

**Titre du projet :**

Effets des radicaux libres de l'environnement sur le vieillissement et la neurodégénérescence via la transcription erronée des lésions de l'ADN

**Acronyme :** MUTATRANSCRI

**Auteurs :**

Damien Brégeon  
Maître de Conférence de l'Université Paris-Sud  
Institut de Génétique et Microbiologie  
CNRS UMR 8621 Equipe GMT  
Campus d'Orsay – Bât 400  
91405 Orsay cedex  
damien.bregeon@igmors.u-psud.fr

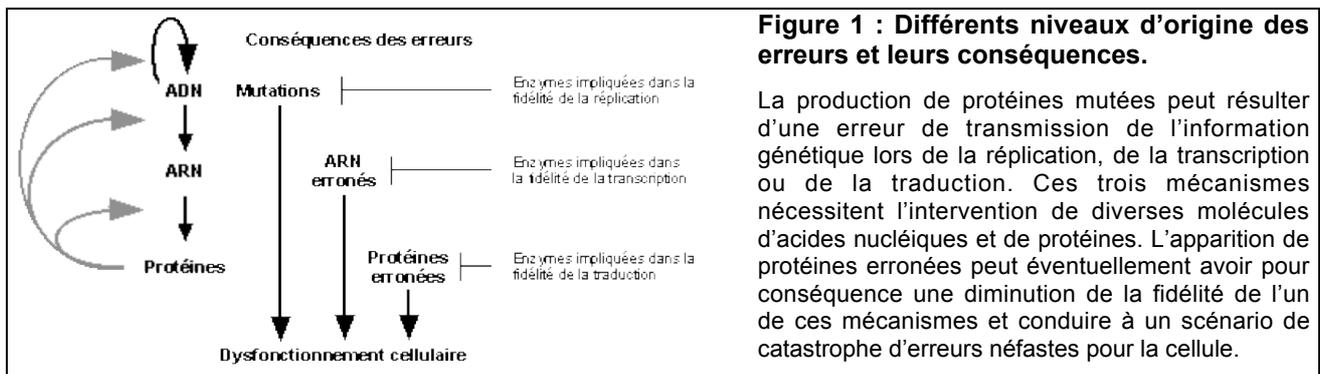
Alain Sarasin  
Directeur de recherche CE  
Institut Gustave Roussy  
CNRS FRE 2939  
39, rue Camille Desmoulins – PR2  
94805 Villejuif cedex  
sarasin@igr.fr

**Objectifs et situation du sujet :**

L'environnement au sens large du terme peut agir sur notre santé par l'induction de maladies d'origine multifactorielle qui pourraient être liées à des contaminants de l'environnement : produits phytosanitaires et pesticides (tel que le Paraquat largement utilisé en agriculture qui a été reconnu comme hautement toxique par l'OMS [1] et qui est un donneur de radicaux libres majeurs), hydrocarbures aromatiques polycycliques, ozone, métaux lourds, rayonnements ionisants ou solaires,... De plus, les variations génétiques observées chez l'homme (plus d'un polymorphisme génétique pour 1000-3000 bp dans le génome humain) entraînent une réponse unique de chaque organisme vis à vis d'une situation de stress et donc une grande difficulté à comprendre les relations gène-environnement. Ces variations génétiques, pouvant aller jusqu'à une maladie génétique expliquent en partie les taux différents de maladies chez des individus exposés aux mêmes polluants, ainsi que les réponses différentes aux médicaments.

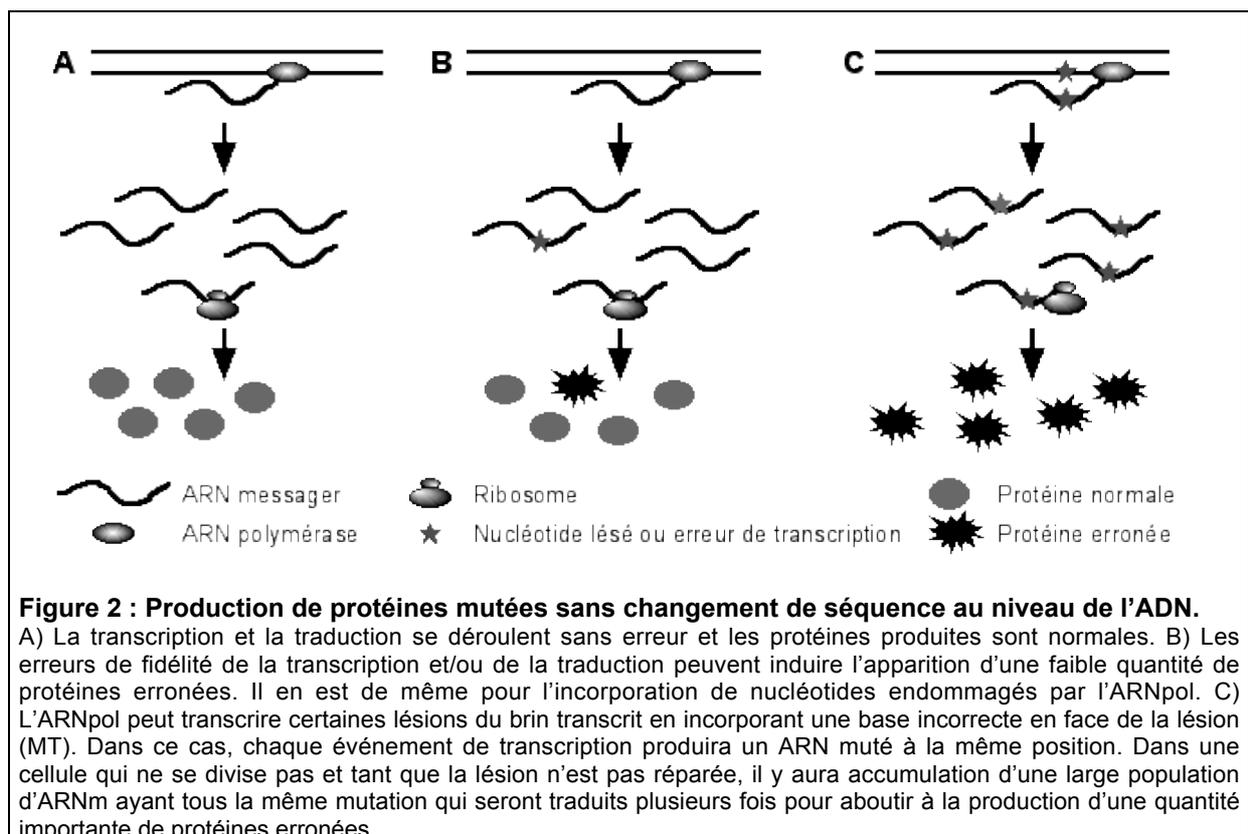
Parmi les différentes théories proposées pour expliquer la diminution progressive des fonctions cellulaires au cours du vieillissement suggère que celle-ci serait la conséquence d'une accumulation de protéines erronées [2]. L'accumulation de protéines erronées peut en effet entraîner la modification de la physiologie d'une cellule. L'apparition de ces protéines erronées dans une cellule peut être due à un défaut dans le contrôle de la fidélité d'un des trois processus vitaux pour la cellule que sont la réplication, la transcription ou la traduction (figure 1). Il existe des mécanismes de maintien de l'efficacité et/ou de la précision de ces processus nécessitant la participation coordonnée de nombreuses protéines. Les changements de séquence en acides aminés d'une protéine peuvent aussi avoir de nombreuses conséquences pouvant aller de la mort cellulaire au vieillissement en créant des maladies génétiques. La grande majorité des études menées jusqu'à présent a été focalisée sur l'analyse de la réplication dans des cellules en cours de division. En effet, les changements de séquence au niveau de l'ADN (mutations) jouent un rôle majeur dans l'apparition des protéines erronées puisqu'ils sont stables et héréditaires. Les études portant sur la fidélité de la réplication ont permis de mieux comprendre les différents mécanismes de mutagenèse (pour revue voir [3]). On sait ainsi que les mutations peuvent survenir suite aux erreurs faites lors de la réplication par l'ADN polymérase (soit par des ADN polymérases répliquatives, soit plutôt par des ADN polymérases translesionnelles et mutagènes) ou être associées à une déficience du système de réparation des mésappariements de bases (SRM), qui est un mécanisme corrigeant les erreurs de réplication et est présent chez la quasi-totalité des organismes [4].

Toutefois, la source majeure de mutations est l'existence de lésions nucléotidiques au niveau de la molécule d'ADN (alkylation, oxydation, dimérisation de bases). L'apparition de ces lésions est induite par des agents physiques ou chimiques d'origine endogène ou exogène. En dehors des ultraviolets solaires et des rayonnements ionisants qui sont des sources majeures de lésions de l'ADN, de nombreux produits chimiques de notre environnement journalier sont aussi génotoxiques : agents oxydants chimiques, pesticides, fibres d'amiante, radicaux libres, métaux lourds, ozone... Ainsi, nous avons montré que l'ozone était fortement oxydant et mutagène sur des cellules humaines en culture [5], ainsi que différents agents alkylants [6] ou médicaments [7]. Parmi les pesticides, le Paraquat, est un exemple intéressant. Il est reconnu par l'OMS, l'EPHA américaine et les instances européennes comme l'un des pesticides les plus dangereux et toxiques [1], bien que l'Europe ait récemment refusé son retrait (54 morts en France en 4 ans). Le Paraquat, considéré comme "un poison violent pour l'homme" par détresse respiratoire est un donneur de radicaux libres. Il tue les cellules humaines en culture facilement et 50-100 fois plus les cellules de malades déficients en réparation de l'ADN. D'autres herbicides comme l'atrazine et la simazine induisent également des radicaux libres toxiques. Certains métaux lourds ont non seulement une activité génotoxique par eux-mêmes mais aussi une action d'inhibition de la réparation normale de l'ADN. Dans ces conditions, ces métaux lourds potentialisent les cellules à l'action d'autres agents génotoxiques.



Les radicaux libres peuvent aussi être produits à l'intérieur de la cellule du fait de l'utilisation de l'oxygène pour fabriquer de l'énergie. Ces molécules fabriquées à proximité de noyaux cellulaires et donc de l'ADN sont aussi très toxiques en particulier dans des organes très biologiquement utilisateur d'énergie comme le cerveau. La spécificité d'appariement d'un nucléotide lésé est souvent différente de celle du nucléotide d'origine, générant ainsi l'apparition d'une mutation lors de la réplication. Pour contrecarrer cet effet délétère des lésions nucléotidiques, il existe plusieurs systèmes enzymatiques permettant la réparation de ces lésions. Une augmentation de la mutagenèse peut donc être due à un excès de lésion au niveau de l'ADN ou à une déficience des systèmes de réparation.

La connaissance des mécanismes de mutagenèse et de la génétique des systèmes de réparation de l'ADN a grandement contribué à la compréhension de nombreux autres sujets comme l'origine de la variabilité génétique, l'évolution des espèces et certaines maladies humaines. Toutefois, il est important de rappeler que l'énorme majorité des cellules d'un organisme sont en phase  $G_0$  ou  $G_1$  et donc ne se répliquent pas. On pouvait donc se poser la question de l'apparition possible de protéines mutées en absence de réplication de l'ADN, mais en présence de lésions non réparées sur l'ADN.



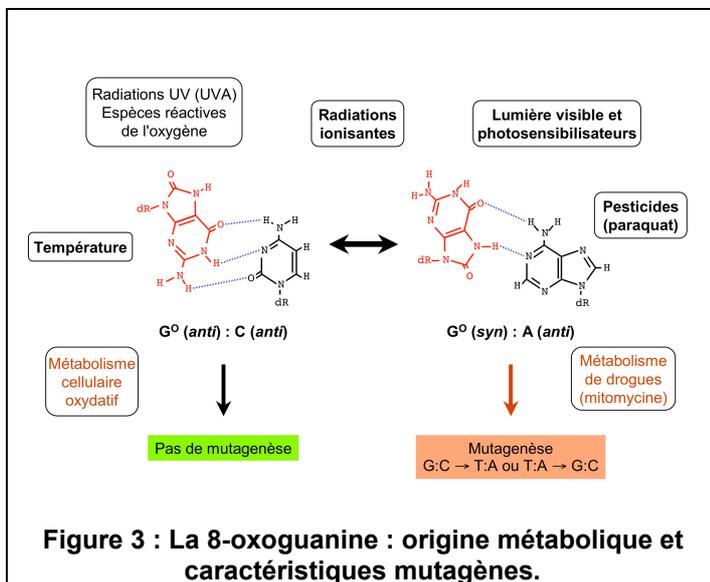
Les erreurs de lecture moléculaire, affectant la fidélité de transcription ou de traduction, modifient l'expression du message génétique et entraînent la production de protéines erronées à partir de gènes ne portant pourtant aucune mutation (Figure 2). Au niveau de la traduction, les erreurs d'incorporation d'acides aminés par le ribosome sont de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-4}$  par codon [8]. Les erreurs de traduction peuvent aussi être dues à une erreur de chargement des ARNt [9] ou encore à un défaut de maturation des ARNt [10, 11]. Au niveau de la transcription, l'incorporation de ribonucléotides lésés ou l'apparition de lésions sur la molécule d'ARN elle-même peuvent modifier les propriétés d'appariement codon-anticodon et entraîner la production

de protéines erronées [12-15]. De plus, des erreurs de fidélité de l'ARN polymérase (ARNpol) peuvent aussi générer l'apparition de transcrits erronés. Il est estimé que les complexes transcriptionnels procaryotes ou eucaryotes font une erreur pour  $10^4$  à  $10^5$  ribonucléotides incorporés [16, 17].

Ces erreurs de lecture moléculaire se produisent de façon aléatoire et ne permettent la production que d'une faible quantité de protéines erronées durant un temps limité (Figure 2B). Toutefois, il a été montré que ces erreurs jouent un rôle essentiel dans la production et l'agrégation de formes mutantes du précurseur de la  $\beta$ -amyloïde observées dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [18-20].

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ADN servant de matrice à la transcription peut contenir des lésions nucléotidiques que l'on peut classer en deux catégories en fonction de résultats obtenus *in vitro*. Les lésions bloquantes, qui empêchent la progression du complexe transcriptionnel en cours d'élongation et qui sont à l'origine d'un signal apoptotique et les lésions non-bloquantes [21]. *In vitro*, il a été montré que les lésions non-bloquantes sont à l'origine de la production d'une population homogène de transcrits mutants (Figure 2C).

Ce mécanisme, appelé **mutagenèse transcriptionnelle (MT)**, est à l'origine d'une production massive de protéines erronées ayant toutes la même séquence peptidique [22]. Très peu de chose sont connues quant aux implications biologiques que peut avoir la MT. Toutefois, la MT peut être induite *in vivo* par des lésions de l'ADN ne bloquant pas l'ARNpol, telles que la 8-oxo-guanine (8OG) [23]. L'ARNm muté ainsi produit peut générer l'apparition de protéines erronées qui nuira à la physiologie de la cellule [22].



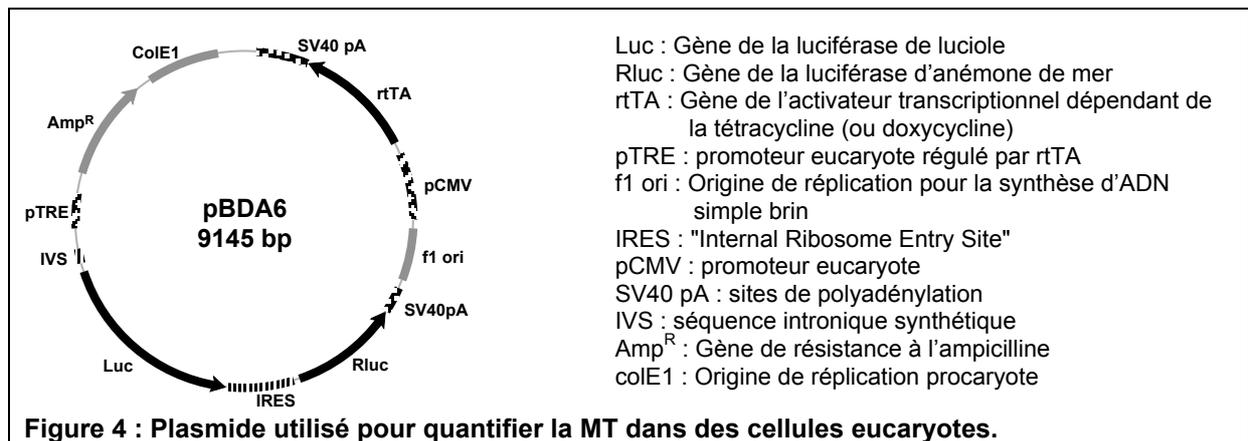
Parmi les lésions endogènes les plus fréquentes, il est admis que ce sont les lésions oxydantes induites par les radicaux libres produits lors de la formation d'énergie dans les mitochondries. Plusieurs dizaines de lésions oxydantes existent mais la mieux analysée (probablement car elle représente une quantité importante, mais aussi parce que nous disposons d'outils efficaces pour la mesurer : enzymes spécifiques, techniques physiques, anticorps, ...) est la 8OG qui est une modification chimique qui apparait mineure sur la guanine mais qui modifie de façon importante ses règles d'appariement Watson-Crick puisque les DNA polymérases répliquatives préfèrent insérer une adénine plutôt qu'une cytosine en face de la 8OG. La 8OG est une des lésions majeures détectées au niveau de l'ADN lors d'un stress oxydatif induit par certains

pesticides, certains polluants comme l'ozone [5], par exemple ou lors de l'exposition à des radiations ionisantes ou aux rayonnements UV-A. Cette base oxydée est fortement mutagène puisqu'elle peut s'apparier lors de la réplication soit avec une adénine, soit avec une cytosine et ainsi augmenter le taux de transversion  $G:C \rightarrow T:A$  [24]. En absence de réparation la 8OG induit via la réplication des mutations G vers A (Figure 3). Compte tenu du fort potentiel mutagène de la 8OG et de la forte MT induite par cette lésion dans des bactéries déficientes pour certains mécanismes de réparation de l'ADN [23], il nous a semblé très important d'étudier de manière plus approfondie les conséquences de la présence de cette lésion dans le brin transcrit d'un gène dans des cellules humaines et en absence de réplication de la matrice endommagée.

## Matériels et méthodes :

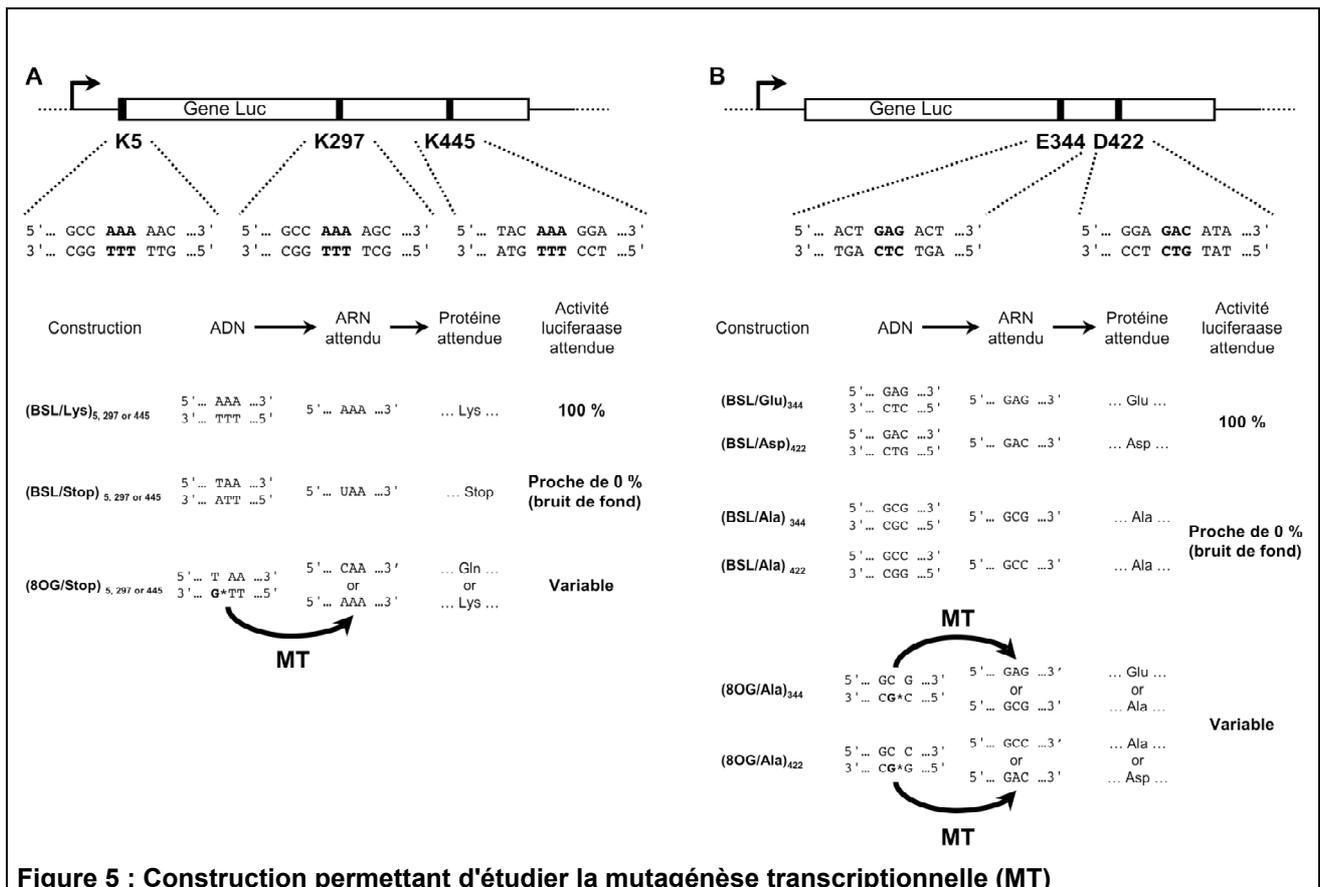
### 1) Mise au point du système rapporteur

Pour mesurer le taux d'erreurs de transcription induites par la 8OG, nous avons construit le plasmide décrit dans la figure 4. L'analyse des résultats n'est pas influencée par les erreurs de réplication induites par la lésion étudiée puisque ce plasmide ne contient pas d'origine de réplication eucaryote. Il possède une origine de réplication du phage f1 permettant, dans les bactéries, la production d'ADN simple brin contenant la séquence codante du gène rapporteur.



Grâce à une technique dont nous avons optimisée tous les paramètres pour l'étude de la MT [25], la synthèse du brin complémentaire se fera *in vitro* en utilisant comme amorce un oligonucléotide contenant une 8OG à une position définie dans le brin transcrit du gène rapporteur.

La particularité de ce plasmide est que l'expression du gène rapporteur est sous le contrôle d'un promoteur inducible. Ce promoteur permet la co-expression sur le même cistron des gènes *Luc* et *Rluc*. Ce dernier code la *Renilla* luciférase, non lésée, utilisée comme marqueur expérimental et dont la mesure de l'activité permettra à la fois d'estimer l'efficacité de transfection et de normaliser les niveaux d'erreurs transcriptionnelles de base dans les cellules transfectées. De plus, l'induction de ce promoteur peut être régulée de façon dépendante de la concentration de doxycycline présente dans le milieu de culture. Cela nous permettra ainsi d'évaluer le taux d'erreurs transcriptionnelles en fonction du taux de transcription du gène. Le système expérimental a été construit et fonctionne déjà dans des cellules humaines au laboratoire.



## 2) Mesure de la MT

A partir du plasmide précédemment décrit, nous avons réalisés une quinzaine de construction. Nous avons ainsi pu tester les effets sur la transcription de la présence à cinq positions différentes d'une 8OG sur le brin transcrit du gène de la luciférase (Figure 5). Sur ce gène, les codons 5, 297 et 445 codent soit pour une Lysine (K) (BSL/Lys) (BSL : Brin sans lésion), soit un codon stop (BSL/Stop), soit une lysine par mutagenèse transcriptionnelle ou une glutamine par transcription fidèle (8OG/Stop) (Figure 5A). Les

construction faites au codon 344 codent soit pour un acide glutamique (BSL/Glu)<sub>344</sub> permettant la synthèse d'une luciférase active, soit une alanine (BSL/Ala)<sub>344</sub> permettant la synthèse d'une luciférase mutante inactive (E344A). De même, Les construction faites au codon 422 codent soit pour un acide aspartique (BSL/Asp)<sub>422</sub> permettant la synthèse d'une luciférase active, soit une alanine (BSL/Ala)<sub>422</sub> permettant la synthèse d'une luciférase mutante inactive (D422A). Pour ces deux derniers groupes de construction, les construction (8OG/Ala) conduisent à la synthèse de luciférase active par MT ou d'une forme mutante inactive par transcription fidèle (Figure 5B). Ces constructions ont été utilisées pour quantifier la MT induite par la 8OG dans différentes lignées cellulaires. Pour chaque lignée cellulaire étudiée, le taux de MT est exprimé en pourcentage d'activité luciférase exprimée 24 heures après transfection avec une construction contenant une 8OG. Le 100% d'activité est mesuré dans les mêmes lignées par transfection des constructions ne contenant pas de 8OG et permettant l'expression d'une luciférase active [(BSL/Lys), (BSL/Glu) et (BSL/Asp)].

### 3) Identification des facteurs contrôlant la MT

La MT induite par une 8OG dans le brin transcrit du gène de la luciférase a été estimée en fonction de la capacité de la cellule à réparer cette lésion. Pour cela, nous avons utilisé différentes lignées cellulaires humaines déficientes pour des mécanismes moléculaires susceptibles de réparer cette lésion et donc de moduler dans le temps les effets de la MT. Ces mécanismes sont la réparation par excision de bases (BER) [26], le système de réparation des mésappariements (SRM) [27] et la réparation couplée à la transcription (TCR) [28, 29].

### Principaux résultats :

#### 1) La MT induite par la 8OG est dépendante du contexte de séquence

Les activités luciférase relatives quantifiées dans différentes lignées cellulaires montrent que les taux de MT induite par une 8OG sont très variables suivant que la lésion est placée au niveau des codons 5, 297 ou 445 dans les constructions (8OG/Stop) (Figure 5 et 6A). Ces résultats indiquent que la MT induite par une 8OG dans le brin transcrit d'un gène est fortement dépendante du contexte nucléotidique environnant la lésion.

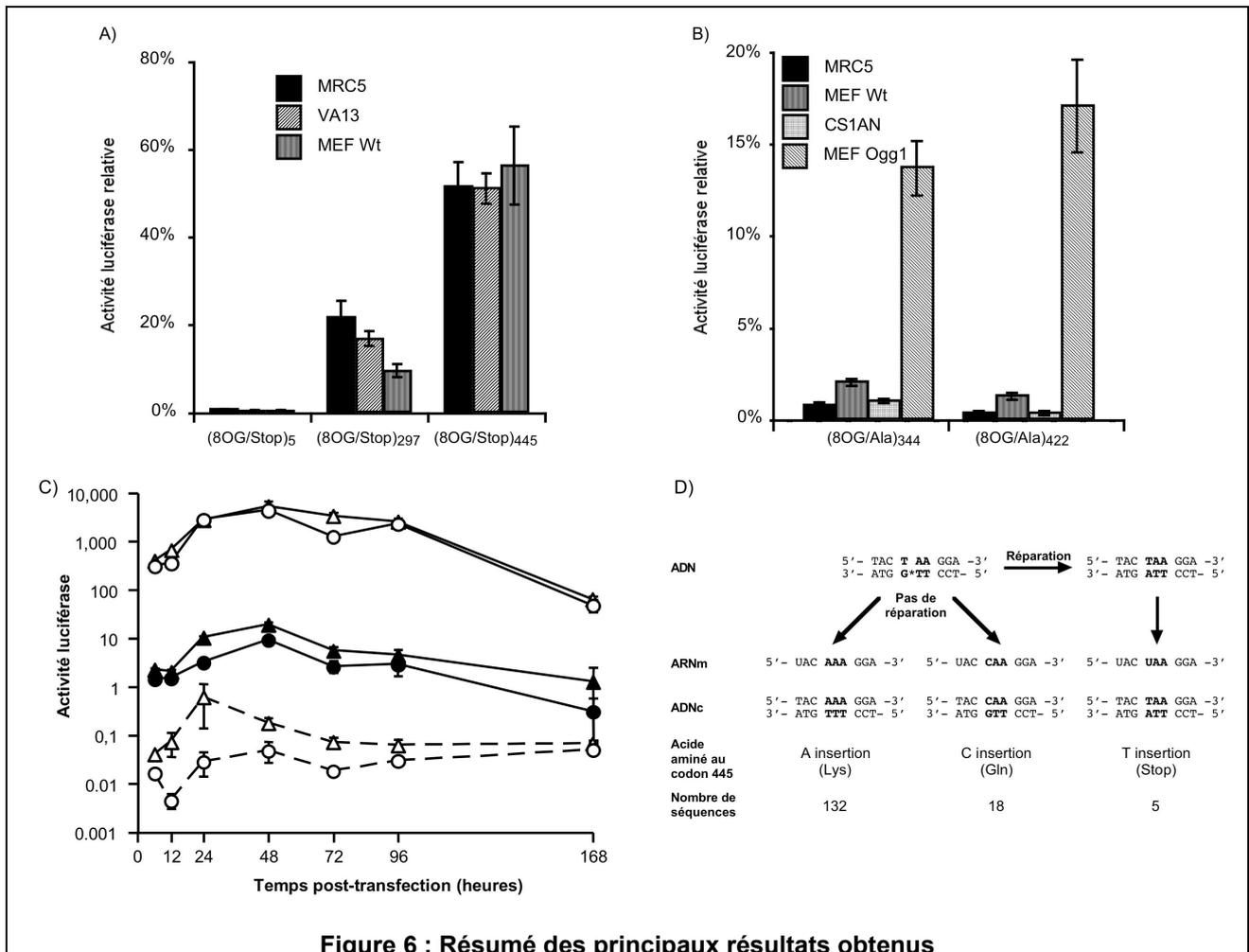


Figure 6 : Résumé des principaux résultats obtenus

De manière inattendue, on remarque que plus la 8OG est éloignée du début du gène de la luciférase, plus elle induit de MT. Ceci pourrait simplement être dû aux contextes nucléotidiques choisis pour nos tests, mais aussi à un lien direct entre la longueur du brin à transcrire et le taux de MT induite. D'autres constructions dans lesquelles la 8OG a été placées à différents endroits du brin transcrit du gène de la luciférase vont pouvoir prochainement être testées. Nous pensons que ces observations permettront de mieux comprendre ce phénomène.

### 2) Les facteurs contrôlant la MT induite par une 8OG

Les résultats précédemment décrits ont été obtenus dans des lignées cellulaires n'ayant aucune déficience pour un des mécanismes de réparation de la 8OG (MRC5 et MEF). Lorsque, dans une cellule, un des mécanismes de réparation de la 8OG est déficient, cela se traduit par une présence prolongée de la lésion dans le brin transcrit du gène de la luciférase. Ainsi, cette lésion pourra être transcrite un plus grand nombre de fois et alors entraîner un taux de MT plus élevé. Avec notre système, cela se traduit par une production plus importante de luciférase active et donc un forte activité relative de cette enzyme comparée à l'activité relative obtenue avec la même construction dans une lignée réparant efficacement la lésion (MRC5 et MEF). C'est bien ce que nous observons dans la lignée MEF Ogg1 qui est déficiente pour la réparation de la 8OG par BER, ce qui indique que ce mécanisme, lorsqu'il est déficient, peut être à l'origine d'un fort taux de MT induite par la 8OG (Figure 6B). Dans une moindre mesure, nous avons aussi observé qu'une déficience du SRM pouvait jouer un rôle stimulateur de la MT induite par la 8OG (résultats non montrés). En revanche, dans nos conditions d'expérimentation, nous n'avons observé aucune différence d'activité relative de luciférase entre les lignées cellulaires de référence (MRC5 et MEF) et les lignées déficientes pour la TCR (CS1AN par exemple dans la figure 6B). Ceci semble donc indiquer que la 8OG ne serait pas réparée par la TCR, mais une étude plus détaillée est nécessaire pour mieux comprendre cette observation.

### 3) La MT est un phénomène ayant des conséquences à long terme

Nous avons précédemment vu que même dans des lignées cellulaires n'ayant aucune déficience pour un des mécanismes de réparation de la 8OG transfectées avec une construction (8OG/Ala)<sub>344</sub> ou <sub>422</sub>, nous pouvions détecter une activité de luciférase due à la MT 24 heures après transfection. Pour savoir si la MT induite par la 8OG peut avoir des conséquences à long terme sur le phénotype de la cellule comme, dans notre cas, une production prolongée de protéine de luciférase active, nous avons quantifié les activités luciférase dans des cellules MRC5 transfectées avec les constructions faites aux codons 344 (triangle sur la figure 6C) et 422 (rond). On peut voir (Figure 6C) que cette activité est systématiquement élevée lorsque les cellules sont transfectées avec les constructions (BSL/Glu)<sub>344</sub> et (BSL/Asp)<sub>422</sub> (symboles vides, lignes continues) et au niveau du bruit de fond lorsque les cellules sont transfectées avec les constructions (BSL/Ala)<sub>344</sub> ou <sub>422</sub> (symboles vides, lignes discontinues). Pour les cellules transfectées avec les constructions (8OG/Ala)<sub>344</sub> ou <sub>422</sub> (symboles pleins), nous observons une activité luciférase intermédiaire de luciférase qui le reflète d'une production d'enzyme active par MT induite par la 8OG. Ce qui est tout à fait notable, c'est que nous observons cette activité intermédiaire jusqu'à 7 jours après transfection. Sachant que la luciférase à un temps de demi-vie de l'ordre de 4 heures dans des cellules en culture [30], cela signifie que la MT peut induire la production de protéines erronées sur une longue durée. Cette observation pourrait avoir des implications importantes concernant le rôle de la MT, induite par des lésions de l'ADN causée par des polluants de l'environnement, dans des maladies affectant des cellules ne se divisant pas et caractérisées par la production de protéines erronées comme c'est le cas, par exemple, pour les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

### 4) Spectre de MT induite par la 8OG

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la MT, nous avons extrait les ARN de cellules MRC5 transfectées par la construction (8OG/Stop)<sub>445</sub>. La région du codon 445 des ARN messagers de la luciférase a ensuite été rétro-transcrite puis insérée dans un vecteur de clonage. Les différents clones obtenus ont alors été séquencés pour déterminer la nature des nucléotides incorporés en face d'une 8OG au cours de la transcription. Les résultats nous montrent que c'est essentiellement une adénine (dans 88% des cas) qui est incorporée en face d'une 8OG par l'ARN polymérase II humaine (Figure 6D).

### Publications obtenues :

Le projet MUTATRANSCRI financé par le programme santé-environnement et santé-travail a débouché sur la publication de trois articles :

D. Brégeon, P-A. Peignon and A. Sarsin (2009). Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells, *PLoS Genet.*, 5 : e1000577.

Article cité dans : In Brief, *Nat. Rev. Genet.*, 10 : 594.

M. Pastoriza-Gallego, J. Armier, and A. Sarasin (2007). Transcription through 8-oxoguanine in DNA repair-proficient and Csb(-)/Ogg1(-) DNA repair-deficient mouse embryonic fibroblasts is dependent upon promoter strength and sequence context, *Mutagenesis*, **22** : 343-351.

D. Brégeon and A. Sarasin (2005). Hypothetical role of RNA damage avoidance in preventing human diseases, *Mutat. Res.*, **577** : 293-302.

### Faits marquants, retombées prévisibles et perspectives de valorisation :

Grâce à l'utilisation de la luciférase comme gène rapporteur, nous avons pu mettre en évidence que des protéines erronées pouvaient être produites par MT. Ces résultats montrent donc que la MT peut avoir des conséquences non négligeables sur la physiologie d'une cellule et permettent donc d'émettre de nombreuses hypothèses qui seront testées par nous et d'autres groupes. Une des questions que nous voudrions résoudre est de savoir si l'accumulation de protéines erronées dans une cellule aux cours du vieillissement est une résultante directe de la MT. De même, il existe plusieurs maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation de protéines erronées au niveau de cellules spécifiques qui sont à l'origine des troubles observés chez les patients atteints de ces maladies. Un rôle de la MT dans l'apparition de ces protéines erronées n'est pas à exclure. Nos travaux pionniers sur le mécanisme de la MT permettent d'ouvrir de nombreuses perspectives dans des domaines de recherche aussi divers que la biologie moléculaire, la biologie du vieillissement et la neurobiologie. Cela permettra ainsi de mieux comprendre les effets des polluants de l'environnement sur le vieillissement et les maladies neurodégénératives et peut-être d'aider à mieux les maîtriser.

### Références :

- [1] Wesseling, C., et al., *Paraquat in developing countries*. Int. J. Occup. Environ. Health, 2001. **7**(4): p. 275-86.
- [2] Holliday, R., *Understanding ageing*. 1995, Cambridge: Cambridge University Press.
- [3] Friedberg, E.C., et al., *DNA repair and mutagenesis*. Second ed. 2006, Washington, DC: ASM Press.
- [4] Bregeon, D., et al., *Inefficient mismatch repair: genetic defects and down regulation*. Journal of Genetics, 1999. **78**(1): p. 21-28.
- [5] Jorge, S.A., et al., *Mutagenic fingerprint of ozone in human cells*. DNA Repair (Amst), 2002. **1**(5): p. 369-78.
- [6] Veaute, X. and A. Sarasin, *Differential replication of a single N-2-acetylaminofluorene lesion in the leading or lagging strand DNA in a human cell extract*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(24): p. 15351-7.
- [7] Pillaire, M.J., et al., *Mutagenesis in monkey cells of a vector containing a single d(GPG) cis-diamminedichloroplatinum(II) adduct placed on codon 13 of the human H-ras proto-oncogene*. Nucleic Acids Res., 1994. **22**(13): p. 2519-24.
- [8] Parker, J., *Errors and alternatives in reading the universal genetic code*. Microbiol Rev., 1989. **53**(3): p. 273-98.
- [9] Ibba, M. and D. Soll, *Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code*. Genes Dev., 2004. **18**(7): p. 731-8.
- [10] Bregeon, D., et al., *Translational misreading: a tRNA modification counteracts a +2 ribosomal frameshift*. Genes Dev, 2001. **15**(17): p. 2295-306.
- [11] Farabaugh, P.J., *Translational frameshifting: implications for the mechanism of translational frame maintenance*. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., 2000. **64**: p. 131-70.
- [12] Hayakawa, H., et al., *Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells*. Biochemistry, 1999. **38**(12): p. 3610-4.
- [13] Rhee, Y., M.R. Valentine, and J. Termini, *Oxidative base damage in RNA detected by reverse transcriptase*. Nucleic Acids Res., 1995. **23**(16): p. 3275-82.
- [14] Shen, Z., W. Wu, and S.L. Hazen, *Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical*. Biochemistry, 2000. **39**(18): p. 5474-82.
- [15] Taddei, F., et al., *Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage*. Science, 1997. **278**(5335): p. 128-30.
- [16] Blank, A., et al., *An RNA polymerase mutant with reduced accuracy of chain elongation*. Biochemistry, 1986. **25**(20): p. 5920-8.
- [17] Shaw, R.J., N.D. Bonawitz, and D. Reines, *Use of an in vivo reporter assay to test for transcriptional and translational fidelity in yeast*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(27): p. 24420-6.
- [18] van Leeuwen, F.W., J.P. Burbach, and E.M. Hol, *Mutations in RNA: a first example of molecular misreading in Alzheimer's disease*. Trends Neurosci., 1998. **21**(8): p. 331-5.
- [19] van Leeuwen, F.W., et al., *Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients*. Science, 1998. **279**(5348): p. 242-7.
- [20] Vogel, G., *Possible new cause of Alzheimer's disease found*. Science, 1998. **279**(5348): p. 174.
- [21] Tornaletti, S. and P.C. Hanawalt, *Effect of DNA lesions on transcription elongation*. Biochimie, 1999. **81**(1-2): p. 139-46.
- [22] Doetsch, P.W., *Translesion synthesis by RNA polymerases: occurrence and biological implications for transcriptional mutagenesis*. Mutat Res, 2002. **510**(1-2): p. 131-40.
- [23] Bregeon, D., et al., *Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in Escherichia coli*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 959-70.
- [24] Shibutani, S., M. Takeshita, and A.P. Grollman, *Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG*. Nature, 1991. **349**(6308): p. 431-4.
- [25] Bregeon, D. and P.W. Doetsch, *Reliable method for generating double-stranded DNA vectors containing site-specific base modifications*. Biotechniques, 2004. **37**(5): p. 760-2, 764, 766.
- [26] Asagoshi, K., et al., *Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4956-64.
- [27] Larson, E.D., K. Iams, and J.T. Drummond, *Strand-specific processing of 8-oxoguanine by the human mismatch repair pathway: inefficient removal of 8-oxoguanine paired with adenine or cytosine*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(11): p. 1199-210.
- [28] Le Page, F., et al., *BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells*. Cancer Res., 2000. **60**(19): p. 5548-52.
- [29] Pastoriza-Gallego, M., J. Armier, and A. Sarasin, *Transcription through 8-oxoguanine in DNA repair-proficient and Csb(-)/Ogg1(-) DNA repair-deficient mouse embryonic fibroblasts is dependent upon promoter strength and sequence context*. Mutagenesis, 2007. **22**(5): p. 343-51.
- [30] Baggett, B., et al., *Thermostability of firefly luciferases affects efficiency of detection by in vivo bioluminescence*. Mol Imaging, 2004. **3**(4): p. 324-32.