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

(10) **DE 694 06 772 T3** 2005.11.17

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 680 517 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 06 772.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/00583**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 907 826.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/17208**
(86) PCT-Anmeldetag: **21.01.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.08.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.11.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **12.11.1997**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **19.01.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.11.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12Q 1/68**

(30) Unionspriorität:
8896 21.01.1993 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Mass., US; Xenometrix, Inc., Boulder, Co., US

(72) Erfinder:
FARR, Spencer B., Longmont, CO 80304, US; TODD, Marque D, Westminster, CO 80021, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND DIAGNOSTISCHE KITS UNTER VERWENDUNG VON SÄUGER-STRESSPROMOTOREN ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT EINER VERBINDUNG**

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 der Erfindung

[0001] Die Erfindung stellt Verfahren und diagnostische Kits zur Identifizierung und Charakterisierung von toxischen Verbindungen bereit. Diese Verfahren und diagnostischen Kits messen die Transkriptions- oder Translationsrate von Genen, die mit nativen eukaryontischen Streßpromotoren, besonders von Säugern, verbunden sind. In den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren wird mindestens ein Streßpromotor von jeder der nachstehenden Kategorien verwendet: Redoxstreß, DNA-Streß, Proteinstreß und Energie-/Ionenstreß. Die Erfindung stellt ferner Verfahren und diagnostische Kits zur Identifizierung und Charakterisierung von Verbindungen bereit, die für bestimmte Organe wie Haut und Auge toxisch sind, sowie für die vorstehend beschriebenen einzelnen Stressarten. Die erfindungsgemäßen Verfahren und diagnostischen Kits liefern Informationen über die Wirkung einer Verbindung auf subzellulärer Ebene. Diese Information kann zur Entwicklung von Antitoxinen gegen nachweisbar toxische Verbindungen und zur Entwicklung von aktiven Arzneimitteln verwendet werden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Mindestens 55 000 Chemikalien werden gegenwärtig in den Vereinigten Staaten produziert. Mehr als 2 000 neue Chemikalien werden jedes Jahr auf dem Markt eingeführt. Sehr wenige dieser Chemikalien wurden umfassend auf eine akute oder chronische Toxizität getestet. Beispielsweise wurden weniger als 1 Prozent der im Handel erhältlichen Chemikalien einer vollständigen Gesundheitsrisikobewertung unterzogen.

[0003] Die Environmental Protection Agency ("EPA") hat das Recht, toxikologische Tests einer Chemikalie vor der kommerziellen Produktion zu verlängen, von diesem Recht wird jedoch selten Gebrauch gemacht. Weniger als 10 Prozent der neuen Chemikalien werden durch das EPA genau geprüft. Aufgrund der Kosten und für eine schnelle Markteinführung verwendet das EPA häufig die Toxizität von zuvor getesteten homologen Verbindungen zur Bewertung der Toxizität einer neuen Chemikalie.

[0004] Die potentielle Toxizität von neuen Arzneimitteln wird durch die Food and Drug Administration ("FDA") überwacht. Für eine New Drug Application (NDA) verlangt die FDA üblicherweise zahlreiche Toxizitäts-, Carcinogenitäts-, Mutagenitäts- und Reproduktions-/Fertilitätstests an mindestens zwei Arten von lebenden Tieren. Diese Tests sollen bis zu einem Jahr dauern. Ein zweijähriger Toxizitätstest bei Ratten kostet etwa $800 000 [Casarett and Doull's Toxicology 4. Ausgabe, M. O. Amdur et al., Hrsg., Pergamon Press, New York, S. 37 (1991)].

[0005] Neben den Kosten zeigen Tierversuche auch Nachteile in bezug auf Dauer, Leid der Tiere und Genauigkeit. Übliche Toxizitätstests werden in drei Stadien eingeteilt: akute, kurzeitige und langzeitige Tests. Für akute Tests, die die LD_{50} einer Verbindung (die für 50% der Testtiere tödliche Dosis) ermitteln, werden etwa 60 bis 100 Tiere benötigt, und es wird eine Testreihe zur Ermittlung der LD_{50} und der Dosis-Wirkungskurven und zur Überwachung der klinischen Endpunkte, die nicht der Tod sind, durchgeführt. Kurzzeittests erfordern üblicherweise mindestens 24 Hunde und 90 Ratten und dauern von 90 Tage bei Ratten bis 6 bis 24 Monate bei Hunden. Körpergewicht, Nahrungsverwertung und Blut-, Urin- und Gewebeproben werden häufig in Kurzzeittests untersucht. Ferner werden tote Tiere post-mortem untersucht. Langzeittests ähneln Kurzzeittests, dauern jedoch 2 Jahre bei Ratten und bis zu 7 Jahre bei Hunden oder Affen.

[0006] Tierversuche gerieten in die Kritik von Tierschutzaktivisten und der breiten Öffentlichkeit, da den Tieren schlimmes Leid zugefügt wird. Ferner gibt es seit kurzen Beweise, die die Exaktheit von Tierversuchen in Frage stellen. Beispielsweise können Variable wie die Tiernahrung die Aussagefähigkeit von Tierversuchen bei der Ermittlung von carcinogenen Eigenschaften beeinträchtigen [P. H. Abelson, "Diet and Cancer in Humans and Rodents" Science 255 (1992), 141]. Frühere Untersuchungen von Dioxin-Toxizität auf der Basis von Meerschweinchentests werden nun erneut bewertet [B. J. Culliton, "US Government Orders New Look At Dioxin", Nature 352 (1991), 753, und L. Roberts, "More Pieces in the Dioxin Puzzle" Research News (Oktober 1991), 377]. Es ist daher offensichtlich, daß es einen dringenden Bedarf nach einer schnellen, kostengünstigen und verläßlichen Alternative für Toxizitätstests bei Tieren gibt.

[0007] Mehrere alternative Kurzzeittests sind verfügbar. Der Ames-Test weist beispielsweise Carcinogene nach, die eine genetische Reversion von mutierten Salmonella typhimurium-Stämmen bewirken. Der Ames-Test kann weder nicht-mutagene Carcinogene noch nicht-carcinogene Toxine nachweisen. Das im United States-Patent 4,997,757 beschriebene Hefe-Carcinogen-Testsystem überwindet einige der Nachteile des Ames-Tests, kann jedoch keine nicht-carcinogenen Toxine nachweisen. Beide Tests sind nur für den Nachweis

von Veränderungen und Mutationen auf DNA-Ebene entwickelt worden. Daher können diese bisherigen Tests weder eine direkte Schädigung von Proteinen oder Lipidmembranen noch Inhibitoren der DNA-Synthese nachweisen. Ferner erlauben diese bisherigen Tests keine Aussage über den Wirkungsmechanismus eines Mutagens oder Toxins.

[0008] WO 90/10710 offenbart die Verwendung von TNF, IL-1α oder IL-1β, die an ein Reportergen fusioniert sind, zum Nachweis von bakteriellen Pyrogenen. Der beschriebene Test weist jedoch die Einschränkung auf, daß er nur einen bestimmten Streß (bakterielle Pyrogene) nachweist und keine qualitative Aussage über den Mechanismus der toxischen Wirkung des Pyrogens zuläßt.

[0009] Im Dokument WO-A-9401584 der Anmelden wird ein Testsystem offenbart, das zur Ermittlung und Charakterisierung der Toxizität einer Verbindung ein an bakterielle Streßpromotoren fusioniertes Reportergen verwendet. Dieser Test kann eine Schädigung von Proteinen oder Lipidmembranen und eine Inhibition der DNA-Synthese nachweisen. Durch diesen Test können daher nicht-carcinogene Toxine nachgewiesen weiden. Unglücklicherweise weist die Korrelation zwischen der Toxizität für Bakterien und der Toxizität für Säuger und andere höhere Eukaryonten bestimmte Einschränkungen auf und muß kein genaues Maß der Toxizität für höhere Tiere sein.

[0010] Daher bleibt ein Bedarf an einem Test, der die Zeit- und Kosteneinsparungsmerkmale des bakteriellen Streßtests aufweist, jedoch auf einer eukaryontischen Zelle beruht.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Der Anmelder erfüllt dieses Bedürfnis durch Bereitstellung eines In vitro-Diagnose-Kits und -Testverfahrens, die die zelluläre und subzelluläre Wirkung eines potentiellen Toxins auf eine tierische Zelle identifizieren und charakterisieren. Diese Kits und Verfahren verwenden die nativen Streßpromotoren von eukaryontischen Zellen, vorzugsweise Säugerzellen, und messen die Transkriptions- oder Translationsrate eines mit ihnen funktionell verbundenen Gens. Je nach Wahl der verwendeten Streßpromotoren können die erfindungsgemäßen Kits und Verfahren so entwickelt werden, daß sie Verbindungen, die für das ganze Tier oder für spezifische Organe dieses Tiers toxisch sind, identifizieren und charakterisieren.

[0012] In einer Ausführungsform charakterisieren die erfindungsgemäßen Kits und Verfahren die Toxizität einer Verbindung durch Ermittlung der Transkriptionsrate von verschiedenen in einer eukaryontischen Zeile vorhandenen Streßgenen. Diese Kits und Verfahren verwenden Oligonucleotide, die mindestens zu einem Teil von verschiedenen Streßgen-Messenger-RNAs komplementär oder homolog sind, für den Nachweis der Transkription dieser Gene in der Zelle. In dieser Ausführungsform wirkt eine einzelne Zelle als ein vivo-Diagnosereagens, mit dem festgestellt wird, welchen spezifischen Streß eine bestimmte Verbindung induziert.

[0013] In einer anderen Ausführungsform enthält jede Zelle eine Vielzahl von ähnlichen eukaryontischen Zellen einen anderen mit einem Reportergen funktionell verbundenen Streßpromotor. Durch getrennte Exposition jeder Zelle gegen eine Verbindung und Messung der Expression des Reportergenprodukts kann die Toxizität dieser Verbindung charakterisiert werden.

[0014] Die erfindungsgemäßen Kits und Verfahren werden optimal entwickelt, so daß sie die Toxizität einer Verbindung in Tagen statt in den für Tierversuche erforderlichen Monaten oder Jahren ermitteln. Ferner werden diese Ergebnisse mit den erfindungsgemäßen Kits bei einen Bruchteil der Kosten von Tierversuchen und ohne die unerwünschten Konsequenzen für lebende Tiere erhalten. Die erfindungsgemäßen diagnostischen Kits und Verfahren liefern direkte Informationen über die Wirkungsweise des Toxins auf Säugerzellen - im Gegensatz zu auf dem Fachgebiet bekannten Kurzzeittests.

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft daher einen diagnostischen Kit zur Identifizierung und Charakterisierung einer toxischen Verbindung, umfassend:

(a) eine Säugerzelle, gekennzeichnet durch:
(i) mindestens einen Promotor, der nur auf Redoxstreß reagiert;
(ii) mindestens einen Promotor, der nur auf DNA-Streß reagiert;
(iii) mindestens einen Promotor, der nur auf Proteinstreß reagiert; und
(iv) mindestens einen Promotor, der nur auf Energie-/Ionenstreß reagiert; wobei jeder der Promotoren mit einem unterschiedlichen Gen funktionell verbunden ist, das ein unterschiedliches nachweisbares Produkt codiert; und
(b) mindestens vier verschiedene Oligonucleotidsonden, wobei jede der Sonden in der Lage ist, mit dem

mRNA-Transkript eines der anderen Gene zu hybridisieren, das funktionell mit den Promotoren verbunden ist, oder mit einer einzelsträngigen cDNA, die von diesem RNA-Transkript hergestellt worden ist, wobei
(i) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf Redoxstreß reagieren,
(ii) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf DNA-Streß reagieren,
(iii) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf Proteinstreß reagieren und
(iv) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf Energie-/Ionenstreß reagieren.

[0016] In einer alternativen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit zur Identifizierung und Charakterisierung einer toxischen Verbindung, mindestens umfassend:
(i) eine erste Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf Redoxstreß reagiert;
(ii) eine zweite Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf DNA-Streß reagiert;
(iii) eine dritte Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf Proteinstreß reagiert; und
(iv) eine vierte Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf Energie-/Ionenstreß reagiert;
wobei jeder der Promotoren oder Response-Elemente funktionell mit einem heterologen Gen verbunden ist, das ein nachweisbares Produkt codiert.

[0017] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein in-vitro-Verfahren zur Bestimmung der Toxizität einer Verbindung für eine Säugerzelle durch die Erzeugung eines Stressinduktionsprofils, umfassend Daten, die jede der Streßarten wie Redoxstreß, DNA-Streß, Proteinstreß und Energie-/Ionenstreß, die die Verbindung auf die Zelle ausübt, getrennt identifizieren und quantifizieren, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
(a) getrennte Züchtung einer oder mehrerer Säugerzellen, die insgesamt gekennzeichnet sind durch:
(i) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf Redoxstreß reagiert;
(ii) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf DNA-Streß reagiert;
(iii) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf Proteinstreß reagiert; und
(iv) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf Energie-/Ionenstreß reagiert,
wobei jeder der Promotoren oder Response-Elemente mit einem Gen funktionell verbunden ist, das ein nachweisbares Produkt codiert;
(b) Aussetzen jeder der einen oder mehreren Zellkulturen der Verbindung;
(c) Quantifizierung der nachweisbaren Produkte, die dem Redoxstreß, DNA-Streß, Proteinstreß oder Energie-/Ionenstreß entsprechen, den die Verbindung in der Zelle verursacht, in jeder der Kulturen; und
(d) Erzeugung eines Streßpromotorinduktionsprofils für die Verbindung aus den Daten, die sich aus Schritt (c) ergeben.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0018] Fig. 1 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD).

[0019] Fig. 2 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von 3-Methylcholanthren (3-MC).

[0020] Fig. 3 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Benzo[a]pyren.

[0021] Fig. 4 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Cadmiumsulfat.

[0022] Fig. 5 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Dimethylsulfoxid (DMSO).

[0023] Fig. 6 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Ethanol.

[0024] Fig. 7 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Methapyrilenhydrochlorid.

[0025] Fig. 8 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Methylmethansulfonsäure (MMS).

[0026] Fig. 9 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Natriumarsenat.

[0027] Fig. 10 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Phorbol-12-acetat-13-myristat (PMA).

[0028] Fig. 11 zeigt die relative Expression der Chloramphenicolacetyltransferase unter der Kontrolle von verschiedenen Streßpromotoren in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen von Retinsäure.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0029] Wie hier verwendet, werden die Begriffe "Streß" und "Toxizität" austauschbar verwendet und bezeichnen die Störung der biochemischen und biophysikalischen Homöostase der Zelle.

[0030] Der Begriff "Redoxstreß", wie hier in der Anmeldung verwendet, meint Bedingungen, die vom normalen Reduktions/Oxidationspotential ("Redox")-Zustand der Zelle abweichen. Redoxstreß schließt erhöhte Mengen von Superoxid-Radikalen, erhöhte Mengen von Peroxiden -- sowohl Wasserstoffperoxid als auch organische Peroxide --, verringerte Mengen von Glutathion und alle anderen das Redoxpotential der Zelle verändernden Bedingungen wie die Exposition gegen starke Reduktionsmittel, einige aromatische Kohlenwasserstoffe, elektrophile Verbindungen, Aldehyde, intrazelluläre Thiole, Steroide, Methylcholanthren, Phenobarbital und CCl_4 ein. Der Begriff schließt alle weiteren eine Proliferation von Peroxisomen bewirkenden Bedingungen ein.

[0031] Der Begriff "DNA-Streß", wie durchgehend in der Anmeldung verwendet, meint Veränderungen der Desoxyribonucleinsäure oder der Vorläufernucleotide. DNA-Streß schließt beispielsweise, jedoch ohne Beschränkung darauf, DNA-Strangbrüche, eine DNA-Strangvernetzung, Exposition gegen in DNA interkalierende Stoffe, sowohl eine stärker als auch eine geringer ausgeprägte Superhelixbildung, eine oxidative DNA-Schädigung, DNA-Alkylierung, Oxidation von Nucleosidtriphosphaten und Alkylierung von Nucleosidtriphosphaten ein. Der Begriff schließt ferner eine Inhibition der DNA-Synthese und -Replikation und eine Inhibition von Mitose oder Meiose ein. Der Begriff schließt ferner Bedingungen ein, die durch Exposition gegen Wachstumsfaktoren, Interferone, Tumorpromotoren, Tumornekrosefaktor, Phorbolester, hydrophobe cytotoxische Wirkstoffe, entzündungsverursachende Stoffe, Mitogene, Carcinogene, Röntgenstrahlen, UV-Strahlung und Dimethylnitrosamine bewirkt werden.

[0032] Der Begriff "Proteinstreß", wie er durchgehend in der Anmeldung verwendet wird, meint Veränderungen von Proteinen oder einzelnen Aminosäuren und eine Inhibition von Enzymfunktionen sowie Störungen des intrazellulären Proteintransports. Der Begriff schließt, jedoch ohne Beschränkung darauf, eine Denaturierung von Proteinen, Fehlfaltung von Proteinen, Chelatbildung von Proteincofaktoren, Vernetzung von Proteinen, sowohl eine Sauerstoff-abhängige als auch -unabhängige Oxidation von inter- und intra-Ketten-Bindungen wie Disulfidbindungen, Alkylierung von Proteinen, Oxidation von einzelnen Aminosäuren und eine durch Exposition gegen Schwermetalle wie Cadmium und Hitze verursachte Proteinschädigung ein.

[0033] Der Begriff "Energie-/Ionenstreß" meint Bedingungen, die die ATP-Mengen in der Zelle oder die Ionengradienten über eine Zellmembran beeinflussen. Beispiele für Energiestreß sind ein erzwungener anaerober Metabolismus in Gegenwart von Sauerstoff, Störungen des Elektronentransports, Exposition gegen Entkupp-

lungsmittel, Membrandepolarisation, osmotischer Schock, Exposition gegen Ionen wie Ca^{2+}, Exposition gegen große Mengen von cAMP und Exposition gegen Ethanol.

[0034] Der Begriff "Streßpromotorinduktion" meint Bedingungen, die die Expressionsrate eines Gens erhöhen, das mit einem nativen Streßpromotor oder einem rekombinant erhältlichen, ein Response-Element enthaltenden Streßpromotor funktionell verbunden ist. Der Begriff "funktionelle Verbindung" oder "funktionell verbunden" meint die Positionierung des Promotors relativ zum Gen, so daß die Transkription des Gens durch den Promotor reguliert wird. Der Begriff umfaßt sowohl rekombinante Konstrukte sowie die Struktur eines natürlich vorkommenden Promotors und seines assoziierten Gens.

[0035] Der Begriff "Bestimmung und Charakterisierung der Toxizität einer Verbindung" schließt die Identifizierung einer Verbindung als Toxin und die Aufklärung ihres Wirkungsmechanismus innerhalb der Zelle ein.

[0036] Der Begriff "Nucleinsäuresequenzen", wie in der Anmeldung verwendet, schließt RNA, einzel- oder doppelsträngige cDNA oder Teile davon, einzel- oder doppelsträngige genomische DNA oder Teile davon oder einzel- oder doppelsträngige synthetische Oligonucleotide ein.

[0037] Während jedes Gen durch einen einzigen Promotor kontrolliert wird, enthalten Gene, die auf identische Stressarten antworten, ein gemeinsames Response-Element innerhalb ihrer Promotoren. Daher ist das gleiche Response-Element für die Induktion der Expression einer Genfamilie nach der Exposition gegen einen bestimmten Streß verantwortlich. Bei der Isolierung und funktionellen Verbindung mit einem Minimalpromotor und einem Strukturgen funktioniert das erhaltene Konstrukt wie ein Streßpromotor. Dies ist beim Zerlegen eines auf mehrere Stressarten antwortenden nativen Streßpromotors in seine Bestandteile besonders nützlich.

[0038] Einzelne Zellen antworten auf toxische Stimuli teilweise durch Aktivierung von spezifischen Genen, deren Proteinprodukte die Stimuli entgiften oder durch sie verursachten Schaden reparieren. Eukaryontische Zellen besitzen eine große Zahl von genetischen und biochemischen Antworten auf eine Schädigung oder Streß. Mindestens 50 verschiedene Säuger-Streßgene wurden bereits isoliert und charakterisiert. Diese Gene werden durch eine Vielzahl von chemischen und physikalischen Stressarten oder zellulären Schäden induziert.

[0039] Zu den chemischen Stressarten, die ein öder mehrere dieser identifizierten Gene induzieren, gehört die Exposition des Zelle gegen Quecksilber, Schwermetalle, Nitroxide, aromatische Kohlenwasserstoffe, Säuren, Basen, Alkylierungsmittel, Peroxidierungsmittel, Vernetzungsmittel, Ionophore, redoxaktive Mittel, elektrophile Verbindungen, zu Entzündungen führende Mittel, hydrophobe cytotoxische Wirkstoffe, Ethanol, Steroide, Entkupplungsmittel, Tumorpromotoren und zelluläre Faktoren wie der Tumornekrosefaktor, Wachstumsfaktoren und Interferon. Physikalische Stressarten schließen eine Exposition gegen UV-Strahlung, Hitze oder Röntgenstrahlen ein.

[0040] Beispiele für einen zellulären Schaden, der diese identifizierten Gene induziert, sind die Lipidoxidation, Peroxisomenproliferation, DNA-Strangbrüche, DNA-Alkylierung, DNA-Vernetzung, DNA-Oxidation, osmotisches Ungleichgewicht, Proteinoxidation, Fehlfaltung von Proteinen, Proteinalkylierung, ATP-Mangel Membranpermeabilisierung, Glutathionmangel und Veränderungen der Signaltransduktion. Es wird angenommen, daß es noch viel mehr Streßgene gibt. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser anderen Streßgene ist für das Verständnis der Wirkung von verschiedenen chemischen Stressarten auf die Zelle sehr wünschenswert.

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt diagnostische Kits und Verfahren zur Ermittlung und Charakterisierung der Toxizität einer Verbindung in bezug auf die Art des in der Zelle verursachten Schadens, d. h. DNA-Schädigung, Proteinschädigung, Redoxschaden, Energieschaden, ionischer Schaden etc., bereit. Gemäß einer Ausführungsform umfaßt jeder erfindungsgemäße diagnostische Kit eine Reihe von eukaryontischen Zellen, von denen jede mindestens einen Promotor oder ein Promotorelement, der (das) auf Streß antwortet, enthält. Das Spektrum von Zellen, in toto, muß mindestens einen Promotor oder ein Promotorelement, der (das) auf jeden der vorstehend beschriebenen Streßarten antwortet -- Redox-, DNA-, Protein- und Energie-/Ionenstreß -- und mit einem ein nachweisbares Produkt codierenden Gen funktionell verbunden ist.

[0042] Gemäß einer Ausführungsform ist das Spektrum von Zellen in diesem Kit sogar eine einzelne Zellinie, in der jede Zelle alle verschiedenen Streßpromotorarten enthält und jeder dieser Promotoren nach einer Exposition gegen den geeigneten Streß aktiviert wird. In dieser Ausführungsform sind die mit den Streßpromotoren funktionell verbundenen Gene am meisten bevorzugt die nativen Streßgene. In dieser Weise muß keine genetische Manipulation der Zellen vor des Durchführung eines Tests erfolgen. In dieser bevorzugten Ausfüh-

rungsform umfassen die Kits ferner Oligonucleotide oder cDNAs, die mindestens zu einem Teil des codierenden oder nicht-codierenden Strangs der Gene unter der Kontrolle der spezifischen Streßpromotoren komplementär sind. Die Oligonucleotide werden zum Nachweis und zur Quantifizierung der mRNA-Transkripte dieser Gene oder der cDNA-Komplemente davon verwendet, wobei eines davon das nachweisbare Produkt in dieser Ausführungsform sein kann.

[0043] Es sollte beachtet werden, daß, obwohl alle eukaryontischen Zellen zahlreiche Streßpromotoren in ihrem Genom enthalten, einige dieser Promotoren nach einer Exposition gegen den geeigneten Streß aktivierbar oder nicht aktivierbar sein können. Dies gilt besonders für höhere Eukaryonten wie Säuger. Die Zellinien, deren Streßpromotoren auf fast alle geeigneten Stressarten antworten, werden in den erfindungsgemäßen Kits bevorzugt. Diese schließen primäres Gewebe von Leber, Herz, Lunge, Niere, Gehirn oder einem anderen Organ von Säugern sowie von Säugern stammende Zellinien ein, die aus diesen von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) erhältlichen Geweben etabliert wurden. Stärker bevorzugt sind HepG2-Zellen, HeLa-Zellen und WIL-2-Zellen. Am meisten bevorzugt sind HepG2-Zellen.

[0044] Die in den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen diagnostischen Kits und Verfahren verwendeten Oligonucleotide werden nach ihrer Fähigkeit zur spezifischen Hybridisierung unter Bedingungen einer relativ hohen Stringenz an entweder das Transkriptionsprodukt des mit den verschiedenen Streßpromotoren funktionell verbundenen Gens öder sein Komplement (d. h. eine von dieser mRNA durch reverse Transkription erhaltene einzelsträngige cDNA) ausgewählt. Die Wahl der Verwendung von komplementären oder homologen Oligonucleotiden hängt von dem zum Nachweis der Transkriptionsprodukte verwendeten Verfahren ab. Diese verschiedenen Verfahren werden nachstehend in der Anmeldung beschrieben.

[0045] Da die DNA-Sequenzen von vielen Säuger-Streßgenen bekannt ist, können hybridisierende Oligonucleotide leicht hergestellt werden. Es sollte beachtet werden, daß eine 100%ige Homologie oder Komplementarität zwischen dem Oligonucleotid und der Streßgen-mRNA nicht erforderlich ist. Dies ist so, da das Oligonucleotid auf der Basis der Sequenz eines Streßgens von einer Art, die sich von der Quelle der in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendeten Zellen unterscheidet, entwickelt werden kann.

[0046] Während erwartet wird, daß ähnliche Streßgene von verschiedenen Säugerarten eng verwandt sind, weisen die Transkripte dieser Gene höchst wahrscheinlich keine identischen Nucleotidsequenzen auf. Daher sind die in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendeten Oligonucleotide vorzugsweise zu mindestens 95% homolog oder komplementär. Die Oligonucleotide sind vorzugsweise zwischen 20 und 500 Basenpaare lang. Am meisten bevorzugt sind die Oligonucleotide mit einer Länge zwischen 50 und 100 Basenpaaren.

[0047] Stärker bevorzugt werden die Oligonucleotide unter Verwendung eines Oligonucleotid-Synthesegeräts synthetisiert, und gegebenenfalls wird anschließend eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. In diesem Verfahren wird ein Oligonucleotid mit einer Sequenz, die entweder mit einem Teil des Matrizenstrangs oder des nicht-codierenden Strangs identisch ist und innerhalb des codierenden Bereichs eines bekannten sequenzierten Streßgens liegt, synthetisiert. Bei Verwendung der PCR zur Erhöhung der Menge an Oligonucleotid wird das Oligonucleotid mit zusätzlichen 6 bis 12 Nucleotiden an jedem Ende synthetisiert. Diese zusätzlichen Nucleotide dienen als Ziele für komplementäre Primer in einer PCR-Reaktion. Vorzugsweise sind die zusätzlichen Nucleotide an jedem Ende zueinander komplementär. Daher kann ein einziger Primer sowohl am ursprünglichen Oligonucleotid als auch am PCR-Produkt davon als Primer dienen. Die zusätzlichen Nucleotide an jedem Ende sind am meisten bevorzugt komplementäre Homohexamere, d. h. AAAAAA an einem Ende und TTTTTT am anderen Ende.

[0048] Während der PCR werden vorzugsweise ein oder mehrere markierte Nucleotide in die Polymerasereaktion eingeschlossen. Vorzugsweise ist der Marker ^{32}P Biotin oder ein fluoreszierender Marker. So wird ein markiertes Produkt erhalten, das direkt zum Nachweis der Menge an Transkriptionsprodukt verwendet werden kann. Der Vorteil dieses gemischten Oligonucleotid-Synthesegerät/PCR-Verfahrens ist, daß Mikrogrammengen von markiertem Oligonucleotid in einem einzigen Verfahren produziert werden können. Die erhaltenen Oligonucleotide können gegebenenfalls nach der Synthese und Reinigung biotinyliert werden.

[0049] Bei der Verwendung des Oligonucleotids zum Nachweis von reversen cDNA-Transkripten des Transkriptionsprodukts wird es vorgezogen, keinen Marker zu verwenden. In dieser Ausführungsform wird es vorgezogen, daß der Marker in die cDNA statt in das Oligonucleotid eingeschlossen wird.

[0050] Die Entwicklung von geeigneten Oligonucleotidsonden zur Verwendung in den erfindungsgemäßen

Kits und Verfahren ist relativ einfach. Natürlich sollen sie eine hohe Sequenzähnlichkeit oder -komplementarität mit oder zu der Streßgen-mRNA, mit der sie hybridisieren sollen, aufweisen. Die Oligonucleotide in jedem einzelnen Kit sollten auch etwa die gleiche Schmelztemperatur (T_m) aufweisen, so daß eine einzige Erwärmungsvorrichtung (wie ein Wasserbad) bei der Durchführung der Hybridisierungs- und anschließenden Waschschritte verwendet werden kann. Die Oligonucleotide sollen vorzugsweise einen T_m von mehr als 70°C in 0,2 × SSC aufweisen. Zur Ermittlung, welche Teile der codierenden Bereiche des Streßgens zur Entwicklung von Oligonucleotidsonden verwendet werden können, kann ein im Handel erhältliches Computerprogramm wie OLIGO (National Biosciences, Plymouth, MN) verwendet werden.

[0051] Gemäß einer weiteren Ausführungsform enthält jede Zelle eines Spektrums von eukaryontischen Zellen im erfindungsgemäßen diagnostischen Kit einen Streßpromotor oder ein Streß-Response-Element, der (das) mit einem ein nachweisbares Produkt codierenden heterologen Gen funktionell verbunden ist. In dieser Ausführungsform wird die Verbindung des gleichen heterologen Gens mit verschiedenen Streßpromotoren oder Response-Elementen im Kit vorgezogen. So muß nur ein einziger Test zum Nachweis der Induktion von jedem beliebigen der Streßpromotoren und Streß-Response-Elemente durchgeführt werden. Es wird ferner bevorzugt, daß jede Zelle im Kit nur ein einziges Konstrukt aus einem Streßpromotor oder Response-Element mit einem heterologen Gen enthält. Daher kann die Expression des nachweisbaren Produkts in jeder beliebigen gegebenen Zelle in dem Kit mit der Induktion eines einzelnen Streßpromotors oder Response-Elements spezifisch in Zusammenhang gebracht werden.

[0052] Die erfindungsgemäßen diagnostischen Kits und Verfahren verwenden ein Spektrum von eukaryontischen Zellen, die in toto Promotoren und Response-Elemente umfassen, die sowohl auf Redoxstreß, DNA-Streß, Proteinstreß als auch Energiestreß antworten. Die bevorzugten erfindungsgemäßen Promotoren und Response-Elemente zur Verwendung bei Säugerzellen sind nachstehend in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Bevorzugte Säuger-Streßpromotoren

Promotor	Redoxstreß	DNA-Streß	Protein-Streß	Energie-/ Ionenstreß
CYP1A1	X			
GST Ya	X	X		
GADD45		X		
GRP78		X	X	X
JUN	X	X	X	
FOS		X	X	X

Promotor	Redoxstreß	DNA-Streß	Protein-Streß	Energie-/ Ionenstreß
XHF		X		
HSP70			X	
MT IIA	X		X	
GADD153		X		
ALDH 1	X			
HMO	X	X		
CRE				X
XRE	X			
NFkBRE	X	X		
RARE	X			
ThRE	X			
PPRE	X			
TRE		X		
ERE	X			
p53RE		X		

[0053] Die Promotoren oder Response-Elemente, die in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits auf Redoxstreß antworten, werden vorzugsweise von den Promotoren der CYP1A1-, GST Ya-, JUN-, ALDH1- und HMO-Gene und den XRE-, NFkBRE-, PPRE-, RARE, ERE- und ThRE-Response-Elementen ausgewählt.

[0054] Das CYP1A1-Gen codiert Cytochrom P450 1A1, ein Enzym, das am Metabolismus vom polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wie Benzo(a)pyren beteiligt ist. Das Gen kann durch aromatische Kohlenwasserstoffe, Pflanzen-Flavone und auch durch Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), einem der potentesten Teratogene und Tumorpromotoren, induziert werden [L. A. Neuhold et al., Mol. Cell. Biol. 9 (1989), 2378–2386, Y. Fujii-Kuriyama et al., The FASEB J. 6 (1992), 706–710, D. W. Neben et al., Env. Health Perspec. (1990), 13–25, R. A. Dixon et al., Biol. Rev. 61 (1986), 239–241]. Die Sequenz dieses Gens wird von K. Sogawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 8044–8048, beschrieben.

[0055] Das GST Ya-Gen codiert die Glutathion S-Transferase-Ya-Untereinheit, einem einmaligen xenobiotischen Response-Element. Der Redoxstreß-empfindliche Teil des GST-Ya-Promotors wird durch elektrophile Herbizide, Insektizide und Planare aromatische Kohlenwasserstoffe wie β-Naphthoflavon und 3-Methylcholanthren stark induziert [T. H. Rushmore et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 382–3830]. Die Sequenz dieses Gens wird von T. H. Rushmore et al., a.a.O., beschrieben.

[0056] Das JUN-Oncogen codiert c-jun, das an der Bildung des AP-1-Komplexes - einem transkriptionellen Aktivator - beteiligt ist. Die das JUN-Gen aktivierenden Redoxstressarten sind Superoxidradikale und UVA-Strahlung. Die Sequenz dieses Gens wird von R. De Groot et al., EMBO J. 10 (1991), 2523–2532, beschrieben.

[0057] Das ALDH 2-Gen codiert die Aldehyddehydrogenase und wird durch Aldehyde und Peroxisomen-Proliferatoren induziert [D. W. Nebert, Env. Health Persp. 88 (1990), 13–25]. Die Sequenz dieses Gens wird von L. C. Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 3771–3775, beschrieben.

[0058] Das HMO-Gen codiert die Härnoxygenase. Der Promotor wird durch die nachstehenden Redoxstressarten induziert: oxidativer Streß, Wasserstoffperoxid und Natriumarsenit [S. T. Keyse und R. M. Tyrell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 99–103]. Die Sequenz dieses Gens wird in diesem Dokument beschrieben.

[0059] Das XRE ist ein Redoxstreß-Response-Element. Es antwortet auf Xenobiotika wie aromatische Kohlenwasserstoffe [T. H. Rushmore et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3826–3830]. Die Sequenz dieses Response-Elements wird in diesem Dokument beschrieben.

[0060] NFkBRE ist ein Redoxstreß-Response-Element, das einen durch intrazelluläre Thiole aktivierten Transkriptionsfaktor codiert [R. Schreck et al., EMBO J. 10 (1991), 2247–2258, und B. Nelson et al., Molec. Cell. Biol. 8 (1988), 3526–3531]. Es antwortet auch auf DNA-Streß. Die Sequenz dieses Response-Elements wird von K. Leung und G. J. Nabel, Nature 333 (1988), 776–778, beschrieben.

[0061] PPRE ist das Peroxisomen-Proliferations-Response-Element. Es ist ein Redoxstreß-Response-Element, das durch Peroxisomen-Proliferatoren induziert wird [C. Dreyer et al., Cell 68 (1992), 879–887]. Die Sequenz dieses Response-Elements wird in diesem Dokument beschrieben.

[0062] RARE ist das Retinsäure-Response-Element. Es ist ein Redoxstreß-empfindliches Response-Element, das auf das Steroidhormon Retinsäure und seine Analogen antwortet [H. de The et al., Nature 343 (1990), 177–180].

[0063] ERE ist das Östrogen-Response-Element. Es antwortet auf Redoxstreß, der durch Östrogenverbindungen induziert wird. Die Sequenz des ERE wird von V. Kumar et al., Cell 55 (1988), 145–156, beschrieben.

[0064] ThRE ist das Thyroidhormon-Response-Element. Es antwortet auf Redoxstreß, der durch Thyroidhormone und seine Analoge induziert wird. Die Sequenz des ThRE wird von M. Beato, Cell 56 (1989), 335–344, beschrieben.

[0065] Weitere Promotoren und Response-Elemente, die auf Redoxstreß antworten und in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendet werden können, können aus der nachstehenden Tabelle 2 ausgewählt werden. In der nachstehenden kurzen Beschreibung jedes dieser Gene und Response-Elemente ist das die DNA-Sequenz des jeweiligen Gens beschreibende Dokument in Klammern angegeben.

[0066] UGT codiert eine UDP-Glucuronosyltransferase und seine Redoxantwort wird durch 3-Methylcholanthren induziert [T. Iyanagi et al., J. Biol. Chem. 261 (1986), 15607–14]. CYP11B2 codiert ein Cytochrom P450, dessen Redoxantwort durch Steroide induziert wird [T. Kawamoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 1458–62]. Cu.ZnSOD codiert eine Superoxid-Dismutase, die durch Kupfer- und Zink-katalysierte Superoxid-Bildung induziert wird [E. Danciger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 3619–23]. Das MnSOD-Gen codiert eine Superoxid-Dismutase, das durch den Tumor-Nekrosefaktor, Interleukin-2 und Lipopolysaccharide aktiviert werden kann [M. K. St. Clair und J. C. Holland, Cancer Res. 51 (1991), 939–943]. ADPRT codiert eine Ribosyltransferase und wird durch oxidativen Stress induziert. GP codiert die Glutathionperoxidase und seine Redoxantwort wird durch Peroxide induziert [S. Chada, Genomics 6 (1990), 268–71]. FAOxase codiert die Fettsäure-Acyl-CoA-Oxidase und wird durch Peroxisomen-Proliferatoren induziert [S. Miyazawa et al., J. Biol. Chem. 262 (1987), 8131–37]. BE codiert ein bifunktionelles peroxisomales Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Enzym und wird durch Peroxisomen-Proliferatoren induziert [J. K. Reddy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 1747–51]. PPAR codiert einen durch Peroxisomen-Proliferatoren aktivierten Rezeptor und wird durch Peroxisomen-Proliferatoren induziert [C. Dreyer et al., Cell 68 (1992), 879–87]. EH codiert eine Epoxidhydrolase, die auf durch Phenobarbital verursachten Redoxstreß antwortet [R. K. Skoda et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 1549–54]. CYP2B2 [J. S. Miles et al., Nucl. Acids Res., 16 (1988), 5783–95], CYP2E1 [J. E. Freeman et al., Biochem. J. 28 (1992), 689–95] und CYP3A3 [N. K. Spurr et al., GenBank-Hinterlegungsnummer X12387] codieren drei verschiedene Cytochrom P450-Enzyme. Sie antworten auf Redox-

streß, der durch Phenobarbital (2B2), CCl_4 (2E1) bzw. Aflatoxin, Cyclosporin, Testosteron und Nifedipin (3A3) bewirkt wird. Das P450b-Gen codiert das Cytochrom P450b, das durch Phenobarbital induziert wird [C. M. Giachelli et al., J. Biol. Chem. 264 (1989), 7046–7053]. Das P450d-Gen codiert Cytochrom P450d, das durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, Isosafrol und 3-Amino-1-5H-pyrido[4,3-b]indol (Trp-P-2) induziert wird [K. Sogawa et al., J. Biol. Chem. 260 (1985), 5026–5032]. PPa codiert eine poly(ADP-Ribose)-Polymerase und weist einen Redoxstreß-empfindlichen Bestandteil auf, der auf eine Lipidperoxidation und oxidativen Streß antwortet [K. Uchida et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 148 (1987), 617–22]. PKC codiert die Proteinkinase C und ihr Redoxstreßempfindlicher Bestandteil wird durch Lipid-Peroxidation induziert. ALDH1 codiert eine weitere Aldehyddehydrogenase, die durch Aldehyde und Peroxisomen-Proliferatoren induziert wird [L. C. Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 3771–75]. Das NMO1-Gen codiert die NAD(P)H-Menadionoxidoreductase und wird durch verschiedene Xenobiotika wie planare aromatische Verbindungen, Azofarbstoffe und phenolische Antioxidantien induziert [L. V. Favreau und C. B. Pickett, J. Biol. Chem. 266 (1991), 4556–4561]. Das GST2-Gen codiert die Glutathion S-Transferase-2 und antwortet auf ähnliche Redoxstressarten wie GST Ya [P. G. Board et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 2377–81]. Das GAPDH-Gen codiert die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase [L. Ercolani et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 15335–41]. Das NQO-Gen codiert die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreductase und antwortet auf die gleichen Redoxstressarten wie NMO [A. K. Jaiswal, Biochemistry 30 (1991), 10647–53].

[0067] Die auf DNA-Streß antwortenden Promotoren und Response-Elemente, die in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits verwendet werden können, werden vorzugsweise von den Promotoren der GST Ya-, GADD45-, JUN-, FOS-, XHF- und GADD153-Gene und des TRE- und p53RE-Response-Elementen ausgewählt.

[0068] Das GST Ya-Gen wird vorstehend beschrieben. Sein DNA-Streß-empfindlicher Bestandteil wird durch alkylierte DNA induziert.

[0069] Das GADD45-Gen codiert ein Wachstumsstillstands- und auf eine DNA-Schädigung antwortendes Response-Protein. Das GADD45-Gen wird durch UV-Strahlen, Röntgenstrahlen und das DNA-schädigende Mittel Methylmethansulfonat (MMS) induziert. Dieses Gen wird von Q. Zhan et al., Mol. Cell Biol. 13 (1993), 4242–50, beschrieben.

[0070] Das JUN-Gen weist einen DNA-Streß-empfindlichen Bestandteil auf, der durch UVA-Strahlen, Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren induziert wird.

[0071] Das FOS-Gen codiert das Onkogen c-fos. Die DNA-Streß-empfindlichen Bestandteile seines Promotors werden durch Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren induziert [E. M. Haliday, EMBO J. 10 (1991), 109–115]. Die Sequenz dieses Gens wird von F. van Straaten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 3183–3187, beschrieben.

[0072] Das XHF-Gen codiert die Collagenase und wird durch Mitogenese, zu Entzündungen führende Mittel, UV-Strahlen und ferner als Antwort auf den Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) aktiviert. Die Sequenz dieses Gens wird von P. Angel et al., Mol. Cell Biol. 7 (1987), 2256–2266, beschrieben.

[0073] Das GADD153-Gen wird als Antwort auf Wachtums-blockierende Signale und DNA-schädigende Mittel exprimiert [J. D. Luethy und N. J. Holbroock, Cancer Res. 52 (1992), 5–10]. Die Sequenz dieses Gens wird von A. J. Fornace et al., Mol. Cell Biol. 9 (1989), 4196–4203, beschrieben.

[0074] TRE ist das TPA-Response-Element. Es antwortet auf durch Phorbolester induzierten DNA-Streß. Die Sequenz von TRE wird von P. Angel et al., Cell 55 (1988), 875–85, beschrieben.

[0075] p53RE ist das p53-Response-Element. Es antwortet auch auf DNA-Streß und wird durch Röntgenstrahlen und MMS induziert. Die Sequenz des p53RE wird von Q. Zahn et al., Mol. Cell Biol. 13 (1993), 4242–4250, beschrieben.

[0076] Weitere Promotoren, die auf DNA-Streß antworten und in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits verwendet werden können, sind nachstehend in Tabelle 2 aufgelistet. In der folgenden kurzen Beschreibung aller dieser Gene wird das die DNA-Sequenz des bestimmten Gens beschreibende Dokument in Klammern angegeben.

[0077] Das EGR-1-Gen codiert einen frühen Wachstums-Response-Faktor und wird durch Mitogenese und

Phosphatase-Inhibitoren induziert [S. V. Suggs, Nucl. Acids Res. 18 (1990), 4283–89]. Das GAS 2,3-Gen ist ein auf Wachstumsstillstand antwortendes Gen [C. Schneider et al., Cell 54 (1988), 787–793). Das MGMT codiert eine O-6-Methylguaninmethyltransferase und wird durch alkylierte DNA induziert [K. Tano et al., Prop. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 686–90]. DNA-Pol codiert die DNA-Polymerase A und wird durch Mitogene induziert. TK (das die Thymidinkinase codiert) [H. D. Bradshaw Jr. et al., Mol. Cell Biol. 4 (1984), 2316–20], DHFR (das die Dihydrofolatreduktase codiert) [C. Morandi, J. Mol. Biol. 156 (1982), 583–607] und PCNA (das das Kernantigen von proliferierenden Zellen codiert) [D. Jaskulski et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 10175–79] werden jeweils durch Zellproliferation induziert. PGHS codiert die Prostaglandin-Endoperoxidasesynthase und wird durch Mitogene induziert [S. A. Kraemer et al., Arch. Biochem. Biophys. 293 (1992), 391–400]. LOX codiert eine 5/12-Lipoxygenase und wird durch Exposition gegen den Tumornekrosefaktor aktiviert [P. A. Dixon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 416-20]. ISG15, das ein Interferon-stimuliertes Gen ist, wird durch α-Interferon induziert [N. Reich et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 6394–98]. 2'-5' AS, das die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase codiert, wird durch β-Interferon induziert [M. Walthelet et al., FEBS Lett. 196 (1986), 113–20]; das vorstehend beschriebene EH enthält einen DNA-Streß-empfindlichen Bestandteil, der durch Carcinogene aktiviert wird. CYP2E1 enthält ein auf Dimethylnitrosamin antwortendes DNA-Streß-empfindliches Element. TPO1 und TPO2 codieren Topoisomerasen und werden durch DNA-Strangbrüche und Stoffe, die eine Promotorrekombination bewirken, induziert [P. D'arpa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 2543–47, und M. Tsai-Pflufelder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 7177–81]. Das vorstehend ebenfalls beschriebene PPa antwortet auf durch einen DNA-Schaden verursachten DNA-Streß. DRA codiert HLA Klasse II-Antigene und wird durch Interferon gamma induziert [A. J. Korman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 6013–17, und D. A. Shackelford et al., Immunol. Rev. 66 (1982), 133–187]. Der vorstehend beschriebene MnSOD-Promotor enthält ferner ein auf DNA-Streß antwortendes Element, das durch den Tumor-Nekrose-Faktor induziert wird. Das MDR-1-Gen codiert ein Protein, das eine Resistenz gegen mehrere Wirkstoffe verleiht und im wesentlichen durch hydrophobe cytotoxische Wirkstoffe induziert wird [J. A. Silverman et al., Gene 106 (1991), 229-236]. Das beta-pol-Gen codiert das DNA-Reparaturenzym DNA-Polymerase-beta und antwortet auf N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), Mechlorethaminhydrochlorid (HN2) und cis-Platinum(II)diamindichlorid (cis-Pt) [S. G. Widen et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 16992–98]. Das Stromelysin-1-Gen codiert ein Protein, das durch Phorbolester wie PMA induziert wird [K. L. Sirum et al., Biochemistry 28 (1989), 8691–98]. Das PCNA-Gen codiert das Kernantigen von proliferierenden Zellen, das durch Tumorpromotoren induziert wird [S. Travali et al., J. Biol. Chem. 264 (1989), 7466–72].

[0078] Auf Proteinstreß antwortende Promotoren, die in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits verwendet werden können, werden vorzugsweise von GRP78, JUN, FOS, HSP70 und MTIIA ausgewählt.

[0079] Das GRP78-Gen codiert ein 78 kD-Protein, das ein Hauptbestandteil des endoplasmatischen Retikulums ist. GRP78 wird durch falsch gefaltete Proteine und die Glykosylierungshindernisse induziert [S. K. Wooden et al., Mol. Cell Biol. 11 (1991), 5612–23]. Die Sequenz dieses Gens wird von E. Resendez et al., Mol. Cell Biol. 5 (1985), 1212–19, beschrieben.

[0080] Die vorstehend beschriebenen JUN- und FQS-Gene enthalten beide auf Proteinstreß antwortende Elemente, die durch Hitze induziert werden.

[0081] Das HSP70-Gen codiert das Hitzeschockprotein 70 und wird durch Hitze, denaturierte Proteine, Aminosäureanaloge, Schwermetalle, Anoxien und Inhibitoren des Energie-Metabolismus induziert [D. D. Mosser et al., Mol. Cell Biol. 8 (1988), 4736-44]. Die Sequenz dieses Gens wird von C. Hunt und R. I. Morimoto, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 6455–59, beschrieben.

[0082] MT IIA, das Metallothionein IIA codiert, wird durch Schwermetalle und Glucocorticoide induziert [M. Karin et al., Nature 299 (1982), 797–802]. Die Sequenz dieses Gens wird im vorstehenden Dokument beschrieben.

[0083] Weitere Promotoren, die in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren zum Nachweis von Proteinstreß verwendet werden können, können von den nachstehend in Tabelle 2 aufgeführten Promotoren, die auf Proteinstreß antworten, ausgewählt werden. In der nachstehenden kurzen Beschreibung jedes dieser Gene wird das die DNA-Sequenz der jeweiligen Gene beschreibende Dokument in Klammern angegeben.

[0084] MT 1A [R. I. Richards et al., Cell 37 (1984), 263–72] und MT III [R. D. Palmitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 6333–37] codieren jeweils ein Metallothionein-Gen, das durch das Schwermetall Cadmium induziert wird. GP enthält ein Element, das auf das Protein-schädigende Schwermetall Selen antwortet.

[0085] Die bevorzugten auf Energie-/Ionenstreß antwortenden Promotoren und Response-Elemente in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits sind die Promotoren der FOS- und GRP78-Gene und das CRE-Response-Element.

[0086] Das vorstehend beschriebene FOS-Gen enthält das cAMP-Response-Element ("CRE") [W. J. Roesler et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 9063–9066].

[0087] Das ebenfalls vorstehend beschriebene GRP78-Gen enthält ein Energie-/Ionenstreß-Response-Element, das auf Calciumionophore antwortet.

[0088] CRE ist das cAMP-Response-Element. Es ist ein Energie-/Ionenstreß-empfindliches Response-Element, das auf erhöhte cAMP-Mengen antwortet [J. Roesler et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 9063–66].

[0089] Weitere in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendbare Energie-/Ionenstreß-Promotoren sind nachstehend in Tabelle 2 aufgelistet. In der folgenden kurzen Beschreibung von jedem dieser Gene wird das die DNA-Sequenz des jeweiligen Gens beschreibende Dokument in Klammern angegeben.

[0090] Zwei Cytochrom P450-Gene -- CYP11B2, das durch cAMP induziert wird, und CYP2E1, das durch Ethanol induziert wird, -- enthalten Energie-/Ionenstreß-Response-Elemente. 2'-5' AS enthält ein Element, das auf durch Ethanol induzierten Energie-/Ionenstreß antwortet. Sowohl DBH, das die Dopamin-β-Hydroxylase codiert [B. Grima, Nature 326 (1987), 707–11], als auch TH, das die Tyrosinhydroxylase codiert [A. Lamouroux et al., EMBO J. 6 (1987), 3921–37], werden durch Membrandepolarisation induziert. ODC, das die Ornithindecarboxylase codiert, wird durch osmotischen Schock induziert [N. J. Hickok et al., DNA 6 (1987), 179–87]. G6PD codiert die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und wird durch ATP-Mangel induziert. PKC enthält ein Energie-/Ionenstreß-Response-Element, das durch Na/K-ATPase-Mangel induziert wird. PVALB codiert Parvalbumin und wird durch Calciumionen induziert [C. Lutum et al., Genbank-Hinterlegungsnummer X63070]. Stromelysin-1 enthält ein Energie-/Ionenstreß-Response-Element, das durch Calcium-Ionophore induziert wird.

Tabelle 2

Weitere Säuger-Streßpromotoren

Promotor	Redox	DNA	Protein	Energie-/ Ionenstreß
UGT	X			
CYP11B2	X			X
Cu.ZnSOD	X			
MnSOD	X	X		
NMO 1	X			
ALDH 2	X			
ADPRT	X			
GP	X		X	
GAS 2,3		X		
EGR-1		X		
MGMT		X		
DNA Pol		X		
beta-pol		X		
DHFR		X		
TK		X		
PCNA		X		
PGHS		X		
LOX		X		
ISG15		X		
DRA		X		
MDR-1		X		
2'-5' AS		X		X
FAOxase	X			
PBE	X			
PPAR	X			
MT 1A/IIA			X	
TH				X
DBH				X
ODC				X
EH	X	X		
CYP2B2	X			

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Promotor	Redox	DNA	Protein	Energie-/ Ionenstreß
CYP2E1	X	X		X
CYP3A3	X			
P450b	X			
P450d	X			
TPO1/TPO2		X		
PPa	X	X		
G6PD				X
PKC	X			X
PVALB				X
Stromelysin-1		X		X
GST2	X			
GAPDH	X			
NQO	X			
PCNA		X		
ARE	X			

[0091] Da Response-Elemente nur von Promotoren, die sie aufgrund rekombinanter DNA-Verfahren enthalten, isoliert werden können, ist die Verwendung dieser Elemente in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren auf Promotor-heterologe Genkonstrukte verwendende Ausführungsformen beschränkt.

[0092] Zur funktionellen Verbindung mit einem heterologen Gen muß ein Response-Element zunächst mit einem Minimalpromotor ligiert werden. Ein Minimalpromotor bewirkt eine basale konstitutive Expression eines mit ihm funktionell verbundenen Gens. Bevorzugte Minimalpromotoren sind die SV40-, TK- oder β-Interferon-Minimalpromotoren. Diese Minimalpromotoren sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Dieses Minimalpromotor/Response-Element-Konstrukt wird anschließend mit dem heterologen Gen durch gut bekannte DNA-Rekombinationsverfahren funktionell verbunden.

[0093] Viele der vorstehend beschriebenen Promotoren oder funktionellen Äquivalente davon sind in anderen Eukaryonten wie Nematoden, Hefe, Insekten, Reptilien, Amphibien und Pflanzen vorhanden.

[0094] Hefe enthält beispielsweise das Metallothioneingen CUP, das auf durch Exposition gegen Schwermetalle induzierten Proteinstreß antwortet [T. R. Butt et al., Gene 27 (1984), 23–33, und T. R. Butt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 3332–36]. Hefe enthält ferner Äquivalente der Gene HSP70 und GRP 78 [E. A. Craig, Stress Proteins In Biology And Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1990), 301–21, W. R. Boorstein et al., J. Biol. Chem. 265 (1990), 18912–21, und M. D. Rose et al., Cell 57 (1990), 1211–21]. Alkoholdehydrogenasen, eine Familie von Hefegenen, die durch Alkohol, einem Energie-/Ionenstreß, induziert werden, wurden ebenfalls sequenziert [T. Young et al., Basic Life Sci. 19 (1982), 335–361].

[0095] Ferner wurde eine große Zahl von DNA-Streßgenen in Hefe identifiziert und sequenziert. Diese schließen MAG, die Methyladenin-DNA-Glycosylase und MGT1, die auf eine Schädigung durch DNA-Alkylierung antworten [W. Xiao et al., Mol. Cell Biol. 13 (1993), 7213–21]; RAD51, RAD54, RAD6, RAD23, RAD2, RAD18 und RAD7, die alle auf DNA-Strangbrüche antworten, [G. Basile et al., Mol. Cell Biol. 12 (1992), 3235–46, G. M. Cole et al., Mol. Cell Biol. 9 (1989), 3314–3326, K. Madura et al., Nucleic Acids Res. 18 (1990), 771–78, Nucleic Acids Res. 18 (1990), 4737–42, K. Madura et al., J. Bacteriol. 166 (1990), 914–23, J. S. Jones et al., Nucleic Acids Res. 19 (1991), 893–98, J. S. Jones et al., Nucleic Acids Res. 18 (1990), 3281–85]; das durch DNA-schädigende Stoffe induzierte PHR1 [J. B. Sebastion et al., Mol. Cell Biol. 10 (1990), 4630 37]; die durch eine Schädigung der DNA induzierten Hefe-Ribonucleotid-Reduktasen RNR2 und RNR3 [S. J. Elledge et al., Mol. Cell Biol. 9 (1989), 5373–86, S. J. Elledge et al., Gene Dev. 4 (1990), 740–51, Z. Zhou et al., Genetics 131 (1992), 851–66]; die Hefe-DNA-Ligase CDC9 [T. A. Peterson et al., Mol. Cell Biol. 5 (1985), 226–35]; UBI4, ein weiteres auf eine DNA-Schädigung antwortendes Gen [J. M. Treger et al., Mol. Cell Biol. 8 (1988), 1132–36]; und DDR48, ein auf Mutagene antwortendes Gen [J. M. Treger et al., Mol. Cell Biol. 10 (1990), 3174–84], ein Ferner wurden mehrere weitere DNA-Streßgene ebenfalls in Hefe identifiziert [G. W. Robinson et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 1842–46, S. W. Ruby et al., Mol. Cell Biol. 5 (1985), 75–84, E. C. Friedberg, Microbiol. Rev. 52 (1988), 70–102, und T. McClanahan et al., Mol. Cell Biol. 4 (1984), 2356–2363].

[0096] Die geeignete Kombination von einem von oder allen diesen Promotoren sowie von weiteren bekannten Hefe-Streßpromotoren kann in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits verwendet werden. Es ist selbstverständlich, daß bei der Verwendung von Hefe-Streßpromotoren Hefe-Wirte bevorzugt sind und unter für diesen Wirt geeigneten Bedingungen gezüchtet werden müssen. Diese Bedingungen sind auf dem Fachgebiet gut bekannt.

[0097] Die am meisten bevorzugten Kits und Verfahren, die die Reportergen-Expression zum Nachweis der Toxizität verwenden, enthalten die folgenden Streßpromotoren und Response-Elemente: CYP1A1, GST Ya, GADD45, FOS, XHF, HSP70, MT IIA, GADD153, CRE, XRE, NFkBRE, RARE und p53RE.

[0098] Die erfindungsgemäßen diagnostischen Kits und Verfahren beruhen auf der Induktion von spezifischen Streßpromotoren oder Streß-Response-Elementen und der Transkription und/oder Translation eines damit funktionell verbundenen Gens.

[0099] Für erfindungsgemäße Ausführungsformen, die ein heterologes Gen verwenden, das mit einem Säuger-Streßpromotor oder Streß-Response-Element funktionell verbunden ist, gibt es für die Wahl des Gens im wesentlichen keine Einschränkung. Die einzigen erforderlichen Parameter sind (1), daß eine das nachweisbare Produkt codierende DNA-Sequenz charakterisiert wurde, und (2) daß das Produkt des Gens nachgewiesen werden kann. Eine ausreichende Charakterisierung schließt die Kenntnis der vollständigen codierenden Sequenz, Verfügbarkeit eines genomischen Clons oder Kenntnis einer ausreichenden Zahl von Restriktionsstellen in der genomischen DNA-Sequenz ein, so daß das Gen manipuliert werden kann, um eine funktionelle Verbindung mit dem Streßpromotor zu erzeugen.

[0100] Die Promotoren der meisten Säuger-Streßgene können durch mehr als eine Art von Streß induziert werden. Dies ist so, da diese Promotoren in ihrer Sequenz eine Reihe von Streß-Response-Elementen enthalten, von denen jedes auf eine andere Art von Streß antwortet. Für Ausführungsformen, die diese multiplen Streßpromotoren verwenden, wird notwendigerweise auch ein anderer nur auf einen der multiplen Stressarten antwortender Promotor verwendet. Dies trifft zu, ungeachtet der Verwendung von nativen Promotorgensystemen oder von rekombinanten Fusionen aus Promotor und nachweisbarem Gen. Der HMO-Promotor und der JUN-Promotor werden beispielsweise sowohl durch Peroxide als auch UVA-Strahlen induziert. Daher antworten diese Promotoren sowohl auf Redoxstreß als auch auf DNA-Streß. Ein NMO1-Promotor, der nur auf oxidativen Streß antwortet, kann zusammen mit einem HMO- oder JUN-Promotor verwendet werden. Durch diese Kombination von Promotoren kann ermittelt werden, ob die Induktion des multiplen Streßpromotors durch Redoxstreß oder UVA-Licht bewirkt wird. So kann die Natur des durch eine Verbindung bewirkten Stresses genauer ermittelt werden.

[0101] Gemäß einer anderen erfindungsgemäßen Ausführungsform können einzelne Response-Elemente eines Promotors isoliert und anschließend mit einem Säuger-Minimalpromotor und einem ein nachweisbares Produkt codierenden Gen funktionell verbunden werden. So wird die Expression des nachweisbaren Produkts in Gegenwart einer Verbindung mit nur einer bestimmten Art von Streß in Zusammenhang gebracht.

[0102] In Ausführungsformen, die ein ein nachweisbares Produkt codierendes Gen verwenden, ist das nachweisbare Produkt vorzugsweise β-Galactosidase (vom lacZ-Gen codiert), Chloramphenicolacetyltransferase (vom CAT-Gen codiert), Galactokinase (vom galK-Gen codiert), β-Glucosidase (vom gus-Gen codiert), Glutathiontransferase, menschliches Wachstumshormon (vom hGH-Gen codiert) oder Glühwürmchen-Luciferase (vom lux-Gen codiert). Am meisten bevorzugt wird das CAT-Gen verwendet.

[0103] Die im Wirt enthaltenen Fusionen aus Streßpromotor und nachweisbarem Produkt, die in bestimmten erfindungsgemäßen diagnostischen Kits und Verfahren verwendet werden, können unter Verwendung von auf dem Fachgebiet gut bekannten Standard-DNA-Rekombinationsverfahren hergestellt werden. Die Wahl der Verfahren hängt davon ab, was über den bestimmten im Stamm zu verwendenden Streßpromotor bekannt ist.

[0104] Wenn ein genomisches Fragment, das einen Streßpromotor und sein Gen enthält, isoliert oder in einen Vektor cloniert wurde, wird der Promotor durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen entfernt. Das Promotorfragment wird anschließend isoliert und mit einem ein nachweisbares Produkt codierenden Gen in einem Plasmid funktionell verbunden. Der Vektor muß ferner einen Marker wie Neo zur Identifizierung von stabilen Transfektanten enthalten. Das Durchmustern auf eine funktionelle Fusion erfolgt durch Exposition von

Transfektanten gegen einen Streß, der bekanntermaßen den spezifischen Streßpromotor induziert, und durch Testen auf das nachweisbare Genprodukt.

[0105] Wenn die Nucleotidsequenz des Streßpromotors und seines Gens bekannt ist, kann das Polymerasekettenreaktionsverfahren zur Herstellung von nachweisbaren Proteinfusionen verwendet werden. Genauer gesagt werden Primer synthetisiert, die zu den 5'- und 3'-Enden des Streßpromotor-Teils des Gens komplementär sind, diese Primer mit denaturierter, vollständiger Säuger-DNA unter geeigneten Bedingungen hybridisiert und die PCR durchgeführt. So können clonierbare Mengen jedes sequenzierten Streßpromotors erhalten werden. Nach Erhalt wird die Streßpromotor-DNA mit einer ein nachweisbares Protein codierenden DNA in einem geeigneten Vektor funktionell verbunden, wie vorstehend beschrieben. Diese Verfahren sind auf dem Fachgebiet gut bekannt.

[0106] Die Konstruktion von funktionellen Fusionen von Streßpromotor-Response-Elementen an ein ein nachweisbares Produkt codierendes Gen wird auch durch Standard-DNA-Rekombinationsverfahren durchgeführt. Da Response-Elemente klein sind, kann die sie codierende DNA unter Verwendung eines Oligonucleotidsynthesegeräts produziert werden. Beiden Strängen des Response-Elements entsprechende Oligonucleotide werden synthetisiert, miteinander aneliert und in ein Plasmid cloniert, das ein Reportergen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors enthält. Alternativ können die doppelsträngigen Oligonucleotide durch Selbstligierung vor der Insertion in einen Vektor multimerisiert werden. Die multiplen Kopien des Response-Elements ermöglichen eine höhere Expression des nachweisbaren Produkts nach der Streßinduktion.

[0107] Erfindungsgemäße Ausführungsformen, die native Streßgene wie die ein nachweisbares Produkt codierenden Gene verwenden, müssen vor dem Toxizitätstest nicht genetisch manipuliert werden.

[0108] Die Wahl der in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendeten Zellinie hängt von dem zur Ermittlung der Toxizität verwendeten Test ab. Für die Ausführungsformen, die Fusionen aus Streßpromotor und nachweisbarem Produktgen verwenden, müssen die Zellen das Expressionsprodukt in nachweisbarer Form produzieren können. Diese Zellen dürfen ferner das nachweisbare Produkt nicht von einer anderen Kopie des Gens in ihrem Genom konstitutiv produzieren.

[0109] Für Ausführungsformen, die die nativen Streßgene des Zellen verwenden, beruht die Wahl von Zellen auf der Fähigkeit dieser Gene, durch Streß induziert zu werden. Bevorzugte Zellen für Ausführungsformen, die keine Zelloberflächenrezeptor-vermittelten Streßpromotoren verwenden, sind HeLa-, HepG2- und WIL-2-Zellen. Für die Kits und Verfahren, die Zelloberflächenrezeptor-vermittelte Streßpromotoren verwenden, wird eine von dem interessierenden Organ stammende Zellinie bevorzugt. Wenn beispielsweise die Streß-Kits und -Verfahren Haut-angreifende Verbindungen identifizieren sollen, sind eine Haut-Fibroblasten- oder Keratinocyten-Zellinie wie SCC12 oder ihre Derivate wie C6C1 bevorzugt. Für Kits und Verfahren, in denen Augentoxine identifiziert werden sollen, ist eine Hornhautzellinie am meisten bevorzugt.

[0110] Bei der Verwendung von Fusionen aus Streßpromotor und nachweisbarem Produkt wird es vorgezögen, daß jeder Wirt, der in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendet wird, nur eine solche Fusion enthält. Wenn daher eine Verbindung die Expression des nachweisbaren Genprodukts in einer bestimmten Wirtszelle induziert, kann die durch die Verbindung bewirkte spezifische Art von Streß zweifelsfrei identifiziert werden.

[0111] Es ist bekannt, daß einige Verbindungen in ihrer nativen Form für Säuger nicht toxisch sind, jedoch nach Umwandlung durch die Leber toxisch werden. Daher muß gemäß einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform die in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits zu testende Verbindung mit einem S9-Leberextrakt vorbehandelt werden. Verfahren zur Herstellung eines S9-Leberextrakts ("S9") werden von S. Vennitt et al., in Mutagenicity Testing – A Practical Approach, S. Vennitt et al., (Hrsg.), IRL Press, Oxford, England, S. 52–57 (1984), beschrieben. S9 ist üblicherweise ein Rohhomogenat von Rattenleber mit durch Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit entfernten unlöslichen Partikeln, es kann jedoch auch von einer menschlichen oder einer anderen Säugerleber hergestellt werden. S9 wird mit der Testverbindung in einem NAD(P)H enthaltenden Kaliumpuffer inkubiert zur Nachahmung von Stadium I und II der Biotransformation von Verbindungen, die normalerweise durch die Säugerleber durchgeführt wird, vor der Durchführung des Toxizitätstests. Wenn jedoch primäre Säuger-Leberzellen in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendet werden, ist die S9-Vorbehandlung nicht erforderlich. Die Zellen können Stadium I und II der Biotransformation von Verbindungen unter Testwachstumsbedingungen durchführen.

[0112] Alternativ erfolgt die Züchtung der in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendeten Zellen

gemeinsam mit Zellen, die Stadium I und II der Biotransformation durchführen können, vorzugsweise mit einer primären Leberzellinie. Die Biotransformation der getesteten Verbindung wird in diesem Fall durch diese anderen Zellen statt durch von Leberzellen stammenden Enzymfraktionen durchgeführt.

[0113] Vor der Durchführung eines Tests auf eine Verbindung von unbekannter Toxizität unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren und Kits müssen Eichkurven unter Verwendung von mindestens einer und vorzugsweise mindestens drei Verbindungen erzeugt weiden, von denen bekannt ist, daß sie jeden spezifischen Streßpromotor oder jedes spezifische Response-Element, das (der) zum Durchmustern der unbekannten Verbindung verwendet wird, induzieren.

[0114] Jede bekannte Chemikalie muß stärker bevorzugt gegen alle Promotoren, nicht nur gegen den Promotor, den sie bekanntermaßen induziert, getestet werden. Und jede Chemikalie muß zur Bereitstellung einer geeigneten Eichkurve über einen ausreichend weiten Konzentrationsbereich, vorzugsweise 1 picomolar bis 1 millimolar, sowie zu mehreren Zeitpunkten getestet werden.

[0115] Nach der Erstellung der Eichkurven wird eine diese Kurven enthaltende Computer-Datenbank angelegt. Diese Datenbank wird anschließend verwendet, um die Streßpromotorinduktionsprofile der zu testenden Verbindungen mit denen der zur Erstellung der Eichkurve verwendeten bekannten Toxine zu vergleichen. Daher werden die Ergebnisse für jede nicht-getestete Verbindung als relative Toxizität im Vergleich zu bekannten Induktoren von Streßpromotoren ausgedrückt.

[0116] Alle erfindungsgemäßen Charakterisierungs- und Toxizitätsbestimmungsverfahren umfassen als ersten Schritt die Züchtung der Zellen sowohl vor als auch nach der Exposition gegen eine potentielle toxische Verbindung. Die Kulturbedingungen variieren je nach verwendetem Zelltyp. Am meisten bevorzugt werden unsterbliche menschliche Leberzellen (HepG2) verwendet. Die Züchtung dieser Zellen wird unter Standardgewebekulturbedingungen -- essentielles Minimalmedium bei 37°C und 5% CO_2 -- durchgeführt. Die Zellen werden üblicherweise in 165 cm^2-Kolben bis zum Erreichen einer Dichte von etwa 5×10^6 Zellen/ml gezüchtet.

[0117] Nach dieser anfänglichen Züchtung werden die Zellen subkultiviert und gegen die zu testende Verbindung exponiert. Ein typischer Test verwendet etwa $2{,}75 \times 10^5$ Zellen/ml. Für anfängliche Tests auf eine Verbindung muß eine Reihe von 10fach-Verdünnungen der Verbindung verwendet werden. Eine weitere Reihe von Verdünnungen der Verbindung, die mit der S9-Fraktion vorinkubiert wurden, müssen auch hergestellt und einem zweiten Teil jeder Kultur zugesetzt werden. Ein dritter Teil jeder Kultur, der als Kontrolle dient, wird nicht gegen die Verbindung exponiert, jedoch sonst in der gleichen Weise wie nachstehend beschrieben behandelt.

[0118] Alle Kulturen läßt man anschließend bei normaler Wachstumstemperatur über einen Zeitraum von 5 Minuten bis 48 Stunden inkubieren. Stärker bevorzugt ist die Exposition gegen die toxische Verbindung oder Testverbindung etwa 2 bis 32 Stunden. Nach der Exposition gegen die Testverbindung wird die Menge des nachweisbaren Produkts oder der Streßgen-mRNAs gemessen.

[0119] Bei Verwendung der das nachweisbare Produkt messenden Ausführungsform kann die Quantifizierung mit mehreren auf dem Fachgebiet gut bekannten Verfahren durchgeführt werden. Beispielsweise kann ein kolorimetrisches Substrat verwendet werden, wenn das Expressionsprodukt ein Enzym ist. Geeignete kolorimetrische Substrate für bestimmte Enzyme sind auf dem Fachgebiet gut bekannt. Alternativ kann ein spezifische Antikörper verwendender Test wie der RIA oder ELISA zum Nachweis des Expressionsprodukts verwendet werden.

[0120] Je nach der Art des verwendeten Tests müssen die Pufferbedingungen der lysierten Kultur oder des Überstands gegebenenfalls eingestellt werden. Dementsprechend kann ein geeigneter Puffer der lysierten Kultur oder dem Überstand zugesetzt werden, so daß optimale Bedingungen für den jeweiligen Test erhalten werden. Wenn beispielsweise das nachzuweisende Produkt durch einen RIA- oder ELISA-Test nachgewiesen werden soll, müssen die Pufferbedingungen auf einen neutralen pH-Wert eingestellt werden, um eine maximale Antikörper-Antigen-Komplex-Bildung zu ermöglichen und die nicht-spezifische Antikörperbindung zu minimieren. Diese Bedingungen sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und bestehen beispielsweise letztendlich aus einem Puffer, der 50 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl und einen pH-Wert von 7,0 aufweist. Wenn das nachzuweisende Produkt ein Enzym ist und der Nachweis durch einen kolorimetrischen Substrattest erreicht werden soll, müssen die Pufferbedingungen für eine maximale Enzymaktivität und eine minimale nicht-katalytische Spaltung des Substrats optimiert werden. Diese Bedingungen sind üblich und variieren je nach dem zu testenden Enzym.

[0121] In der am meisten bevorzugten Ausführungsform dieses erfindungsgemäßen Gesichtspunkts. ist das nachzuweisende Produkt die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT). Tests auf dieses Enzym sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und werden von J. Sambrook et al., "Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), 16.60–16.65, beschrieben. Dieses Dokument beschreibt ferner Tests auf die β-Galactosidase, einem weiteren nachzuweisenden Produkt, das in den erfindungsgemäßen Verfahren und Kits verwendet werden kann (S. 16.66–16.67).

[0122] In Ausführungsformen, die zur Ermittlung der Streßgeninduktion die Transkriptionsrate verwenden, müssen die mRNA-Mengen, die von Genen transkribiert werden, die mit den in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren verwendeten Streßpromotoren funktionell verbunden sind, gemessen werden ("Streßgen-mRNA"). Dies erfordert, daß die gesamte RNA oder mRNA von exponierten Zellen isoliert wird. Dies kann durch jedes der zahlreichen und gut-bekannten Verfahren erreicht werden. Im Handel erhältliche mRNA- oder Gesamt-RNA-Isolations-Kits, wie sie von Stratagene [La Jolla, CA] erhältlich sind, können ebenfalls verwendet werden. Vorzugsweise werden die Zellen mit Guanidiniumisothiocyanat (GTC) lysiert. Das Lysat wird anschließend mit Natriumacetatpuffer (pH 5,2) angesäuert und die Verunreinigungen mit Phenol extrahiert. Die RNA wird anschließend zweimal mit Ethanol ausgefällt, getrocknet und in Wasser erneut gelöst.

[0123] Nach der Isolierung der RNA kann die Streßgen-mRNA-Menge durch zahlreiche Verfahren entweder direkt oder indirekt gemessen werden. Im direkten Verfahren werden zu Streßgen-mRNA komplementäre Oligonucleotide verwendet. In diesem Verfahren wird die aus den Zellen isolierte mRNA auf Nitrocellulosepapier oder Nylonmembranfilter in einem "Slot-Blot"-Gerät aufgetragen. Nach der Verdünnung der RNA in dem Gerät mit einer geeigneten Salzlösung (vorzugsweise zwei Volumina von 20 × SSC) und Waschen der "Schlitze" wird das Nitrocellulosepapier oder -filter entweder 2 Stunden bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken oder durch UV-Strahlen vernetzt, um die RNA zu fixieren. Die an die Nitrocellulose fixierte RNA wird anschließend mit markierten, zu den Streßgen-mRNAs komplementären Oligonucleotidsonden unter geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen hybridisiert.

[0124] Ein indirektes Verfahren verwendet zum Nachweis Streßgen-mRNA-homologe Oligonucleotide. Dieses Verfahren mißt die Transkription unter Verwendung der Streßgen-mRNAs als Matrizen zur Herstellung von markierter einzelsträngiger cDNA durch reverse Transkription. Diese cDNAs werden anschließend durch Hybridisierung mit an einen festen Träger gebundenen komplementären Oligonucleotiden (oder denaturierten doppelsträngigen cDNAs) nachgewiesen und quantitativ bestimmt.

[0125] Der feste Träger ist vorzugsweise eine negativ geladene Membran, und die Oligonucleotide werden vor der Bindung an die Membran durch Anfügen eines positiv geladenen Amidits oder einer positiv geladenen Aminogruppe am 3'-Ende modifiziert. Durch diese 3'-terminale Modifikation kann das Oligonucleotid nur über sein 3'-Ende an die Membran binden, was eine effizientere Hybridisierung als andere Verfahren der Bindung von DNA an einen festen Träger ermöglicht.

[0126] In jedem Verfahren wird auch eine Kontrolle verwendet, die ein nicht durch die spezifische experimentelle Probe induziertes konstitutiv exprimiertes "Housekeeping-Gen" wie β-Globin, β-Tubulin, β-Actin oder γ-Actin exprimiert. Dies liefert eine Kontrolle für richtiges Wachstum und Funktionieren der Zellen sowie den Hintergrundstandard, auf dem das Ausmaß der spezifischen Induktion berechnet wird. Nach der Hybridisierung wird die Menge der Hybridisierung quantitativ bestimmt. Die quantitative Bestimmung wird durch ein Verfahren erreicht, das mit dem Marker des Oligonucleotids oder der cDNA übereinstimmt. Bei Verwendung eines Radioisotops als Marker sind die Exponierung der Membran gegen einen Röntgenfilm mit einer anschließenden densitometrischen Aufzeichnung oder Flüssigszintillationszählung die bevorzugten quantitativen Bestimmungsverfahren. Bei Verwendung eines fluoreszierenden Markers wird zur quantitativen Bestimmung ein Fluorometer verwendet. So kann das Maß von verschiedenen Streßgeninduktionen gemessen werden. Bei Verwendung eines biotinylierten Markers wird die quantitative Bestimmung unter Verwendung von Streptavidin erreicht, das mit einem Enzym konjugiert ist, durch das ein meßbares kolorimetrisches Produkt erhalten werden kann.

[0127] Es ist bekannt, daß während einzelne Verbindungen nicht toxisch sein müssen, Kombinationen von nicht-toxischen Verbindungen toxisch sein können. Daher ist es klar, daß die erfindungsgemäßen Kits und Verfahren auch zur Ermittlung der potentiellen Toxizität von Kombinationen von bekannten und unbekannten Verbindungen (z. B. Arzneimittelinteraktionen), so wie vorstehend beschrieben, verwendet werden können.

[0128] Schließlich stellt die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der Entwicklung von Arzneimitteln bereit. Gemäß dieser Ausführungsform wird ein neues Arzneimittel zunächst mit allen vorstehend beschriebenen

Kits und Verfahren getestet und seine Toxizität ermittelt. Die von diesen Verfahren und Kits gelieferte Information zeigt den zellulären Mechanismus der Arzneimittel-Toxizität. Der Teil des Arzneimittels, der wahrscheinlich die bestimmte angegebene Zellschädigung bewirkt, kann anschließend je nach der Rolle, die der Teil für die pharmazeutische Aktivität des Arzneimittels spielt, geeignet modifiziert oder eliminiert werden. Das erhaltene modifizierte Arzneimittel wird anschließend mit den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren erneut getestet, um festzustellen, ob seine Toxizität ausreichend reduziert oder beseitigt wurde.

[0129] Zum besseren Verständnis des hier beschriebenen Erfindung werden die nachstehenden Beispiele vorgebracht. Es ist selbstverständlich, daß diese Beispiele die Erfindung erläutern und nicht so ausgelegt werden sollen, daß sie diese Erfindung in irgendeiner Weise einschränken.

[0130] Bestimmte der nachstehend beschriebenen grundlegenden molekularbiologischen Verfahren werden nicht genauer beschrieben. Diese Verfahren sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und werden in der Offenbarung Molecular Cloning - A Laboratory Manual Second Edition, J. Sambrook et al., Hrsg., Cold Spring Harbor Laborstory Press, New York (1989), beschrieben.

Beispiel 1

Entwicklung und Synthese von Streßgen-spezifischen Oligonucleotidsonden

[0131] Die Nucleotidsequenz von jedem der hier beschriebenen Streßgene ist bekannt. Daher hängt die Entwicklung von spezifischen Oligonucleotiden einfach von der Wahl des zu modifizierenden Teils des Gens ab. Das Computerprogramm OLIGO ermöglicht die Eingabe der Nucleotidsequenz des interessierenden Gens und die Analyse der Sequenz zur Ermittlung von Position, Länge und Zusammensetzung von Oligonucleotiden, die mit der interessierenden Sequenz bei vom Anwender gewählten Salzkonzentrationen und Temperaturen hybridisieren. Unter Verwendung dieses Programms wurden die nachstehenden Streßgen-spezifischen komplementären. Oligonucleotide zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren entwickelt:

GADD 153-Gen: [SEQ ID No. 1] 5'-AAAAAAACCCAGTCCAACTA
CAGACATGGCAGCTGAGTCCCTGCCATTCACCTTGGAGACGGTGTTTTTT-3';
XHF1-Gen: [SEQ ID No. 2] 5'-AAAAAAGGCCAGTATGCACAGC
TTTCCTCCACTGCTGCTGCTGCTGTTCTGGGGTGTGGTGTCTTTTTT-3';
JUN-Gen: [SEQ ID No. 3] 5'-AAAAAACCCCAAGATCCT
GAAACAGAGCATGACCCTGAACCTGGCCGACCCAGTTTTTT-3';
MnSOD-Gen: [SEQ ID No. 4] 5'-AAAAAACAACCTGAAC
GTCAACGAGGAGAAGTACCAGGAGGCGTTGGCCAAGGGAGATTTTTT-3';
HMO-Gen: [SEQ ID No. 5] 5'-AAAAAATAGAGCGTCCGCA
ACCCGACAGCATGCCCCAGGATTTGTCAGAGGCCCTTTTTT-3';
GST Ya-Gen: [SEQ ID No. 6] 5'-AAAAAAGGAGTTGGGAGCTG
AGTGGAGAAGAAGCCACGACTCTCGCTAGGTCAGTACTCTTTTTT-3';
HSP70-Gen: [SEQ ID No. 7] 5'-AAAAAAGCCGCGGCAGTCG
GCATCGACCTGGGCACCACCTACTCCTGCGTGGGGGTGTTCCAATTTTTT-3'
MDR-1-Gen: [SEQ ID No. 8] 5'-AAAAAAATTACAGCAAGCC
TGGAACCTATAGCCCCTTTAACTTGAGCAGCATCATTTTTTTT-3'
CYP-1A1-Gen: [SEQ ID No. 9] 5'-AAAAAACATTCAGGGAAGG
GTTGGGTAGGTAGCGAAGAATAGGGATGAAGTCAGCTTTTTTT-3'

FOS-Gen: [SEQ ID No. 10] 5'-AAAAAAATGCTGGAGAAGG
AGTCTGCGGGTGAGTGGTAGTAAGAGAGGCTATCCCCTTTTTT-3'

NMO1-Gen: [SEQ ID No. 11] 5'-AAAAAAGGAATCTCATTTT
CTAGCTTTGATCTGGTTGTCAGTTGGGATGGACTTGCTTTTTT-3'

ALDH2-Gen: [SEQ ID No. 12] 5'-AAAAAACCTCTTGCTTCCC
CGTGTTGATGTAGCCGAGGATCTTCTTAAACTGAGTTTTTTTT-3'

DRA-Gen: [SEQ ID No. 13] 5'-AAAAAACAGTGGTCAATGTCA
CGTGGCTTCGAAATGGAAAACCTGTCACCACAGGATTTTTT-3'

MGMT-Gen: [SEQ ID No. 14] 5'-AAAAAAGGATTGTGAAATG
AAACGCACCACACTGGACAGCCCGTTGGGGAAGCTGGAGCTGTCTTTTTT-3'

2'-5'-AS-Gen: [SEQ ID No. 15] 5'-AAAAAATTCTTACAATTTT
GGTACCAGTGCTTGACTAGGCGGATGAGGCTCTTGAGTTTTTT-3'

DHFR-Gen: [SEQ ID No. 16] 5'-AAAAAAAGTCTTGCATGATCCTT
GTCACAAATAGTTTAAGATGGCCTGGGTGATTCTTTTTT-3'

Cu.ZnSOD-Gen: [SEQ ID No. 17] 5'-AAAAAACCAGCACCCCGTCT
CCGCGACTACTTTATAGGCCAGACCTTTTTT-3'

ALDHA1-Gen: [SEQ ID No. 18] 5'-AAAAAAAACCGTACTCTCC
CAGTTCTCTTCCATTTCCAGACATCTTGAATCCACCATTTTTT-3'

TK-Gen: [SEQ ID No. 19] 5'-AAAAAAGAGTGTCTTTGGC
ATACTTGATCACCAGGCACTTGTACTGAGCAATCTGGTTTTTT-3'

PVALB-Gen: [SEQ ID No. 20] 5'-AAAAAAAAACACCTTCTTC
ACATCATCCGCACTCTTTTTCTTCAGGCCGACCATTTTTTTTT-3'

TH-Gen: [SEQ ID No. 21] 5'-AAAAAAGAAGCTCTCAGACAC
GAAGTAGACTGACTGGTACGTCTGGTCTTGGTAGGTTTTTT-3'

EH-Gen: [SEQ ID No. 22] 5'-AAAAAATCTAGAATATAGG
CAGCCAGACCCACAGGAGAGTCATTCAGAGCAGAGCCTTTTTT-3'

TOP1-Gen: [SEQ ID No. 23] 5'-AAAAAAGATAGCGCTCTTCTTC
CCACCATTTCCACTTCTGTTCCTCTTCTTTCTTCTTTTTT-3'

TOP2-Gen: [SEQ ID No. 24] 5'-AAAAAAGCCTCTGCCAGTTTTTCTT
CAGTCATCTTCACAACAAATTTCACAGTGGTTTTTTT-3'

MT 1A-Gen: [SEQ ID No. 25] 5'-AAAAAATCTCTTCCTTGCAG
GTGGCTCCTGCACCTGCACTGGCTCCTGCAAATGCAAAGAGTTTTTT-3'

[0132] Die Synthese der vorstehenden Oligonucleotide wurde, wie nachstehend beschrieben, durchgeführt. Das spezifische Oligonucleotid wurde unter Verwendung eines automatisierten Oligonucleotidsynthesegeräts [Model 392, Applied Biosystems, Foster City, CA] synthetisiert.

[0133] Es wurden ferner die nachstehenden Oligonucleotide, die zu den angegebenen Streßgen-mRNAs homolog sind, auf der Basis der beschriebenen Nucleotidsequenz der verschiedenen Gene oder cDNAs davon entwickelt:

ALDH1-Gen: [SEQ ID No. 26] 5'-AATTGCTATGGCGTGGTAAGTG
CCCAGTGCCCCTTTGGTGGATTCAAGAT-3'
CYP1A1-Gen: [SEQ ID No. 27] 5'-ATCTGAGTTCCTACCTGAACGGT
TTCTCACCCCTGATGGTGCTATCGACA-3'
FOS-Gen: [SEQ ID No. 28] 5'-GTACTCCCAGCTGCACTGCT
TACACGTCTTCCTTCGTCTTCACCT-3'
GADD153-Gen: [SEQ ID No. 29] 5'-AGGAGAATGAAAGGAAAGTGGC
ACAGCTAGCTGAAGAGAATGAACGGCTC-3'
GADD45-Gen: [SEQ ID No. 30] 5'-AGTCGCTACATGGATCAATGGGT
TCCAGTGATTAATCTCCCTGAACGGTG-3'
GAPDH-Gen: [SEQ ID No. 31] 5'-GTGGTGGACCTGACCTGCCGTCT
AGAAAAACCTGCCAAATATGATGACAT-3'
GST2-Gen: [SEQ ID No. 32] 5'-CAGCCCAAGGAAGCCTCCCATGG
ATGAGAAATCTTTAGAAGAAGCAAGGA-3'
HMO-Gen: [SEQ ID No. 33] 5'-CTTACACTCAGCTTTCTGGTGGCG
ACAGTTGCTGTAGGGCTTTA-3'
HSP70-Gen: [SEQ ID No. 34] 5'-AGAAGGACGAGTTTGAGCACAAG
AGGAAGGAGCTGGAGCAGGTGT-3'
JUN-Gen: [SEQ ID No. 35] 5'-GCTCAGGGAACAGGTGGCACAGC
TTAAACAGAAAGTCATGAACCACGTTA-3'
MDR1-Gen: [SEQ ID No. 36] 5'-GAAAGGCATCTATTTTTCAATGGT
CAGTGTCCAGGCTGGAACAAAGCGCC-3'
MT1A-Gen: [SEQ ID No. 37] 5'-GCACTGGCTCCTGCAAATGCAAA
GAGTGCAAATGCAACTCCTGCAAG-3'
MTIIA-Gen: [SEQ ID No. 38] 5'-CCCAGGGCTGCATCTGCAAAG
GGGCGTCGGACAAG-3'
NMO-Gen: [SEQ ID No. 39] 5'-ACCACTGTATTTTGCTCCAAGCAGC
CTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAG-3'
PCNA-Gen: [SEQ ID No. 40] 5'-ACAAAAGCCACTCCACTCTCTTCA
ACGGTGACACTCAGTATGTCTGCAGA-3'
NQO-Gen: [SEQ ID No. 41] 5'-TTGCTCTCGACAGTATCCACAAT
AGCTGACGGCTGGGTGTTTCAGTTTGA-3'

[0134] Es wurden ferner die folgenden Kontrolloligonucleotide entwickelt, die zu den "Housekeeping"-Gen-transkripten homolog sind:

ACTG (gamma-Actin)-Gen: [SEQ ID No. 42] 5'-ACCTTCCAGCA
GATGTGGATTAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTCG-3'
BTUB (beta-Tubulin)-Gen: [SEQ ID No. 43] 5'-TTGAGTGG
ATCCCCAACAATGTGAAAACGGCTGTCTGTGACATCCCACCT-3'.

[0135] Diese Oligonucleotide wurden jeweils an ihrem 3'-Ende durch Anfügen einer Aminogruppe modifiziert, so daß sie an eine negativ geladene Membran nur über ihr 3'-Ende binden konnten. Diese Oligonucleotide wur-

den auf Bestellung von Operon Technologies, Inc., Alameda, CA, synthetisiert.

[0136] Komplementäre und homologe Oligonucleotidsonden für alle anderen Streßgen-mRNAs, die in dieser Erfindung verwendet werden können, können unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Software in ähnlicher Weise entwickelt werden.

Beispiel 2 (Referenzbeispiel)

Toxizitätstest einer unbekannten Verbindung unter Verwendung von radioaktiv markierten Oligonucleotidsonden

I. Direkte quantitative Bestimmung der Streßgen-mRNA durch Hybridisierung mit Oligonucleotidsonden

[0137] Es ist wünschenswert zu wissen, ob die unbekannte Verbindung "X" toxisch ist, und wenn es so ist, welche Art von Schädigung sie bei Säugerzellen bewirkt.

[0138] HepG2-Zellen werden in 165 cm^2-Kolben, die ein minimales essentielles Medium (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) enthalten, bis zu einer Dichte von etwa 8×10^6 Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen werden anschließend durch Verdünnen auf 5×10^6 Zellen/ml subkultiviert und mit 10 ml/Platte plattiert. Mehrere Platten von jeder Subkultur werden gegen eine unterschiedliche Konzentration der Verbindung X (1 pM bis 1 mM in einer Reihe von 10fachen Verdünnungen) exponiert. Die Messenger-RNA wird aus den Subkulturen nach 2, 4, 8, 16 und 32 Stunden, wie nachstehend beschrieben, isoliert.

[0139] Das Medium wird durch Absaugen von den einzelligen Schichten entfernt, und die Zellen werden zweimal mit kalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Anschließend werden 2 ml kalte phosphatgepufferte Kochsalzlösung der einzelligen Schicht zugesetzt und ein "Gummipolizist" zum Auskratzen des Lysats in 15 ml Polypropylen-Einwegröhrchen verwendet. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNAzol B-Reagenzes (Biotecx Laboratories, Houston, TX) nach der Anleitung des Herstellers isoliert. Das RNA-Pellet wird getrocknet und in 10 µl Wasser erneut gelöst. Eine normale Ausbeute von RNA ist etwa 100 bis 200 µg/Platte.

[0140] Die RNA von allen Replika-Platten wird anschließend auf die 20 verschiedenen "Schlitze" eines Slot-Blot-Geräts, wie nachstehend beschrieben, aufgetragen. Das Slot-Blot-Gerät wird vor der Verwendung in 0,1 N NaOH gereinigt. Ein Stück Nitrocellulosepapier oder Nylonmembranfilter (0,45 µm Porengröße) wird kurz mit Wasser angefeuchtet und anschließend in 20 × SSC 1 Stunde bei Raumtemperatur eingeweicht. Das Filter wird anschließend in das Gerät gegeben. Die RNA-Probe von jeder Platte wird mit 20 µl 100% Formamid, 7 µl 37% Formaldehyd und 2 µl 20 × SSC vermischt, 15 Minuten bei 68°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

[0141] 20 µg RNA wird in jeden "Schlitz" des Geräts zusammen mit zwei Volumina 20 × SSC gegeben. Nach dem Durchtritt der Lösung durch das Filter werden die "Schlitze" zweimal mit 1 ml 10 × SSC gespült. Das Filter wird anschließend getrocknet und 2 Stunden bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken. Das Filter wird anschließend in Streifen geschnitten, so daß Proben, die gegen verschiedene Konzentrationen von X über verschiedene Zeiträume exponiert wurden, mit einzelnen Streßgen-spezifischen Sonden hybridisiert werden können. Ein Streifen wird für jede einzelne Sonde verwendet.

[0142] Die Hybridisierung der Streifen mit den einzelnen Oligonucleotidsonden wird unter gut bekannten Bedingungen für die RNA-DNA-Hybridisierung durchgeführt. Die Temperatur und die Salzkonzentration zur Hybridisierung mehrerer Sonden mit der RNA hängen von der Natur des Oligonucleotids ab. Diese Bedingungen können unter Verwendung von gut bekannten Formeln berechnet werden. Sonden für die nachstehenden Gene werden verwendet:
Nur Redoxstreß: CYP1A1, NMO1 und ALDH2;
Nur DNA-Streß: XHF, DRA, GADD153 und MDR-1;
Nur Proteinstreß: HSP70 und MT 1A;
Redox- und DNA-Streß: GST Ya, HMO und MnSOD;
Redox-, DNA- und Proteinstreß: JUN;
DNA-, Protein- und Energie-/Ionenstreß: FOS.

[0143] Nach der Hybridisierung werden die Streifen gewaschen, getrocknet und die. mRNA-Mengen auf einem von zwei Wegen quantitativ bestimmt. In einem Verfahren werden die Streifen gegen einen Röntgenfilm

exponiert und die Hybridisierung wird durch Densitometrie quantitativ bestimmt. Alternativ werden die Streifen in einzelne "Schlitze" gegeben, und es wird eine Szintillationszählung durchgeführt. Tatsächlich können beide Verfahren durchgeführt werden, wenn das erstere zuerst durchgeführt wird.

II. Indirekte quantitative Bestimmung der Streßgen-mRNA durch Hybridisierung von cDNA mit Oligonucleotidsonden

A. Vernetzung von Oligonucleotiden mit einer negativ geladenen Membran

[0144] Getrennt davon wurden zu den mRNAs der folgenden Streß- und "Housekeeping"-Gene homologe Oligonucleotide mit Biodyne C-Membranen (Fall Corporation, East Hills, New York) im wesentlichen unter Verwendung des von Y. Zhand et al., Nucleic Acids Res. 19 (1991), 3929–33, beschriebenen Verfahrens vernetzt:
Nur Redoxstreß: CYP1A1 und ALDH1;
Nur DNA-Streß: GADD153;
Nur Proteinstreß: HSP70;
Redox- und Proteinstreß: MTIIA;
Redox- und DNA-Streß: HMO;
Redox-, DNA- und Proteinstreß: JUN;
DNA-, Protein- und Energie-/Ionenstreß: FOS;
Kontrolle: γ-Actin.

[0145] Die Biodyne C-Membran wurde zunächst kurz mit 0,1 N HCl gespült. Anschließend wurde die Membran 15 Minuten mit frisch hergestellter 20% (Gew./Vol.) EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropylcarbodiimid) behandelt. Die Membran wurde anschließend mit H_2O gespült und auf ein 96 Vertiefungen aufweisendes Dot-Blot-Gerät gegeben. Die Aminogruppen modifizierten Oligonucleotide wurden anschließend in 0,5 M $NaHCO_3$ (pH 8,4) auf die Membran in separaten Vertiefungen unter Verwendung von Vakuum 15 min. aufgetragen. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung sollte 3 µl nicht übersteigen. Jedes einzelne Oligonucleotid wurde in vier benachbarte Vertiefungen gegeben.

[0146] Nach dem Auftragen der Oligonucleotide wurde die Membran mit 1 × TBS/0,1% Tween™-20 gespült und anschließend alle verbliebenen aktiven Gruppen auf der Membran durch Behandlung mit 0,1 N NaOH 10 min. gelöscht. Anschließend wurde die Membran mit dH_2O gespült, an der Luft getrocknet und die getrocknete Membran in einem versiegelten Plastikbeutel aufbewahrt.

B. Behandlung von Zellen und Isolierung von RNA

[0147] HepG2-Zellen werden in essentiellem Minimalmedium in 100 mm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von höchstens 80% gezüchtet. Die Kulturen werden anschließend gegen verschiedene Konzentrationen der Verbindung X exponiert und bei 37°C über den gewünschten Zeitraum inkubiert. Nach dem Absaugen der Medien werden die Zellen dreimal mit 10 ml einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung bei Raumtemperatur gewaschen. 5 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung werden anschließend der Zellkulturschale zugesetzt und die Zellen mit einem "Gummipolizisten" von der Schale abgekratzt und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen werden mit einem Hämocytometer gezählt und in einer Zentrifuge pelletiert. Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung wird abgegossen.

[0148] Wenn die Isolierung von Gesamt-RNA gewünscht wird, wird RNAzol B (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Wenn nur mRNA gewünscht wird, wird der Messenger RNA Isolation Kit (Stratagene Inc., La Jolla, CA) gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

3. Reverse Transkription und gegebenenfalls eine PCR mit Streß-spezifischen cDNAs

[0149] Die durch die vorstehend beschriebenen Verfahren isolierte Gesamt-RNA (50 µg) oder mRNA (2 µg) wird anschließend unter Verwendung von SUPERSCRIPT II (reverse Transkriptase) (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) und dem nachstehend beschriebenen Protokoll revers transkribiert.

[0150] Die RNA wird mit DEPC-H_2O und Oligo-dT-Primer in ein Microzentrifugenröhrchen gegeben. Die dem Reaktionsgemisch zugesetzte Menge DEPC-H_2O wird nach der Ermittlung der Volumina der anderen Reagenzien bestimmt. Der Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µl) wird so zugesetzt, daß das Volumen 10% des gesamten Endvolumens ist. Das Reaktionsgemisch wird 10 min. auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis schnell abgekühlt. Die nachstehend beschriebenen Bestandteile werden in der folgenden Reihenfolge zugesetzt: 5 × SUPER-

SCRIPT-Erststrangpuffer (20% des Gesamtvolumens); 0,1 M DTT (10% des Gesamtvolumens); 10 mM dNTP-Gemisch (5% des Gesamtvolumens) und SUPERSCRIPT II (5% des Gesamtvolumens). Das. Reaktionsgemisch wird kurz zentrifugiert und anschließend durch wiederholtes Pipettieren vermischt. Das Gemisch wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 2 µl RNAse A (10 mg/ml) werden anschließend dem Reaktionsgemisch zugesetzt und durch Pipettieren vermischt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wird ddH_2O zu einem Endvolumen von 450 µl zugesetzt. Die cDNA wird durch Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetat und anschließend von 1 ml 100% Ethanol ausgefällt. Das Gemisch wird anschließend 30 Minuten in einer Microzentrifuge bei 12 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die cDNA in 100 µl ddH_2O resuspendiert. 2 µl der resuspendierten cDNA werden anschließend entfernt und in einem Szintillationszähler gemessen. Insgesamt 1 000 000 CpM werden zur Hybridisierung benötigt.

[0151] Die cDNA kann entweder unter Verwendung von α-^{32}P-dCTP (100 µCi) in der Reaktion radioaktiv markiert werden oder unter Verwendung von Digoxigenin-dUTP unter Verwendung des GENIUS 1-Kits (Boehringer Mannheim Biochemical, Indianapolis, IN) chemisch markiert werden.

[0152] Wenn eine unzureichende Menge Streßgen-cDNA durch das vorstehend beschriebene Verfahren erhalten wird, kann die PCR zur Amplifikation verwendet werden. Die reverse Transkription wird, wie vorstehend beschrieben, durchgeführt, ausgenommen daß kein Marken in die cDNA eingeschlossen wird. Die Primer, die auf den veröffentlichten codierenden 5'- und 3'-Sequenzen des gewünschten Streßgens beruhen, werden in der PCR-Reaktion verwendet. Die Amplifikation aller Streßgen-cDNAs wird im gleichen Reaktionsröhrchen durchgeführt.

[0153] Die gesamte cDNA wird 1:10 mit dH_2O verdünnt, und 10 µl werden für die PCR-Reaktion verwendet. Die nachstehenden Bestandteile werden anschließend zugesetzt, um die angegebene Endkonzentration zu erhalten: 1 × TAQ-Puffer (Boehringer Mannheim Biochemical); jeweils 300 µM von jedem der dNTPs; jeweils 25 pmol von jedem der PCR-Primer; 2,5 Einheiten TAQ-Polymerase (Boehringer Mannheim Biochemical) und dH_2O bis zu einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl. Das Gemisch wird durch Pipettieren vermischt, wonach eine zweite Zentrifugation folgt. Zwei Tropfen von leichtem Mineralöl werden oben auf das Reaktionsgemisch gegeben. Die PCR wird anschließend über 30 Zyklen von 1 Minute bei 95°C, 2 Minuten bei T_m + 2°C und 3 Minuten bei 72°C (10 Minuten während des letzten Zyklus) durchgeführt. Die PCR-Produkte werden mit ^{32}P, das in innere (nested) Primer über eine Kinasereaktion in einer PCR-Reaktion mit 1 Zyklus eingeschlossen wird, markiert.

[0154] Ein innerer Primer ist ein Primer, der auf einer Streß-spezifischen Nucleotidsequenz basiert, die innerhalb der Sequenzen liegt, auf denen die Primer für die PCR beruhen. Diese Primer werden unter Verwendung eines Oligonucleotid-Synthesegeräts synthetisiert oder von einem Händler erworben. Die inneren Primer werden durch Vermischen von 1,2 µl (0,5 µg/µl) von innerem Primer mit 1,0 µl 10 × Kinasepuffer (0,5 M Tris, pH 8,2, 0,1 M $MgCl_2$ und 50 mM DTT), 5,0 µl α-^{32}P ATP, 1,0 µl Polynucleotidkinase und 1,8 µl dH_2O markiert. Das Reaktionsgemisch wird durch Pipettieren vermischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 10-minütige Inkubation bei 70°C beendet, wonach eine schnelle Zentrifugation und Kühlen auf Eis folgen. 90 µl dH_2O werden anschließend zugesetzt, wonach 100 µl Phenol/Chloroform (1:1) zugegeben werden. Das Gemisch wird gut vermischt, 10 Minuten zentrifugiert und die wäßrige Phase anschließend in ein neues Röhrchen transferiert. Anschließend werden die markierten Primer durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, 1 µl 10 mg/ml tRNA und 400 µl 100% Ethanol ausgefällt und 10 Minuten auf Eis gegeben. Das Gemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wird mit 80% Ethanol gewaschen, 5 Sekunden zentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wird mit 4 µl dH_2O, 0,5 µl 10 × TAQ-Puffer und 0,5 µl TAQ-Enzym resuspendiert.

[0155] Anschließend werden 5 µl der markierten inneren Primer zur wäßrigen Phase des vorstehend beschriebenen PCR-Gemisches unter dem Mineralöl zugesetzt und ein weiterer Zyklus der PCR durch 2-minütiges Erhitzen auf 95°C, 2-minütiges Abkühlen auf T_m + 2°C (markierter Primer) und 10-minütiges Erhitzen auf 72°C durchgeführt.

[0156] Anschließend werden 50 µl wäßrige Phase in ein neues Röhrchen transferiert, 50 µl dH_2O und 100 µl Phenol/Chloroform zugesetzt, gut vermischt und 10 Minuten zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird gewonnen und in ein frisches Röhrchen gegeben. Nicht eingeschlossene Primer werden unter Verwendung einer Spinsäule entfernt.

4. Hybridisierung

[0157] Die die vernetzten Oligonucleotide enthaltende Membran wird in 15 ml RAPID HYB-Puffer (Amersham, Arlington Heights, IL) angefeuchtet, indem ein Ende der Membran mit einer Pinzette gehalten und die Membran langsam eingetaucht wird. Die Membran wird anschließend vorhybridisiert, indem sie in einen "Seal-a-Meal"-Beutel überführt wird, die 15 ml RAPID HYB-Puffer aus dem Anfeuchtungsschritt zugesetzt werden und der Beutel versiegelt wird. Er wird anschließend 1 Stunde in ein Schüttelwasserbad von 68°C eingetaucht. Die markierte cDNA (15 000 000 CpM) wird in 1 ml RAPID HYB verdünnt, 10 Minuten gekocht und anschließend auf Eis schnell abgekühlt.

[0158] Nach der Vorhybridisierung wird des RAPID HYB-Puffer entfernt und durch 14 ml auf 65°C vorerhitzten frischen RAPID HYB-Puffer ersetzt. Die markierte cDNA wird anschließend dem Beutel zugesetzt und das Ende erneut versiegelt. Der Beutel wird anschließend über Nacht in ein Schüttelwasserbad von 68°C eingetaucht. Nach der Hybridisierung wird die Membran aus dem Beutel entfernt und 20 Minuten bei Raumtemperatur in eine einen Puffer von geringer Stringenz (2 × SSC/0,1% SDS) enthaltende Schale gegeben. Die Membran wird anschließend in einen Puffer von hoher Stringenz (0,2 × SSC/0,1% SDS; auf 45°C vorerhitzt) transferiert und 30 Minuten bei 45°C geschüttelt. Die Membran wird anschließend aus dem Puffer von hoher Stringenz entfernt, auf ein Stück Whatman 3MM-Filter gegeben und gegen einen Röntgenfilm über Nacht bei –70°C mit einem Verstärkerschirm exponiert. Nach der Entwicklung wird das Autoradiogramm so geschnitten, daß es in eine Halterung von einer 96 Vertiefungen aufweisenden Mikrotiterplatte paßt, und so befestigt, daß die Anordnung der radioaktiven Flecken nach den Löchern in der Halterung ausgerichtet ist. Das Autoradiogramm wird anschließend bei 600 nm zur quantitativen Bestimmung gelesen.

[0159] Die Ergebnisse der beiden vorstehend beschriebenen Tests werden anschließend mit einer Datenbank aus Standards verglichen, die unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Promotoren und bekannten Toxine hergestellt wurden. Durch Korrelieren der Ergebnisse für X mit bekannten Verbindungen kann ein Toxizitätsprofil erstellt werden. Wenn X beispielsweise die gleichen Streßgene wie TCDD bei ähnlichen Konzentrationen induziert, zeigt dies, daß X für alle Tiere. bei ähnlichen Konzentrationen wie TCDD toxisch ist.

Beispiel 3

Konstruktion von Streßpromotor-CAT-Fusionen

[0160] Eine XHF-Promotor-CAT-Fusion wurde, wie nachstehend beschrieben, hergestellt. Zwei Oligonucleotide wurden auf der Basis der veröffentlichten Sequenz des XHF (Kollagenase)-Promotors synthetisiert [P. Angel et al., Mol. Cell Biol. 7 (1987), 2256–66]. Eines entsprach den Positionen –520 bis –501 stromaufwärts vom Primer der Transkriptionsstartstelle. [SEQ ID No. 44]: 5'-TACCAGGCAGCTTAACAAAG-3'. Das andere entsprach den Positionen +53 bis +73 stromabwärts der Transkriptionsstartstelle. [SEQ ID No. 45]: 5'-ACTGGCCTTTGTCTTCTTTC-3'. Die Oligonucleotide wurden von Operon Technologies (Alameda, CA) synthetisiert. Die Oligonucleotide wurden in Wasser zu einer Endkonzentration von 500 pmol/ml gelöst.

[0161] Zur Amplifikation des XHF-Promotors winden 0,1 µg von Raji (menschliche Genombank) genomischer DNA, 20 pmol von jedem der beiden vorstehend beschriebenen Primer, 5 µl 10 x-Puffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$ und 0,1% Gelatine], 5 µl 2,0 mM von jedem dNTP und 1 Einheit AMPLITAQ (Taq-Polymerase) (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) vermischt. Es wurde Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl zugesetzt und die PCR durchgeführt.

[0162] Die PCR-Reaktion wurde 2 Minuten bei 94°C mit anschließenden 30 Zyklen von 10 Sekunden bei 56°C, 30 Sekunden bei 71°C und 10 Sekunden bei 94°C durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde durch Inkubation des Gemisches 1,5 Minuten bei 56°C und anschließend 4 Minuten bei 71°C beendet. Mit dem Reaktionsprodukt wurde anschließend auf einem 1,0% Agarosegel eine Elektrophorese durchgeführt und die amplifizierte Sequenz aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit einer Kinase behandelt und mit glatten Enden in den pBLCAT3-Vektor ligiert, der von B. Luckow et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 5490, beschrieben wurde, wobei dessen Beschreibung hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

[0163] Weitere Streßpromotor-CAT-Fusionen können in ähnlicher Weise unter Verwendung aller vorstehend beschriebenen veröffentlichten Nucleotidsequenzen der verschiedenen Streßgen-Promotorregionen hergestellt werden, um geeignete Oligonucleotidprimer für die PCR zu entwickeln. CAT-Fusionen mit den folgenden Streßpromotoren wurden zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren hergestellt: XHF,

CYP1A1, GST Ya, MTIIA, FOS, HSP70, GADD45, GADD153 und JUN.

Beispiel 4

Konstruktion einer Response-Element-CAT-Fusion

[0164] Eine xenobiotische Response-Element XRE-CAT-Fusion wurde, wie nachstehend beschrieben, konstruiert. Zunächst wurden die Oligonucleotide, die beiden Strängen des XRE entsprachen, von einem unabhängigen Vertragspartner (Operon Technologien, Inc., Alameda, CA) synthetisiert. Die Sequenz des XRE wird von M. Denison et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 17221–24, beschrieben. Die Oligonucleotide wurden mit überstehenden BamHI-kompatiblen Enden synthetisiert.

[0165] Die Oligonucleotide wurden in Wasser zu einer Endkonzentration von 500 pmol/ml gelöst. Anschließend wurden 50 µg jedes Oligonucleotids zusammen in einer 500 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7,8, und 1 mM EDTA enthaltenden Lösung vermischt und 5 Minuten gekocht. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei 68°C inkubiert, damit die Stränge miteinander anelieren konnten. Die doppelsträngigen Oligos wurden anschließend auf einem 12% Polyacrylamidgel einer Elektrophorese unterzogen und durch Ausschneiden der Bande und Elektroelution der DNA gereinigt. Die gereinigten Response-Elemente wurden anschließend mit Kinase behandelt und in die BamHI-Stelle von pBLCAT2 [M. Denison et al., J. Biol. Chem. 263 (1988), 17221–24] genau stromaufwärts des tk-Minimalpromotors cloniert.

[0166] Weitere Response-Element-CAT-Fusionen können in ähnlicher Weise unter Verwendung aller vorstehend beschriebenen veröffentlichten Nucleotidsequenzen der verschiedenen Response-Elemente hergestellt werden, um geeignete Oligonucleotidprimer für die PCR zu entwickeln. CAT-Fusionen mit den folgenden Response-Elementen wurden zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Kits und Verfahren hergestellt: XRE, NFkB, CRE, p53RE und RARE.

Beispiel 5

Test von Toxinen unter Verwendung von Streßpromotor-CAT-Fusionen

[0167] Etwa 5×10^4 Zellen von jedem der vorstehend in den Beispielen 3 und 4 beschriebenen 14 transformierten Stämme wurden separat in einer Reihe von 12 Vertiefungen in einer von zwei 96 Vertiefungen aufweisenden Platten plattiert. Eine nicht-transformierte menschliche Leberzellinie wurde in den Vertiefungen der letzten Reihe der zweiten Platte plattiert, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu ermitteln. Die Zellen wurden in 10% komplettem minimalem essentiellem Medium (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) bei 37°C und 5% CO_2 bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90% gezüchtet.

[0168] Es wurden fünf oder sechs verschiedene Konzentrationen der nachstehend in Tabelle 3 aufgeführten verschiedenen Chemikalien, die im geeigneten Lösungsmittel gelöst waren, in dreifacher Ausführung getestet.

Tabelle 3

Testverbindungen

Verbindung	Lösungsmittel	Konzentrationsbereich
3-MC	DMSO	1 nM - 10 μM
Natriumarsenat	Wasser	1 nM - 10 μM
DMSO	Keines	0,001 - 10% (Vol./Vol.)
Cadmiumsulfat	Wasser	100 nM - 10 μM
Benzo[a]pyren	DMSO	10 nM - 100 μM
Ethanol	Keines	0,001 - 10% (Vol./Vol.)
PMA	Ethanol	3,2 - 200 ng/ml
MMS	Wasser	10 ng/ml - 100 μg/ml
Methapyrilen	Wasser	10 nM - 100 μM
TCDD	DMSO	1 nM - 10 μM
Retinsäure	DMSO	10 nM - 100 μM

[0169] Die verschiedenen Konzentrationen wurden durch Herstellung einer Verdünnungsreihe erhalten. Für TCDD wurden zunächst 20 µl Medium von jeder Vertiefung der Spalten 3 bis 10 und 10 µl von den Spalten 11 und 12 der 96 Vertiefungen aufweisenden Platten entnommen. 10 µl einer 200 µM Lösung der Testchemikalie wurden in jede Vertiefung der Spalten 11 und 12 gegeben. Die Flüssigkeit in diesen Vertiefungen wurde mit einem Multikanal-Pipetman unter Verwendung von separaten Pipettenspitzen für jede Spalte gut vermischt und 20 µl wurden anschließend von den Vertiefungen de Spalte 12 in die Spalte 10 transferiert. Die Flüssigkeit in Spalte 10 wurde vermischt, anschließend wurden 20 µl in Spalte 8 transferiert und das Verfahren bei den geradzahligen Spalten bis zur Spalte 4 wiederholt. Das gleiche Verfahren wurde bei den ungeradzahligen Spalten beginnend mit Spalte 11 und endend mit Spalte 3 durchgeführt. Die Spalten 1 und 2 von jeder Reihe repräsentieren unbehandelte Kontrollen. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C in 5% CO_2 inkubiert.

[0170] Am Ende der Inkubation wurden die Medien vorsichtig aus allen Vertiefungen abgesaugt, ausgenommen der Reihe auf der zweiten Platte, die die Lebensfähigkeit der Zellen anzeigte. Die Zellen irr allen außer der letzten Reihe wurden zweimal mit 200 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Waschen wurden 100 µl Zellysepuffer (5 mM Mops, 2,5 mM NaCl, 0,38 mM $MgCl_2$, 0,25% Triton X-100, pH 6,5 unter Verwendung von NaOH) jeder Vertiefung zugesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lysate der Vertiefungen, die doppelte Konzentrationen der Chemikalie enthielten, kombiniert, indem 100 µl Lysat der Spalte 12 in die Spalte 11, der Spalte 10 in die Spalte 9 und so weiter transferiert wurden.

[0171] Das Gesamtprotein in jeder Vertiefung wurde, wie nachstehend beschrieben, getestet. Zu zwei frischen 96 Vertiefungen aufweisenden Platten wurden 190 µl 1 × Proteintestreagenz (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) zu jeder Vertiefung der Spalten 1 bis 7 zugesetzt. 10 µl Zellysat wurden aus den Vertiefungen in Spalte 1 der Toxintestplatte in die Spalte 2 der Proteintestplatte, von Spalte 3 der Toxintestplatte in die Spalte 3 der Proteintestplatte, von der Spalte 5 der Toxintestplatte in Spalte 4 der Proteintestplatte und so weiter transferiert. Die Platten wurden anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend wurde die Absorption von jeder Vertiefung bei OD_{600} gemessen.

[0172] Der CAT-Test wurde unter Verwendung eines CAT ELISA-Kits (5 Prime - 3 Prime, Inc., Boulder, CO) und gemäß den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. 190 µl jedes Zellysats der Toxintestplatten wurden zur Ermittlung der CAT-Aktivität verwendet. Der CAT-Test konnte dreieinhalb Stunden bei Raumtemperatur ablaufen. Die CAT-Aktivität wurde unter Verwendung eines biotinylierten anti-CAT-Antikörpers, gefolgt von einer Streptavidin-konjugierten alkalischen Phosphatase und schließlich dem kolorimetrischen Substrat p-Nitrophenylphosphat gemessen. Die Farbentwicklung wurde bei OD_{405} gemessen.

[0173] Das Vielfache der Induktion wurde unter Verwendung der nachstehenden Formel berechnet:

$$\frac{OD_{405}\ (\text{Testprobe})/OD_{600}\ (\text{Testprobe})}{OD_{405}\ (\text{Kontrolle})/OD_{600}\ (\text{Kontrolle})}$$

[0174] Die Ergebnisse aller Experimente sind in den Fig. 1 bis Fig. 11 graphisch dargestellt.

[0175] Obwohl hier vorstehend eine Reihe von erfindungsgemäßen Ausführungsformen präsentiert wurden, ist es offensichtlich, daß die grundlegende Konstruktion verändert werden kann, um weitere die erfindungsgemäßen diagnostischen Kits, Verfahren und Produkte verwendenden Ausführungsformen bereitzustellen. Daher ist zu beachten, daß der erfindungsgemäße Schutzbereich durch die hier angefügten Ansprüche und nicht durch die hier vorstehend als Beispiel präsentierten spezifischen Ausführungsformen definiert ist.

Sequenzprotokoll

(1) Allgemeine Information:

(i) Anmelder: XenometirX, Inc. (alle Staaten außer USA)
2860 Wilderness Place
Suite 150
Boulder, Colorado 80301
Vereinigte Staaten von Amerika

(i) Anmelder: Farr, Spencer B (nur USA)
2852 Kalmia Avenue
Boulder, Colorado 80301
Vereinigte Staaten von Amerika

(i) Anmelder: Todd, Marque D (nur USA)
8200 North Sheridan Boulevard
Nr. 904
Westminster, Colorado 80003
Vereinigte Staaten von Amerika

(ii) Titel der Erfindung: Verfahren und diagnostische Kits unter Verwendung von eukaryontischen Streßpromotoren zur Bestimmung der Toxizität einer Verbindung

(iii) Zahl der Sequenzen: 45

(iv) Korespondenzadresse:

(A) Empfänger: James F. Haley, Jr.
(B) Straße: 1251 Avenue of the Americas
(C) Stadt: New York
(D) Staat: New York
(E) Land: Vereinigte Staaten von Amerika
(F) PLZ: 10020

(v) Computer-lesbare Form:

(A) Mediumtyp: Diskette

(B) Computer: IBM PC-kompatibel

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1,0, Version #1.25

(vi) Aktuelle Anmeldungsdaten:

(A) Anmeldungsnummer:

(B) Einreichungsdatum:

(C) Klassifikation:

(vii) Bisherige Anmeldungsdaten:

(A) Anmeldungsnummer: US 08/008,896

(B) Einreichungsdatum: 21. Jan. 1993

(viii) Anwalts/Agenten-Information:

(A) Name: Marks, Andrew S

(B) Registrierungsnummer: 33,259

(C) Referenz-/Aktennummer: X-1 CIP

(ix) Telekommunikationsinformation:

(A) Telefon: (212) 596-9000

(B) Telefax: (212) 596-9090

(C) Telex: 14-8367

(2) Information zu [SEQ ID No: 1]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 70 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 1]

AAAAAAACCC AGTCCAACTA CAGACATGGC AGCTGAGTCC CTGCCATTCA CCTTGGAGAC 60

GGTGTTTTTT 70

(2) Information zu [SEQ ID No: 2]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 69 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 2]

AAAAAAGGCC AGTATGCACA GCTTTCCTCC ACTGCTGCTG CTGCTGTTCT GGGGTGTGGT 60

GTCTTTTTT 69

(2) Information zu [SEQ ID No: 3]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 59 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 3]

AAAAAACCCC AAGATCCTGA AACAGAGCAT GACCCTGAAC CTGGCCGACC CAGTTTTTT 59

(2) Information zu [SEQ ID No: 4]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 63 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 4]

AAAAAACAAC CTGAACGTCA ACGAGGAGAA GTACCAGGAG GCGTTGGCCA AGGGAGATTT 60

TTT 63

(2) Information zu [SEQ ID No: 5]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 60 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 5]

AAAAAATAGA GCGTCCGCAA CCCGACAGCA TGCCCCAGGA TTTGTCAGAG GCCCTTTTTT 60

(2) Information zu [SEQ ID No: 6]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 65 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 6]

AAAAAAGGAG TTGGGAGCTG AGTGGAGAAG AAGCCACGAC TCTCGCTAGG TCAGTACTCT 60

TTTTT 65

(2) Information zu [SEQ ID No: 7]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 69 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 7]

AAAAAAGCCG CGGCAGTCGG CATCGACCTG GGCACCACCT ACTCCTGCGT GGGGGTGTTC 60

CAATTTTTT 69

(2) Information zu [SEQ ID No: 8]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 8]

AAAAAAATTA CAGCAAGCCT GGAACCTATA GCCCCTTTAA CTTGAGCAGC ATCATTTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 9]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 9]

AAAAAACATT CAGGGAAGGG TTGGGTAGGT AGCGAAGAAT AGGGATGAAG TCAGCTTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 10]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 10]

AAAAAAATGC TGGAGAAGGA GTCTGCGGGT GAGTGGTAGT AAGAGAGGCT ATCCCCTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 11]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 11]

AAAAAAGGAA TCTCATTTTC TAGCTTTGAT CTGGTTGTCA GTTGGGATGG ACTTGCTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 12]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 12]

AAAAAACCTC TTGCTTCCCC GTGTTGATGT AGCCGAGGAT CTTCTTAAAC TGAGTTTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 13]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 13]

AAAAAACAGT GGTCAATGTC ACGTGGCTTC GAAATGGAAA ACCTGTCACC ACAGGATTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 14]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 69 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 14]

AAAAAAGGAT TGTGAAATGA AACGCACCAC ACTGGACAGC CCGTTGGGGA AGCTGGAGCT 60

GTCTTTTTT 69

(2) Information zu [SEQ ID No: 15]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 15]

AAAAAATTCT TACAATTTTG GTACCAGTGC TTGACTAGGC GGATGAGGCT CTTGAGTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 16]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 16]

AAAAAAAGTC TTGCATGATC CTTGTCACAA ATAGTTTAAG ATGGCCTGGG TGATTCTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 17]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 51 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 17]

AAAAAACCAG CACCCCGTCT CCGCGACTAC TTTATAGGCC AGACCTTTTT T 51

(2) Information zu [SEQ ID No: 18]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 18]

AAAAAAAACC GTACTCTCCC AGTTCTCTTC CATTTCCAGA CATCTTGAAT CCACCATTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 19]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 19]

AAAAAAGAGT GTCTTTGGCA TACTTGATCA CCAGGCACTT GTACTGAGCA ATCTGGTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 20]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 20]

AAAAAAAAAC ACCTTCTTCA CATCATCCGC ACTCTTTTTC TTCAGGCCGA CCATTTTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 21]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 21]

AAAAAAGAAG CTCTCAGACA CGAAGTAGAC TGACTGGTAC GTCTGGTCTT GGTAGGTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 22]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 22]

AAAAAATCTA GAATATAGGC AGCCAGACCC ACAGGAGAGT CATTCAGAGC AGAGCCTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 23]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 23]

AAAAAAGATA GCGCTCTTCT TCCCACCATT TCCACTTCTG TTCCTCTTCT TTCTTCTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 24]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 62 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 24]

AAAAAAGCCT CTGCCAGTTT TTCTTCAGTC ATCTTCACAA CAAATTTCAC AGTGGTTTTT 60

TT 62

(2) Information zu [SEQ ID No: 25]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 67 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 25]

AAAAAATCTC TTCCTTGCAG GTGGCTCCTG CACCTGCACT GGCTCCTGCA AATGCAAAGA 60

GTTTTTT 67

(2) Information zu [SEQ ID No: 26]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 26]

AATTGCTATG GCGTGGTAAG TGCCCAGTGC CCCTTTGGTG GATTCAAGAT 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 27]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 27]

ATCTGAGTTC CTACCTGAAC GGTTTCTCAC CCCTGATGGT GCTATCGACA 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 28]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 45 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 28]

GTACTCCCAG CTGCACTGCT TACACGTCTT CCTTCGTCTT CACCT 45

(2) Information zu [SEQ ID No: 29]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 29]

AGGAGAATGA AAGGAAAGTG GCACAGCTAG CTGAAGAGAA TGAACGGCTC 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 30]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 30]

AGTCGCTACA TGGATCAATG GGTTCCAGTG ATTAATCTCC CTGAACGGTG 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 31]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 31]

GTGGTGGACC TGACCTGCCG TCTAGAAAAA CCTGCCAAAT ATGATGACAT 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 32]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 32]

CAGCCCAAGG AAGCCTCCCA TGGATGAGAA ATCTTTAGAA GAAGCAAGGA 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 33]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 44 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 33]

CTTACACTCA GCTTTCTGGT GGCGACAGTT GCTGTAGGGC TTTA 44

(2) Information zu [SEQ ID No: 34]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 45 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: einzelsträngig
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 34]

AGAAGGACGA GTTTGAGCAC AAGAGGAAGG AGCTGGAGCA GGTGT 45

(2) Information zu [SEQ ID No: 35]

(i) Sequenzcharakteristika:
(A) Länge: 50 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: einzelsträngig
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 35]

GCTCAGGGAA CAGGTGGCAC AGCTTAAACA GAAAGTCATG AACCACGTTA 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 36]

(i) Sequenzcharakteristika:
(A) Länge: 50 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: einzelsträngig
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 36]

GAAAGGCATC TATTTTTCAA TGGTCAGTGT CCAGGCTGGA ACAAAGCGCC 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 37]

(i) Sequenzcharakteristika:
(A) Länge: 47 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: einzelsträngig
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 37]

GCACTGGCTC CTGCAAATGC AAAGAGTGCA AATGCAACTC CTGCAAG 47

(2) Information zu [SEQ ID No: 38]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 35 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 38]

CCCAGGGCTG CATCTGCAAA GGGGCGTCGG ACAAG 35

(2) Information zu [SEQ ID No: 39]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 39]

ACCACTGTAT TTTGCTCCAA GCAGCCTCTT TGACCTAAAC TTCCAGGCAG 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 40]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 40]

ACAAAAGCCA CTCCACTCTC TTCAACGGTG ACACTCAGTA TGTCTGCAGA 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 41]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 41]

TTGCTCTCGA CAGTATCCAC AATAGCTGAC GGCTGGGTGT TTCAGTTTGA 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 42]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 45 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 42]

ACCTTCCAGC AGATGTGGAT TAGCAAGCAG GAGTACGACG AGTCG 45

(2) Information zu [SEQ ID No: 43]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 50 Basenpaare

(B) Typ: Nucleinsäure

(C) Strangform: einzelsträngig

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 43]

TTGAGTGGAT CCCCAACAAT GTGAAAACGG CTGTCTGTGA CATCCCACCT 50

(2) Information zu [SEQ ID No: 44]

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 20 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: einzelsträngig
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 44]

TACCAGGCAG CTTAACAAAG 20

(2) Information zu [SEQ ID No: 45]

(i) Sequenzcharakteristika:
(A) Länge: 20 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: einzelsträngig
(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNA

(iii) Hypothetisch: Nein

(xi) Sequenzbeschreibung: [SEQ ID No: 45]

ACTGGCCTTT GTCTTCTTTC 20

Patentansprüche

1. Diagnostischer Kit zur Identifizierung und Charakterisierung einer toxischen Verbindung, umfassend:
(a) eine Säugerzelle, gekennzeichnet durch:
(i) mindestens einen Promotor der nur auf Redoxstreß reagiert;
(ii) mindestens einen Promotor, der nur auf DNA-Streß reagiert;
(iii) mindestens einen Promotor, der nur auf Proteinstreß reagiert; und
(iv) mindestens einen Promotor der nur auf Energie-/Ionenstreß reagiert,
wobei jeder der Promotoren mit einem unterschiedlichen Gen funktionell verbunden ist, das ein unterschiedliches nachweisbares Produkt codiert; und
(b) mindestens vier verschiedene Oligonucleotidsonden, wobei jede der Sonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript eines der anderen Gene zu hybridisieren, das funktionell mit den Promotoren verbunden ist, oder mit einer einzelsträngigen cDNA, die von diesem RNA-Transkript hergestellt worden ist, wobei
(i) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf Redoxstreß reagieren,
(ii) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf DNA-Streß reagieren,
(iii) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf Proteinstreß reagieren und
(iv) mindestens eine der Oligonucleotidsonden in der Lage ist, mit dem mRNA-Transkript oder mit einer einzelsträngigen cDNA zu hybridisieren, die von diesem RNA-Transkript eines der Gene hergestellt worden ist, das funktionell mit einem der Promotoren verbunden ist, die nur auf Energie-/Ionenstreß reagieren.

2. Diagnostischer Kit zur Identifizierung und Charakterisierung einer toxischen Verbindung, mindestens umfassend:
(i) eine erste Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf Redoxstreß reagiert;
(ii) eine zweite Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur

auf DNA-Streß reagiert;
(iii) eine dritte Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf Proteinstreß reagiert; und
(iv) eine vierte Säugerzelle, die mindestens einen Promotor oder ein Response-Element trägt, der (das) nur auf Energie-/Ionenstreß reagiert;
wobei jeder der Promotoren oder Response-Elemente funktionell mit einem heterologen Gen verbunden ist, das ein nachweisbares Produkt codiert.

3. In-vitro-Verfahren zur Bestimmung der Toxizität einer Verbindung für eine Säugerzelle durch die Erzeugung eines Stressinduktionsprofils, umfassend Daten, die jede der Streßarten wie Redoxstreß, DNA-Streß, Proteinstreß und Energie-/Ionenstreß, die die Verbindung auf die Zelle ausübt, getrennt identifizieren und quantifizieren, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:
(a) getrennte Züchtung einer oder mehrerer Säugerzellen, die insgesamt gekennzeichnet sind durch:
(i) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf Redoxstreß reagiert;
(ii) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf DNA-Streß reagiert;
(iii) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf Proteinstreß reagiert; und
(iv) mindestens einen Promotor oder ein Response-Element, der (das) nur auf Energie-/Ionenstreß reagiert,
wobei jeder der Promotoren oder Response-Elemente mit einem Gen funktionell verbunden ist, das ein nachweisbares Produkt codiert;
(b) Aussetzen jeder der einen oder mehreren Zellkulturen der Verbindung;
(c) Quantifizierung der nachweisbaren Produkte, die dem Redoxstreß, DNA-Streß, Proteinstreß oder Energie-/Ionenstreß entsprechen, den die Verbindung in der Zelle verursacht, in jeder der Kulturen, und
(d) Erzeugung eines Streßpromotorinduktionsprofils für die Verbindung aus den Daten, die sich aus Schritt (c) ergeben.

4. Diagnostischer Kit oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Säugerzelle eine HepG2-Zelle ist.

5. Diagnostischer Kit nach Anspruch 1 oder 2 oder Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Promotor oder das Response-Element, (der) das auf Redoxstreß reagiert, ausgewählt ist aus CYP1A1, XRE, PPRE, NMO1, ALDH2, UGT, Cu.ZnSOD, ADPRT, FAOxase, PBE, PPAR, CYP2B2, CYP3A3 oder ARE.

6. Diagnostischer Kit nach Anspruch 1 oder 2 oder Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Promotor oder das Response-Element, (der) das auf DNA-Streß reagiert, ausgewählt ist aus XHF, GADD153, TRE, DRA, MDR-1, EGR-1, GAS 2,3, MGMT, DNA Pol, DHFR, TK, PCNA, PGHS, LOX, ISG15, TPO1, TPO2 or PCNA.

7. Diagnostischer Kit nach Anspruch 1 oder 2 oder Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Promotor oder das Response-Element, (der) das auf Proteinstreß reagiert, ausgewählt ist aus HSP70, MT 1A or MT III.

8. Diagnostischer Kit nach Anspruch 1 oder 2 oder Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Promotor der auf Energie-/Ionenstreß reagiert, ausgewählt ist aus CRE, TH, DBH, ODC, G6PD oder PVALB.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei jeder (jedes) der Promotoren oder Response-Elemente in der gleichen Zelle ist, und wobei die Quantifizierung des nachweisbaren Produkts die Schritte umfaßt:
(a) Isolierung von mRNA aus der Kultur, die der Verbindung ausgesetzt wurde; und
(b) Quantifizierung der Menge an mRNA, die in der Kultur von jedem Gen transkribiert wurde, das funktionell mit jedem der Streßpromotoren oder Response-Elemente verbunden ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei jedes der Gene, die ein nachweisbares Produkt codieren, heterolog zu jedem der Promotoren oder Response-Elemente ist, und wobei jeder der Promotoren oder Response-Elemente von einer anderen Zelle getragen wird.

11. Diagnostischer Kit nach Anspruch 2 oder Verfahren nach Anspruch 10, wobei jeder der Promotoren oder Response-Elementen funktionell mit einem Gen verbunden ist, das das gleiche heterologe nachweisbare Produkt codiert.

12. Diagnostischer Kit oder Verfahren nach Anspruch 11, wobei das heterologe nachweisbare Produkt CAT ist.

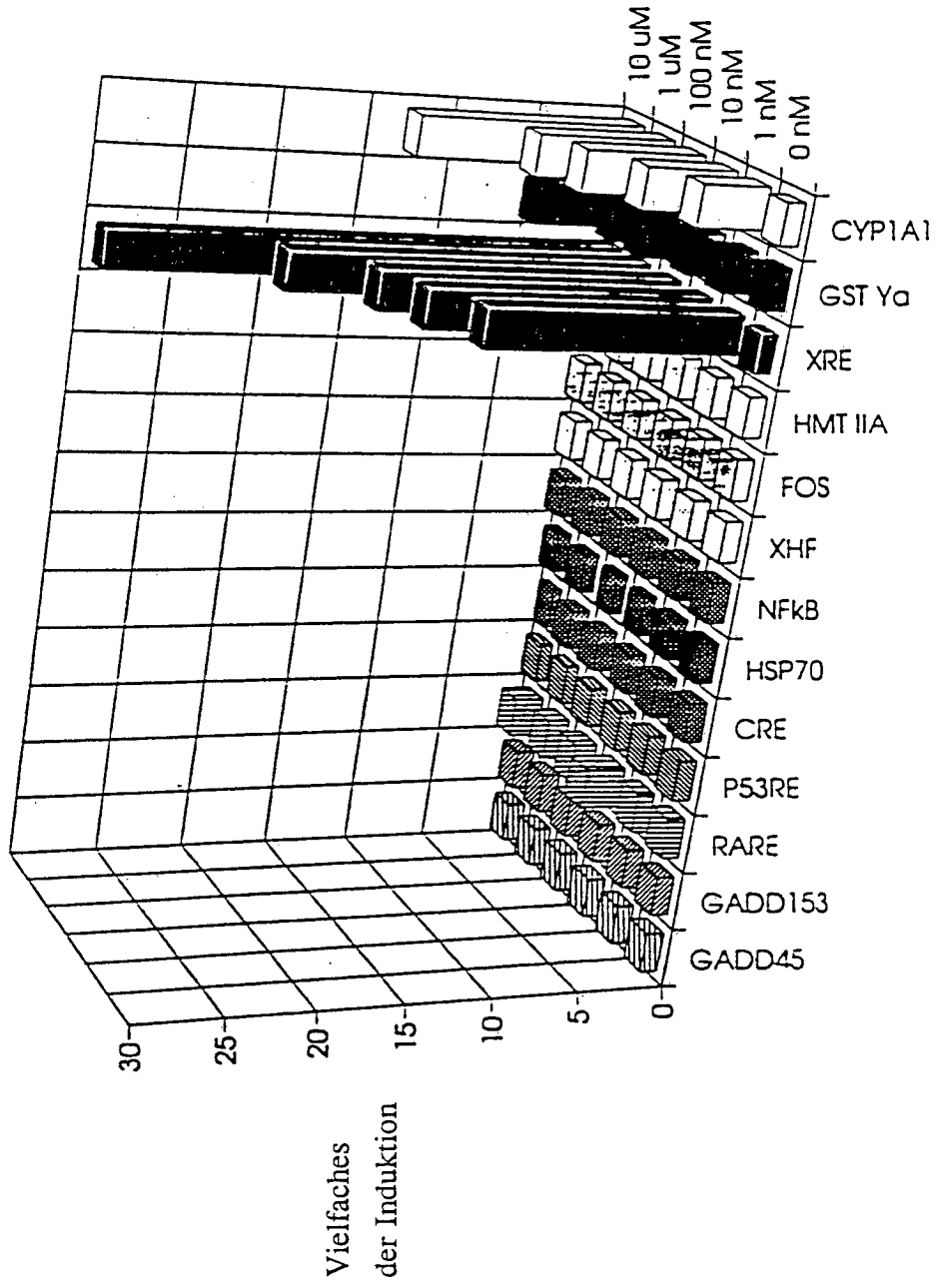
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 12, umfassend den zusätzlichen Schritt der Inkubation der

Verbindung mit einem S9-Leberextrakt, bevor eine oder mehrere Zellkulturen der Verbindung ausgesetzt werden.

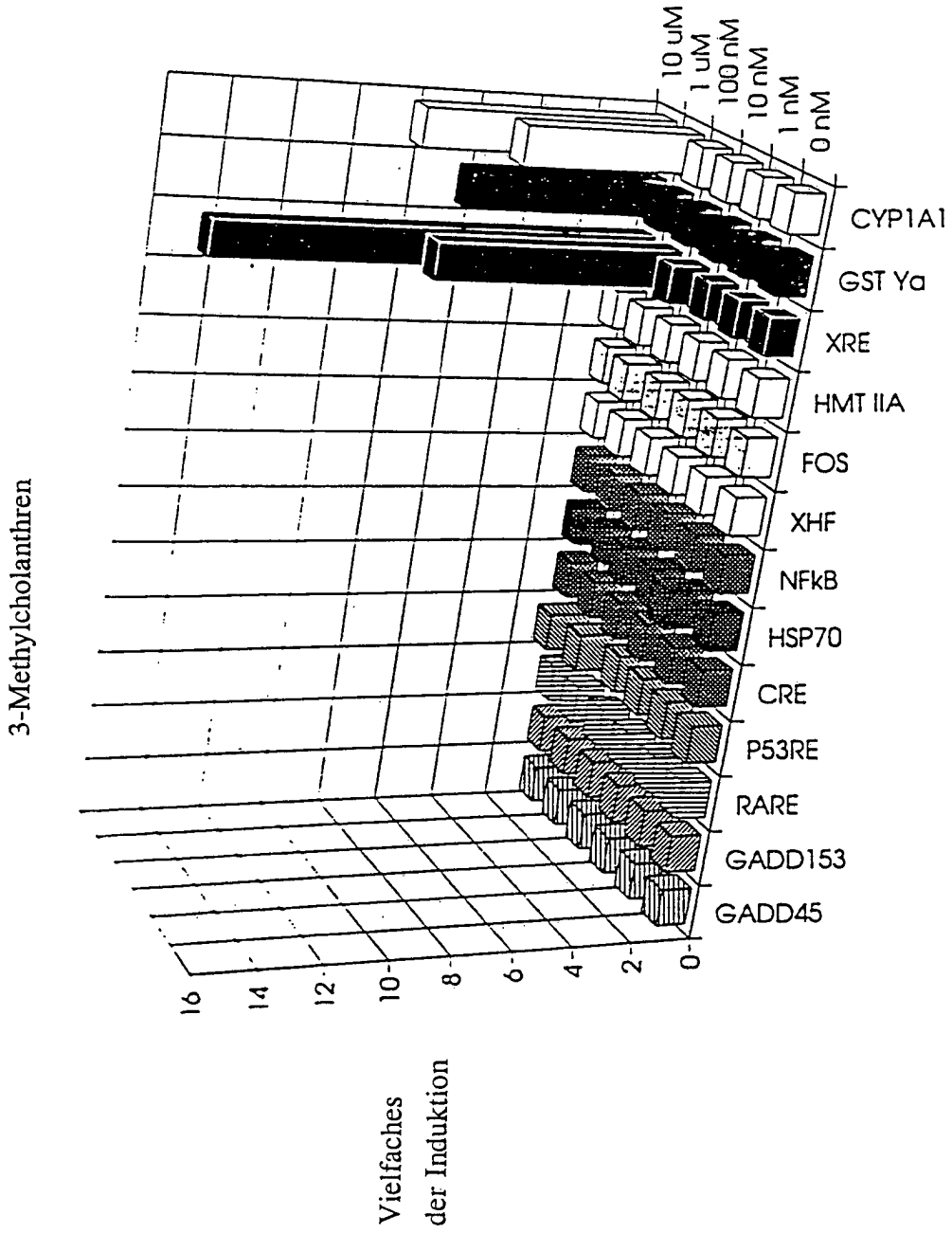
Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

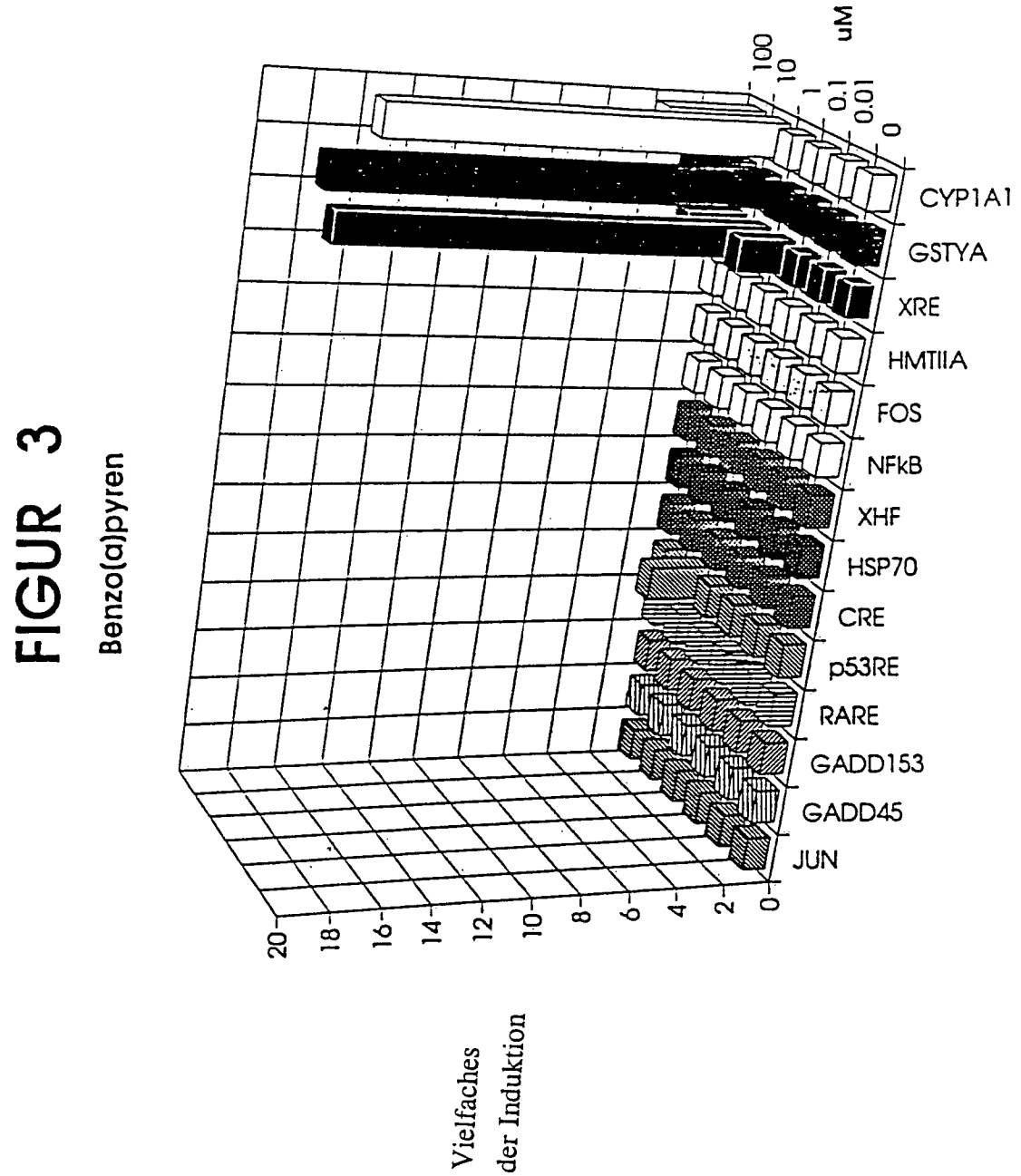
FIGUR 1



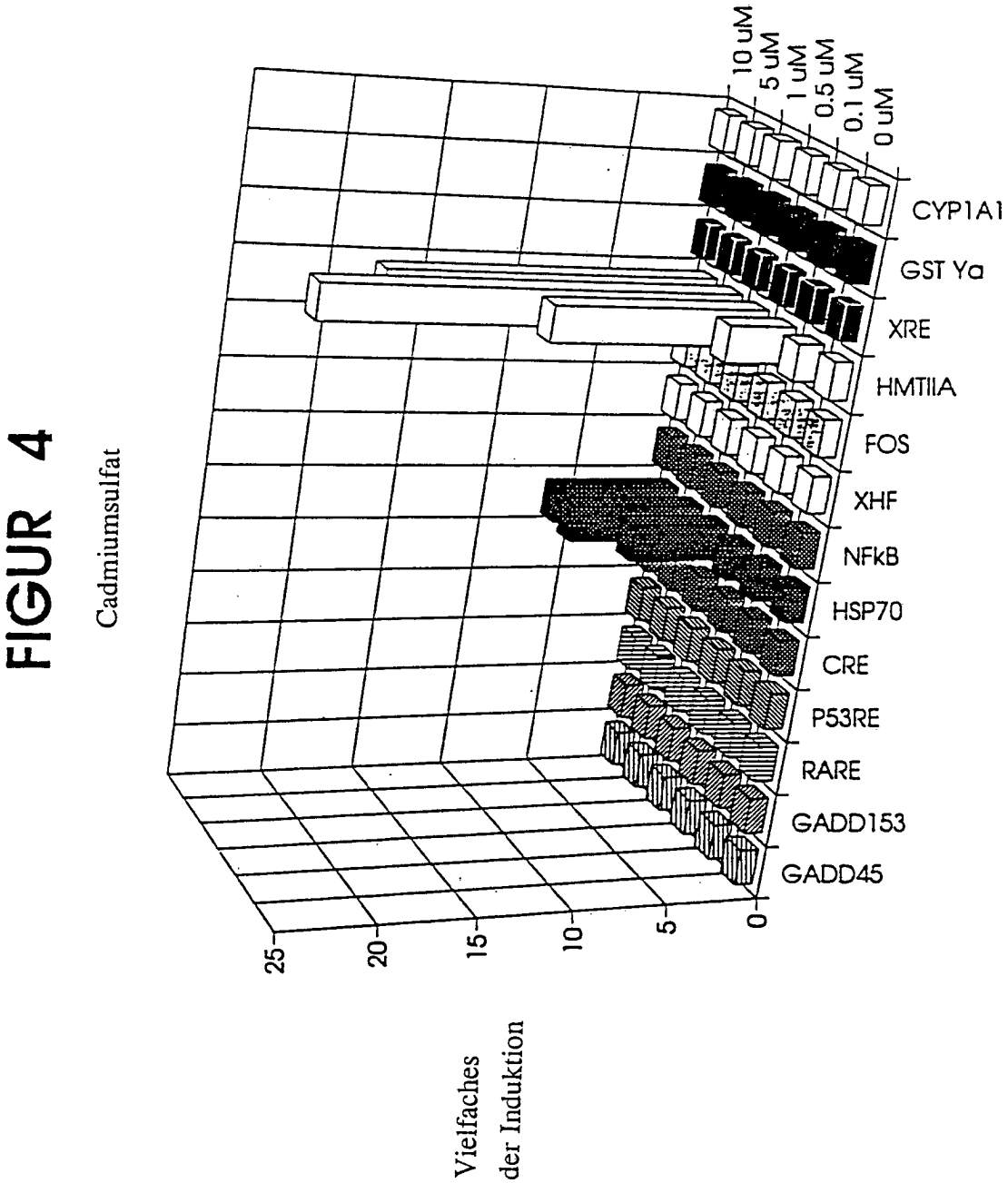
FIGUR 2


3-Methylcholanthren
10 uM
1 uM
100 nM
10 nM
1 nM
0 nM
CYP1A1
GST Ya
XRE
HMT IIA
FOS
XHF
NFkB
HSP70
CRE
P53RE
RARE
GADD153
GADD45
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Vielfaches
der Induktion

FIGUR 3

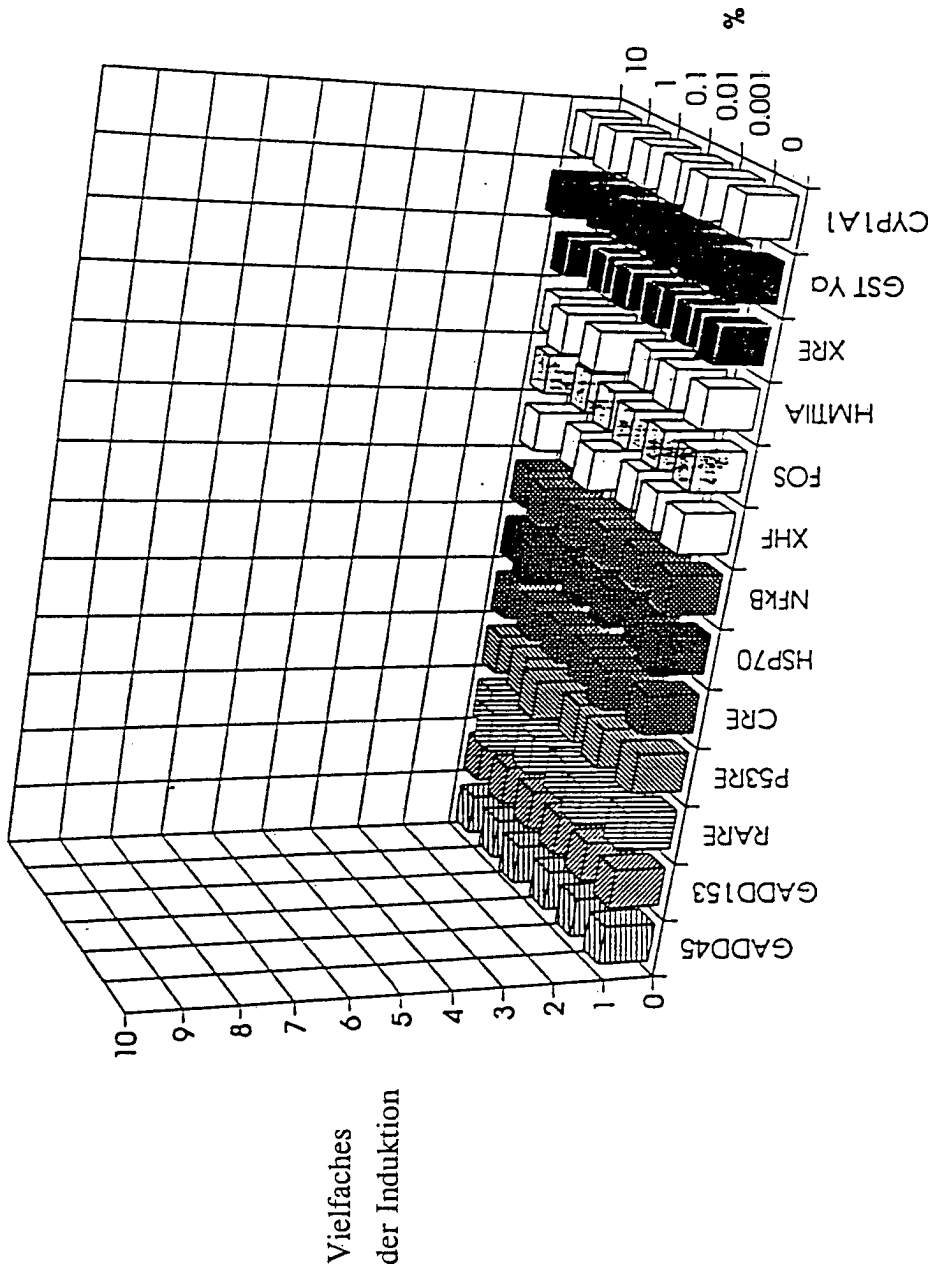

Benzo(a)pyren
uM
100
10
1
0.1
0.01
0
CYP1A1
GSTYA
XRE
HMTIIA
FOS
NFkB
XHF
HSP70
CRE
p53RE
RARE
GADD153
GADD45
JUN
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Vielfaches
der Induktion

FIGUR 4

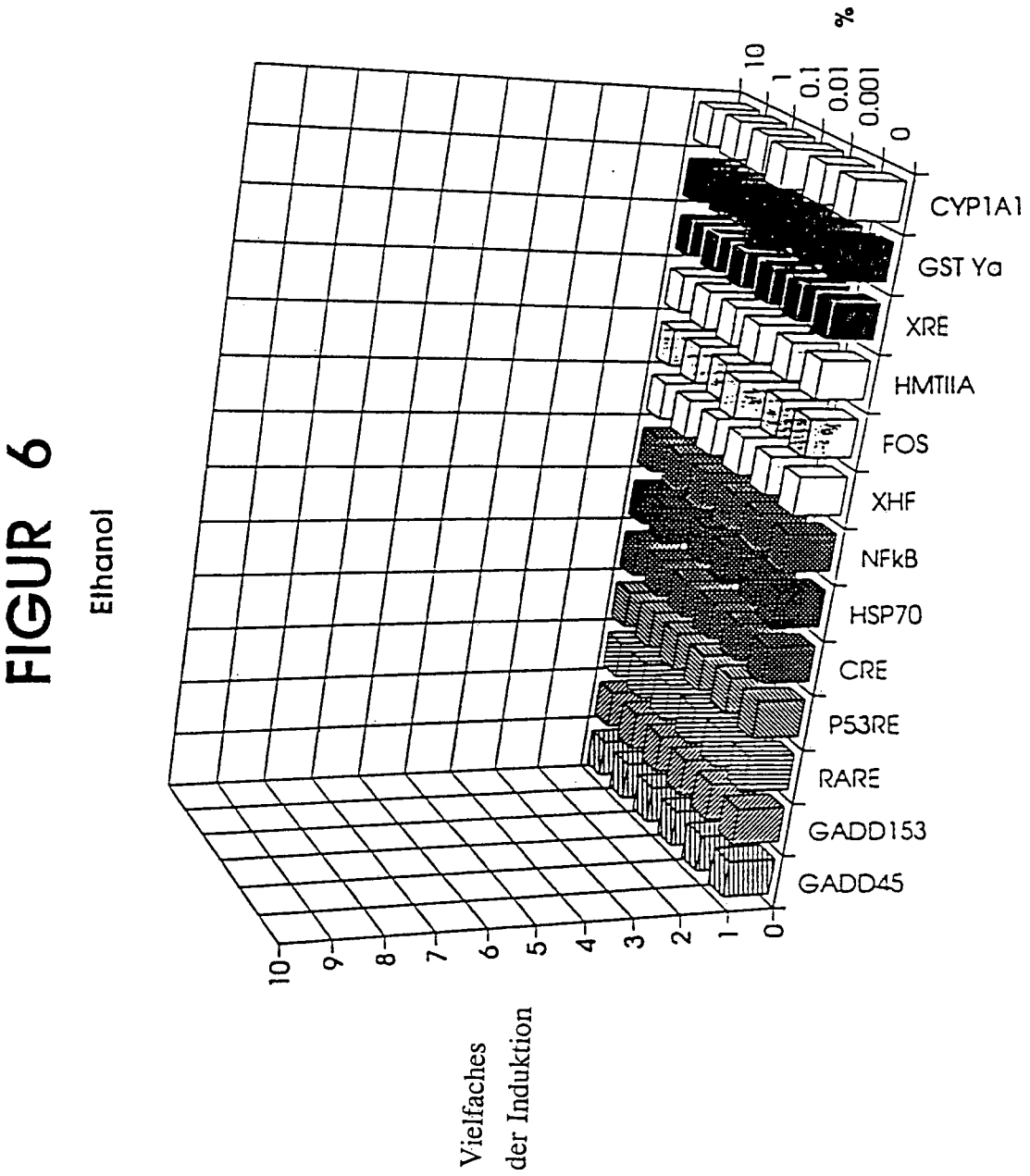

Cadmiumsulfat
10 uM
5 uM
1 uM
0.5 uM
0.1 uM
0 uM
CYP1A1
GST Ya
XRE
HMTIIA
FOS
XHF
NFkB
HSP70
CRE
P53RE
RARE
GADD153
GADD45
25
20
15
10
5
0
Vielfaches
der Induktion

FIGUR 5

DMSO

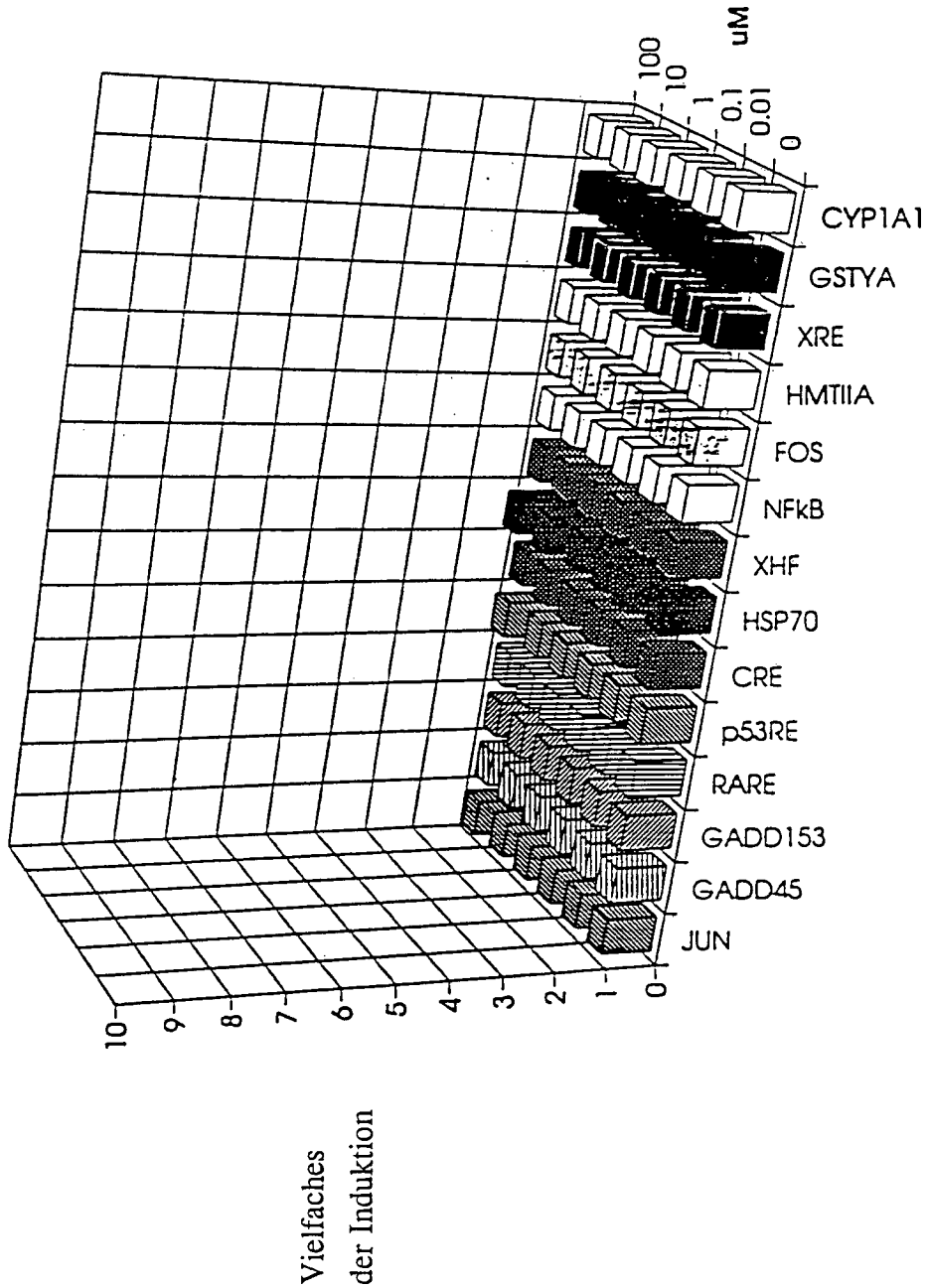

%
10
1
0.1
0.01
0.001
0
CYP1A1
GST Yα
XRE
HMTIIA
FOS
XHF
NFκB
HSP70
CRE
P53RE
RARE
GADD153
GADD45
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Vielfaches
der Induktion

FIGUR 6

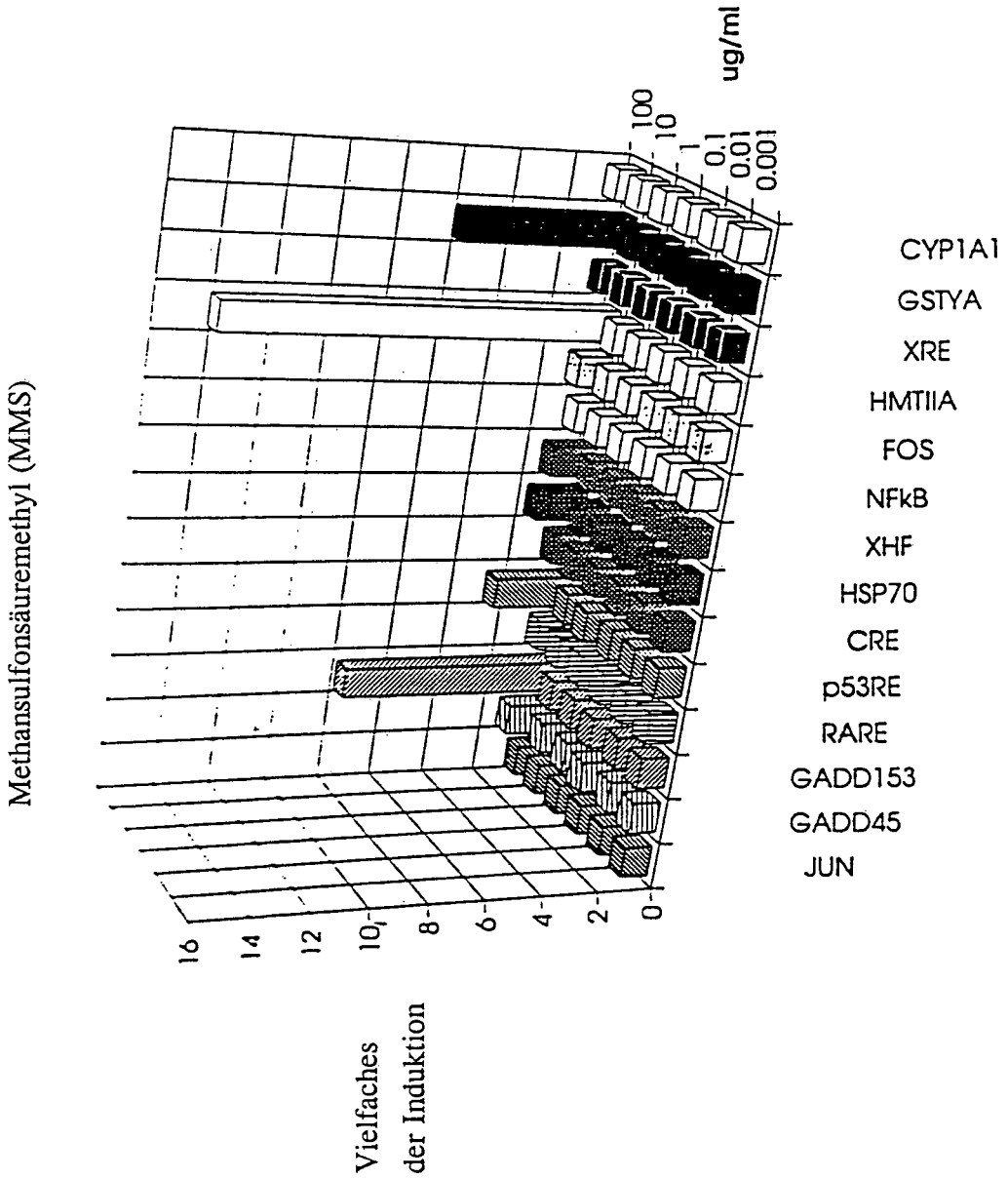

Ethanol
%
10
1
0.1
0.01
0.001
0
CYP1A1
GST Ya
XRE
HMTIIA
FOS
XHF
NFkB
HSP70
CRE
P53RE
RARE
GADD153
GADD45
Vielfaches
der Induktion
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FIGUR 7

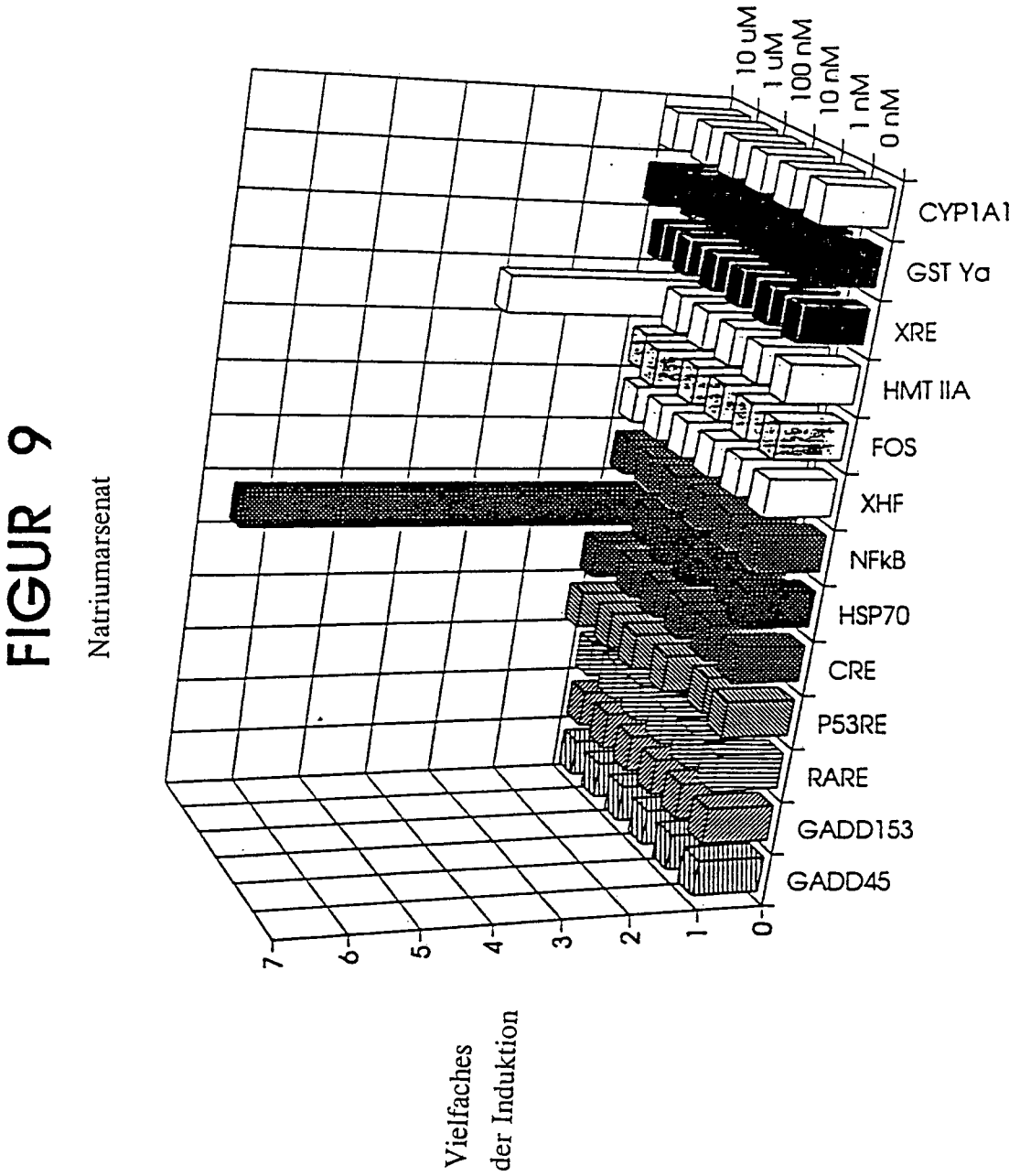
Methapyrilenhydrochlorid



FIGUR 8


Methansulfonsäuremethyl (MMS)
ug/ml
100
10
1
0.1
0.01
0.001
CYP1A1
GSTYA
XRE
HMTIIA
FOS
NFkB
XHF
HSP70
CRE
p53RE
RARE
GADD153
GADD45
JUN
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Vielfaches
der Induktion

FIGUR 9


Natriumarsenat
10 uM
1 uM
100 nM
10 nM
1 nM
0 nM
CYP1A1
GST Ya
XRE
HMT IIA
FOS
XHF
NFkB
HSP70
CRE
P53RE
RARE
GADD153
GADD45
0
1
2
3
4
5
6
7
Vielfaches
der Induktion

FIGUR 10

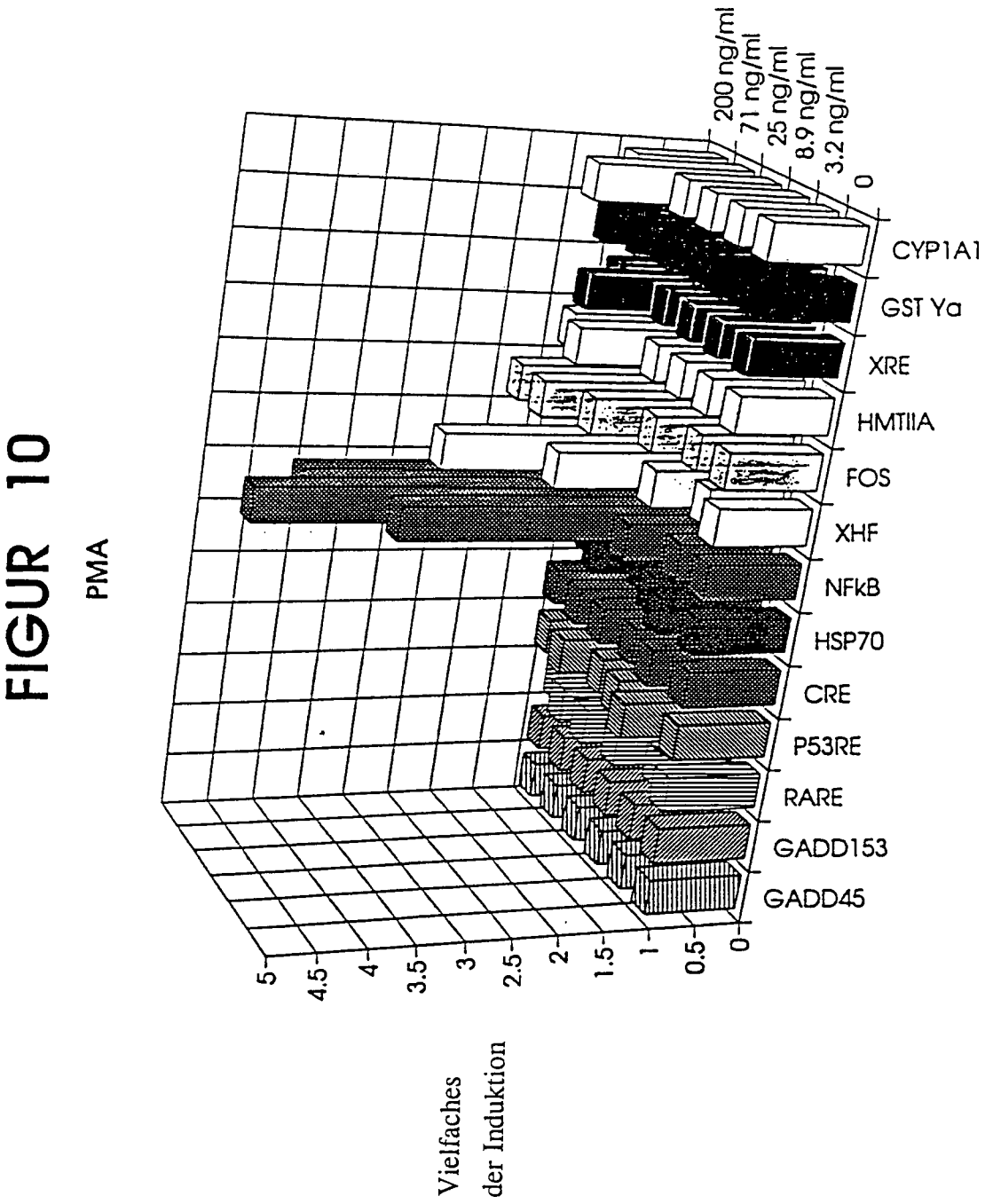
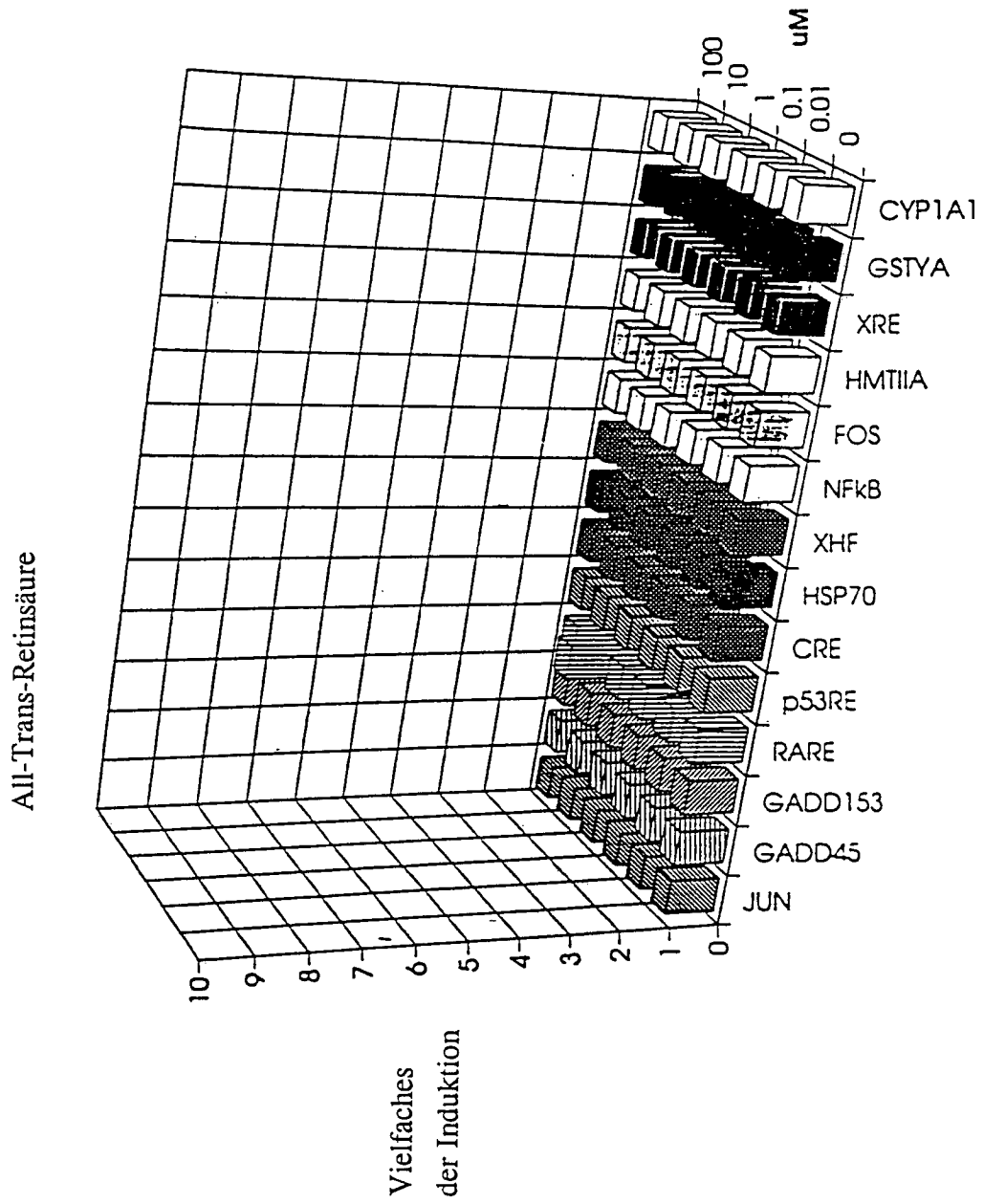

PMA
200 ng/ml
71 ng/ml
25 ng/ml
8.9 ng/ml
3.2 ng/ml
0
CYP1A1
GST Ya
XRE
HMTIIA
FOS
XHF
NFkB
HSP70
CRE
P53RE
RARE
GADD153
GADD45
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Vielfaches
der Induktion

FIGURE 11


All-Trans-Retinsäure
uM
100
10
1
0.1
0.01
0
CYP1A1
GSTYA
XRE
HMTIIA
FOS
NFkB
XHF
HSP70
CRE
p53RE
RARE
GADD153
GADD45
JUN
Vielfaches
der Induktion
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0