(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 601 29 220 T2** 2008.03.13

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 283 911 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 29 220.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR01/01605**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 938 324.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/090408**
(86) PCT-Anmeldetag: **23.05.2001**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.11.2001**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.02.2003**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **04.07.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.03.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
***G01N 33/68*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
**0006624** **24.05.2000** **FR**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**CH, DE, FR, GB, IT, LI**

(73) Patentinhaber:
**Commissariat à l'Energie Atomique, Paris, FR**

(72) Erfinder:
**SAUVAIGO, Sylvie, F-38320 Herbeys, FR**

(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG DER AKTIVITÄT VON PROTEINEN, WELCHE AN DER REPARATUR VON DNA-LÄSIONEN BETEILIGT SIND**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Technisches Gebiet

**[0001]** Die vorliegende Erfindung hat ein Verfahren zur Detektion und Charakterisierung der Aktivität von Proteinen, die an der Reparatur von Läsionen der DNS beteiligt sind, zum Gegenstand.

**[0002]** Sie ist besonders auf die Untersuchung von Enzymen und Proteinfaktoren, die an der DNS-Reparatur beteiligt sind, sowie auf die Untersuchung der Genotoxizität chemischer Substanzen oder physikalischer Mittel in lebenden Systemen anwendbar.

### Stand der Technik

**[0003]** Läsionen oder Schäden können in Zell-DNS durch Aussetzen gegenüber verschiedenen chemischen oder physikalischen Mitteln, insbesondere nach der Bestrahlung (ionisierende und Sonnenstrahlung), nach dem Auslösen durch eine oxidierende Beanspruchung oder nach dem Aussetzen gegenüber bestimmten genotoxischen oder zytotoxischen Mitteln gebildet werden. Beschädigte Nucleoside können sich auch während des Zellalterungsvorgangs auf natürliche Weise in dem Genom anreichern.

**[0004]** Es gibt mehrere Typen Läsionen oder Schäden von Nucleinsäuren, die häufig für das Mittel, das sie ausgelöst hat, kennzeichnend sind. Dieses Schadenstypen schließen Einzel- und Doppelstrangbrüche, abasische Stellen und Modifikationen der Nucleinbasen ein.

**[0005]** Unterschiedliche Reparaturmechanismen sind in Abhängigkeit von der Läsion beteiligt und können sogar im Wettstreit stehen. Es kann zwischen drei Hauptreparaturmechanismen unterschieden werden: der Reparatur falscher Übereinstimmungen, der Reparatur durch Herausschneiden von Nucleotiden (REN) und der Reparatur durch Herausschneiden von Basen (REB). Weiterhin ermöglicht die homologe Rekombination, die ein an der Meiose beteiligter Zellmechanismus ist, die Reparatur von Brüchen doppelsträngiger DNS.

**[0006]** Diese Mechanismen schließen verschiedene Reparaturproteine ein. So sind an dem Reparaturmechanismus durch Herausschneiden von Nucleotiden (REN) wie folgt mehrere Schritte beteiligt:

1) Erkennen des Schadens durch einen Proteinkomplex,
2) Einschneiden des die Läsion enthaltenden Strangs auf jeder Seite derselben,
3) Herausschneiden eines die Läsion enthaltenden Oligonucleotidfragments und
4) Synthese des neuen guten DNS-Strangs mit einer Endligation.

**[0007]** Zahlreiche Proteine und Enzyme sind an diesem Mechanismus beteiligt, der hauptsächlich lichtinduzierte Läsionen und durch chemische Behandlungen verursachte großvolumige Schädigungen repariert.

**[0008]** Bei dem Reparaturmechanismus durch Herausschneiden eines Basenpaars (REB) wird eine Glykosylasen genannte Enzymfamilie verwendet. Diese sind manchmal für das herauszuschneidende Substrat spezifisch, erkennen aber im allgemeinen modifizierte Kategorien. Bestimmte Glykosylasen weisen auch Endonukleaseaktivitäten auf. Diese Enzyme reparieren oxidierte, fragmentierte oder alkylierte Basen. Dieses System schließt auch abasische Stellen, bestimmte Fehlpaarungen und bestimmte Einzelstrangbrüche ein.

**[0009]** Sechs Glykosylasen sind beim Menschen nachgewiesen worden (Wilson III, D. M. und Thompson, L. H., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., 94, Seite 12754-12757 [9]), die hauptsächlich zum Reparieren deaminierter, oxidierter und alkylierter Basen oder zur Korrektur bestimmter Fehlpaarungen nützlich sind. Die Wirkung der Glykosylasen führt zur Bildung einer abasischen Stelle, die durch eine spezifische Endonuklease, die die Phosphodiesterbindung an 5' von der Base aus entfernt schneidet, erkannt wird. Eine Polymerase ersetzt das entfernte Nucleotid und eine Ligase schließt die Nucleotidkette. Es ist anzumerken, daß einige Glykosylasen eine damit verbundene Lyaseaktivität aufweisen, die die Phosphodiesterbindung an 3' der Läsion schneidet und zur Bildung eines 5'-Phosphatendes führt. Es gibt eine Alternative zu diesem REB-Weg, bei dem ein kleines, den Schaden enthaltendes DNS-Fragment entfernt und anschließend ersetzt wird. Dies kann bestimmte Einzelstrang-DNS-Brüche betreffen. Durch identifizierte Gene kodierte spezifische Enzyme sind so mit dem Herausschneiden der definierten Läsionen verbunden.

**[0010]** Zum Ermitteln zellulärer Reparaturaktivitäten bestimmte Verfahren sind kompliziert und schwierig auszuführen. Sie erfordern häufig die Verwendung chemisch modifizierter Plasmide. Das Reparaturvermögen von Zellextrakten wird in vitro durch die Reparatur dieser Modifikationen, die mit dem Einbau markierter Nucleotide

in Zusammenhang steht, während der Resynthese der herausgeschnittenen Stränge gemessen. Das Verfahren wurde zuerst durch Wood et al., Cell, 53, 1988, Seite 97-106 [1], entwickelt. Superhelikale Plasmide werden durch UV-Strahlung des C-Typs, Acetylaminofluoren oder cis-Dichlordiamminplatin modifiziert. Die Plasmide werden anschließend in einem Medium inkubiert, das Zellextrakte, die vier Desoxynucleosidtriphosphate, wovon eines in der α-Stellung durch $^{32}P$ markiert ist, ATP und ein ATP-Regenerationssystem enthält. Läsionen können während der Inkubation durch Nucleotidausschneide- oder Basenausschneidesysteme entfernt werden. Die DNS-Resyntheserate wird nach der Wanderung der DNS auf Agarosegel und nach dem Auszählen der Radioaktivität der untersuchten Bande bestimmt. Die Bedeutung und die Spezifität der Reparatur hängen wie durch Sallès et al., Biochimie, 77, 1995, Seite 796-802 [2], beschrieben mit der Qualität der Extrakte und dem Plasmid, den erzeugten Läsionen und den Reaktionsparametern zusammen. Insbesondere ist eine erste Plasmidherstellung zum Entfernen von Plasmiden notwendig, die Brüche vor der Behandlung oder bakterielle Chromosomenfragmente enthalten, die Polymerisationsstartstellen liefern.

**[0011]** Ein weiterer Nachteil dieser Technik betrifft die erzeugten Läsionen. Die angewendeten Behandlungen lösen keinen einzelnen Defekt aus. Zum Beispiel ist der größte durch UVC-Strahlung erzeugte Schaden Pyrimidindimere des Cyclobutantyps. Es werden aber andere Läsionen wie etwa Photoprodukte, Kettenbrüche, Cytosinhydrate usw. gebildet. Somit kann eine besondere Überwachung der Reparatur jedes Schadens mit Hilfe dieser Substrate nicht leicht bewerkstelligt werden.

**[0012]** Das Dokument FR-A-2 731 711 [3] beschreibt ein Verfahren zum Nachweisen von DNS-Läsionen, das aus dem Fixieren der DNS auf einer festen Phase und anschließend Erzeugen von Läsionen auf dieser DNS mittels eines Läsionen erzeugenden Produkts und Verwenden Reparaturfaktoren und einen Marker enthaltender Zellextrakte besteht. Der Zweck dieses Systems ist, die Messung genotoxischer Wirkungen bestimmter chemischer Substanzen zu erlauben. DNS in Plasmidform wird zuerst auf einer festen Phase (Mikroplattennäpfchen) fixiert und die Plasmide werden anschließend chemisch modifiziert. Die Reparaturreaktionen werden in Gegenwart modifizierter Nucleosidtriphosphate durchgeführt, was einen nicht-radioaktiven Nachweis neusynthetisierter Stränge ermöglicht. Dieses System gestatte es nicht, spezifische Modifikationen auf eine zielgerichtete Weise an dem gewünschten Ort einzubauen. Es handelt sich um ein System zum Nachweisen einer umfassenden Wirkung eines DNS modifizierenden Mittels ohne durch Reparatursysteme erkannte Läsionen zu ermitteln. Weiterhin ist der Zweck dieses Verfahrens nicht das Nachweisen und größenmäßige Bestimmen an der DNS-Reparatur beteiligter Proteine, sondern vielmehr das Feststellen des Vorhandenseins von Läsionen auf der behandelten DNS.

**[0013]** Page et al., Biochemistry, 29, 1990, Seite 1016-1024 [4], und Huang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 1994, Seite 12213-12217 [5], verwenden einen unterschiedlichen Test zum Messen der Fähigkeit zum Herausschneiden eines Schadens durch Zellextrakte verschiedener Herkunft. Spezifische Läsionen werden bei kurzen synthetischen Oligonucleotiden erzeugt oder darin eingebaut. Diese werden anschließend durch Ligasen unter Ergeben längerer Doppelstrangfragmente (150 bis 180 Basenpaare) an einander gebunden. Der Einbau von $^{32}P$ an unterschiedlichen Positionen auf den Fragmenten gestattet das Lokalisieren durch die Reparaturenzyme erzeugter Bruchstellen. Die Analyse wird durch Autoradiographie nach der Elektrophorese auf Acrylamidgel durchgeführt. Dieser Test ist auf Reparaturen des REB- und REN-Typs anwendbar.

**[0014]** Alle vorstehend beschriebenen Verfahren weisen Nachteile auf. In den meisten Fällen sind radioaktive Markierungen und lange Trennungen durch Elektrophorese zum Bestimmen des Herausschneidens von Schäden nötig. Die Verwendung von Plasmiden ist schwierig auszuführen, da Vorkehrungen zum Garantieren ihrer Reinheit und Minimieren des Hintergrundrauschens notwendig sind. Wie bereits angeführt ist es weiterhin unmöglich, einen einzigen Schadenstyp durch eine Beanspruchung auszulösen und bei der DNS liegen auf diese Weise mehrere Läsionen gleichzeitig vor.

**[0015]** Wie durch Romieu et al., J. Org. Chem., 63, 1998, Seite 5245-5249 [6], und D'Ham et al., Biochemistry, 38, 1999, Seite 3335-3344 [7], beschrieben sind auch Verfahren zum Untersuchen der Spezifität und der Mechanismen des Herausschneidens eines Schadens durch Reparatursysteme an 10 bis 50 Basen langen, synthetischen Oligonucleotiden bekannt, die wohldefinierte Läsionen enthalten.

**[0016]** In den meisten Fällen ist das zu untersuchende Oligonucleotid, das die zu untersuchende(n) chemische(n) Modifikation(en) enthält, an einem seiner Enden radioaktiv markiert. Die Wirkung des Enzyms (Kinetik des Herausschneidens, Bestimmung der Affinitätskonstanten, Bruch oder kein Bruch des Oligonucleotidfragments, Wirkung auf einen Einzel- oder Doppelstrang) wird nach der Elektrophorese auf Acrylamidgel analysiert.

**[0017]** Eine weitere Technik vermeidet den Einsatz von Radioaktivität, erfordert aber eine hohe Investition. Dies ist die Analyse des Verdaus durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF). Diese Analyse ist interessant, da sie eine Untersuchung des Mechanismus des Herausschneidens gestattet. Andererseits ist sie für eine Routineanalyse einer Enzymaktivität absolut nicht geeignet.

**[0018]** Das Herausschneiden modifizierter Basen kann auch durch mit der Massenspektrometrie gekoppelte Gaschromatographie verfolgt werden. Dies wurde ausgehend vom Herausschneiden von 5-Hydroxy-5,6-dihydrothymin und 5,6-Dihydrothymin durch Endonuklease III an durch γ-Bestrahlung bestrahlter DNS gezeigt. Diese genaue Technik weist jedoch mehrere Nachteile auf: sie erfordert eine große Investition in analytisches Material, sie ist wenig empfindlich und erfordert eine große Menge Ausgangsmaterial und sie ist nicht zur Routineanalyse geeignet.

## Beschreibung der Erfindung

**[0019]** Die Erfindung hat genauer ein Verfahren zur Detektion und Charakterisierung von Aktivitäten von Proteinen zum Gegenstand, die an der Reparatur von Schäden der DNS beteiligt sind, das leichter auszuführen ist, an verschiedene Reparaturweisen anpaßbar ist und bequem und rasch routinemäßig angewendet werden kann, wobei der Einsatz von Radioaktivität vermieden wird.

**[0020]** Erfindungsgemäß umfaßt das Verfahren zur Detektion und Charakterisierung einer oder mehrerer Aktivität(en) eines Proteins/von Proteinen, das/die an der Reparatur von DNS beteiligt ist/sind, die folgenden Schritte:

a) Fixieren mehrerer beschädigter DNS, die aus Oligonucleotiden mit identischer Sequenz, die bekannte, verschiedene Läsionen aufweisen, und/oder aus Oligonucleotiden mit unterschiedlicher Sequenz, die bekannte, identische oder verschiedene Läsionen aufweisen, bestehen, auf einem festen Träger an verschiedenen definierten Stellen;

b) Unterwerfen dieser beschädigten DNS der Einwirkung einer Reparaturzusammensetzung, die wenigstens ein Protein enthält oder nicht enthält, das in die Reparatur dieser beschädigten DNS eingreift, und

c) Bestimmen der Aktivität dieses/dieser Protein(e) für die Reparatur unter Messen der Veränderung des Signals, das durch einen Marker emittiert wird, der während des Schritts (b) auf dem Träger fixiert oder von diesem eliminiert wird.

**[0021]** Bei diesem Verfahren wird die beschädigte DNS, bei der wenigstens eine DNS bekannt ist, auf einem festen Träger wie etwa einem Biochip fixiert und anschließend der Einwirkung eines Proteins als Reparaturenzym oder einer Zusammensetzung, die dieses Protein enthalten kann, unterzogen und die Reparatur wird anschließend durch Verwenden eines Markers, der zu Anfang an der beschädigten DNS fixiert oder ihr während des Reparaturverfahrens zugesetzt werden kann, überwacht.

**[0022]** Auf diese Weise kann das Verfahren zum Charakterisieren an der DNS-Reparatur beteiligter Proteine verwendet werden. Es kann auch zum Aufzeigen der Nicht-Funktionalität bestimmter Proteine gegenüber bekannten Läsionen oder außerdem zum Nachweisen des Fehlens von DNS-Reparaturproteinen in Zusammensetzungen verwendet werden, die sie normalerweise enthalten sollten.

**[0023]** Das Erhalten dieser Ergebnisse kann für diagnostische Anwendungen nützlich sein. Tatsächlich sind die Reparaturgene bei bestimmten Krankheiten mutiert und die Enzymaktivität oder das assoziierte Protein ist nicht funktionsfähig oder nur teilweise funktionsfähig (zum Beispiel Xeroderma pigmentosum).

**[0024]** Bei diesem Verfahren umfaßt der feste Träger wenigstens eine Fixierungsstelle, die durch ein Fragment beschädigter DNS definiert wird und vorteilhafterweise mehrere Fixierungsstellen umfaßt, die verschiedene, zuvor ausgewählte, beschädigte DNS-Fragmente immobilisieren können.

**[0025]** Die Proteine, bei denen die Aktivität gemessen werden soll, sind an dem Reparaturverfahren beteiligt, das im allgemeinen das Erkennen der Beschädigung, ein Einschneiden der DNS-Kette, Ausschneiden der Beschädigung oder von Nucleinsäurefragmenten und eine In-situ-Synthese der DNS und eine Ligation des neu gebildeten Strangs umfaßt.

**[0026]** Zum Beispiel können die an diesem Verfahren beteiligten Proteine aus den folgenden ausgewählt werden:

– an der Erkennung von Läsionen beteiligte Proteine wie etwa XPA, der TFIIH-Transkriptionsfaktor und seine Polypeptidbestandteile, XPC, XPF, XPG und ihre damit verbundenen Proteine (ERCC-Familie usw.)),

HSSB usw. (siehe Sancar, A. (1995) Annu. Rev. Genetics, 29, Seite 69-105, [10]),
– an der Exzision von Läsionen beteiligte Proteine wie etwa Glykosylasen, an der Resynthese des (der) Nucleotids (Nucleotide) des herausgeschnittenen Strangs beteiligte Proteine wie etwa Polymerasen und
– an der Ligation der neugebildeten Stränge beteiligte Proteine wie etwa Ligasen.

**[0027]** Gemäß einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Marker auf der auf dem Träger fixierten, beschädigten DNS zugegen und wird durch Einwirkung des Proteins von Schritt b) eliminiert.

**[0028]** Zum Beispiel kann diese Ausführungsform zum Beispiel zum Bestimmen der Aktivität von Enzymen zum Einschneiden oder zum Herausschneiden von Läsionen einer beschädigten DNS verwendet werden. In diesem Fall kann der Marker an einem Ende der beschädigten DNS vorliegen. So bewirkt ein Einschneiden oder Herausschneiden das Entfernen des den Marker tragenden, beschädigten DNS-Fragments und verursacht einen Signalverlust auf dem Träger an der Stelle, an der die beschädigte DNS fixiert ist.

**[0029]** Bei der ersten Ausführungsform kann auch ein für Läsionen der beschädigten DNS spezifischer Marker wie etwa ein Antikörper eingesetzt werden, der diese Läsionen vor dem Schritt b) sichtbar macht. Nach der Einwirkung des Proteins und Reparatur der Läsionen kann dieser Marker sich nicht fixieren und man kann einen Verlust des für das Reparaturprotein repräsentativen Markersignals beobachten.

**[0030]** Auf diese Weise korreliert das Verhältnis des durch die spezifischen Antikörper vor der DNS-Reparatur ausgesandten Signals zu dem durch die Antikörper nach der Proteinreaktion, zum Beispiel Enzymreaktion, ausgesandten Signal mit dem Ausmaß der DNS-Reparatur. In diesem letzten Fall wird die Schadensreparatur durch das Verschwinden eines spezifischen Schadensignals ermittelt.

**[0031]** Gemäß einer zweiten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung liegt der Marker in der Reparaturzusammensetzung vor und wird während Schritt b) in die auf dem Träger fixierte DNS eingeführt.

**[0032]** In diesem Fall kann man zum Beispiel der Reparaturzusammensetzung modifizierte Nucleotide zusetzen, die durch Polymerasen eingebaut sind und als Markierung des neu gebildeten Strangs dienen können. Diese modifizierten Nucleotide können ein Biotin, ein Hapten, eine fluoreszierende Verbindung oder jedes andere, mit der Markierung von Nucleinsäuren verträgliche Molekül tragen. Diese während des Resyntheseschritts eingeführten Marker können anschließend nachgewiesen werden und das entsprechende Signal kann mit der Reparaturrate korreliert werden.

**[0033]** Die zum Bestimmen der Aktivität der an der DNS-Reparatur beteiligten Proteine verwendbaren Marker können verschiedene Typen sein, vorausgesetzt daß sie ein nachweisbares Signal aussenden oder beim Aussenden eines nachweisbaren Signals erkannt werden können.

**[0034]** Mehrere Marker oder Erkennungsweisen können gleichzeitig oder nacheinander zum Nachweisen der Zustandsänderungen verwendet werden, die bei den beschädigten DNS-Fragmenten durch die mit der Reparatur verbundenen Proteinaktivitäten eingetreten sind.

**[0035]** Der Marker kann insbesondere ein Affinitätsmolekül, eine fluoreszierende Verbindung, ein Antikörper, ein Hapten oder ein Biotin sein.

**[0036]** Vorzugsweise werden als Marker oder Erkennungsmittel für den Marker erfindungsgemäß fluoreszierende Verbindungen mit direkter Fluoreszenz oder indirekter Fluoreszenz verwendet, Derartige Moleküle können zum Beispiel Avidin sein, das durch Streptavidin-Phycoerythrin, Europiumkryptate, fluoreszierende Verbindungen wie etwa Fluorescein, Rhodamin usw. sichtbar gemacht wird.

**[0037]** Die Energieübertragungseigenschaften zwischen fluoreszierenden Molekülen können ebenfalls zum quantitativen Bestimmen einer Enzymaktivität genützt werden, die an der Reparatur an einem Oligonucleotidsubstrat beteiligt ist. In dem Fall, wenn das Oligonucleotid, das die lädierte Base oder Basen trägt, auch ein fluoreszierendes Molekül trägt, das die Energieübertragung mit einem anderen fluoreszierenden, entweder auf demselben Oligonucleotid befindlichen oder auf einem Oligonucleotid in Kontakt mit dem ersten befindlichen Molekül erlaubt, beweist die Aussendung eines Signals nach der Anregung die Anwesenheit der Läsion auf dem Träger. Der Einschnitt des die Läsion oder Läsionen tragenden Oligonucleotids durch ein Reparaturenzym führt zur Entfernung des eingeschnittenen Fragments und zum Verlust des Fluoreszenzsignals, wobei keine Energieübertragung stattfinden kann. Diese Signaländerung kann gemessen und mit einer spezifischen

Verdaurate korreliert werden.

**[0038]** Die Fixierung der beschädigten DNS auf dem festen Träger kann erfindungsgemäß durch klassische Verfahren bewerkstelligt werden.

**[0039]** Auf diese Weise kann eine beschädigte DNS mittels Syntheseautomaten, die zum Beispiel den Einbau modifizierter Basen erlauben, direkt auf dem festen Träger synthetisiert werden.

**[0040]** Die beschädigte DNS kann auch durch irgendein Verfahren, das mit dem Erhalten der Integrität des beschädigten DNS-Fragments verträglich ist, zum Beispiel durch Hybridisieren mit einem anderen, auf dem Träger immobilisierten DNS-Fragment, durch Immobilisierung durch ein Affinitätsmolekül oder durch direkte Fixierung auf dem Chip durch Abscheidung oder durch irgendein anderes Mittel auf dem festen Träger fixiert werden.

**[0041]** Vorzugsweise wird ein Biochip als fester Träger verwendet, auf dem verschiedene oder identische, vollständig identifizierte Läsionen tragende oder mehrfache, nicht vollständig identifizierte Läsionen tragende DNS-Fragmente an vorbestimmten Stellen fixiert sind.

**[0042]** Die immobilisierten und Läsionen tragenden DNS-Fragmente können kurze Oligonucleotide (15-100 Basen lang, vorzugsweise 15 bis 50 Basen lang) oder längere Fragmente (100-20000 Basen) sein. Es gibt verschiedene Verfahren, die den Einbau Läsionen tragender Oligonucleotide in lange DNS-Fragmente ermöglichen: Kettenpolymerisationsreaktion (PCR), Ligation. Immobilisierte DNS-Fragmente können in Einzel- oder Doppelstrangform vorliegen. Die modifizierte DNS kann direkt oder über ein Zwischenmolekül (Biotin-, Antigen-, Nucleinsäuretyp usw.) fixiert sein.

**[0043]** Lange DNS-Fragmente können ebenfalls durch eine physikalische oder chemische, Läsionen auslösende Behandlung beschädigt werden. Sie können zum Beispiel durch radioaktive, Sonnen- oder Ultraviolettstrahlung bestrahlt werden. Sie können durch Lichtsensibilisationsreaktionen, durch chemische Mittel und durch Kanzerogene beschädigt werden. In diesem Fall werden die Läsionen entlang der Nucleotidkette statistisch ausgelöst. Die Qualität, Spezifität und Quantität der induzierten Läsionen hängt von der Wahl des chemischen oder physikalischen Mittels ab, das die Läsionen hervorruft. Auf diese Weise kann auf die Art der Läsionen, die man in ein DNS-Fragment einzuführen wünscht, abgezielt werden.

**[0044]** Der Träger kann zum Beispiel ein DNS-Fragmente tragender Biochip sein, auf dem durch Hybridisieren beschädigte DNS mittels eines Oligonucleotids fixiert wird, das einen komplementären Teil der beschädigten DNS und einen komplementären Teil eines der DNS-Fragmente des Biochips trägt.

**[0045]** Die Erfindung zieht unter anderem Nutzen aus der chemischen Synthese von Oligonucleotiden und daher aus der Tatsache, daß es möglich ist, die den Schaden enthaltenden und umgebenden Sequenzen genau bestimmen zu können.

**[0046]** Derselbe Träger kann durch Nucleotidfragmente mit identischen oder unterschiedlichen Sequenzen funktionalisiert werden. Die Schäden können sich an verschiedenen definierten oder nicht definierten Stellen der Sequenzen befinden.

**[0047]** Die Natur der auf dem Träger fixierten Fragmente (Größe, Anzahl der Schäden, Ort der Schäden ...) kann schwanken und hängt von der Natur der gesuchten Information ab.

**[0048]** Die Läsionen tragenden DNS-Fragmente oder die komplementären Fragmente Läsionen tragender Fragmente können ebenfalls Marker tragen, die zum Nachweisen mit einer enzymatischen Reparaturaktivität verbundener DNS-Transformationen brauchbar sind. Diese Marker können Affinitätsmoleküle, fluoreszierende Verbindungen oder irgendein an einen speziellen Chiptyp gebundenes spezielles Nachweissystem sein.

**[0049]** Wenn die DNS-Fragmente auf dem Chip (Referenzchip) immobilisiert sind, wird eine Erkennung durchgeführt, um das Charakterisieren des Zustands zu gestatten, in dem sich die Fragmente befinden. Die unterschiedlichen Kontakte des Chips sind somit durch die Signale, die sie aussenden, gekennzeichnet. Sie dienen als Referenzsignal.

**[0050]** Der Referenzchip oder ein zu denen auf dem Referenzchip identische beschädigte DNS-Fragmente tragender, Testchip genannter Chip wird anschließend in Gegenwart von Lösungen inkubiert, die enzymatische

Reparaturaktivitäten enthalten können. Die auf dem Chip fixierten DNS-Fragmente können durch die vorhandenen Enzymaktivitäten transformiert werden.

**[0051]** Ein zweites Auslesen des Testchips oder des Referenzchips wird unter geeigneten Bedingungen und nach den notwendigen Erkennungsschritten durchgeführt. Die Pins des Chips können auf diese Weise von den Signalen beim ersten Auslesen verschiedene Signale aussenden, was bedeutet, daß eine oder mehrer Enzymreaktionen auf dem Chip stattgefunden haben.

**[0052]** Es ist anzumerken, daß die Messung der Transformation von DNS, die durch mit Reparatursystemen verbundene Enzyme beschädigt ist, durch kontinuierliche Aufzeichnung der durch die verschiedenen Kontakte des Chips ausgesandten Signale überwacht werden kann, falls die verwendeten Marker mit einem derartigen Nachweissystem verträglich sind.

**[0053]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Untersuchung von Enzymen oder gereinigten Proteinfaktoren sowie zur Untersuchung in Zellextrakten vorhandener Aktivitäten angewendet werden.

**[0054]** Es kann auch zum Untersuchen der Spezifität verschiedener DNS-Läsionen für bestimmte Reparatursysteme, insbesondere für Glykosylasen verwendet werden. Auf demselben Gebiet kann die Kinetik der Reparatur dieser Läsionen als Funktion verschiedener Faktoren verfolgt werden. Diese Faktoren können mit der Nucleotidsequenz (zum Beispiel Wirkung der umgebenden Basen auf die Reparatur) und den Hemmern oder andererseits den Stimulatoren der Reparaturaktivität verbunden sein.

**[0055]** Das Verfolgen der Reparatur einer identifizierten Läsion ist für die Bestimmung der an dem Erkennungs- und Ausschneideschritt einer bestimmten Läsion beteiligten Enzymaktivität interessant. Es ist zum Beispiel bekannt, daß es zum Herausschneiden einer bestimmten Läsion spezifische Glykosylasen gibt. Ein Mangel an einem bestimmten Enzym führt somit zu keiner Reparatur einer bestimmten Läsion.

**[0056]** Die Miniaturisierung des Trägers gestattet das Verbessern der Empfindlichkeit des Systems insbesondere bei der Verwendung von Zellextrakten. Die Erfindung erleichtert den Nachweis unterschiedlicher, mit den Reparatursystemen verbundener Proteine ausgehend von Zellkulturen oder Biopsien. Außerdem kann durch Verwenden eines Biochips, der mehrere beschädigte DNS-Sequenzen trägt, die verschiedene bekannte Läsionen aufweisen, das Reparaturvermögen dieser verschiedenen Schäden für eine begrenzte Menge desselben Zellextrakts nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere in dem Fall der Diagnose bestimmter Pathologien und Erbkrankheiten sehr bedeutsam.

**[0057]** Insbesondere bietet die Erfindung zahlreiche Vorteile.

**[0058]** Tatsächlich gestattet sie die Miniaturisierung der Systeme zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und insbesondere der mit einer Reparatur verbundenen. Das Ergebnis ist ein Empfindlichkeitszuwachs. Diese Verbesserung ist sehr bedeutsam, da die Zellextrakte, insbesondere wenn sie aus biologischen Proben und nicht aus Zellinien stammen, schwierig zu erhalten sind.

**[0059]** Es gestattet das Erhalten genauer Informationen zur Funktionalität, der Induktion und Repression verschiedener, mit der Reparatur von DNS-Schäden in Prokaryonten- und Eukaryontensystemen verbundener Schritte.

**[0060]** Es erleichtert auch den leichteren Zugang zu biologischen Bestimmungen von Enzymaktivitäten beim Menschen. Es gestattet insbesondere den Nachweis von Enzymmängeln, wie sie bei Pathologien angetroffen werden, bei denen eine Strahlungsempfindlichkeit oder Lichtempfindlichkeit wie etwa Xeroderma pigmentosum und Cockaine-Krankheit beteiligt ist. Sie gestattet das leichtere Untersuchen der Wirkungen des Alterns auf die Enzymaktivitäten der Reparatur.

**[0061]** Die Erfindung gestattet auch das gleichzeitige Untersuchen des Verhaltens von Enzymen gegenüber unterschiedlichen Läsionen, die in den auf demselben miniaturisierten Träger immobilisierten Nucleotidsequenzen enthaltenen sind. Dies erleichtert den Vergleich zwischen den Ergebnissen und macht sie zuverlässiger und reproduzierbarer. Ein weiteres Ergebnis ist ein bedeutsamer Zeitgewinn.

**[0062]** Die Erfindung stellt zum ersten Mal einen umfassenden Ansatz zur Beurteilung der Funktionalität von Reparatursystemen mit einem gleichzeitigen Zugang zu mehreren Läsionen und mehreren Reparaturmechanismen oder -schritten.

**[0063]** Eine direkte Analyse der durch die unterschiedlichen Chipkontakte nach der Einwirkung der untersuchten Enzymsysteme ausgesandten Signale gestattet das direkte Rückverfolgen der Schritte bei den verschiedenen Reparatursystemen und Ziehen von Schlußfolgerungen über ihre Funktionsweise.

**[0064]** Die Erfindung gestattet die Bestimmung eines bestimmten Proteins, das an der Reparatur einer gezielten Läsion beteiligt ist, wie zum Beispiel die Bestimmung einer am Herausschneiden oxidierter Basen beteiligten Glykosylase. In diesem Fall wird die Läsion, von der bekannt ist, daß sie das bevorzugte Substrat für die Glykosylase ist, auf die abgezielt wird, in ein synthetisches Oligonucleotid eingebaut und an einer bestimmten Stelle auf dem Chip fixiert. Man erkennt daher, daß durch Fixieren mehrerer Oligonucleotide, die an unterschiedlichen Stellen des Chips zielgerichtete und unterschiedliche Läsionen umfassen, eine Ermittlung der Funktion unterschiedlicher, am REB-System beteiligter Glykosylasen erhalten werden kann. Die Erfindung gestattet aber auch die Bestimmung von Proteinen, die an Schritten beteiligt sind, die der Reparatur aller Läsionen, wie etwa Polymerasen und Ligasen, gemeinsam ist. Im letzten Fall können DNS-Fragmente verwendet werden, die weniger genau identifiziert sind.

**[0065]** Die Erfindung ist auch durch die Tatsache gekennzeichnet, daß die Wahl der verschiedenen, an unterschiedlichen Kontakten des Chips fixierten Substrate das Abzielen auf das interessierende Reparatursystem gestattet. Tatsächlich gestattet die Fixierung kurzer (unter 25 Basen), Läsionen tragender Oligonucleotide, auf die Proteine des REB-Systems abzuzielen. Die Fixierung längerer (über 50 Basen), Läsionen tragender Oligonucleotide gestattet die gleichzeitige Zielrichtung auf Proteine des REB- und REN-Systems. Die genaue Auswahl der fixierten Schäden gestattet ferner die Zielrichtung auf die untersuchten Reparatursysteme.

**[0066]** Auf diese Weise kann das Verfahren der Erfindung zur Untersuchung der Spezifität und der Funktionalität der an der Reparatur beteiligten Proteine gegenüber den bekannten DNS-Läsionen, zum Verfolgen der Kinetik der Reparatur der DNS-Läsionen durch die Proteine, zum Ermitteln der genotoxischen Wirkung von Substanzen oder physischen Mitteln, die die Synthese an der DNS-Reparatur beteiligter Proteine hemmen oder stimulieren, oder zur Diagnose von Mängeln an den mit den Krankheiten verbundenen Proteinen angewendet werden.

**[0067]** Andere Eigenschaften und Vorteile der Erfindung werden nach dem Lesen der folgenden Beispiele unter Verweis auf die angefügten Zeichnungen deutlicher, die selbstverständlich nur zu Veranschauungszwecken angegeben sind und keinesfalls einschränkend sind.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0068]** Fig. 1 stellt schematisch den Zustand eines Systems im ersten Schritt des Verfahrens der Erfindung dar.

**[0069]** Fig. 2 stellt schematisch den Zustand eines Systems der Fig. 1 nach dem Schritt b) des Verfahrens der Erfindung dar.

## Genaue Beschreibung der Ausführungsformen

### Beispiel 1

**[0070]** Bei diesem Beispiel wird die erste Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung zum Bestimmen der Aktivität einer Reparatur des Glykosylasetyps an einem beschädigten, als Läsion ein 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin tragenden Oligonucleotid angewendet.

**[0071]** Es wird ein Biochip des Typs MICAM pb4 verwendet, der wie durch Livache et al., Biosens. Bioelectron., 13, 1998, Seite 629 und 634 [8], beschrieben erhalten wurde und vier funktionalisierte Kontakte durch vier synthetische Oligonucleotide mit unterschiedlichen Sequenzen (H, I, J, K) umfaßt. Die Sequenz H ist die folgende:
Sequenz H: 5' TTTTT CCA CAC GGT AGG TAT CAG TC

**[0072]** Der funktionalisierte Teil des Biochips wird in Gegenwart eines Hybrids inkubiert, das aus dem beschädigten Oligonucleotid (O), das ein 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin trägt, und einem Oligonucleotid (cOcH) gebildet ist, das einen komplementären Teil des Oligonucleotids O (cO) und einen komplementären Teil des auf dem Chip (cH) fixierten Oligonucleotids H trägt. Das Oligonucleotid O trägt ein Biotin an seinem 3'-Ende.

O : 5'GAA CTA GTG XAT CCC CCG GGC TGC – Biotin 3'
(wobei X 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin ist).
cOcH : 5' GCA GCC CGG GGG ATC CAC TAG TTC GAC TGA CTA CCG TGT GG

**[0073]** Das Hybrid O-cOcH wird durch Inkubation von 10 pMol cOcH und 12 pMol O in 200 µl 0,2 M NaCl enthaltendem PBS-Puffer während 60 min bei 37°C erhalten.

**[0074]** 20 µl dieser Lösung werden abgenommen und dem funktionalisierten Teil des Chips zugesetzt, der eine Vertiefung bildet. Nach 1 Stunde Inkubation in feuchtem Medium bei 37°C wird der Chip in einen Waschpuffer (PBS/0,2 M NaCl/0,05 % Tween 20) getaucht.

**[0075]** Fig. 1 stellt das durch Fixierung des Oligonucleotids O auf Kontakt **1** des das Oligonucleotid H tragenden Biochips erhaltene System dar. Dieses Oligonucleotid H ist mit der Sequenz cH des Oligonucleotids **3** hybridisiert, das auch eine mit dem beschädigten Oligonucleotid O hybridisierte Sequenz trägt, das ein Biotin **5** an seinem 3'-Ende und eine Läsion **7** trägt.

**[0076]** Das Oligonucleotid O, das die Läsion trägt und durch Hybridisierung auf dem Biochip fixiert ist, wird nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit 20 µl 0,5 % Rinderserumalbumin BSA und 1 µl Streptavidin-Phycoerythrin R (0,5 mg/ml; Jackson ImmunoResearch) enthaltendem PBS-Puffer/NaCl sichtbar gemacht.

**[0077]** Nach dem Waschen in PBS/NaCl/Tween wird der Biochip unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und das Signal wird mit dem Programm Image Pro Plus analysiert.

**[0078]** Das Signal wird in Pixel integriert. Die funktionalisierten Kontakte senden selbst in Abwesenheit irgendeiner Hybridisierung ein schwaches Fluoreszenzsignal aus. Die nicht funktionalisierten Kontakte sind schwarz.

**[0079]** An dem durch das Oligonucleotid H funktionalisierten Kontakt wird ein intensives, sättigendes Signal bei 250 Pixel beobachtet. Zum Vergleich weist der durch die Sequenz I funktionalisierte Kontakt eine maximale Fluoreszenz von etwa 110 Pixel auf. Das Signal-Rauschverhältnis (H/I) ist 2,27.

**[0080]** Die Hybridisierung des eine DNS-Läsion tragenden Oligonucleotids ist folglich spezifisch. Weiterhin ist ersichtlich, daß ein Nucleinsäurefragment, das einen definierten Schaden auf einer vordefinierten Stelle umfaßt, auf einem Biochip fixiert werden kann.

**[0081]** Der Biochip wird 10 min mit 0,1 N NaOH gewaschen und anschließend 10 min mit $H_2O$ gewaschen, was zur Wirkung hat, daß die Oligonucleotide O und cOcH vom Biochip entfernt werden. Im Mikroskop wird bestätigt, daß alle Signale verschwunden sind.

**[0082]** Der Chip wird mit dem Hybrid O-cOcH unter den vorstehend definierten Bedingungen erneut hybridisiert. Nach dem Waschen mit PBS/NaCl/Tween wird der Chip 10 min mit 0,1 M KCl, Tris-Puffer gewaschen, anschließend werden 20 µl desselben Puffers, der 0,5 µg Fapy DNS Glykosylase (S. Boiteux, CEA Fontenayaux-Roses, Frankreich) enthält, zugesetzt. Der Chip wird in einer feuchten Atmosphäre 30 min bei 37°C inkubiert.

**[0083]** Nach dem Waschen mit PBS/NaCl/Tween wird wie vorstehend bei dem Schritt des Sichtbarmachens mit Streptavidin-Phycoerythrin R verfahren. Das Signal wird nach dem Waschen mit PBS/Tween aufgezeichnet. Die intensive Fluoreszenz am Kontakt H ist verschwunden. Das Signal-Rauschverhältnis (H/I) ist 1,04.

**[0084]** Fig. 2 stellt den Systemzustand nach der Reaktion mit dem Enzym vom Glykosylasetyp dar.

**[0085]** Aus dieser Figur ist zu ersehen, daß das Oligonucleotid O vom Biochip entfernt worden ist. Das Enzym Fapy-DNS-Glykosylase hat das Oligonucleotid O an dem 8-Oxo-7,8-dihydrodesoxyguanin geschnitten. Die so erzeugten kurzen DNS-Fragmente bilden unter den angewandten Bedingungen instabile Hybride und werden von dem Biochip entfernt. Dies verursacht das Verschwinden des Fluoreszenzsignals aufgrund der Entwicklung von Biotin.

**[0086]** Auf diese Weise zeigt dieses Beispiel, daß eine DNS-Reparaturaktivität auf einem Mikroträger festgestellt werden kann, der ein DNS-Fragment mit einer Läsion einer DNS-Base trägt.

Beispiel 2

**[0087]** Dieses Beispiel veranschaulicht den Nachweis einer Aktivität des Glykosylasetyps bei einem Zellysat unter Anwenden der ersten Ausführungsart des Verfahrens der Erfindung.

**[0088]** Bei diesem Beispiel wird das in Beispiel 1 verwendete, das 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxynucleotid tragende Oligonucleotid O wie in Beispiel 1 auf dem Biochip pb4 hybridisiert, was dem in Fig. 1 dargestellten System entspricht.

**[0089]** Ein Gesamtzellysat wird aus Hela-Zellen in Kultur hergestellt.

**[0090]** Die Zellen werden trypsiniert und anschließend mit PBS-Puffer gewaschen. Die ungefähr $15{,}16^6$ Zellen enthaltende Hülle wird mit 1 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 Pastille Antiproteasen „Complete, Mini" (Boehringer Mannheim) auf 10 ml enthaltend) und 5 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma, 17,4 mg/ml in Isopropanol) aufgenommen. Die Zellen werden zerkleinert und anschließend wird das Lysat 50 min bei 65000 Umdrehungen/min in einer Beckman-Ultrazentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird isoliert und anschließend werden 200 µl Glycerin und 20 µl 0,1 M Dithioerythrit zugesetzt. Die Lysate werden in aliquote Mengen aufgeteilt und bei –80°C aufbewahrt.

**[0091]** Der Biochip wird anschließend mit 20 µl Zellextrakt 45 min bei 37°C inkubiert. Der Erkennung wird wie in Beispiel 1 bewerkstelligt.

**[0092]** Das Signal des Kontakts H wird aufgezeichnet. Es beträgt 180 Pixel.

**[0093]** Der Versuch wird mit denaturiertem Lysat (10 min Erhitzen auf 100°C) wiederholt. Das Signal des Kontakts H ist bei 250 Pixel sättigend. Daher besteht auf die Inkubation des Biochips, der durch den den Schaden enthaltenden Duplex funktionalisiert ist, mit dem rohen Zellysat folgend ein Signalverlust. Dieser Signalverlust ist ungefähr 30 %, was einem teilweisen Abschneiden des durch in dem Lysat enthaltene Enzyme modifizierten Oligonucleotids O entspricht.

**[0094]** Diese Versuche werden durch Analyse auf Polyacrylamidgel nach dem radioaktiven Markieren des Oligonucleotids O bestätigt.

Beispiel 3

**[0095]** Dieses Beispiel veranschaulicht den Nachweis der Exzision/Resynthese-Reparaturaktivität eines Gesamtzellysats unter Verwenden eines auf einem Mikroträger fixierten DNS-Fragments.

**[0096]** Die zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in diesem Fall angewendet.

**[0097]** Ein aus 5000 Basenpaaren bestehendes DNS-Fragment wird durch PCR-Amplifikation aus dem Lambda-Phagen durch Verwenden des Kits „Expand™ Long template PCR system" von Roche hergestellt. Ein Amplifikationsprimer weist eine Sequenz von 15 Basen ($J_{15}$) an seinem 5'-Ende auf, die durch ein Aminsynthon von der auf dem Phagen hybridisierenden Sequenz getrennt ist. Diese Sequenz bleibt nach der PCR-Amplifikation ein Einzelstrang. Dieses PCR-Fragment wird durch eine Micro-spin-S300-Säule (Amersham-Pharmacia) gereinigt. Der DNS-Strang wird 3 Minuten durch Ultraviolettstrahlen des C-Typs ($\lambda_{max}$ 254 nm, 0,8 J/cm$^2$) bestrahlt.

**[0098]** Die bestrahlte DNS wird anschließend mittels eines 30 Basen langen, erstens zu der Sequenz $I_{15}$ und zweitens zur Sequenz $J_{15}$ komplementären Oligonucleotids $cI_{15}cJ_{15}$ auf einem pb2-Biochip (MICAM) hybridisiert, der vier verschiedene Oligonucleotidsequenzen auf vier verschiedenen Kontakten ($S_1$, $S_2$, $S_3$, $I_{15}$) einschließlich der $I_{15}$ genannten Sequenz trägt.
$I_{15}$: 5' TTTTT ATC CGT TCT ACA GCC

**[0099]** Die Hybridisierung findet 1 Stunde bei 37°C in 20 µl PBS/NaCl-Puffer statt, der etwa 0,1 Mol PCR-Amplifikationsprodukt enthält.

**[0100]** Der Chip wird anschließend in Gegenwart von Gesamtzellextrakten in einem wie nachstehend beschriebenen Puffer inkubiert.

Versuch zur Exzision/Resynthese bei dem funktionalisierten Chip

**[0101]** Die Vorschrift wird von Robins et al., The EMBO Journal, Bd. 10, Nr. 12, Seite 3913-3921, 1991 [10], angepaßt. Es wird eine Lösung hergestellt, die 25 µl Zellysat von Hela-Zellen, 10 µl Reaktionspuffer 5X (225 mM Hepes KOH pH 7,8, 350 mM KCl, 37,5 mM $MgCl_2$, 4,5 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,09 mg/ml BSA, 17 % Glycerin), 2 mM ATP, 5 µM dGTP, 5 µM dATP, 5 µM dCTP, 1 µM dTTP, 4 µM Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat, 200 mM Phosphokreatinin und 12,5 µg Kreatininphosphokinase Typ I in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthält. 25 µl dieser Lösung werden auf den Biochip aufgebracht, der 2 h 30 min bei 30°C in feuchtem Medium inkubiert wird.

**[0102]** Nach dem Spülen mit PBS/NaCl/Tween wird der Nachweis mit Streptavidin-Phycoerythrin bewerkstelligt.

**[0103]** Der Chip wird anschließend mit dem Mikroskop analysiert.

**[0104]** Es wird eine starke Fluoreszenz (Sättigungssignal) bei dem durch das Oligonucleotid $I_{15}$ funktionalisierten Kontakt beobachtet. Das Signal-Rauschverhältnis ($I_{15}$/S3) ist 2,2.

**[0105]** Die vor der Reparatur des modifizierten DNS-Fragments durch die in dem Lysat enthaltenen Enzyme durchgeführte Sichtbarmachung mit Streptavidin-Phycoerythrin ergibt ein Signal-Rauschverhältnis ($I_{15}$/S3) von 1.

**[0106]** Der Versuch wird mit dem durch die PCR-Reaktion erhaltenen unmodifizierten Fragment wiederholt. Nach der unter denselben Bedingungen wie zuvor durchgeführten Exzision/Resynthesereaktion (Signal/Rauschen 1) ist auf dem Chip kein Signal zu erkennen.

**[0107]** Dieses Beispiel zeigt, daß die an der Reparatur der modifizierten DNS-Basen beteiligten Enzymaktivitäten an einem durch modifizierte Basen tragenden DNS-Fragment funktionalisierten Chip nachgewiesen werden können.

Beispiel 4

**[0108]** Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung spezifischer Antikörper zum Nachweisen aus Pyrimidindimeren des Cyclobutantyps bestehender Läsionen.

**[0109]** Es wird derselbe Biochip wie in Beispiel 3 verwendet, bei dem unter denselben Bedingungen wie denen des Beispiels 3 bestrahlte DNS mittels desselben Oligonucleotids $cI_{15}cJ_{15}$ fixiert wird.

**[0110]** Nach dem Waschen in PBS/NaCl/Tween wird die Sichtbarmachung der durch die UVB-Strahlung gebildeten Pyrimidindimeren des Cyclobutantyps vorgenommen.

**[0111]** Der Chip wird mit 20 µl 1 µl Anti-Dimer-Antikörper (500 µg/ml; Kamiya Biomedicam Company, Seattle, USA) enthaltendem PBS/NaCl-Puffer 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

**[0112]** Nach dem Waschen mit PBS/NaCl/Tween wird der Chip in Gegenwart von 20 µl 1 µl Ziege-anti-Maus-Antikörper, der an den Marker $Cy^{TM}3$ (1,4 mg/ml; Jackson ImmunoResearch Laborstories, Inc.) gekuppelt ist, enthaltendem PBS/NaCl 1 h bei 37°C inkubiert.

**[0113]** Nach dem Waschen mit PBS/NaCl/Tween wird das Signal auf dem Chip aufgezeichnet. Das Signal-Rauschverhältnis ($I_{15}$/S3) ist 1,33.

**[0114]** So gestattet die Verwendung von DNS-anti-Schaden-Antikörpern das spezifische Nachweisen von Schäden und somit das Nachverfolgen ihrer Entfernung durch Reparatursysteme.

Literaturzitate

[1] : Wood et al, Cell, 53, 1988, Seite 97-106.
[2] : Sallès et al, in Biochimie, 77, 1995, Seite 796-802.
[3] : FR-A-2 731 711.
[4] : Page et al, Biochemistry, 29, 1990, Seite 1016-1024.

[5] : Huang et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 1994, Seite 12213-12217.
[6] : Romieu et al, J. Org. Chem., 63, 1998, Seite 5245-5249.
[7] : D'Ham et al, Biochemistry, 38, 1999, Seite 3335-3344.
[8] : Livache et al, Biosens. Bioelectron, 13, 1998, Seite 629-634.
[9] : Wilson III, D.M. and Thompson, L.H., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., 94, Seite 12754-12757.
[10] : Sancar, A. (1995) Annu. Rev. Genetics, 29, Seite 69-105.

SEQUENZLISTE

<110> **COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**
**SAUVAIGO, Sylvie**

<120> DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG DER AKTIVITÄT VON PROTEINEN, WELCHE AN DER REPARATUR VON DNA-LÄSIONEN BETEILIGT SIND

<130> **B13548MDT**

<140> **PCT/FR01/01605**
<141> **2001-05-23**

<150> **FR00/06624**
<151> **2000-05-24**

<160> **4**

<170> **PatentIn Ver. 2.1**

<210> **1**
<211> **24**
<212> DNS
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
synthetisches Oligonucleotid

<400> **1**
**tttttccaca cggtaggtat cagtc** **25**

<210> **2**
<211> **24**
<212> DNS
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
synthetisches Oligonucleotid

<220>
<221> **modified_base**
<222> **(10)**
<223> 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin

<220>

<223> -Biotin 3'

<400> 2
gaactagtgn atcccccggg ctgc 24

<210> 3
<211> 41
<212> DNS
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
synthetisches Oligonucleotid

<400> 3
gcagcccggg ggatccacta gttcgactga ctaccgtgtg g 41

<210> 4
<211> 20
<212> DNS
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
synthetisches Oligonucleotid

<400> 4
tttttatccg ttctacagcc 20

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Detektion und Charakterisierung einer oder mehrerer Aktivität(en) eines Proteins/von Proteinen, das/die an der Reparatur von DNS beteiligt ist/sind, umfassend die folgenden Schritte:
a) Fixieren mehrerer beschädigter DNS, die aus Oligonucleotiden mit identischer Sequenz, die bekannte, verschiedene Läsionen aufweisen, und/oder aus Oligonucleotiden mit unterschiedlicher Sequenz, die bekannte, identische oder verschiedene Läsionen aufweisen, bestehen, auf einem festen Träger an verschiedenen definierten Stellen;
b) Unterwerfen dieser beschädigten DNS der Einwirkung einer Reparatur-Zusammensetzung, die wenigstens ein Protein enthält oder nicht enthält, das in die Reparatur dieser beschädigten DNS eingreift; und
c) Bestimmen der Aktivität dieses/dieser Protein(e) für die Reparatur unter Messen der Veränderung des Signals, das durch einen Marker emittiert wird, der während des Schritts (b) auf dem Träger fixiert oder von diesem eliminiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Protein gewählt ist unter den Proteinen, die beteiligt sind an der Erkennung der Läsionen der DNS, den Proteinen, die beteiligt sind an der Exzision der Läsionen der DNS, den Proteinen, die an der Resynthese des/der Nucleotid(e) des herausgeschnittenen Strangs beteiligt sind, und den Proteinen, die an der Ligation der neugebildeten Stränge beteiligt sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1, in dem der Marker auf der beschädigten DNS zugegen ist, die auf dem Träger fixiert ist und durch Einwirkung des Proteins von Schritt (b) eliminiert wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, in dem der Marker an einem Ende der beschädigten DNS fixiert ist, das Pro-

tein ein Enzym zum Einschneiden oder zum Herausschneiden von Läsionen der beschädigten DNS ist und das Einschneiden oder Herausschneiden die Eliminierung eines Fragments der beschädigten DNS hervorruft, das den Marker trägt.

5. Verfahren nach Anspruch 3, in dem der Marker ein für Läsionen der beschädigten DNS spezifischer Marker ist, der in der Lage ist, diese Läsionen vor dem Schritt (b) aufzudecken, und die Läsion während der Reparatur in der Weise eliminiert wird, dass der Marker die Läsion nicht mehr aufdecken kann.

6. Verfahren nach Anspruch 1, in dem der Marker in der Reparatur-Zusammensetzung zugegen ist und in die auf dem Träger fixierte DNS während des Schritts (b) eingeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, in dem die Reparatur-Zusammensetzung ein Nucleotid umfasst, das durch den Marker modifiziert ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, in dem die Reparatur-Zusammensetzung ein Zell-Lysat oder ein gereinigtes Reparatur-Enzym ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in dem der Marker ein Affinitäts-Molekül, eine Fluoressenz-Verbindung, ein Antikörper, ein Hapten oder ein Biotin ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, in dem der Träger ein Biochip ist, der DNS-Fragmente umfasst, auf dem man durch Hybridisierung die beschädigte DNS mittels eines Oligonucleotids fixiert, das einen komplementären Abschnitt der beschädigten DNS und einen komplementären Abschnitt eines der Fragmente der DNS des Biochips umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, in dem die beschädigte DNS ein kurzes Oligonucleotid mit einer Länge von 15 bis 100 Basen ist, vorzugsweise einer Länge von 15 bis 50 Basen, das die Läsionen in dem Oligonucleotid während seiner chemischen Synthese inkorporiert umfasst.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, in dem die beschädigte DNS ein Polynucleotid mit einer Länge von 100 bis 20.000 Basen ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, in dem die beschädigte DNS in einzelsträngiger oder doppelsträngiger Form vorliegt.

14. Biochip, auf dem an verschiedenen definierten Orten mehrere beschädigte DNS fixiert sind, die aus Oligonucleotiden mit identischer Sequenz, die bekannte, verschiedene Läsionen aufweisen, und oder aus Oligonucleotiden mit unterschiedlicher Sequenz, die bekannte, identische oder unterschiedliche Läsionen aufweisen, bestehen.

15. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Untersuchung der Spezifität und der Funktionalität der Proteine, die an der Reparatur von bekannten Läsionen einer DNS beteiligt sind.

16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zum Verfolgen der Kinetik der Reparatur von Läsionen der DNS durch die Proteine.

17. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zum Bewerten des gentoxischen Effekts von Substanzen oder physischen Mitteln, die die Synthese der Proteine inhibieren oder stimulieren, die an der Reparatur der DNS beteiligt sind.

18. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zum Diagnostizieren von Mängeln von Reparaturproteinen, die mit Krankheiten verbunden sind.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

**Anhängende Zeichnungen**

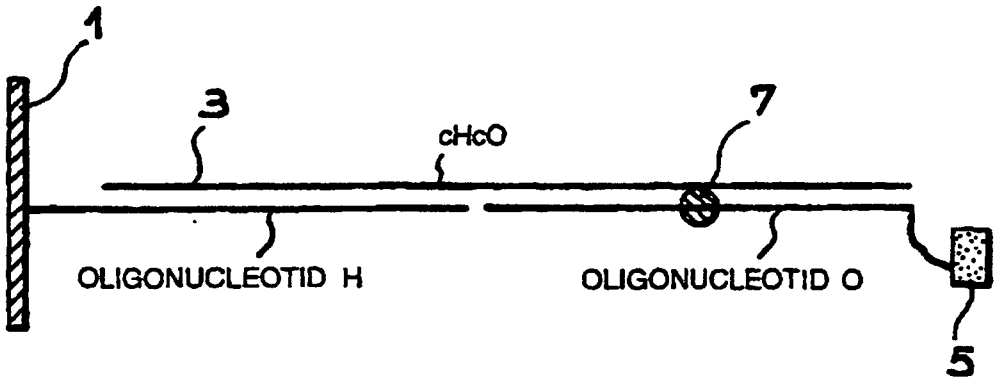


FIG. 1

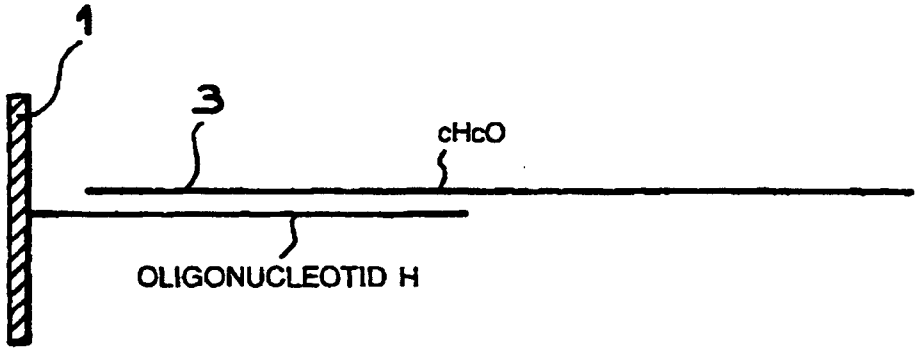


FIG. 2