



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 355**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06778613 .7**

96 Fecha de presentación : **19.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1899485**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Procedimiento de inmovilización del ADN superenrollado y utilización para analizar la reparación del ADN.**

30 Prioridad: **20.06.2005 FR 05 06213**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2010

73 Titular/es: **COMMISSARIAT A L'ÉNERGIE
ATOMIQUE ET AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES
Bâtiment "Le Ponant D" - 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Millau, Jean-François y
Sauvaigo, Sylvie**

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofia**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de inmovilización del ADN superenrollado y utilización para analizar la reparación del ADN.

5 La invención se refiere a un procedimiento de inmovilización del ADN superenrollado y a la utilización del ADN superenrollado inmovilizado sobre un soporte, como sustrato para analizar las reacciones enzimáticas de reparación del ADN.

10 Los biochips se han convertido en herramientas de análisis indispensables para la investigación biomédica y el diagnóstico clínico. Estas herramientas poderosas permiten analizar simultáneamente varias decenas a varios cientos de miles de muestras, usando sondas de ADN (oligonucleótidos, ADNc, productos de amplificación por PCR) o una proteína (anticuerpos, péptidos), inmovilizados sobre un soporte.

15 Los biochips se preparan usando un soporte (vidrio, polipropileno, poliestireno, silicona, metal, nitrocelulosa o nylon), eventualmente modificado con una película porosa [vidrio cubierto con nylon (Atlas arrays™; CLONTECH); silicona cubierta con un hidrogel (Nanochip™; NANOGEN), vidrio cubierto con un gel de polímero de acrilamida HydroGel™ (PERKIN-ELMER) o de metacrilato (Solicitud de Estados Unidos 2005/0042363)].

20 Para inmovilizar la sonda de ADN o una proteína sobre el soporte, se han utilizado dos tipos de procedimientos.

**Deposito de sondas previamente sintetizadas e inmovilización por acoplamiento covalente o no covalente*

25 La sonda (oligonucleótido (de 10 a 25 bases), péptido, ADNc o fragmento de amplificación por PCR (como máximo de 500 pb a 0,2 kb), proteína (anticuerpo)) se deposita generalmente sobre el soporte usando un distribuidor automático (Lemmo *et al.*, Current Opinion in Biotechnology, 1998, 9:615-617). La sonda que está cargada también puede depositarse en la superficie de un soporte basado en microelectrodos cubierto con una capa permeable (gel de agarosa) y transportarse al interior del gel, por electroforesis (Heller *et al.*, Electrophoresis, 2000, 21:157-164).

30 Además, en el caso particular de la técnica de hibridación de colonias sobre filtros (o colony-hybridization; Hana-han y Meselson, Gene, 1983, 10:63-67), las colonias bacterianas depositadas sobre un soporte se transfieren sobre un filtro de nylon o de nitrocelulosa y después se produce la lisis para liberar el ADN (plásmido o cósmido) sobre el filtro.

35 A continuación la sonda se inmoviliza sobre el soporte por medio de enlaces covalentes o no covalentes (hidrófobos, electroestáticos) o una combinación de ambos.

40 Los enlaces covalentes se forman generalmente entre los grupos funcionales reactivos de un soporte activado y los de una sonda modificada en uno de sus extremos (grupo fosfato o ácido carboxílico para la sonda y amina para el soporte, y de manera reciproca; grupo amino para la sonda e isotiocianato, aldehído o epoxi, para el soporte; Zammatero *et al.*, Analytical Biochemistry, 2000, 208:143-150).

45 Cuando el soporte se cubre con una película de poli(acrilamida), puede activarse por sustitución de grupos hidracida por tratamiento de hidracina. Las sondas modificadas en 3' por un grupo 3-metil-uridina se oxidan en presencia de peryodato para formar un aldehído reactivo, después éstas se depositan sobre el soporte. La reacción de los grupos aldehído de la sonda con los grupos hidracina del gel forma enlaces covalentes que inmovilizan el ADN en el gel de acrilamida (Khrapo *et al.*, DNA sequence, 1991, 6:375-388; Yershov *et al.*, P. N. A. S., 1996, 93: 4913-4918). También es posible inmovilizar fragmentos de ADN aminados, de longitud inferior a 500 nucleótidos, durante la polimerización del gel (Rubina *et al.*, Anal. Biochem., 2004, 325:92-106).

50 Los soportes cubiertos con hidrogel permiten aumentar particularmente la capacidad de inmovilización del soporte y mejorar el medio de la sonda, la sensibilidad y el umbral de detección.

55 Además, la radiación con UV o con agentes acopladores homo o bi-funcionales también pueden formar enlaces covalentes entre los grupos amina de un soporte cubierto con poli-L-lisina y, o los restos de timidina del ADN (UV), o los grupos amina de una sonda modificada (glutaraldehído).

Los enlaces no covalentes comprenden principalmente interacciones electroestáticas entre el ADN y un soporte cubierto con poli-L-lisina.

**Síntesis e inmovilización de las sondas in situ*

60 Este método que se utiliza únicamente para preparar chips de oligonucleótidos (Southern *et al.*, Genomics, 1992, 4, 1008-1017) o de péptidos, permite realizar simultáneamente el acoplamiento covalente y la síntesis de oligonucleótidos sobre una zona que está delimitada, particularmente usando una máscara (mecánica, fotolitográfica).

65 Esos procedimientos permiten obtener biochips adaptados a numerosas aplicaciones de análisis genético (secuenciación, cartografía, polimorfismo, mutaciones, número de copias de genes, perfil de expresión) y analizar interacciones proteína/ligando (inmuno ensayos; interacciones entre proteínas y moléculas de ADN; ARN o pequeñas moléculas).

Sin embargo, determinados análisis como los de la actividad de reparación del ADN, aplican una sonda de ADN particular, es decir un ADN circular bicatenario superenrollado (plásmido superenrollado), cuya estructura debe conservarse imperativamente durante la inmovilización del ADN sobre el soporte, y conservarse una vez se ha inmovilizado el ADN sobre el soporte. De hecho, el sustrato utilizado para analizar la reparación del ADN es un plásmido superenrollado que presenta lesiones de bases púricas o pirimidínicas (lesiones oxidativas, fotoproductos, aductos químicos), de azúcares, de la estructura de la doble hélice (puentes inter- o intracatenarios, agentes intercalados) y/o roturas, inducidas por tratamiento del plásmido por diferentes agentes genotóxicos, después de la purificación del plásmido superenrollado sobre un gradiente de sacarosa o de cesio. La purificación del plásmido superenrollado permite eliminar los plásmidos que comprenden roturas (estructura relajada). De hecho, a diferencia de otros tipos de lesiones anteriormente citadas que conservan la estructura superenrollada del ADN, las roturas destruyen la estructura superenrollada del plásmido y forman una estructura relajada. El plásmido superenrollado, no tratado (plásmido sin lesión) sirve de control. La muestra biológica a analizar se incuba en presencia de un plásmido superenrollado que comprende lesiones (plásmido lesionado) y de un nucleósido trifosfato marcado. La actividad de reparación del ADN se cuantifica después midiendo la cantidad del marcador incorporado en el plásmido lesionado, por comparación con el plásmido control.

Los sistemas de reparación contenidos en las muestras a analizar reparan las lesiones no dirigidas del ADN y particularmente las roturas (mono- o bicatenarias) aparecidas durante la inmovilización del plásmido sobre un soporte y posteriormente durante la conservación del plásmido inmovilizado sobre un soporte. De esta manera la presencia de roturas, además de las bases modificadas, produce la incorporación de marcadores parásitos que se cuantifican y enmascaran la respuesta de reparación específica de las bases. Por otro lado, las roturas inducen una relajación del plásmido y permiten de esta manera un acceso más fácil a las nucleasas del medio biológico, produciendo un aumento de la actividad de reparación del plásmido. Por último, las estructuras relajadas favorecen la puesta en marcha de la reacción de polimerización no deseada. La reparación de lesiones no dirigidas del ADN y particularmente las roturas pueden enmascarar o interferir de esta manera con la reparación de lesiones específicas. La señal específica de las lesiones estudiadas puede por tanto perderse en el ruido de fondo generado por las señales no específicas, dificultando el análisis de la reparación del ADN, es decir imposible.

La mayoría de los procedimientos de preparación de biochips no permiten inmovilizar ADN de gran tamaño que presente una estructura particular como los plásmidos (ADN circular superenrollado) conservando su integridad.

De hecho, la inmovilización del ADN superenrollado por acoplamiento no covalente sobre las laminas cubiertas con poli-L-lisina tal como describe la Solicitud de Patente FR 02 16435, no permite conservar la estructura del ADN de manera estable y los soportes que comprenden el plásmido inmovilizado deben utilizarse inmediatamente después de la inmovilización del ADN, lo que limita su utilización industrial. Las interacciones entre el ADN cuyos grupos fosfato internucleosídicos están cargados negativamente, y los grupos catiónicos de la poli-L-lisina, producen más o menos rápidamente una inestabilidad de la estructura superenrollada del plásmido conduciendo a la aparición de roturas en el ADN y al cebamiento de reacciones de reparación no deseadas. En consecuencia, se observa un aumento de la tasa de reparación del plásmido no modificado que sirve de control, algunas horas después del depósito sobre las laminas de poli-L-lisina, con respecto a una reacción efectuada inmediatamente después del depósito. Esta tasa de reparación detectada sobre el plásmido de control aumenta proporcionalmente con respecto al tiempo de conservación de las láminas. El mismo fenómeno se produce sobre los plásmidos que incluyen lesiones del ADN y enmascaran la respuesta específica esperada. Del mismo modo, las láminas deben utilizarse muy rápidamente después del depósito de los plásmidos, lo que presenta un importante inconveniente para una utilización industrial.

Por otro lado, la conservación de las láminas de poli-L-lisina sobre las que se inmovilizan los plásmidos es muy dependiente del medio higrométrico durante el depósito de los plásmidos y el almacenaje de las láminas. Ahora bien, el control de este parámetro es delicado de efectuar de manera precisa, lo que conduce a tiempos de conservación aleatorios de las láminas. El carácter aleatorio de la conservación limita más la utilización de esta técnica. Además, incluso si el depósito del plásmido puede realizarse eventualmente en atmósfera húmeda, esta alternativa no es satisfactoria ya que la fijación del plásmido sobre la lámina de poli-L-lisina no es tan buena y las señales de reparación obtenidas son débiles.

Otra desventaja de este método está asociada al volumen de los depósitos de las soluciones del plásmido sobre la lámina. Este es del orden de unos cientos de picolitros; sin embargo, dado que la velocidad de evaporación del agua contenida en los depósitos depende de factores tales como la tasa de humedad ambiental, la temperatura ambiente y los adyuvantes eventualmente presentes en la solución del depósito, existe siempre un riesgo de que una evaporación rápida del agua produzca una concentración de la muestra en la circunferencia de la gota y por tanto una falta de homogeneidad del depósito. La falta de homogeneidad del depósito tiene como consecuencia dificultades durante la cuantificación de la señal de reparación al nivel del depósito, mientras que es necesaria una cuantificación precisa para determinar las capacidades de reparación de un medio celular proporcionado y para comparar diferentes medios entre sí. Sin embargo, Rickman *et al.* (Nucleic Acids Res., 2003, 31, e109) han demostrado que algunos adyuvantes ralentizan la evaporación. Por lo tanto la utilización de dichos compuestos produce una heterogeneidad de la morfología o un aumento del tamaño de los depósitos. Determinados compuestos parecen proporcionar resultados interesantes en términos de calidad del depósito pero no están adaptados a los estudios de reparación por lo que son susceptibles de producir una desnaturalización del plásmido como es el caso de la formamida (Rickman *et al.*, 2003, citado anteriormente).

El acoplamiento covalente del ADN sobre el soporte no es posible en la medida en que genera tensiones que conducen a la aparición de roturas sobre el plásmido. Además, implica pasos de tratamiento químico y/o físico (calor, radiación por UV) que pueden introducir lesiones en el ADN. Por otro lado, los métodos de síntesis *in situ* se utilizan únicamente para preparar chips de oligonucleótidos.

En consecuencia, existe una verdadera necesidad de disponer de procedimientos alternativos para inmovilizar el ADN superenrollado sobre un soporte, que respondan mejor a las necesidades en el ámbito cumpliendo con la integridad de la estructura superenrollada del ADN y que permitan conservar esta estructura con vistas a una utilización posterior del ADN, particularmente como sustrato en las reacciones de reparación enzimática del ADN.

Los inventores han demostrado que el ADN superenrollado puede inmovilizarse de manera estable en una película de polímero poroso, por difusión pasiva del ADN no activado por grupos funcionales reactivos (no funcionalizados), en una película de polímero, igualmente inactivada. En estas condiciones, el ADN inmovilizado conserva su estructura superenrollada durante varios meses, incluso aunque comprenda lesiones introducidas por la exposición a agentes genotóxicos. El ADN se inmoviliza ventajosamente sobre un soporte miniaturizado cubierto por una película de polímero poroso, permitiendo preparar grandes cantidades de muestras de ADN inmovilizado y su almacenaje en vistas a una utilización posterior particularmente como sustrato en las reacciones de reparación del ADN.

La presente invención en consecuencia tiene por objeto, un procedimiento de inmovilización de un ADN superenrollado, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- el depósito de una muestra de ADN superenrollado en la superficie de una película de polímero poroso, y
- la inmovilización del ADN superenrollado por difusión pasiva en dicha película de polímero poroso.

Definiciones

- *ADN superenrollado*: una molécula de ADN superenrollada circular bicatenaria, particularmente un plásmido.
- *película de polímero poroso*: una capa delgada de una matriz tridimensional que comprende cadenas de uno o varios polímeros y un disolvente, incluyendo la matriz intersticios (poros) que pueden contener macromoléculas como ADN. El espesor de la película de polímero es lo suficientemente débil para limitar el ruido de fondo. Preferentemente, el espesor de la película es inferior a 0,1 mm.
- *inmovilización*: la penetración del ADN por difusión pasiva dentro de la matriz tridimensional constituida por cadenas de uno o varios polímeros y un disolvente.

En estas condiciones el ADN superenrollado, diluido en un tampón clásico conocido por expertos en la técnica, particularmente PBS, pH 7,4, penetra en la película de polímero poroso sin corriente eléctrica (sin el paso de electroforesis) y se inmoviliza en los intersticios de la matriz de polímero, sin ningún tratamiento físico o químico posterior de la película de polímero o del ADN. El ADN superenrollado inmovilizado de esta manera se mantiene de manera estable en la película de polímero, durante varios meses.

Entre los polímeros porosos preferidos, se pueden citar los polímeros acuosos extensibles (hidrogel o gel acuoso: polisacáridos y particularmente agarosa) y los polímeros en los que se establecen enlaces químicos covalentes entre las cadenas de polímeros, para formar una malla (poliacrilamida).

La cantidad de ADN inmovilizado en el polímero (capacidad de inmovilización) depende de la naturaleza del polímero y de su concentración y puede aumentarse añadiendo un absorbente de ADN en el hidrogel.

De acuerdo con un primer modo de realización ventajosa de dicho procedimiento, la película de polímero es un hidrogel de poliacrilamida. Preferentemente, comprende del 5 a 15% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida 50:1 a 5:1, de manera preferida del 5 al 15% de una mezcla 19:1.

De acuerdo con un segundo modo de realización ventajoso de dicho procedimiento, la película de polímero comprende del 0,1% al 5% de un adsorbente de ADN tal como gelatina, colágeno o un polisacárido como agarosa, dextrano o un polímero de glucosa o de sacarosa, o bien una mezcla de dichos adsorbentes. Preferentemente, dicho adsorbente es agarosa, de manera preferida una agarosa de bajo punto de fusión (*low-melting agarose*) cuya temperatura de fusión es ventajosamente inferior a 40°C.

De acuerdo con una disposición ventajosa de los modos de realización anteriores, la película de polímero es un hidrogel de poliacrilamida que comprende el 10% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida 19:1 y el 0,8% de agarosa de bajo punto de fusión.

De acuerdo con un tercer modo de realización ventajosa de dicho procedimiento, dicho ADN superenrollado es un plásmido.

De acuerdo con un cuarto modo de realización ventajosa de dicho procedimiento, dicho ADN superenrollado comprende lesiones inducidas por un agente genotóxico. Preferentemente, dichas lesiones se han inducido por tratamiento de un plásmido aislado o de células que comprenden dicho plásmido, por un agente físico o químico genotóxico. Entre estas lesiones, pueden citarse particularmente lesiones de las bases púricas o pirimidínicas (lesiones oxidativas, fotoproductos, aductos químicos), de los azúcares, de la estructura de la doble hélice (puentes inter o intracatenarios, agentes intercalados) y las roturas.

De acuerdo con una quinta realización ventajosa de dicho procedimiento, la película de polímero poroso se deposita sobre un soporte apropiado, conocido por el experto en la materia, tal como un soporte de vidrio, de metal, de silicona o de plástico. Preferentemente, se trata de un soporte miniaturizado de tipo microchip. De manera preferida, se trata de una lámina de vidrio.

La presente invención también tiene por objeto un soporte cubierto por una película de polímero poroso que comprende un ADN superenrollado inmovilizado, que puede obtenerse por el procedimiento de inmovilización tal como se define anteriormente.

Ventajosamente, se trata de una lámina de vidrio cubierta por un hidrogel de poliacrilamida que comprende un ADN superenrollado lesionado.

La polimerización y el depósito de la película de polímero en la superficie del soporte se realizan de acuerdo con las técnicas clásicas conocidas por expertos en la materia. Para realizar la invención se puede utilizar cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la materia. Un polímero poroso tal como un hidrogel de poliacrilamida se prepara a partir de una solución acuosa que contiene acrilamida y medios de polimerización. Por ejemplo: (i) del 5 al 15% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida (50:1 a 5:1 preferentemente 19:1), (ii) del 0 al 5% de adsorbente o (adsorbentes) de ADN tales como los definidos anteriormente, preferentemente un polisacárido y particularmente agarosa de bajo punto de fusión, y (iii) una fuente de radicales, por ejemplo del 0,001 al 0,1% de persulfato de amonio junto con del 0,001 a 0,5% de TEMED (N, N, N', N'-tetrametilendiamina).

También pueden utilizarse composiciones de polímeros listas para el uso, particularmente hidrogeles tales como HydroGel™ (PERKIN-ELMER; www.perkinelmer.com/proteomics).

El soporte es por ejemplo una lámina de vidrio previamente recubierta con aminosilano. La solución acuosa de hidrogel se deposita después y se coloca sobre el soporte, usando un medio adaptado tal como una lámina de vidrio, para formar una fina capa homogénea. El hidrogel se polimeriza, eventualmente por calor o exposición con rayos ultra violeta, en función del medio de polimerización empleado. El soporte cubierto por una película de polímero obtenido de esta manera puede eventualmente secarse, presentemente por calor.

El ADN, particularmente un plásmido, se prepara de acuerdo con las técnicas clásicas de biología molecular, utilizando los protocolos convencionales tales como los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

El tratamiento del ADN con agente genotóxicos efectuado de acuerdo con las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia, siguiendo los protocolos convencionales como se describe en la Solicitud de Patente FR 0216435.

La fracción de ADN superenrollado se aísla por centrifugación sobre gradiente de sacarosa y/o gradiente de cloruro de cesio, de acuerdo con los protocolos convencionales tales como los descritos en la Solicitud de Patente FR 0216435.

El ADN superenrollado se diluye a una concentración comprendida preferentemente entre 5 y 100 µg/ml, y ventajosamente de 20 a 40 µg/ml, en un tampón convencional tal como PBS, pH 7,4.

El ADN superenrollado se deposita después sobre las zonas del soporte cubiertas de hidrogel, por ejemplo usando un robot tal como un robot piezoeléctrico.

La presente invención también tiene por objeto la utilización de una composición acuosa que comprende el 10% de una mezcla de acrilamina: metileno bis acrilamida 19:1 y el 0,8% de agarosa de bajo punto de fusión para inmovilizar el ADN superenrollado.

La presente invención también tiene por objeto la utilización de un ADN superenrollado inmovilizado en una película de polímero poroso tal como se define anteriormente, como sustrato para analizar la reparación del ADN en un medio biológico.

La reparación del ADN puede analizarse particularmente de acuerdo con el procedimiento de evaluación cuantitativa de las capacidades globales y específicas de la reparación del ADN descrito en la Solicitud FR 0216435.

El análisis de reparación del ADN en un medio biológico y particularmente la evaluación cuantitativa de las capacidades globales y específicas de la reparación del ADN en un medio biológico, permiten particularmente establecer el perfil de reparación de un medio proporcionado, diagnosticar una enfermedad asociada a la reparación del ADN,

ES 2 345 355 T3

evaluar la influencia de un tratamiento físico o químico sobre las capacidades de reacción de un medio biológico proporcionado y explorar sustancias que pueden modular el sistema de reparación de un medio biológico.

La utilización de hidrogel en lugar de la poli-L-lisina, para inmovilizar el ADN superenrollado (ADN que comprende lesiones (plásmido superenrollado lesionado) y el ADN de control (plásmido superenrollado)), presenta las siguientes ventajas, particularmente para medir la actividad de reparación del ADN en un medio biológico:

- *Estabilidad del plásmido inmovilizado en el hidrogel:*

El plásmido inmovilizado sobre un soporte cubierto con hidrogel, por ejemplo un polímero de acrilamida, conserva su estructura superenrollada a pesar de las lesiones del ADN, y esto durante varias semanas, en un medio no controlado del punto de vista de la higrometría. De esta manera pueden prepararse simultáneamente grandes cantidades de láminas que comprenden el plásmido inmovilizado y almacenarse fácilmente hasta su utilización después de varias semanas.

- *Sensibilidad de detección de la reparación del ADN:*

El intervalo de valores de las señales de reparación es muy amplio, lo que permite un análisis más preciso de las muestras cuya actividad de reparación se analiza y particularmente una mejor discriminación de diferencias entre las muestras analizadas.

Además de las disposiciones anteriores, la invención también comprende otras disposiciones que surgirán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos de utilización del ADN superenrollado lesionado, inmovilizado en un hidrogel, como sustrato de reacción de reparación enzimática del ADN, así como a los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 ilustra la estabilidad a + 4°C, durante un periodo de 85 días, de un ADN superenrollado lesionado, inmovilizado sobre láminas de vidrio cubiertas con un hidrogel de poliacrilamida. El ADN plasmídico superenrollado que presenta lesiones inducidas por diferentes agentes físicos o químicos se ha preparado como se describe en el ejemplo 1, después se ha diluido usando un plásmido de control (no tratado) para conservar la concentración total del plásmido en el tampón de PBS a 40 µg/ml: únicamente plásmido lesionado (4/4), 30 µg/ml de plásmido lesionado y 10 µg/ml de plásmido de control (3/4); 20 µg/ml de plásmido lesionado y 20 µg/ml de plásmido de control (1/2). El ADN plasmídico no tratado se ha utilizado como control. Las muestras de ADN se han depositado sobre láminas de vidrio cubiertas con un hidrogel de poliacrilamida después las láminas se han conservado a + 4°C durante 1, 3, 71 y 85 días (D₁, D₃, D₇₁, D₈₅) antes de evaluar la reparación del ADN, midiendo la emisión de fluorescencia. Los valores de fluorescencia se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). **T:** control. **UVC:** radiación con UVC (0,3 J/cm²). **endo:** tratamiento con endoperoxido de naftaleno. **DDE:** tratamiento en trans, trans-2,4-decadienol. **CIS:** tratamiento con cisplatino. **PSO:** tratamiento con psoraleno. **ABA:** inducción de sitios abásicos. **U:** introducción de uracilo.

La figura 2 ilustra la estabilidad a + 4°C de un ADN superenrollado lesionado, inmovilizado sobre láminas de vidrio cubiertas de poli-L-lisina. El ADN plasmídico superenrollado que presenta lesiones inducidas por diferentes agentes físicos o químicos se ha preparado como se describe en el ejemplo 1, después se ha diluido usando plásmido de control (no tratado) para conservar la concentración total del plásmido en el tampón PBS a 40 µg/ml: únicamente plásmido lesionado (4/4), 30 µg/ml de plásmido lesionado y 10 µg/ml de plásmido de control (3/4); 20 µg/ml de plásmido lesionado y 20 µg/ml de plásmido de control (1/2). El ADN plasmídico no tratado se ha utilizado como control. Las muestras de ADN se han depositado sobre láminas de vidrio cubiertas con poli-L-lisina, a continuación se ha evaluado la reparación del ADN inmediatamente después del depósito midiendo la emisión de fluorescencia (D₀) en el que las láminas se han conservado a + 4°C durante un día (D₁) antes de evaluar la reparación del ADN. **T:** control. **UVC:** radiación con UVC (0,3 J/cm²). **endo:** tratamiento con endoperoxido de naftaleno. **DDE:** tratamiento en trans, trans-2,4-decadienol. **CIS:** tratamiento con cisplatino. **PSO:** tratamiento con psoraleno. **ABA:** inducción de sitios abásicos. **U:** introducción de uracilo.

Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración del objeto de la invención, y no constituyen de ninguna manera una limitación.

Ejemplo

Utilización de un ADN inmovilizado en un hidrogel como sustrato para analizar la reparación del ADN

El principio del ensayo de la reparación del ADN que se ha utilizado para comparar la reparación del ADN inmovilizado sobre un soporte cubierto, o con poli-L-lisina, o con hidrogel, se describe en la Solicitud de Patente FR 0216435.

1) Material y métodos

a) Preparación de ADN superenrollado que comprende lesiones

El plásmido (pBluescript II, STRATAGENE) se produce por transformación de la cepa de *E. coli* XL 1 blue MRF' (STRATAGENE) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor. El plásmido se purifica utilizando el

ES 2 345 355 T3

kit plasmídico midi kit™ (QIAGEN) y se diluye en un tampón PBS (fosfato 10 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2 mM).

El plásmido se trata con distintos agentes físicos o químicos para introducir lesiones en su interior es decir:

- *radiación con UVC (UVC)*

El plásmido en solución en PBS (25 μ l; 40 μ g/ml) se irradia con una lámpara que emite a 254 nm. La dosis recibida es de 0,3 J/cm² (figuras 1 y 2) o bien de 0,03, 0,06 y 0,12 J/cm² (figura 3).

- *tratamiento con endoperóxido de naftaleno (Endo)*

Se incuban 20 μ l de endoperóxido de naftaleno 50 mM (1,4-endoperoxido de N,N', -di(2,3-dihidroxiopropil)-1,4-naftalenodipropionamida, preparado de acuerdo con el protocolo descrito en J. Biol. Chem., 2000, 275, 40601-40604) con 200 μ l de plásmido a 1 mg/ml en PBS, durante 2 horas a 37°C.

- *tratamiento en trans- trans- 2,4-decadial (DDE)*

Se mezclan 200 μ l de plásmido a 1 mg/ml en PBS con 200 μ l de tampón carbonato/bicarbonato 0,2 M, pH 9,2 y 200 μ l de tetrahidrofurano, en los que se añaden 4 μ l de DDE (5,7 M) y 12 μ l de H₂O₂ (8,8 M). La mezcla se incuba a 50°C durante 16 horas, en la oscuridad. A continuación se elimina el DDE mediante dos extracciones con diclorometano.

- *tratamiento con cisplatino (CIS)*

Se tratan 150 μ l de plásmido a 1 mg/ml en PBS con 1 μ l de una solución de cis-diamina dicloroplatino (II) a 15 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO), durante 2 horas a 37°C.

- *tratamiento con psoraleno (PSO)*

Se mezclan 150 μ l de plásmido a 1 mg/ml en PBS con 20 μ l de una solución de psoraleno amina a 120 μ M, y se irradian a 365 nm a una dosis de 1,48 J/cm².

- *creación de sitios abásicos (ABA)*

Se incuban 100 μ l de plásmido a 1 mg/ml en citrato de sodio a 0,05 M, pH 4,8 que contiene 12 μ l de KCl (2 M), durante 4 horas a 70°C.

- *introducción de uracilo (U)*

El plásmido (pBluescript II, STRATAGENE) se produce por transformación de una cepa de *E. coli* deficiente en la actividad uracil-ADN-glicosilasa (UNG⁻), de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor. El plásmido se purifica utilizando el kit plasmídico midi kit™ (QIAGEN) después sobre gradiente de sacarosa.

A continuación el plásmido tratado se precipita, se purifica sobre gradiente de sacarosa, y se recuperan las fracciones que contienen al menos el 90% del plásmido superenrollado, como se describe en la Solicitud FR 0216435. Las diferentes preparaciones de ADN superenrollado que comprende lesiones, de manera que el plásmido de control no tratado comprenda ADN superenrollado sin lesiones, se diluyen a 40 μ g/ml en PBS.

b) Preparación de los soportes y del depósito del ADN

Las láminas de vidrio cubiertas con poli-L-lisina se obtienen de VWR Internacional.

b1) Preparación de las láminas de vidrio cubiertas con un hidrogel de poliacrilamida

Se colocan láminas de vidrio (76 x 26 mm) sobre una gradilla, después se incuban en una solución que comprende 4 ml de Bind-Silane (3-metacriloxipropil-trimetoxilano) y 220 μ l de ácido acético refrigerado en un volumen total de un litro de agua destilada, durante 1 hora, agitando. A continuación las láminas se aclaran tres veces con agua destilada y una vez con etanol, después se secan en una campana extractora.

El hidrogel de poliacrilamida es una solución acuosa, que también puede prepararse a partir de un tampón de PBS (o un tampón de TBE), que contiene: el 10% de una mezcla de acrilamida y de metileno bis acrilamida 19:1, el 0,8% de agarosa de bajo punto de fusión (low-melting agarose; TEBU-BIO), el 0,06% de persulfato de amonio, el 0,065% de (N, N, N', N'-tetrametilendiamina). 100 μ l de esta solución se depositan uniformemente sobre una lámina de vidrio (76 x 26 mm), preparada como se ha indicado anteriormente, después se colocan de manera fina y homogénea usando una laminilla de vidrio. La lámina cubierta con la laminilla se calienta a 40°C durante 5 minutos, para permitir que el gel se fije. La laminilla de vidrio se retira después, a continuación la lámina que incluye el gel se calienta de nuevo a 40°C, durante 3 minutos, para secar el hidrogel. Las láminas cubiertas con hidrogel de poliacrilamida se conservan a

ES 2 345 355 T3

+ 4°C. Preferentemente, se conservan al menos 24 horas a + 4°C antes de utilizarse.

b2) Depósito de muestras de ADN

La concentración total de plásmido en las muestras es de 40 µg/ml en el tampón de PBS y más precisamente en referencia a las figuras 1 y 2: únicamente plásmido lesionado (4/4); 30 µg/ml de plásmido lesionado y 10 µg/ml de plásmido de control (3/4); 20 µg/ml de plásmido lesionado y 20 µg/ml de plásmido de control (1/2). El ADN plasmídico superenrollado sin lesión se utiliza como control.

Tres gotas de muestra de ADN (volumen total de aproximadamente 500 picolitros) se depositan sobre cada zona de la lámina, usando un robot piezoeléctrico (Scieflexarrayer, SCIENION).

Las láminas recubiertas con poli-L-lisina se utilizan inmediatamente después del depósito (D₀) o se conservan 24 horas a 4°C (D₁) antes de analizar la reparación del ADN (D₁).

Después de la inmovilización pasiva del ADN, a 4°C durante 24 h, las láminas cubiertas con hidrogel se utilizan para analizar la reparación del ADN (D₁) o se conservan a la misma temperatura durante un tiempo variable, antes de analizar la reparación del ADN (D₃, D₇₁, D₈₅).

c) Reacción de reparación y medición de la señal de reparación

Una solución (30 µl) que contiene un lisado celular que puede contener sistemas de reparación del ADN (25 µl; 0,6 mg/ml de proteínas de extractos nucleares de células HeLa; CIL BIOTECH) y diferentes compuestos necesarios para conseguir la reacción de reparación por las proteínas del medio biológico (5 µl de tampón ATG (Hepes 200 mM, KOH pH 7,8, MgCl₂ 356 mM, DTT 2,5 mM, dATP 1,25 pM, dGTP 1,25 pM, TTP 1,25 pM, glicero al 17%, EDTA 10 mM, 250 µg/ml de creatina fosfoquinasa, fosfocreatina 50 mM, ATP 10 mM, dCTP-Cy5 1,25 µM)), se depositan sobre cada zona de la lámina que contiene las diferentes muestras de ADN inmovilizado. Las láminas se incuban durante 3 horas a 30°C. A continuación las láminas se lavan sucesivamente en PBS que contiene Tween 20 al 0,5% (2 lavados de 3 minutos) y en agua destilada (2 lavados de 3 minutos). Después de secar por centrifugación (800 rpm, 3 minutos), se mide la señal fluorescente (Scanner Genepix 4200^a, AXON) y se analiza usando el programa informático Genepix Pro 5.1 (AXON). Las señales se normalizan con respecto a la mediana de las señales de cada zona.

2) Resultados

a) Mejora de la sensibilidad de la evaluación de la reparación del ADN

El ADN inmovilizado sobre una lámina cubierta con hidrogel permite aumentar la sensibilidad de detección de la actividad de reparación del ADN, como lo demuestra la comparación de las medidas de reparación del ADN efectuadas después de la inmovilización pasiva de las muestras del ADN (Figura 1).

De hecho, por comparación con la utilización de poli-L-lisina (señales comprendidas entre 9000 y 1200 unidades arbitrarias para las diferentes lesiones a D₀), la utilización de hidrogel de poliacrilamida permite obtener señales de reparación del ADN comprendidas en un mayor intervalo de valores (señales comprendidas entre 11000 y 20000 unidades arbitrarias para las diferentes lesiones a D₁), y cualquiera que sea el tipo de lesión del ADN cuya reparación se estudia. Esta diferencia podría explicarse por una mejora de la cantidad y/o de la calidad del ADN inmovilizado en el hidrogel y por la eficacia de la reacción de reparación en ese medio.

b) Estabilidad del ADN inmovilizado

El ADN inmovilizado sobre una lámina cubierta con hidrogel es estable durante más de 2 meses, como lo demuestran los resultados de los ensayos de reparación del ADN efectuados a diferentes tiempos después del depósito del ADN sobre el hidrogel (Figura 1). A D₇₁, la actividad de reparación del ADN es comparable a la detectada a D₁, y cualquiera que sea el tipo de lesión cuya reparación se estudia. Además, el ruido de fondo más débil observado a D₁ con el ADN de control refleja una mejor conservación de la estructura del ADN durante la inmovilización del ADN en el hidrogel.

Por comparación, con el ADN inmovilizado sobre una lámina cubierta con poli-L-lisina, se observa un ruido de fondo más elevado a D₀ con el ADN de control, así como un aumento rápido de la señal de reparación del ADN (D₁), a la vez en las muestras de ADN de control y del ADN lesionado lo que indica la aparición de roturas suplementarias en el ADN.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de inmovilización de un ADN superenrollado, **caracterizado** por que comprende los siguientes pasos:

- el depósito de una muestra de ADN superenrollado en la superficie de una película de polímero poroso constituida por una capa delgada de una matriz tridimensional que comprende cadenas de uno o varios polímeros y un disolvente, en el que la matriz incluye intersticios que pueden contener macromoléculas como ADN, y
- la inmovilización del ADN superenrollado por difusión pasiva en dicha película de polímero poroso.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el polímero poroso es un hidrogel de poliacrilamida.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** por que el hidrogel de poliacrilamida comprende del 5 al 15% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida 50:1 a 5:1.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** por que el hidrogel de poliacrilamida comprende del 5 al 15% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida 19:1.

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por que la película de polímero comprende del 0,1% al 5% de adsorbente (o adsorbentes) de ADN.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** por que el adsorbente es un polisacárido.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** por que el adsorbente es agarosa.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado** por que el adsorbente es agarosa de bajo punto de fusión.

9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, **caracterizado** por que el hidrogel de poliacrilamida comprende el 10% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida 19:1 y el 0,8% de agarosa de bajo punto de fusión.

10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** por que dicho ADN superenrollado es un plásmido.

11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** por que dicho ADN superenrollado comprende lesiones inducidas por un agente genotóxico.

12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** por que la película de polímero poroso se deposita sobre un soporte apropiado.

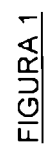
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado** por que dicho soporte es una lámina de vidrio.

14. Soporte cubierto con una película de polímero poroso que comprende un ADN superenrollado inmovilizado, que puede obtenerse por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13.

15. Soporte de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizado** por que se trata de una lámina de vidrio cubierta con un hidrogel de poliacrilamida que comprende un ADN superenrollado lesionado.

16. Utilización de una composición acuosa que comprende el 10% de una mezcla de acrilamida: metileno bis acrilamida 19:1 y el 0,8% de agarosa de bajo punto de fusión para inmovilizar el ADN superenrollado.

17. Utilización de un ADN superenrollado inmovilizado en una película de polímero poroso tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, como sustrato para analizar la reparación del ADN.



ES 2 345 355 T3

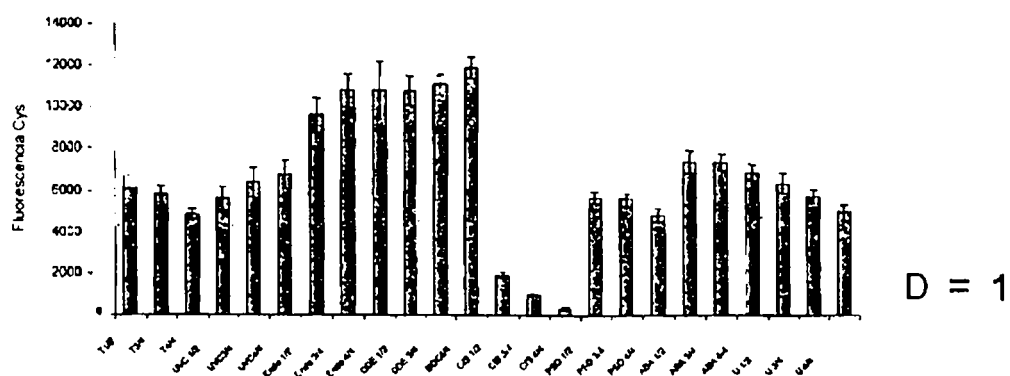
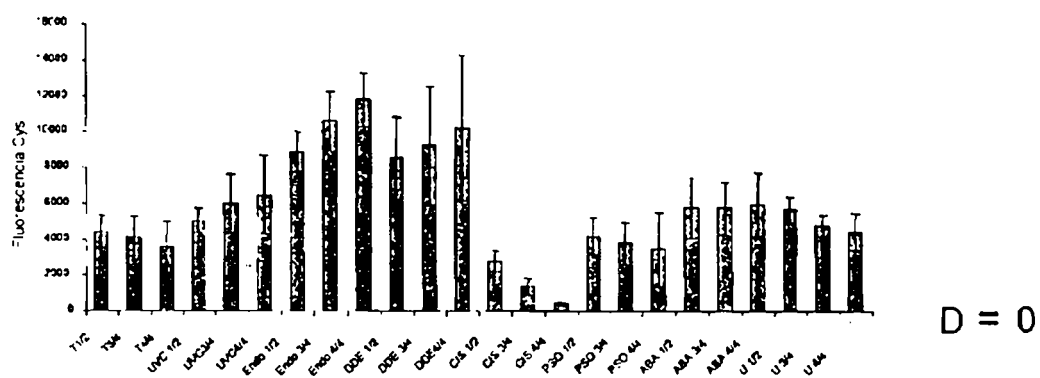


FIGURA 2