with particular emphasis on the mechanism of mutagenesis taking place with bacteria under stationary-phase stress conditions. This process involves the presence of DNA nicks or breaks, the participation of recombination-repair proteins and specific polymerases, and the induction of cellular stress responses.

RESUMEN

La variabilidad genómica, que es una propiedad intrínseca de los organismos, juega un rol esencial en el proceso evolutivo. Se analizan algunos de los procesos generadores de variabilidad genómica, con particular énfasis en el mecanismo de la mutagénesis que tiene lugar en las bacterias en las condiciones de estrés de fase estacionaria. Este proceso requiere la presencia de roturas en el ADN, la participación de proteínas de recombinación y reparación del ADN y de polimerasas específicas, y la inducción de respuestas celulares al estrés.

Palabras clave: respuesta al estrés; rotura ADN; recombinación; polimerasas; amplificación génica

Mutación y azar

La teoría evolutiva se asienta sobre dos pilares fundamentales: la mutación y la selección. La mutación es una modificación hereditaria que involucra uno o pocos pares de bases, o segmentos mayores del ADN. La evolución resultaría de la acción selectiva del medio ambiente sobre los organismos mutantes favoreciendo la sobrevivencia y reproducción de los mejor adaptados.

Es una afirmación generalizada en la genética que la mutación ocurre al azar, en forma independiente de las condiciones ambientales.

Monod, en su libro “El azar y la necesidad”, considera a la mutación como resultante de un azar esencial, definiendo a éste como intrínseco e independiente del entorno celular. Asimila el proceso de mutación a un accidente, azaroso e imprevisible, que compara con una colisión o encuentro accidental entre dos líneas de eventos absolutamente independientes (Monod, 1971).

Esta definición se encuadra dentro de la interpretación neodarwinista de la mutación. Según la perspectiva más ortodoxa la mutación aparece como un proceso azaroso y pasivo. El proceso de selección es el que impondría la direccionalidad adaptativa observada en los organismos.

Las bacterias habían constituido hasta la década de 1940 el último reducto del lamarckismo, que postulaba la influencia del medio sobre los caracteres y la herencia de los caracteres adquiridos. Los estudios genéticos realizados en las décadas de 1940-1950 demostraron, por diferentes métodos, y en forma indiscutible, que las mutaciones ocurren en las bacterias independientemente del medio selectivo (Luria y Delbrück, 1943; Lederberg y Lederberg, 1952). Éstos se basaron en la detección de mutantes resistentes a un agente letal, como un antibiótico o un bacteriófago, que mataba la población sensible. Demostraron que las mutantes resistentes preexisten en el cultivo de las bacterias, previamente a la exposición al agente selectivo. Las mutaciones se generan en forma aleatoria, con una frecuencia expresada como tasa de mutación (número de mutantes por célula y por generación).

La definición de Monod se encuadraba dentro de estos conocimientos.

Ensayo de Cairns y respuesta al estrés

En el año 1988, o sea menos de dos décadas atrás, en base a un trabajo también realizado con bacterias, Cairns concluyó que las mutaciones podían ser inducidas por el medio y las denominó mutaciones dirigidas (Cairns *et al.*, 1988).

Esta propuesta desató un intenso debate. ¿La mutación ocurría al azar o podía ser “dirigida” por el medio?. En esta polémica, mientras un grupo de investigadores sostenía la hipótesis de que la mutación ocurre en forma aleatoria, otros planteaban que la mutación no es un proceso independiente de las condiciones ambientales (Charlesworth *et al.*, 1988; Benson *et al.*, 1988; Stahl, 1988, 1992). Dentro de una perspectiva evolutiva se llegó a comparar a la mutación al azar como el producto de la acción de un relojero ciego vs la mutación no aleatoria, que se describió como el producto de la actividad de un hábil ingeniero genético (Shapiro, 1995). Esta cuestión fue considerada en la revisión ¿Mutación adaptativa vs mutación al azar?(Nagel, 1995).

El experimento de Cairns y col. consistió en sembrar un cultivo de una cepa mutante de

Escherichia coli Lac⁻, FC40, (incapaz de crecer sobre lactosa) en un medio selectivo no letal, con lactosa como fuente de carbono. En estas condiciones de no crecimiento, se generaban gradualmente mutantes (revertantes) Lac⁺, capaces de crecer sobre lactosa.

La mutante Lac⁻ empleada en este estudio tenía ciertas características que, como fuera demostrado en estudios posteriores, resultaron ser esenciales para la aparición de las revertantes Lac⁺. Una de ellas era que la región del gen *lac*, que consistía de una fusión entre los genes *lacI* y *lacZ* (*lacI33-lacz*), portadora de una mutación de corrimiento de código (frameshift) de adición de 1 par de bases en *lacI*, estaba localizada en el plásmido conjugativo F (Fig. 1).

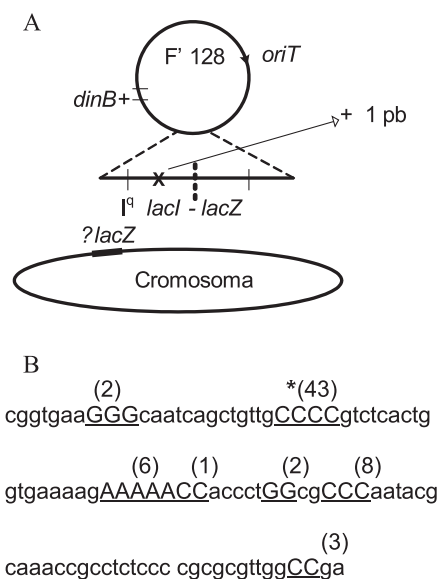


Fig. 1.

A. *E. coli* FC40. La región *lac* cromosomal está deletionada. La fusión de los genes *lacI-lacZ* está localizada en el plásmido F. La mutación Lac⁻ se debe a la adición de 1 pb en *lacI*.

Ori T: origen de transferencia de F; *dinB*: codifica la polimerasa IV.

B. Secuencia de nucleótidos de una zona de *lacI*. La mutación de adición de 1 pb (CCC a CCCC), indicada por un asterisco, resulta en el corrimiento del marco de lectura que se extiende a *lacZ* y confiere el fenotipo Lac⁻. Las pérdidas de 1 pb, que ocurren en las secuencias mononucleotídicas subrayadas, restituyen el marco de lectura y por ende el fenotipo Lac⁺. Se indican entre paréntesis el número de revertantes Lac⁺ recuperados en estos sitios.

Las investigaciones, continuadas en parte por el mismo Cairns en colaboración con P. Foster (Cairns y Foster, 1991; Foster y Cairns, 1992), y luego por ésta última (Foster y Trimarchi, 1994) y por S. Rosenberg y col. (Rosenberg *et al.*, 1994)

evidenciaron que la mayoría de las revertantes Lac⁺ que se generaban en el medio en condiciones de no crecimiento se debían a pérdidas de 1 pb, compensatorias de la mutación original, localizadas mayoritariamente en dos regiones cercanas de secuencias homopoliméricas de citosinas, a diferencia de revertantes Lac⁺ que ocurrían en esta misma cepa en la fase de crecimiento, que eran heterogéneas (Fig. 1).

El mismo Cairns aceptó más tarde que las mutantes Lac⁺ generadas en su sistema no eran en sentido estricto “dirigidas” por el medio selectivo empleado, y se pasó a designarlas “adaptativas”, para distinguirlas de las mutantes que se generan en la fase de crecimiento. Fueron también designadas mutantes de fase estacionaria, inducidas por estrés o cairnsianas (Cairns y Foster, 1991; Rosenberg et al., 1998).

Se observó que la mutación “adaptativa” Lac⁺, que ocurre en condiciones de fase estacionaria, de inanición y no crecimiento, requiere la inducción del sistema SOS* (Walker, 1984) y la presencia de las proteínas de recombinación RecA y RecBC (Rosenberg et al., 1996; Foster et al., 1996). La mutación “espontánea” que ocurre durante la fase de crecimiento no presenta estos requerimientos

Además resultaron esenciales las funciones de transferencia del plásmido, codificadas por *traI*, pero no la transferencia per se, para que tuviese lugar la alta frecuencia de aparición de las mutantes Lac⁺ (Radicella et al., 1995; Foster y Trimarchi, 1995). La proteína TraI es una endonucleasa que reconoce y corta el ADN en una sola cadena en *OriT*, sitio de origen de transferencia del plásmido. La mutación a Lac⁺ no ocurría cuando la construcción *lac* se relocizaba del plásmido F al cromosoma.

Por otro lado, se detectó la presencia de mutaciones cromosomales entre las revertantes Lac⁺, y no entre las células de la población Lac⁻. Para explicar estas

* Sistema SOS: regulado por los genes *recA* y *lexA*, se induce por daño en el ADN y/o detención de su síntesis. Controla la expresión de más de 40 genes, entre ellos *din B*. mutaciones se pos-

tuló la inducción, en una subpoblación de las células Lac⁺, de un estado de hipermutabilidad (HM) transitoria resultante del estrés de inanición (Rosche y Foster, 1999; Rosenberg et al., 2000)

Amplificación génica

Un nuevo giro se introdujo con los trabajos llevados a cabo por J. Roth y col. (Andersson et al., 1998) quienes demostraron que las mutantes Lac⁺ se generaban por un proceso de amplificación del gen *lac*. La mutante Lac⁻ original produce una muy pequeña cantidad de β-galactosidasa, lo que permite un débil crecimiento sobre lactosa. La amplificación del gen, que puede alcanzar hasta 50-100 copias contiguas, posibilita un crecimiento muy lento sobre la lactosa y la formación de microcolonias. Estos investigadores propusieron que no era necesario recurrir a la hipótesis de una aumentada tasa de mutación en las células en condiciones de no crecimiento. Basando sus estimaciones en el mayor número de copias del gen *lac* y el crecimiento residual de las células portadoras de la amplificación (que forman microcolonias) propusieron que la tasa de mutación a Lac⁺ y el mecanismo son los mismos que los que tienen lugar en las células en crecimiento. Extendieron el modelo de amplificación a otros caracteres localizados en el plásmido F próximos a *lac* (Hendrikson et al., 2002).

Se inició una nueva controversia que quedó plasmada en una serie de ocho artículos con resultados experimentales, interpretaciones y refutaciones mutuas (Roth y Andersson, 2004; Rosenberg y Hastings, 2004; Foster, 2004). ¿El proceso de amplificación génica explicaba la aparición de las revertantes Lac⁺? ¿Había, en efecto, un aumento de la tasa de mutación en las condiciones del medio selectivo no letal, según lo postulaban P. Foster y S. Rosenberg y col., o la tasa de mutación era igual a la de las células en crecimiento, de acuerdo con el modelo propuesto por J. Roth y col.? ¿El mecanismo de generación de las mutaciones Lac⁺ adaptativas que aparecían en la fase estacionaria era diferente al de las mutaciones que se generan en la fase de creci-

miento, o ambas eran consecuencia de un mismo proceso mutacional?. Una de las objeciones planteadas a la hipótesis del aumento de la tasa de mutación bajo determinadas condiciones ambientales era que ello impondría una carga genética que resultaría, en términos evolutivos, desventajosa para el organismo, dado que la mayoría de las mutaciones resultan desfavorables para el organismo, y solo unas muy pocas ventajosas.

Roturas en el ADN y reparación. Mecanismos

Los tres grupos de investigación continuaron activamente con el estudio de este sistema. Sus trabajos, en particular los de Foster, Rosenberg y col., ofrecen evidencias experimentales e interpretaciones sobre las mutaciones que se generan en las condiciones del ensayo que permiten un mejor conocimiento y comprensión de los complejos mecanismos subyacentes.

En la fase estacionaria, de no crecimiento e inanición, y selección con lactosa, las mutantes se generan por dos vías independientes, la mutagénesis puntual y la amplificación génica (Powell y Wartell 2001, Rosenberg y Hastings, 2004). La mayoría de las mutantes Lac⁺ generadas en los primeros 7 días corresponden al primer tipo y aproximadamente el 40% de las generadas en los días subsiguientes resultan de la amplificación génica. Se designa a estos procesos mutación puntual adaptativa o mutación puntual inducida por estrés, y amplificación adaptativa o amplificación inducida por estrés, respectivamente.

Las revertantes adaptativas Lac⁺ puntuales requieren la actividad de las proteínas de recombinación RecA, RecBC, RuvABC y RecF que reparan las roturas en el ADN (y se representan con la sigla DSBR por double strand break repair), la inducción de la respuesta SOS, la polimerasa IV (Pol IV o DinB), el regulador de respuesta al estrés RpoS* y la proteína TraI (Fig. 2) (Foster, 2004; Ponder *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006).

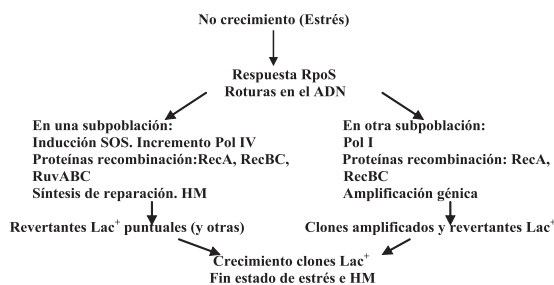


Fig. 2. Esquema de los mecanismos de generación de revertantes Lac⁺ HM: hipermutabilidad.

El gen *dinB* codifica la polimerasa Pol IV que sintetiza el ADN con baja fidelidad (con propensión a error) y es por ende causal de mutaciones (Jarosz *et al.*, 2007). Este gen está localizado, en la cepa empleada por Cairns, en el factor F' próximo a *lac* y se amplifica junto con éste (Fig. 1).

La importancia de un corte o rotura en el ADN en la generación de revertantes Lac⁺ fue demostrada primero por experimentos en los que se reemplazó la función de TraI por la de otra endonucleasa, gIIp, que produce cortes en una sola cadena del ADN. La presencia de gIIp y de su sitio blanco (de 37 pb), que se introdujo en el factor F', estimularon la formación de las revertantes Lac⁺ (Rodríguez *et al.*, 2002).

En experimentos más recientes se insertó el gen que codifica la endonucleasa/helicasa I-SceI en el genoma de las células de *E. coli* y su correspondiente

*RpoS: factor de transcripción que promueve la transcripción de más de 100 genes (entre ellos *dinB*). Se induce por diferentes tipos de estrés (inanición, fase estacionaria, pH ácido, estrés oxidativo, estrés osmótico, etc.).

sitio de corte (de 18 pb) en el plásmido F' (Ponder *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006). La actividad de esta enzima, que genera la formación de roturas de doble cadena (DSBs), aumentó en más de 100 veces el número de revertantes Lac⁺ que se generan en presencia de TraI.

La presencia del corte en ambas cadenas del ADN (DSB) y la reparación del mismo por la operatividad de las proteínas de recombinación homóloga (DSBR) frente a una región homóloga, y de Pol IV que sintetiza el ADN con producción

de errores, mayoritariamente de tipo “frameshift”, conducirían a la mutagénesis. Este proceso es aplicable a un DSB que ocurra en cualquier sitio, en el factor F o en el cromosoma. De acuerdo al mismo la síntesis de reparación y por ende las mutaciones quedan restringidas a las regiones próximas al sitio de rotura y no ocurren en forma generalizada en todo el genoma (Fig. 3).

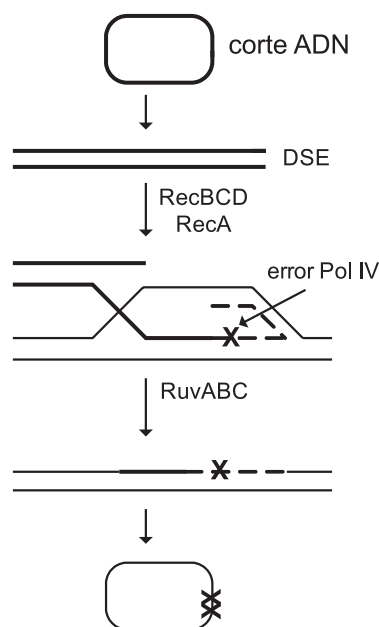


Fig. 3
Modelo del mecanismo de generación de revertantes puntuales Lac⁺ en las condiciones de estrés de fase estacionaria.
Las líneas de puntos indican la síntesis de reparación del ADN.
RecA, RecBCD, RuvABC: proteínas de recombinación; Pol IV: polimerasa IV de baja fidelidad inducible por SOS y RpoS; DSE: extremos de doble cadena.
Las mutaciones, indicadas por cruces, se localizan en un región limitada del genoma, próxima a las roturas de doble cadena (DSBs).

De estos experimentos se concluye que la mutagénesis se activa en la fase estacionaria independientemente de la presencia de la lactosa.

Los estudios con células en crecimiento evidenciaron que se puede inducir un aumento de la tasa de mutación en regiones localizadas del genoma por un mecanismo similar al responsable de la generación de mutaciones puntuales en la fase de estrés nutricional. Se requieren para ello la producción experimental de roturas de doble cadena (DSBs), la inducción del sistema SOS y las actividades de las proteínas DSBR y de la polimerasa Pol IV. Resulta clave para este proceso la inducción de la respuesta RpoS, que ocu-

re frente a diferentes tipos de estrés, entre ellos el de inanición en la fase estacionaria (Ponder *et al.*, 2005). Además se observó que un exceso de extremos de ADN monocatenario, provocado en las células en crecimiento por la ausencia de exonucleasas específicas (ExoI o ExoVIII), induce un aumento de la mutagénesis que es dependiente de la respuesta SOS y de Pol IV (Hersch *et al.*, 2006).

La amplificación génica inducida por el estrés ocurre por un mecanismo diferente del de la mutación puntual. Se encontró que, al igual que en ésta, intervienen las proteínas de recombinación RecA, RecBC y Ruv, la respuesta RpoS y la presencia de cortes en el ADN, producidos por TraI o por I-SceI (Fig. 2). En cambio, no se requieren para la amplificación la inducción SOS ni la actividad de Pol IV, pero sí la actividad de la polimerasa I (Pol I) (Rosenberg y Hasting, 2004; Slack *et al.* 2006).

Se propusieron dos modelos alternativos para explicar la amplificación génica.

En uno de estos modelos se considera que la amplificación es resultante de un estrés nutricional y que se genera por un mecanismo recombinatorio que denominan de desplazamiento de molde o template (“template-switching”). Éste se iniciaría por desplazamiento del extremo 3’ de un ADN monocatenario generado por rotura del ADN y arresto de la síntesis de ADN en una horquilla de replicación, a una posición diferente en otra horquilla de replicación (“template-switching”), la formación de una estructura de Holliday y su resolución vía RuvC (Slack *et al.*, 2006).

Según el otro modelo, propuesto por Roth y col., las duplicaciones y amplificaciones de la región *lac*, algunas presentes previamente, y otras, que se producirían durante la selección con lactosa, ocurrirían por recombinación homóloga entre copias diferentes de un cromosoma en replicación, entre secuencias repetidas cortas (REP) o secuencias de inserción (IS) presentes en el F, o copias de *lac* (Kugelberg *et al.* 2006). Estos investigadores consideran que todas o la mayoría de las revertantes Lac⁺ se generan a partir del aumentado número de copias de *lac* producidas por la amplificación y el consiguiente crecimiento resi-

dual, y siguen sosteniendo que no es necesario postular un aumento de la tasa de mutación e inducción por estrés.

Foster y col. (Stumpf *et al.*, 2007) demuestran que varias de las predicciones del modelo de amplificación génica propuesto por Roth y col. como generador de las revertantes Lac⁺ no son sostenibles y reenfatan su interpretación de que la mayoría de estas revertantes se generan a partir de las células Lac⁻, en un solo paso, por un mecanismo recombinatorio de reparación a partir de cortes en el sitio *oriT* del plásmido F, y no de células precursoras portadoras de amplificaciones. Sin embargo sus consideraciones son compatibles con evidencias que indican que la reversión puntual a Lac⁺ y la amplificación, que ocurre más tarde, corresponden a eventos independientes que pueden generar el fenotipo Lac⁺.

Consideraciones generales y conclusiones

La estabilidad del ADN a través de su replicación en sucesivas generaciones no solo depende de su propia estructura, sino también de las numerosas proteínas que intervienen en este proceso. La mutación no es un proceso pasivo, aislado de la célula. Modificaciones en la actividad de alguna de las enzimas que intervienen en la replicación del ADN, por ej. las polimerasas replicativas y/o sus actividades correctoras (“editing”), o en las proteínas de alguno de los numerosos sistemas de reparación del ADN, como por ej. el sistema de reparación de bases mal apareadas MMR (o mismatch repair), daños en el ADN, etc., traen apareados cambios en la tasa de mutación.

Cuando se habla de mutación se suele considerar, implícita o explícitamente, que se trata de un proceso al azar. Si bien las mutaciones son poco predecibles, los estudios de fase estacionaria en bacterias, y otros llevados a cabo con otros sistemas, revelan que las mismas no ocurren precisamente al azar. La mutación tiene una probabilidad de ocurrencia, que varía en distintos tipos de organismos (es más alta en los virus de ARN que en las bacterias u organismos superiores, Drake *et al.* 1998), en distintos genes de un orga-

nismo (es varios órdenes de magnitud más alta en los genes de inmunoglobulinas de los mamíferos, Shapiro 2005) y también en distintos sitios de un gen. Las mutaciones puntuales se distribuyen en forma heterogénea, en agrupamientos designados sitios calientes (hot spots), racimos (clusters) o lluvias (showers) (Benzer, 1961; Drake, 2007).

Las deleciones, duplicaciones, amplificaciones y reordenamientos de genes o segmentos mayores del ADN ocurren con frecuencia en los organismos. Estos cambios constituyen un importante causal de variabilidad. Algunos de ellos se deben a la presencia de elementos genéticos móviles denominados transposones. La presencia de este tipo de elementos y su vinculación con condiciones de estrés e inestabilidad genómica fue descrita por primera vez por B. McClintock en sus estudios con maíz (McClintock, 1984). Los reordenamientos del ADN, operando en forma programada o no programada, pueden configurar cambios que posibiliten la expresión de nuevas funciones (Shapiro, 2005).

Factores ambientales de estrés, como el daño al ADN y/o alteraciones en su replicación, inducen en las bacterias la respuesta SOS y por ende el aumento de la escisión y/o movilización de algunos transposones y de la frecuencia de la mutación puntual y de ciertos tipos de deleciones (Levy *et al.* 1993; Chan y Nagel, 2004).

Es razonable pensar que el proceso de mutación esté sometido, como otros procesos celulares, a cambio y selección. La mutación no aparece así como un mecanismo autónomo e inmanente, sino como un proceso pasible de cambio. Señales internas y externas podrían modificar la expresión de los genes y la mutabilidad. Las condiciones del medio seleccionarían las variantes mejor adaptadas. La mutabilidad también sería una característica pasible de selección, y por ende de evolución.

De los estudios realizados sobre las mutaciones que se generan en las bacterias en condiciones de inanición y no crecimiento, bajo presión selectiva no letal, se concluye que la célula puede recurrir a mecanismos de mutación diferentes a los que operan en las células en crecimiento.

En las condiciones del sistema de Cairns la

mutagénesis puntual se produce en lugares próximos a sitios de rotura del ADN, como consecuencia de la operatividad de sistemas de reparación que involucran proteínas de recombinación, la síntesis de ADN por polimerasas de baja fidelidad, y la inducción de las respuestas celulares SOS y RpoS. Este proceso de reparación con error inducido por estrés constituiría un mecanismo general por el que se generan algunos tipos de mutantes. Otro aspecto de este sistema es la amplificación génica que también requiere la producción de roturas en el ADN, actividades de recombinación y la inducción de la respuesta RpoS.

La formación espontánea de roturas en el ADN induciría la inestabilidad y los cambios genómicos.

Interesa destacar que los trabajos sobre la mutabilidad puntual generada en la fase estacionaria por inanición indican que ésta se localiza en regiones restringidas del genoma, lo que no constituiría el mismo riesgo para la célula que un aumento generalizado de la mutabilidad.

La amplificación génica observada en estas condiciones experimentales, ya sea resultante de las condiciones de estrés y/o de la selección impuesta, constituye otro mecanismo relevante de variabilidad y cambio genómico.

Las mutaciones inducidas por estrés pueden ocurrir por diversos mecanismos, según las diferentes condiciones, cepas u organismos (Bjedov *et al.*, 2003). Sin embargo, estos mecanismos presentan algunas similitudes y difieren de los que ocurren en las cepas en crecimiento.

Se discute si estos mecanismos de mutación fueron seleccionados por su capacidad de producir diversidad genética o si solo son el subproducto de los mecanismos de reparación celular seleccionados por sus efectos en la sobrevivencia. Independientemente de la interpretación, el aumento de la variabilidad conferiría mayor valor adaptativo.

Los mecanismos de mutagénesis operativos en las células bacterianas en condiciones de estrés podrían proveer modelos para la comprensión de otros cambios genéticos, tales como la generación de la resistencia a la acción de antibióticos, la evolución de patógenos, el cáncer, la resisten-

cia a agentes quimioterapéuticos, y aún los de procesos evolutivos, como los que condujeron al desarrollo de nuestro sistema inmune.

Referencias

- Andersson DI, Slechta ES, Roth JR (1998) Evidence that gene amplification underlies adaptive mutability of the bacterial *lac* operon. *Science* 282(5391):1133-1135.
- Benson SA; Partridge L, Morgan MJ (1988) Is bacterial evolution random or selective?. *Nature* 336: 21-22.
- Benzer S (1961) On the topography of the genetic fine structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 47: 403-415.
- Bjedov I, Tenaillon O, Gérard B, Souza V, Denamur E, Radman M, Taddei F, Matic I (2003) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* 300: 1404-1409.
- Cairns J, Foster PL (1991) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* 128: 695-701.
- Cairns J, Overbaugh J, Miller S (1988) The origin of mutants. *Nature* 335: 142-145.
- Chan A, Nagel R (2004) The participation of RecB in the induction of mini-Tn10 precise excision in a *dnaB* thermosensitive mutant, *Mutat.Res.* 548: 47-52.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Bull JJ; Grafen A; Holliday R, Rosenberger RF; Van Valen L M; Danchin A; Tessman I; Cairns J (1988) Origin of mutants disputed. *Nature* 336: 525-528.
- Drake JW (2007) Mutations in clusters and showers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 104: 8203-8204.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148: 1667-1686.
- Foster PL (1997) Nonadaptive mutations occur on the F' episome during adaptive mutation conditions in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 179: 1550-1554.
- Foster PL (2004) Adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 186: 4846-4852.

- Foster PL (2004) Rebuttal: Adaptive point mutation (Rosenberg and Hastings). *J.Bacteriol.* 186:4845.
- Foster PL, Cairns J (1992) Mechanisms of directed mutation. *Genetics* 123: 255-260.
- Foster PL, Trimarchi JM (1994) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science* 265: 407-409.
- Foster PL, Trimarchi JM (1995) Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 92: 5487-5490.
- Foster PL, Trimarchi JM., Maurer RA (1996) Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics.* 142: 25-37.
- He AS, Rohatgi PR, Hersh MN, Rosenberg SM. (2006) Roles of *E. coli* double-strand-break-repair proteins in stress-induced mutation. *DNA Repair* 5:258-73.
- Hendrikson HE, Slechta ES, Bergthorsson U, Andersson DI, Roth JI (2002) Amplification-mutagenesis: evidence that “directed” adaptive mutation and general hypermutability result from growth with a selected gene amplification. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 99: 2164-2169.
- Hersh MN, Morales LD, Ross KJ, Rosenberg SM. (2006) Single-strand-specific exonucleases prevent frameshift mutagenesis by suppressing SOS induction and the action of DinB/DNA polymerase IV in growing cell. *J.Bacteriol.* 188:2336-2342.
- Jarosz DF, Beuning PJ, Cohen SE, Walker GC (2007) Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiol.* 15: 70-77.
- Kugelberg E, Kofold E, Reams AB, Andersson DI, Roth JR (2006) Multiple pathways of selected gene amplification during adaptive mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 103: 17319-17324.
- Lederberg J, Lederberg E (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J.Bacteriol.* 63: 399-406.
- Levy S, Balbinder E, Nagel R (1993) Effect of mutations in SOS genes on UV-induced Tn10 precise excision in *Escherichia coli*. *Mutat.Res.* 293: 241-247.
- Luria SE, Delbrück M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.
- McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- Monod J (1971) *El azar y la necesidad*. Monte Avila Ed. Barcelona-Caracas.
- Nagel R (1995) ¿Mutación al azar vs mutación adaptativa?. *Mendeliana* 11:1-6.
- Ponder RG, Fonville NC, Rosenberg SM (2005) A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation. *Mol.Cell.* 19:791-804.
- Powell SC, Wartell RM (2001) Different characteristics distinguish early versus late arising adaptive mutations in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 473: 219-228.
- Radicella JP, Park PU, Fox MS (1995) Adaptive mutation in *Escherichia coli*: a role for conjugation. *Science* 268: 418-420.
- Rodriguez C, Tompkin J, Hazel J, Foster PL (2002) Induction of a DNA nickase in the presence of its target site stimulates adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 184:5599-608.
- Rosche WA, Foster PL (1999) The role of transient hypermutators in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 96:6862-7.
- Rosenberg SM, Harris RS, Longerich S, Galloway AM (1996) Recombination-dependent mutation in non-dividing cells. *Mutat.Res.* 350: 69-76.
- Rosenberg SM, Hastings PJ (2004) Adaptive point mutation and adaptive amplification pathways in the *Escherichia coli* Lac system: stress responses producing genetic change. *J.Bacteriol.* 186: 4838-4843.
- Rosenberg SM, Hastings PJ (2004) Rebuttal: adaptive mutation in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 186: 4853

- Rosenberg SM, Hastings PJ (2004) Rebuttal: growth under selection stimulates Lac⁺ reversion (Roth and Andersson) *J.Bacteriol.* 186: 4862-4863.
- Rosenberg SM, Longrich S, Gee P, Harris RS (1994) Adaptive mutation by deletions in small mononucleotide repeats. *Science* 265: 405-407.
- Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS (1998) Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics* 148: 1559-1566.
- Roth JR, Andersson DI (2004) Adaptive mutation: how growth under selection stimulates growth and reversion by increasing target copy number *J Bacteriol.* 186: 4855-4860.
- Roth JR, Andersson DI. (2004) Rebuttal: adaptive point mutation (Rosenberg and Hastings). *J.Bacteriol.* 186: 4844.
- Roth JR, Andersson DI. (2004) Rebuttal: adaptive point mutation (Foster). *J.Bacteriol.* 186: 4854.
- Shapiro J. (1995) Adaptive mutation: Who's really in the garden? *Science* 268: 373-374.
- Shapiro JA (2005) Structural approaches to sequence evolution: genome system architecture, repetitive DNA and natural genetic engineering. *Gene* 345: 91-100.
- Slack A, Thornton PC, Magner DB, Rosenberg SM, Hastings PJ. (2006) On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 2: 385-397
- Stahl FW (1988) A unicorn in the garden. *Nature* 335: 112-113.
- Stahl FW (1992) Unicorns revisited. *Genetics* 132: 865-867.
- Stumpf JD, Poteete AR, Foster PL (2007) Amplification of *lac* cannot account for adaptive mutation to Lac⁺ in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 189:2291-2299.
- Walker GC (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol.Rev.* 48: 60-93.

