

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36670 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10478
- (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 2000 (25.10.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 55 024.7 16. November 1999 (16.11.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): ADNAGEN AG [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Hannover-Langenhagen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): WASCHÜTZA, Stefanie [DE/DE]; Mühlenweg 11, 29227 Celle (DE).
- (74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

Veröffentlicht:

— *Ohne internationales Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DIAGNOSIS KIT, METHOD AND MICROARRAY FOR DETERMINING HUMAN DETOXIFICATION CAPACITY

(54) Bezeichnung: DIAGNOSE-KIT, VERFAHREN UND MIKROARRAY ZUR BESTIMMUNG DER MENSCHLICHEN ENTGIFTUNGSFÄHIGKEIT

(57) Abstract: The invention relates to a diagnosis kit, a microarray and a method for determining human detoxification capacity. Said diagnosis kit contains at least one pair of oligonucleotides (reverse primer, forward primer), the two oligonucleotides of a pair being suitable for use as primers for amplifying one of the two complementary strands of a DNA segment that is sought by means of polymerase chain reaction, respectively and the DNA segment that is sought coding for at least one part of an enzyme of the animal detoxification metabolism.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Diagnose-Kit, einen Mikroarray sowie ein Verfahren für die Bestimmung der menschlichen Entgiftungsfähigkeit. Das Diagnose-Kit enthält mindestens ein Paar Oligonukleotide (Reverseprimer, Forwardprimer), wobei die beiden Oligonukleotide eines Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind und wobei der gesuchte DNS-Abschnitt zumindest für einen Teil eines Enzyms des tierischen Entgiftungsstoffwechsels kodiert.

WO 01/36670 A2

Diagnose-Kit, Verfahren und Mikroarray zur Bestimmung
der menschlichen Entgiftungsfähigkeit

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Diagnose-Kit, ein Verfahren, ein Mikroarray sowie deren Verwendung für die Bestimmung der menschlichen Entgiftungsfähigkeit. Derartige Diagnose-Kits, Verfahren und Mikroarrays werden im Bereich der Umweltmedizin und Arbeitsmedizin und den damit verbundenen Erkrankungen wie Neurodermitis, Asthma, MCS (Multiple Chemical Sensitivity, Multiple Chemikalien-Empfindlichkeit) oder CFS (Chronic Fatigue Syndrom, Müdigkeitssyndrom) verwendet. Weitere Verwendung finden sie im Bereich der Pharmakologie, bzw. zur Bestimmung der menschlichen Verstoffwechselung von Medikamenten oder neuen Produkten.

Die Umwelt des Menschen ist durch Umweltchemikalien (Xenobiotika = Fremdstoffe für den lebenden Organismus) natürlichen und anthropogenen Ursprungs bela-

stet, die nach heutigen Maßstäben nicht mit höherem Leben vereinbar, also unphysiologisch sind. Durch sie werden Störungen in diffizil regulierten physiologischen Systemen hervorgerufen, die nur schwer oder 5 überhaupt nicht reparabel sind. Diese Fremdstoffe gelangen durch die Luft, die Haut oder die Nahrung in den menschlichen oder tierischen Organismus. Wasserlösliche Stoffe werden meist schnell wieder ausgeschieden, nicht so jedoch die wasserunlöslichen. Diese sammeln sich im Gegenteil im Körper -oft im Fettgewebe- an (Bioakkumulation), wenn sie nicht zeitnah verstoffwechselt und abgebaut werden.

10 Daher verfügen der Mensch und höhere Organismen über ein komplexes Enzymsystem, durch das wasserunlösliche Substanzen der Ausscheidung zugängig gemacht werden. Dieses komplexe Enzymsystem vermittelt folgende Reaktionen in zwei Phasen:

15 20 In der sogenannten Phase-I-Reaktion werden die Umweltgifte zunächst durch Enzyme aus dem Zytochromsystem in reaktive Zwischenprodukte umgesetzt, die jedoch akut toxischer sein können als die Schadstoffe selbst. Diese Zwischenprodukte der Phase-I-Reaktion können z.B. an zelluläre Komponenten binden und dadurch Schaden anrichten. Chronische Schäden sind jedoch in der Regel eher auf die wasserunlöslichen Ausgangssubstanzen zurückzuführen.

25 30 Die sich an die Phase-I anschließende Phase-II-Reaktion setzt die reaktiven Zwischenprodukte zu ausscheidbaren Endprodukten um.

35 Phase-I beschreibt also die Umsetzung und Aktivierung beispielsweise von verschiedenen bekannten Medikamenten und Umweltchemikalien (z.B. Debrisoquin, Opioide,

Benzo (a)pyren, polzyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe) sowie einer Anzahl von noch nicht bekannten Xenobiotika zu elektrophilen, radikalalen Substanzen.

5

Bei den Phase-II-Reaktionen gibt es mehrere Reaktionswege, unter anderem Glucoronidierung, Sulfatesterbildung, Aminosäure-Konjugation, wobei die Enzyme des wichtigsten Phase-II-Reaktionsweges (Glutathion-S-Transferasen) die Zwischenprodukte aus der Phase-I (z.B. Epoxide, Nitrosamine) zu ausscheidbaren Endstoffen deaktivieren durch Konjugation mit Glutathion.

15 Es besteht dabei ein Zusammenhang zwischen der Schwere von Vergiftungssymptomen und der Verminderung der Enzymaktivitäten der beteiligten Enzyme des Entgiftungssystems. Bei einigen dieser Enzyme sind genetische Variationen beschrieben, die sich direkt auf die Aktivität dieser Enzyme auswirken und dadurch deren Leistungsfähigkeit entscheidend beeinflussen. Die individuelle genetisch bedingte Variation in der Aktivität der einzelnen Enzyme erlaubt folglich die Zuordnung des Individuums zu verschiedenen Stufen des Entgiftungspotentials. Zur Beurteilung, welche Dosis eine Giftwirkung hervorruft, ist neben der Giftaufnahme und dem Giftstoffwechsel folglich auch die Giftausscheidung von entscheidender Bedeutung.

20
25
30
35 Dies gilt hier auch für die Glutathion-S-Transferase. Diese deaktiviert Zwischenprodukte aus der Phase-I-Reaktion zu ausscheidbaren Endstoffen durch Konjugation mit Glutathion, dessen reduzierte Form eine nukleophile SH-Gruppe besitzt, die leicht mit Verbindung mit elektrophilen C-Atomen zum Thioether reagiert. Eine möglichst hohe Aktivität der Glutathion-

S-Transferase bedeutet dabei eine effiziente Konjugation und schnelle Entgiftung, während eine verminder-
te bzw. fehlende Aktivität der Glutathion-S-
Transferase eine verlangsamte Entgiftung bewirkt.

5

Das System der Glutathion-S-Transferasen weist mehrere unterschiedliche Enzyme auf, beispielsweise die Glutathion-S-Transferase GSTM1 und die Glutathion-S-Transferase GSTT1.

10

Glutathion-S-Transferase GSTM 1

Die Glutathion-S-Transferase GSTM1 weist einen Polymorphismus auf, bei dem die einzelnen Genotypen gleichberechtigt nebeneinander vorkommen. Durch den Genotyp 00 wird das Fehlen des Gens für die GSTM1 angezeigt. Liegt ein funktionelles Gen vor, können zwei verschiedene Varianten A und B unterschieden werden. Beide Varianten formen aktive homodimere Enzyme (AA/BB bzw. bei Fehlen des Gens für ein Allel A0/B0) oder heterodimere Enzyme (AB), wobei die Mischform AB die höchste Enzymaktivität zeigt und u.a. mitverantwortlich gemacht wird für das "drug-resistance"-Phänomen in der Chemotherapie.

25

Die Glutathion-S-Transferase M1 spielt in der Leber, Lunge und der Haut eine große Rolle, wobei in etwas 40 % der kaukasischen Bevölkerung der Null-Genotyp vorkommt. Dieser Null-Genotyp wird mit der Entstehung diverser Tumorerkrankungen (Lungen-, Haut-, Blasenkrebs) sowie chronische Erkrankungen mit Umweltbelastungsfaktor (Asbestosis, chronische Bronchitis) beschrieben.

35

Glutathion-S-Transferase GSTT1

Die Glutathion-S-Transferase T1 kommt u.a. in der Leber und in Erythrozyten vor und vermittelt die Glutathion-Konjugation mit halogenierten Kohlenwasserstoffen und Epoxiden. Bei etwa 25 % der bisher untersuchten deutschen Bevölkerung wurde in Erythrozyten keine Enzymaktivität der Glutathion-S-Transferase gefunden. Durch den Genotyp 00 wird das Fehlen des Genes für diese Glutathion-S-Transferase angezeigt. Der 0-Genotyp wird daher als Risikofaktor angesehen, weil hier die GSTT1 vermittelte Aktivität gegenüber DNA-schädigenden Peroxiden und anderen Metaboliten vermindert ist. Bekannte toxische Substrate der GSTT1 sind u.a. Methylbromid, Ethylenoxid und Methylenchlorid.

15

Das gleichzeitige Fehlen beider Enzyme, d.h. der genetische Null-Typ für GSTM1 und GSTT1 wurde in 10 % der kaukasischen Bevölkerung gefunden. Für diesen Bevölkerungsanteil ergibt sich folglich ein erhöhtes Risiko aufgrund verminderter Entgiftungskapazität.

20

Die geltenden MAK-Werte (max. Arbeitsplatzkonzentrationen) berücksichtigen derzeit nicht den Anteil an genetisch bedingt empfindlichen Menschen.

25

Um die individuelle Belastungsfähigkeit mit Umweltchemikalien zu bestimmen bzw. um bei erkrankten Personen die richtige Therapie zu ermitteln, wird nach dem Stand der Technik ein Belastungstest durchgeführt, über den auf die Entgiftungsfähigkeit und damit Enzymaktivität dieses Individuums geschlossen werden kann. Dies erfolgt nach dem Stand der Technik durch Gabe einer Testsubstanz, die durch die zu untersuchenden Enzyme abgebaut wird und anschließende Bestimmung der Clearance des jeweiligen Individuums für diese Substanz.

30

35

Nachteilig hieran ist, daß die Bestimmung der Enzymaktivitäten nur über eine zusätzliche Belastung der Person mit einer Chemikalie bestimmt werden kann. Eine derartige Bestimmungsmethode verbietet sich insbesondere bei Kindern oder Personen mit reduziertem Allgemeinzustand oder Personen, von denen bekannt ist, daß sie bereits stark schadstoffbelastet sind. Daher kann dieses Verfahren nicht in jedem Falle angewandt werden, insbesondere nicht bei Personen, bei denen aufgrund ihrer Schadstoffbelastung die Bestimmung der Enzymaktivität zur Ermittlung der geeigneten Therapie besonders wichtig wäre.

Demgegenüber schlägt die DE 197 38 908, die auf dieselben Erfinder wie die vorliegende Erfindung zurückgeht, vor, genetische Polymorphismen von Genen in Individuen zu bestimmen, die für ein Enzym aus dem Entgiftungsstoffwechsel kodieren. Der Polymorphismus kann dabei sowohl in der Anlage eines Genes als auch in verschiedenen allelischen Variabilitäten eines oder mehrerer polymorpher Gene bestehen.

Das in der DE 197 38 908 vorgeschlagene Verfahren ist jedoch extrem aufwendig und kann nur von einzelnen spezialisierten Laboren durchgeführt werden. Denn für dieses Verfahren ist es erforderlich, eine Multiplikation der DNA eines Menschen durchzuführen, wozu eine erhebliche molekularbiologische Kenntnis sowie ein Höchstmaß an experimenteller Erfahrung gehört. Denn die Entwicklung entsprechender Reaktionsansätze, beispielsweise für eine Polymerase-Kettenreaktion, ist aufwendig und erfordert zum sicheren Gelingen eine weit über das Durchschnittskönnen des Fachmanns erforderliche Erfahrung und Kenntnis. Nachteilig an dem in der DE 197 38 908 vorgeschlagenen Verfahren ist

daher, daß dieses nicht von jedem beliebigen Laborarzt bzw. medizinischen Labor nachvollzogen werden kann.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Diagnose-Kit, ein Mikroarray, ein Verfahren sowie Verwendungen hiervon zur Verfügung zu stellen, mit denen die menschliche Entgiftungsfähigkeit auf einfache Art und Weise von jedem beliebigen Labor standarisert bestimmt werden kann.

10 15 Diese Aufgabe wird durch das Diagnose-Kit nach Anspruch 1, dem Mikroarray nach Anspruch 21, das Verfahren nach Anspruch 28 sowie die Verwendungen nach Anspruch 45 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen finden sich in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen.

20 25 Das erfindungsgemäße Diagnose-Kit enthält dabei die zur Durchführung einer Polymerrasekettenreaktion erforderlichen Substanzen, wie sie auch von verschiedenen Herstellern angeboten werden. Weiterhin enthält das Diagnose-Kit mindestens ein Paar Oligonukleotide, die als Reverseprimer und Forwardprimer bei der Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion erforderlich sind. Derartige Oligonukleotide werden auch bei den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt. Die Oligonukleotide der Paare sind dabei erfindungsgemäß so ausgesucht, daß eine Amplifikation eines DNS-Abschnittes erfolgt, der zumindest für einen Teil des Enzyms GSTT1 des tierischen Entgiftungsstoffwechsel kodiert. Erfolgt somit eine Amplifikation eines DNS-Abschnittes, so kann einfach festgestellt werden, ob ein Gen für das Enzym GSTT1 vorliegt. Damit ist eine Null-Typ-Bestimmung möglich.

30 35

Um weiterhin auch verschiedene Allele desselben Genes

zu erfassen, werden in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet bzw. in das Diagnose-Kit für jedes der Allele verschiedene Oligonukleotide gegeben, so daß eine Amplifikation eines Alleles nachgewiesen werden kann. Dies kann beispielsweise auch so geschehen, daß die Oligonukleotide für die einzelnen Allele sich derart unterscheiden, daß Bereiche der DNS der Allele amplifiziert werden, die sich beispielsweise durch eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym unterscheiden.

Die Erfassung eines Gens bzw. seiner Allele kann auch mittels des erfindungsgemäßen Mikroarrays, z.B. eines DNA-Chips, erfolgen, wobei die einzelnen Zellen des Chips Oligonukleotide aufweisen, die spezifisch mit bestimmten Abschnitten der nachzuweisenden Gene hybridisieren. Zum Aufbau und dem Einsatz von DNS-Chips wird beispielhaft allgemein auf die EP 0 373 203 verwiesen. Der Nachweis kann dabei ohne Amplifikation direkt oder auch erst nach Amplifikation des gesuchten DNS-Abschnittes erfolgen. In gleicher Weise kann der Nachweis ohne oder erst nach Restriktionsverdau der DNS bzw. eines amplifizierten DNS-Abschnittes hiervon in kürzere DNS-Abschnitte durchgeführt werden.

Vorteilhaft an dem erfindungsgemäßen Diagnose-Kit, dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie dem erfindungsgemäßen Mikroarray ist es, daß jeder Laborarzt und jedes medizinische Labor sowie jedes wissenschaftliche Labor, das derartige Untersuchungen durchführt, sämtliche aufeinander abgestimmte Substanzen gegebenenfalls in einem einzigen Diagnose-Kit, zur Verfügung erhält, bzw. daß jegliche Vorbereitungsarbeiten für die Labore entfallen und auf einfache Art und Weise der Polymorphismus bestimmt werden kann. Insbe-

sondere sind die Primer-Oligonukleotide bzw. die Oligonukleotide des Mikroarrays bereits ausgetestet, so daß die Hauptarbeit bei der Entwicklung entsprechender Oligonukleotide entfällt.

5

Damit ist es erstmals möglich, die Bestimmung von Polymorphismen und des individuellen Entgiftungspotentials von einzelnen Patienten in großem Maßstabe und am jeweiligen Ort des Patienten auf einfache und kostengünstige Weise durchzuführen. Denn hierzu benötigt der einzelne Laborarzt bzw. das einzelne medizinische Labor lediglich noch einen erfindungsgemäßen Mikroarray, einen herkömmlichen Thermoscyler (PCR-Gerät) und/oder ein Gerät zur Auftrennung der einzelnen amplifizierten DNS-Fragmente. Dies kann beispielsweise eine Gelelektrophorese-Einheit oder ein Kapillarelektrophoresegerät sein. Ein derartiges herkömmliches Kapillarelektrophoresegerät wird beispielsweise von der Firma Perkin Elmer Biosystems™ unter dem Namen "PE ABI Prism Genetic Analyser 310"™ vertrieben. Entsprechende Thermocycler für die Amplification der DNS werden beispielsweise von der Firma Perkin Elmer Biosystems™ unter dem Namen "GenAmp 2400"™ bzw. auch "GenAmp9600"™ vertrieben.

25

Zur leichteren Erfassung der amplifizierten DNS-Abschnitte kann jeweils mindestens eines der Oligonukleotide eines Paars mit einem Fluorophor gekennzeichnet sein, so daß hierdurch auch eine automatisierte Auswertung anhand der spezifischen Fluoreszenzemission der jeweiligen Fluorophore möglich ist.

30

Insgesamt wird durch das erfindungsgemäße Diagnose-Kit, Mikroarray bzw. Verfahren die Bestimmung des Polymorphismus von Entgiftungsenzymen jedermann auf einfache, sichere und standardisierte Weise ermög-

35

licht.

Erfindungsgemäß kann das Diagnose-Kit auch dahingehend weitergebildet werden, daß dem Diagnose-Kit nicht nur Oligonukleotide für die Bestimmung eines einzelnen Enzymes sondern auch weitere Oligonukleotidpaare für die Bestimmung weiterer Gene von Entgiftungsenzymen beigegeben werden. In gleicher Weise kann der erfundungsgemäße Mikroarray auch Felder vorsehen, die Oligonukleotide aufweisen, mit denen weitere Gene von Entgiftungsenzymen nachgewiesen werden können.

In diesem Falle ist es dem Anwender möglich, auf einfache Art und Weise nicht nur eine Null-Typ-Bestimmung oder eine Allelbestimmung eines einzelnen Enzymes durchzuführen sondern zugleich weitere Enzyme zu bestimmen. So ist es ihm beispielsweise möglich, Informationen sowohl über die GSTM1 als auch die GSTT1 zu erfassen, und dadurch beispielsweise das "drug-resistance"-Phänomen in der Chemotherapie für einen Patienten vorherzusagen.

Im folgenden sollen einige Beispiele erfundungsgemäßer Kits und erfundungsgemäßer Verfahren beschrieben werden.

Ein erster Kit ermöglicht eine Multiplex-Null-Typ-Bestimmung mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) der Gene für GSTM1 und GSTT1 mit markierten Oligonukleotiden als Primer für einen Nachweis über das Gerät Perkin Elmer ABI Prism Genetic Analyzer 310.

Als Substanzen, die für die PCR nötig sind, enthält der Kit die folgenden Inhaltsstoffe getrennt in einzelnen Behältnissen:

10 μ l PCR-Puffer (10 x Puffer, z.B. der Fa. Promega)
8 μ l MgCl₂ (25 mM)
2 μ l dNTPs (10 mM) (Desoxi-Nucleotid-Triphosphate,
5 z.B. Guanin (G), Adenin (A),
Cytosin (C), Thymin (T))
2 μ l Primer GSTM1 fw (10 pmol/ μ l)
2 μ l Primer GSTM1 rv (10 pmol/ μ l)
2 μ l Primer Albumin fw (10 pmol/ μ l)
10 2 μ l Primer Albumin rv (10 pmol/ μ l)
2 μ l Primer GSTT1 fw (10 pmol/ μ l)
2 μ l Primer GSTT1 rv (10 pmol/ μ l)
6 μ l Template DNS (83 ng/ μ l)
61,5 μ l H₂O bidest.
15 0,5 μ l Tag-Polymerase (5U/ μ l) (z.B. der Fa. Promega)

Dabei sind die Oligonukleotidie GSTM1 fw, die als Vorwärts-Primer dienen, mit dem Farbstoff Fam (Carboxyfluorescein) markiert, der Vorwärts-Primer für Albumin mit Ned (Fluoreszenzfarbstoff der Fa. PE Biosystems) markiert und der Vorwärts-Primer für GSTT1 mit Hex (4, 7, 2', 4', 5', 7'-Hexachloro-6-Carboxyfluorescein) markiert.
20

25 Die einzelnen Primer besitzen die folgende Nukleotidabfolgen:

GSTM1 fw: GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C;

30 GSTM1 rv: GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G;

GSTT1 fw: TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC;

GSTT1 rv: TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA;

35 Albumin fw: GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C

sowie

Albumin rv: GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC

5

Weiterhin kann das Kit einen Fluoreszenzstandard (Rox-Standard, Rox = 6-carboxy-X-rhodamin) als Längenstandard für die Fragmentgrößenzuordnung enthalten.

10

Weiterhin enthält das Kit die Verfahrensbeschreibung für die Amplifikation der DNS mit den folgenden Parametern:

95 °C	94 °C	64 °C	72 °C	72 °C	4 °C
2 min	1 min	1 min	1 min	5 min	∞
Preheat	30 x			Hold 1	Hold 2

15

Die Auswertung kann nun beispielsweise über Gelelektrophorese erfolgen. Hierzu wird ein 2,5 %iges Gel (SeaKem LE™, Biozym™) gegossen, ein Marker (100 bp-ladder) mitaufgetragen und das Gel bei einer Spannung von 100 mV für 45 Minuten zur Auftrennung laufengelassen. Die interne Kontrolle für das Gen für Albumin besitzt eine Länge von 350 bp und muß in jedem Ansatz positiv sein. Die GSTM1 besitzt eine Länge von 219 bp und die GSTT1 eine Länge von 480 bp. Die letzten beiden Gene sind als DNS-Banden im Gel nur bei Vorhandensein eines funktionellen Gens zu sehen, andererfalls liegt der jeweilige Null-Typ vor.

20

25

30

Figur 1 zeigt ein derartiges Gel, bei dem die Banden für die GSTT1 (T1) bei 480 bp, für das Gen für Albumin (A) bei 350 bp sowie für das Gen GSTM1 (M1) bei 219 bp deutlich in den Spuren 3 und 4 zu erkennen sind. Spur 2 enthält als Standard Markersubstanzen.

In diesem Falle liegt also folglich sowohl das Gen für GSTM1 als auch das GSTT1-Gen vor.

5 Figur 2 zeigt eine entsprechende Auswertung mittels Kapillarelektrophorese durch das Gerät PE ABI Prism Genetic Analyzer 310™. Auch hier sind die entsprechenden Banden bei den entsprechenden Fragmentlängen (in Basenpaaren) deutlich zu erkennen. Die Höhen der einzelnen Banden sind dabei von den verwendeten Fluoreszenzmarkern abhängig und geben daher selbst keine quantitative Information. Die weiteren Banden stellen 10 den ROX-Standard dar, der die Zuordnung der Fragmentgrößen ermöglicht.

15 Figur 3 zeigt die Ergebnisse einer weiteren Untersuchung mittels Kapillarelektrophorese. Hierbei treten neben den Banden des Rox-Standards lediglich die Banden des Albumin-Standards (A) und der GSTT1 (T1) auf. Offensichtlich liegt bezüglich der GSTM1 ein Nulltyp 20 vor.

25 In einem weiteren Beispiel wurde ein Kit verwendet für die Variantenbestimmung der GSTM1 mit markierten Oligonukleotiden als Primern.

30 Die Glutathion-S-Transferase M1 ist in zweierlei Hinsicht durch einen genetischen Polymorphismus ausgezeichnet. Zum einen kann eines oder beide der (auf den paarweisen Chromosomen befindlichen) für die Glutathion-S-Transferase M1 codierenden Gene GSTM1 fehlen und dadurch ein bei Vorhandensein zweier Gene GSTM1 homozygoter Typus, ein bei lediglich eines Genes GSTM1 heterozygoter Typus sowie ein bei Fehlen beider Gene wiederum homozygoter Null-Typus entstehen. Zum anderen führt der Austausch von Guanin (G) 35 gegen Cytosin (C) an Position 2619 von einem Enzymtyp

B zu einem Enzymtyp A, wobei der heterozygote AB-Typ die höchste potentielle Enzymaktivität aufweist. Durch die Bestimmung der genomischen Allelvariationen eines Individuums lassen sich daher die potentielle Entgiftungsfähigkeit und damit die potentiellen Belastungsgrenzwerte sowie die für dieses Individuum daraus folgende geeignete Therapie bestimmen.

Der zur Bestimmung dieser Allelvariabilität dienende Kit enthält die folgenden, für die PCR erforderlichen Substanzen, jeweils in getrennter Einzelverpackung:

10 10 µl PCR-Puffer (10 x Puffer, z.B. der Fa. Promega)
8 µl MgCl₂ (25 mM)
15 2 µl dNTPs (10 mM) (Guanin (G), Cytosin (C),
Adenin (A), Thymin (T))
4 µl Primer GSTM1 fw (10 pmol/µl)
2 µl Primer GSTM1-A (10 pmol/µl)
2 µl Primer GSTM1-B (10 pmol/µl)
20 6 µl Template DNA (83 ng/µl)
65,5 µl H₂O bidest.
0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl) (z.B. der Fa. Promega)

25 Dabei sind die Oligonukleotide GSTM1-A mit dem Fluorophor Hex markiert und die Oligonukleotide GSTM1-B mit dem Fluorophor Fam markiert. Die Oligonukleotide weisen dabei die folgende Basenfolge auf:

30

GSTM1 fw: GCT TCA CGT GTT ATG GAG GTT C für beide Allele der GSTM1;

35

GSTM1-A : TTG GGA AGG CGT CCA AGC GC;

GSTM1-B : TTG GGA AGG CGT CCA AGC AG.

Weiterhin enthält das Kit eine Anweisung mit folgen-
5 dem PCR-Programm:

94°C	94°C	57°C	72°C	94°C	57°C	72°C	4°C
3min	45sec	1 min	1,5min	30sec	30 sec	45sec*	∞
Pre-heat	4 x			30 x			Hold 1

10 *plus 3 sec pro Zyklus

15 Die bei dem genannten PCR-Programm amplifizierten
DNS-Segmente weisen eine Länge von 132 bp auf. Der
Nachweis erfolgt wiederum über Kapillarelektrophorese
mit den in den Figuren 4 und 5 dargestellten Ergeb-
nissen. Dabei ist mit M1-B jeweils die Bande gekenn-
zeichnet, die durch das 132 bp lange DNS-Stück der
20 Variante B der GSTM1 entsteht und mit dem Fluorophor
FAM markiert ist, während M1-A die Bande kennzeich-
net, die durch das 132 bp lange DNS-Stückes der Vari-
ante A der GSTM1 entsteht.

25 Alternativ kann die Auswertung auch über Gelelektro-
phorese erfolgen. Hierzu wird ein 2,5 %iges Gel (Sea-
Kem LE Biozym™) gegossen, wobei dann anschließend
neben dem PCR-Produkt auch ein Marker (100 bp-Ladder)
mitaufgetragen wird, um den PCR-Erfolg zu prüfen. Das
30 Gel läuft dann mit einer Spannung von 100 mV für 45
Minuten. Um mittels Gel-Elektrophorese zwischen der
Variante A und B zu unterscheiden, wird das PCR-
Produkt einem Restriktionsverdau unterworfen. Denn

5 Variante A enthält eine Schnittstelle für HaeII und wird in zwei Fragmente von 116 bp und 16 bp Länge zerteilt, während Variante B keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HaeII enthält. Daraufhin wird ein 4 %iges Gel für die Auftrennung kleinerer Fragmente (Biorad) gegossen, wobei wiederum ein Marker (100 bp-Ladder) mitaufgetragen wird. Das 4 %ige Gel läuft dann bei einer Spannung von 100 mV für eine 10 Stunde. Bei diesem Gel können nun die entsprechenden Banden bei 116 bp und 16 bp für die Variante A und für 132 bp für die Variante B des Genes GSTM1 erkannt werden.

15 Figur 6 zeigt ein derartiges Gel für verschiedene Proben in verschiedener Gelspuren, bei dem sowohl die 116 bp-Bande ("GSTM1-A" für Variante A) als auch die 132 bp-Bande ("GSTM1-B" für Variante B) zu erkennen ist. Die zweite Spur von links enthält als Standard 20 Markersubstanzen. Die Spuren 4, 6, 9 entsprechen Proben, die das Gen für die GSTM1 Variante B enthalten, während die Spuren 3, 5, 7, 8, 10 bis 14 Proben mit dem Gen für die GSTM1 Variante A enthalten.

5

Patentansprüche

1. Diagnose-Kit für die Bestimmung der menschlichen Entgiftungsfähigkeit mit mindestens einem Paar Oligonukleotide (Reverse-primer, Forwardprimer), wobei die beiden Oligonukleotide eines Paars als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind, und wobei der gesuchte DNS-Abschnitt zumindest für einen Teil eines Enzyms des tierischen Entgiftungsstoffwechsels kodiert.
2. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.
3. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate, sowie eine hitzestabile Polymerase enthält.

30

4. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile
Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus*
(Taq-Polymerase) enthält.

5

5. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-
sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest
eines der beiden Oligonukleotide eines Paars
von Oligonukleotiden mit einem Fluorophor mar-
kiert ist.

10

6. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-
sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als
15 Positivkontrolle eine DNS-Probe mit dem gesuch-
ten DNS-Abschnitt enthält.

15

7. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es
20 weiterhin für eine Kontrollbestimmung einen
Abschnitt einer für ein Albumin kodierenden DNS
sowie zwei Oligonukleotide, die jeweils als
Primer zur Amplifikation zumindest eines Ab-
schnitts jeweils eines der beiden komple-
25 mentären Stränge der für das Albumin kodierenden
DNS geeignet sind, enthält.

25

8. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er zwei

bzw. mehrere Paare Oligonukleotide für DNS-Abschnitte jeweils zweier bzw. mehrerer verschiedener Gene bzw. Genvarianten enthält.

- 5 9. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die mehreren verschiedenen Gene bzw. Genvarianten für verschiedene Enzyme bzw. für verschiedene Varianten desselben Enzyms kodieren.
- 10 10. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die mehreren verschiedenen Gene für GSTM1 und/oder GSTT1 und/oder verschiedene Varianten des Enzyms GSTM1 kodieren.
- 15 11. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Bestimmung des Vorhandenseins des Enzyms GSTM1 ein Paar Oligonukleotide mit den folgenden Sequenzen aufweist:
- 20 GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C und
GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G
- 25 12. Diagnose-Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Bestimmung des Vorhandenseins des Enzyms GSTT1 ein Paar Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen aufweist:

TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC und
TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA.

- 5 13. Diagnose-Kit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Bestimmung des Vorhandenseins und gegebenenfalls der vorhandenen Varianten des Enzyms GSTM1 zwei Paare Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen enthält:

10 GCT TCA CGT GTT ATG GAG GTT C identisch für beide Paare und
TTG GGA AGG CGT CCAAGC GC bzw.
TTG GGA AGG CGT CCA AGC AG.

- 15 14. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Oligonukleotide
TTG GGA AGG CGT CCAAGC GC bzw.
TTG GGA AGG CGT CCA AGC AG
jeweils mit zueinander verschiedenen Fluorophoren markiert sind.

- 20 25 15. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin
eine Anleitung zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion,

eine Anleitung zur Durchführung einer Fragment-analyse enthält.

16. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er eine An-leitung zur Durchführung eines Restriktions-verdaus mit anschließender Gelelektrophorese enthält.
- 10 17. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergeb-nisse enthält.
- 15 18. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden An-sprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Mikroarray (DNS-Chip) enthält, wobei der Mikro-array eine Anzahl Zellen (Felder) aufweist und in mindestens einer Zelle ein Oligonukleotid an-geordnet ist, das mit einem der gesuchten DNS-Abschnitte hybridisiert.
- 20 25 19. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Abschnitt, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle des Mikroarrays ein weiteres Oli-gonukleotid angeordnet ist und die Sequenz des Oligonukleotids, das in der mindestens einen Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotids unterscheidet.

- 5 20. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligonukleotide jeweils mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.

10 21. Mikroarray, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen (Feldern), dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer Zelle ein Oligonukleotid angeordnet ist, das mit einem DNS-Abschnitt hybridisiert, der für einen Teil eines Enzyms des Entgiftungsstoffwechsels kodiert.

15 22. Mikroarray nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens einer weiteren Zelle ein weiteres Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die Sequenz des Oligonukleotids, das in der mindestens einen Zelle angeordnet ist, sich von der Sequenz des weiteren Oligonukleotids unterscheidet.

20 25 23. Mikroarray nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen jeweils ein Oligonukleotid angeordnet ist, wobei die in verschiedenen Zellen angeordneten Oligo-

nukleotide jeweils mit verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisieren.

- 5 24. Mikroarray nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die gesuchten DNS-Abschnitte für einen Teil der Enzyme GSTT1 und/oder GSTM1 kodieren.
- 10 25. Mikroarray nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest einer der gesuchten DNS-Abschnitte Position 2619 des Gens enthält, das für das Enzym GSTM1 kodiert.
- 15 26. Mikroarray nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest einer der gesuchten DNS-Abschnitte an Position 2619 ein Cytosin oder ein Guanin aufweist.
- 20 27. Mikroarray nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß ein gesuchter DNS-Abschnitt an Position 2619 ein Guanin und ein weiterer gesuchter DNS-Abschnitt an Position 2619 ein Cytosin aufweist.
- 25 28. Verfahren zur Bestimmung der Entgiftungsfähigkeit eines Menschen, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein und/oder die allelische Variabilität zumindest eines Gens erfaßt wird, das

für ein Enzym des tierischen Entgiftungsstoffwechsels kodiert.

- 5 29. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein oder Fehlen der Glutathion-S-Transferase GSTT1 erfaßt wird.
- 10 30. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Entgiftungsfähigkeit in zunehmender Reihenfolge
00 < A0,AA bestimmt wird,
wobei 00 für das Fehlen beider Gene der GSTT1 und A0 bzw. AA für das Vorhandensein eines oder
15 beider Gene der GSTT1 steht.
- 20 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Vorhandensein und/oder verschiedene Varianten der Glutathion-S-Transferase GSTM1 erfaßt wird.
- 25 32. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß erfaßt wird, ob an Position 2619 eines oder beider menschlicher Gene der GSTM1 sich ein Guanin oder ein Cytosin befindet.

33. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Entgiftungsfähigkeit in zunehmender Reihenfolge $00 < A0, B0, AA, BB < AB$ bestimmt wird,

5

wobei 00 für das Fehlen beider Gene der GSTM1, A0 bzw. B0 für das Vorhandensein eines Gens der GSTM1, AA, BB für das Vorhandensein zweier Gene mit jeweils Cytosin an Position 2619(A) bzw. Guanin an Position 2619(B) und AB für das Vorhandensein je eines Gens der GSTM1 mit Cytosin (A) bzw. Guanin(B) an Position 2619.

10

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Probe des Menschen DNS oder c-DNS isoliert und zumindest teilweise vervielfältigt und anschließend die allelische Variabilität und/oder das Vorhandensein oder Fehlen eines Gens erfaßt wird, das für ein Enzym des Entgiftungsstoffwechsels kodiert.

20

35. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS durch Polymerasekettenreaktion vervielfältigt wird.

25

36. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerasekettenreaktion mit einem Paar Oligonukleotide durchge-

führt wird, die die folgenden Sequenzen aufweisen:

TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC und

5 TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA.

10 37. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß eines der beiden Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

15 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerasekettenreaktion mit einem Paar Oligonukleotide durchgeführt wird, die die folgenden Sequenzen aufweisen.

20 GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C und

GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G

25

39. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß eines der beiden Oligonukleotide mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

25

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerasekettenreaktion mit zwei Paaren Oligonukleotiden

durchgeführt wird, die die folgenden Sequenzen aufweisen:

5 GCT TCA CGT GTT ATG GAG GTT C identisch für beide Paare und

TTG GGA AGG CGT CCAAGC GC bzw.

TTG GGA AGG CGT CCA AGC AG.

41. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Oligonukleotide

TTG GGA AGG CGT CCAAGC GC bzw.

TTG GGA AGG CGT CCA AGC AG

15 jeweils mit zueinander verschiedenen Fluorophoren markiert sind.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß die vervielfältigte DNS durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut und anhand der erzeugten DNS-Bruchstücke die allelische Variabilität bzw. das Vorhandensein oder Fehlen eines Gens erfaßt wird, das für ein Enzym des Entgiftungsstoffwechsels kodiert.

- 25 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 37, 39 oder 41, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der vervielfältigten DNS die von der vervielfältigten DNS abgegebene Fluoreszenzstrahlung erfaßt wird.

- 5 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Erfassung der allelischen Variabilität bzw. das Vorhandensein oder Fehlen eines Gens mittels eines Mikroarrays nach einem der Ansprüche 21 bis 27 erfolgt.
- 10 45. Verwendung eines Diagnose-Kits, Mikroarrays und/oder eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bestimmung der Anwesenheit bzw. des Fehlens von Genen und/oder zur Bestimmung der vorhandenen Varianten von Genen für Enzyme des Entgiftungsstoffwechsels.
- 15 46. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Bestimmung des Nulltyps bzw. des Genpolymorphismus für das Enzym Glutathion-S-Transferase GSTT1 und gegebenenfalls GSTM1.

1 / 6

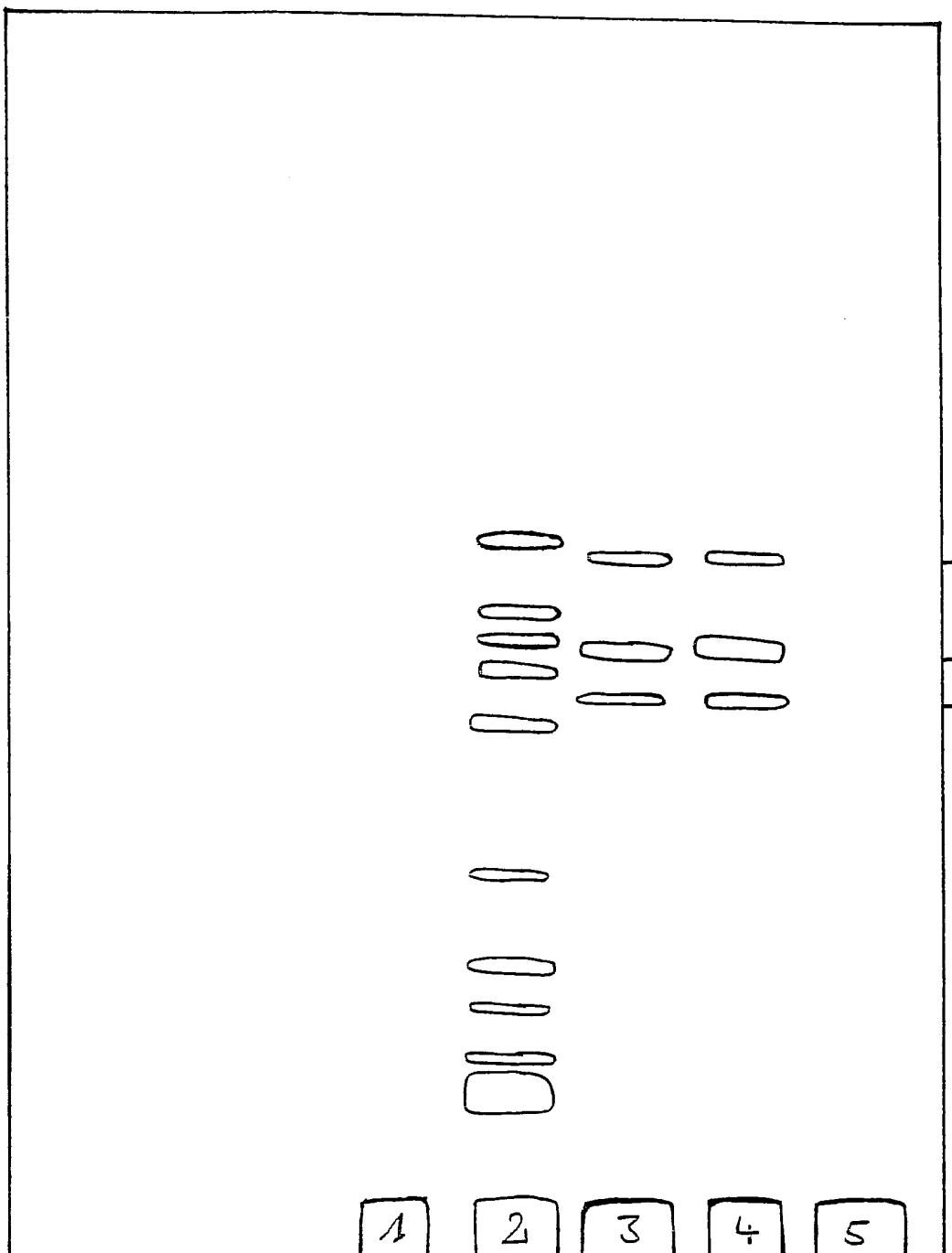
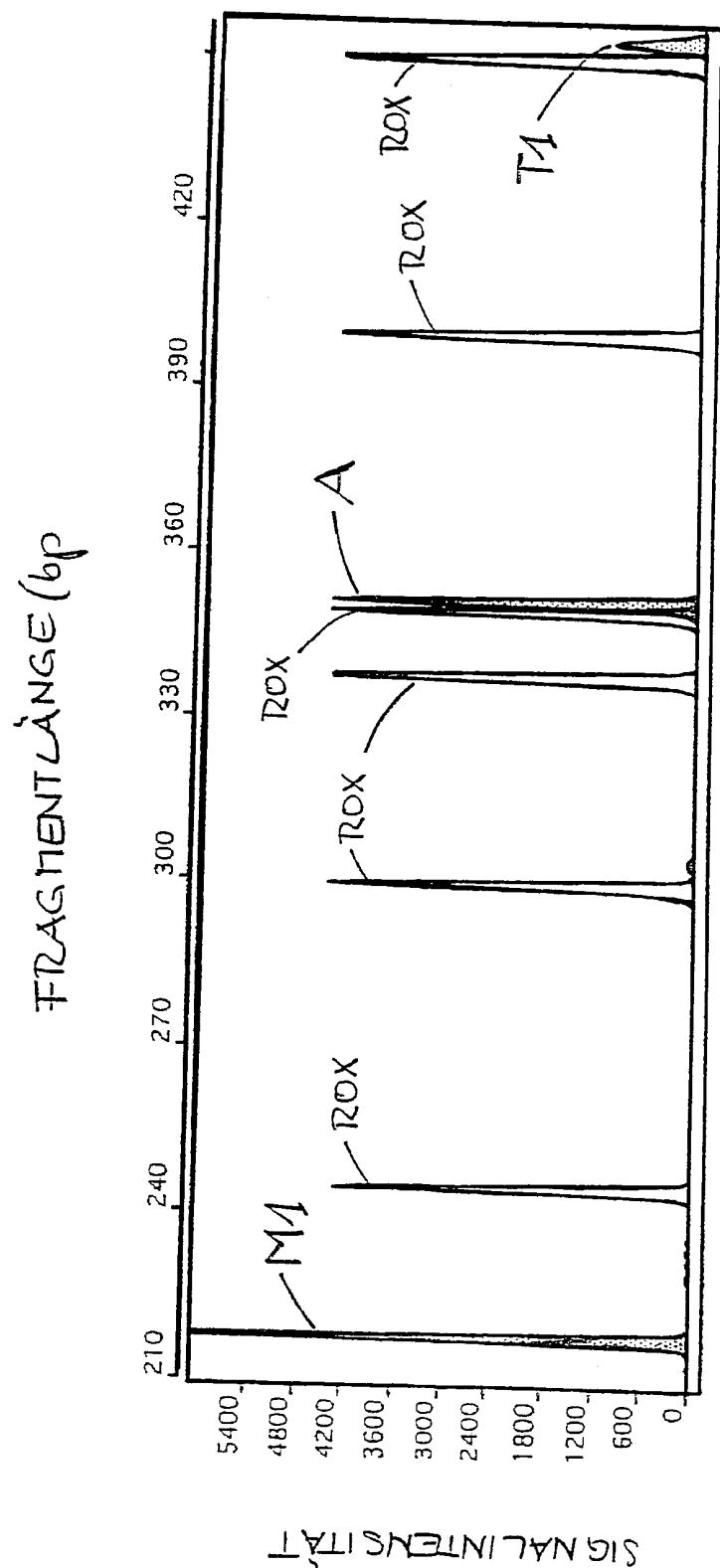


Fig. 1

2 / 6

Fig. 2



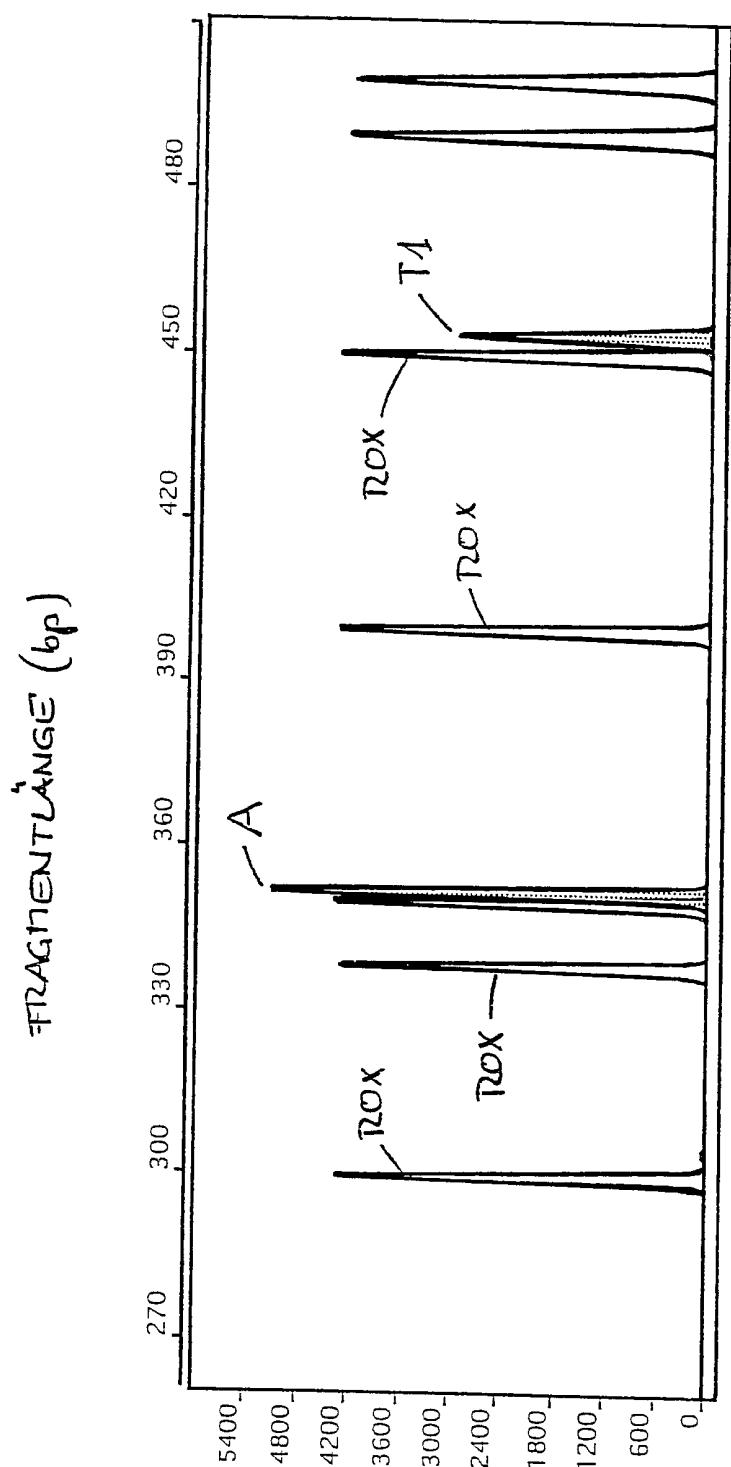


Fig. 3

4 / 6

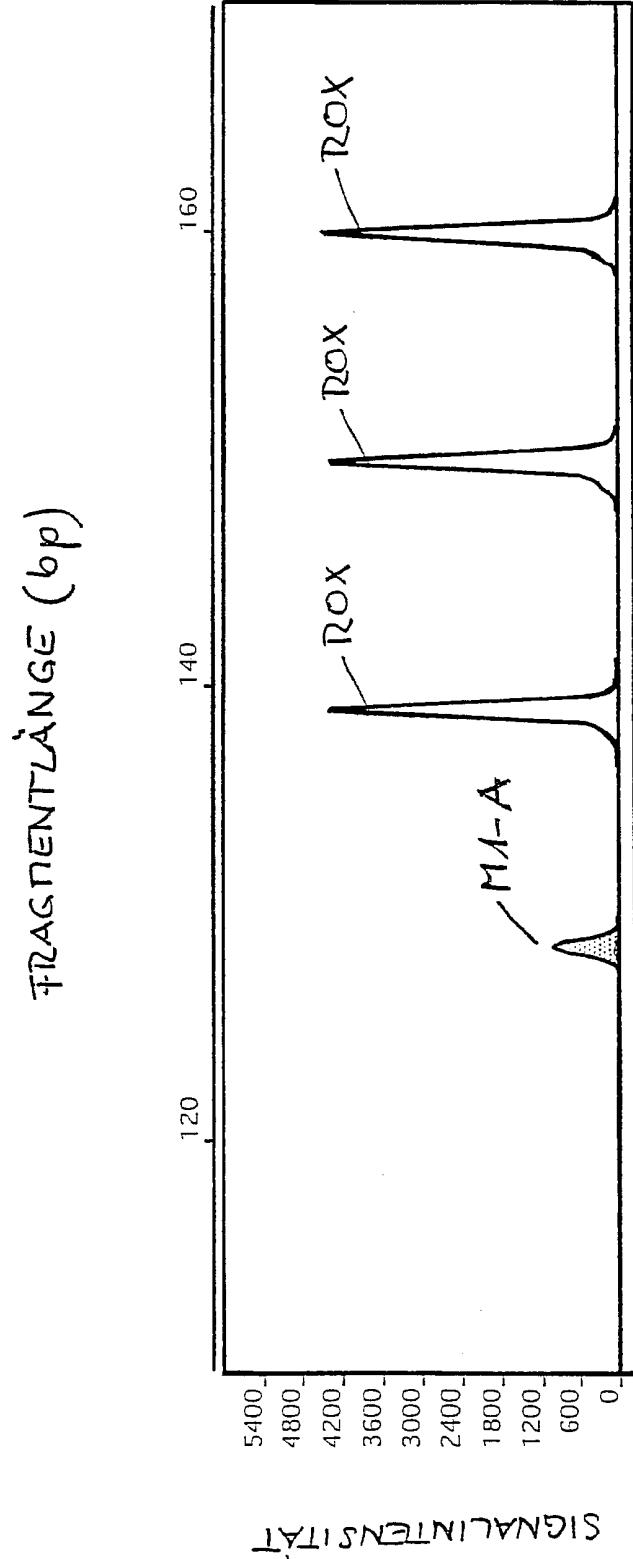


Fig. 4

5 / 6

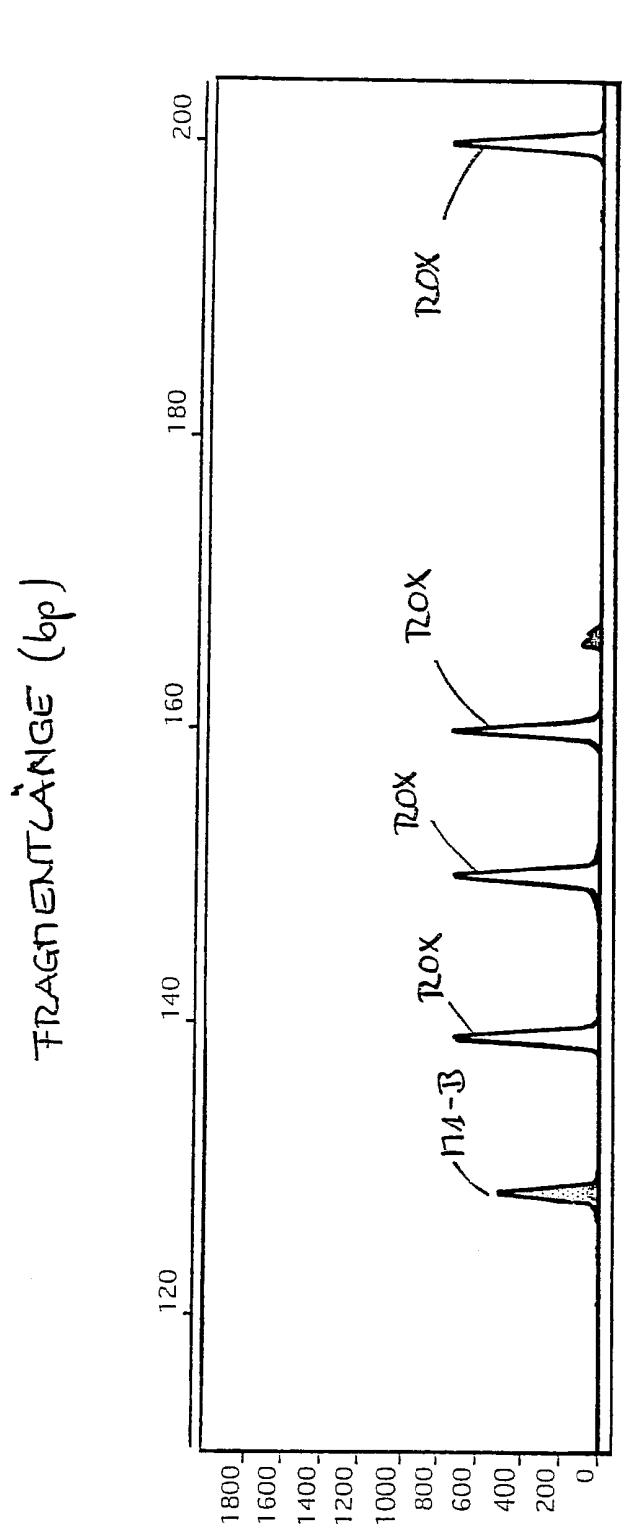


Fig. 5

SIGNALINTENSITÄT

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5 / 5

— GST $\Pi 1 - A$
— GST $\Pi 1 - B$

□ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Fig. 6