



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 27 901 T2 2008.01.17**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 174 522 B1

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 27 901.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 116 692.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **17.07.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.04.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.01.2008**

(30) Unionspriorität:
219812 21.07.2000 US

(72) Erfinder:
Begovich, Ann Bethea, El Cerrito, CA 94530, US; Erlich, Henry Anthony, Oakland, CA 94602, US; Gruppe, Andrew, Redwood City, California 94062, US; Noble, Janelle Annette, Berkeley, CA 94702, US; Peltz, Gary Allen, Redwood City, CA 94303, US; Reynolds, Rebecca Lynne, Alameda, CA 94501-1045, US; Walker, Karen Myra, Alameda, CA 94501, US; Zangenberg, Gabriele, 82319 Starnberg, DE

(73) Patentinhaber:
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

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

(54) Bezeichnung: **TCF-1 Nukleotidsequenzvariation**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das technische Gebiet der Immunologie und der Molekularbiologie. Insbesondere betrifft sie Verfahren und Reagenzien zum Nachweis der Nukleotidsequenzvariabilität im TCF-1-Locus, die möglicherweise mit der Gefahr der Entwicklung einer Th1- oder Th2-vermittelten Entzündungskrankheit assoziiert ist.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] CD4+-T-Lymphozyten wurden auf der Grundlage des Musters sezernierter Cytokine in zwei funktionell unterschiedliche Untergruppen eingeteilt. Dabei werden von einer Untergruppe mit der Bezeichnung T-Helfer-Typ 1 (Th1) Interleukin 2 (IL-2), IL-12, Tumornekrosefaktor (TNF), Lymphotoksin (LT) und Interferon-Gamma (IFN- γ) bei Aktivierung sezerniert, wobei diese Untergruppe hauptsächlich für die zellvermittelte Immunität, wie beispielsweise die Spät-Typ-Überempfindlichkeitsreaktion, verantwortlich ist. Von einer zweiten Untergruppe mit der Bezeichnung T-Helfer-Typ 2 (Th2) werden bei Aktivierung IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 sezerniert, wobei diese Untergruppe hauptsächlich für extrazelluläre Abwehrmechanismen verantwortlich ist. Die Stimulierung von Lymphozyten des TH2-Typs führt zur Sekretion von Lymphokinen, die B-Zellen induzieren, so daß diese Antikörper produzieren, und einen Anstieg der eosinophilen Zellen sowie der IgE-Produktion stimulieren, was zu einem Anstieg der Mastzellen, der Freisetzung von Histaminen und einer Entzündungsreaktion führt. Die Rolle von Th1- und Th2-Zellen wird in einem Übersichtsartikel von Peltz, 1991, Immunological Reviews 123: 23-25 beschrieben.

[0003] Die immunologische Antwort auf ein Antigen wird über die selektive Differenzierung von CD4+-T-Helfer-Vorläuferzellen (Th0) zu Th1- bzw. Th2-Effektorzellen mit ihren unterschiedlichen Mustern der Lymphokinproduktion vermittelt. Die Sekretion der Lymphokinuntergruppen sorgt ferner für eine Regulationsfunktion bei der Differenzierung von Th0 zu Th1- bzw. Th2-Effektorzellen. So fördert beispielsweise ein von Th2-Zellen produziertes Lymphokin, IL-4, sowohl die Differenzierung zu Th2-Zellen, hemmt aber auch die Differenzierung zu Th1-Zellen. Umgekehrt fördern von TH1-Zellen produzierte Lymphokine, IL-12 und IFN- γ , die Differenzierung zu Th1-Zellen, hemmen die Differenzierung zu Th2-Zellen und unterdrücken die IgE-Synthese über einen direkten Effekt auf B-Zellen. Die reziproken Regulationseffekte der untergruppenspezifischen Lymphokine sind an der Polarisierung der Th1- bzw. Th2-Antwort beteiligt.

[0004] Menschliche T-Zellen zeigen bei der Aktivierung als Antwort auf an der Pathogenese mehrerer chronischer Entzündungs- oder allergischer Erkrankungen beteiligte Antigene ein selektives Muster der Lymphokinproduktion, das für Zellen vom Th1- bzw. Th2-Typ charakteristisch ist. Für bestimmte Autoimmunkrankheiten, wie beispielsweise Typ-1-Diabetes oder multiple Sklerose (MS), konnte gezeigt werden, daß sie mit einer überwiegenden Th1-Antwort assoziiert sind. Ein Th1-ähnliches Muster der Lymphokinexpression beobachtet man bei aus Patienten mit chronischer Lyme-Arthritis isolierten allergenspezifischen T-Zellen sowie bei Patienten mit tuberkulöser Lepra. Im Gegensatz dazu beobachtet man eine Th2-ähnliche Antwort der Lymphokinexpression bei aus atopischen Patienten isolierten allergenspezifischen T-Zellen. Die meisten der charakteristischen Merkmale von Atopy und Asthma, vor allem die IgE-Synthese, röhren von den kombinierten Effekten der von Th2-Zellen sezernierten Cytokine her.

[0005] Es ist wahrscheinlich, daß ein selektives Ungleichgewicht oder eine unangemessene Aktivierung von Th1 bzw. Th2-T-Zelluntergruppen für die Pathogenese bestimmter chronischer Entzündungs- oder allergischer Krankheiten von zentraler Bedeutung ist. Warum die Immunantwort bestimmter Individuen auf einen Krankheitserreger oder ein Allergen eine Schutzreaktion darstellt, während die Immunantwort bei anderen zur Krankheit führt, ist nach wie vor unklar. Allerdings kann die Wahrscheinlichkeit, daß ein Individuum eine Entzündungs- oder allergische Krankheit als Antwort auf das Inkontaktkommen mit einem Krankheitserreger oder einem Allergen entwickelt, über den Typ der CD4+-T-Zelle, der die Antwort dominiert, bestimmt werden. Eine immunvermittelte Krankheit kann sich entwickeln, wenn die zelluläre Antwort krankhaft in einem Th1- oder Th2-Modus fixiert wird. Die Fähigkeit zur Eliminierung oder Auflösung einer Virusinfektion kann ebenso eher eine Th1- als eine Th2-Antwort widerspiegeln.

[0006] Genetisch bestimmte Unterschiede bei der T-Zelldifferenzierung können die Art der T-Zellantwort gegenüber einem Antigen und somit darüber, ob es krankmachende oder nicht krankmachende Folgen gibt, be-

stimmen. Zwar bleibt die Steuerung der T-Zelldifferenzierung noch aufzuklären, doch wurden bereits viele Komponenten des kaskadeähnlichen Systems von Genen, die die T-Zelldifferenzierung steuern, identifiziert. Der T-zellspezifische Transkriptionsfaktor TCF-1 (nun offiziell als TCF-7 bezeichnet) stellt eine Komponente des Systems von Genen, die die T-Zelldifferenzierung steuern, dar. Das TCF-1-Gen wurde kloniert und die Sequenz und Struktur beschrieben (siehe van der Wetering et al., 1992, J. Biol. Chem. 367(12):8530-8536; van der Wetering et al., 1996, Molecular and Cellular Biology 16(3):745-7852).

[0007] Die von Adams (GenBank Zugangsnummer AA 311787) und Marra (GenBank Zugangsnummer A1131784) eingereichten Nukleinsäuresequenzen sind im Bereich der Position 883 des hier beschriebenen TCF-1-Gens (SEQ ID:1) homolog.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft einen neu entdeckten Nukleotidsequenzpolymorphismus im Exon 2 des TCF-1-Gens sowie die Assoziation der Sequenzvarianten mit durch Th1 bzw. Th2 vermittelten Entzündungskrankheiten. Durch die Identifizierung der vorliegenden allelischen Sequenzvariante(n) werden Angaben hinsichtlich des Immunsystems zur Verfügung gestellt, die bei der Charakterisierung von Individuen gemäß deren Risiko einer Krankheit, bei der das Immunsystem ein Faktor ist, wie beispielsweise einer Entzündungskrankheit, behilflich sein können.

[0009] Zwei allelische Sequenzvarianten, die sich voneinander durch das an der Nukleotidposition 883 des TCF-1-Gens vorliegenden Nukleotid unterscheiden, wurden identifiziert. Ein erfindungsgemäßer Aspekt betrifft die Genotypisierung im Hinblick auf die an der Nukleotidposition 883 vorliegende Sequenzvariante.

[0010] Die allelischen Unterschiede von TCF-1 scheinen mit der Wahrscheinlichkeit einer durch Th1 bzw. Th2 vermittelten Entzündungskrankheit assoziiert zu sein. Da TCF-1 eine Komponente des Systems von Genen, die die T-Zelldifferenzierung steuern, darstellt und da genetisch bestimmte Unterschiede der T-Zelldifferenzierung die Art der T-Zellantwort gegenüber einem Antigen und somit auch darüber, ob es krankmachende oder nicht krankmachende Folgen gibt, bestimmen können, wird erwartet, daß sich allelische Unterschiede im TCF-1-Gen auf die T-Zelldifferenzierung auswirken können. Die Assoziation der allelischen Unterschiede von TCF-1 mit der Wahrscheinlichkeit einer durch Th1 bzw. Th2 vermittelten Entzündungskrankheit läßt darauf schließen, daß allelische Unterschiede von TCF-1 einen Faktor bei der Bestimmung der Tendenz einer Th1- bzw. Th2-Typ-Antwort darstellen können. Es scheint, daß eines der Allele mit einer erhöhten Tendenz zu einer Th1-Typ-Antwort als Reaktion auf ein Antigen assoziiert sein kann, wohingegen das andere Allel mit einer erhöhten Tendenz zu einer Th2-Typ-Antwort assoziiert sein kann. Somit werden durch die Genotypisierungsverfahren der vorliegenden Erfindung Angaben hinsichtlich eines Faktors, der für die Klassifizierung eines Individuums nach ihrer reaktiven Neigung zur Reaktion auf ein Antigen mit einer Th1-Antwort oder einer Th2-Antwort relevant sein kann, bereitgestellt.

[0011] Wie oben angemerkt, kann die Wahrscheinlichkeit, daß ein Individuum eine Entzündungs- oder allergische Krankheit als Antwort auf das Inkontaktkommen mit einem Krankheitserreger oder einem Allergen entwickelt, über die Art der T-Zellantwort bestimmt werden. Durch die Bereitstellung von Angaben über die Tendenz eines Individuums, auf ein Antigen mit einer Th1-Antwort oder einer Th2-Antwort zu reagieren, stellt die vorliegende Erfindung Angaben hinsichtlich des Immunsystems des Individuums bereit, die zur Klassifizierung des relativen Risikos einer durch Th1 bzw. Th2 vermittelten Krankheit für ein Individuum relevant sein können. Somit werden durch die Genotypisierungsverfahren der vorliegenden Erfindung Angaben hinsichtlich eines Faktors bereitgestellt, der zur Klassifizierung eines Individuums dahingehend, daß es ein erhöhtes Risiko entweder einer durch Th1 oder einer durch Th2 vermittelten Krankheit besitzt, relevant sein kann.

[0012] In bestimmten Ausführungsformen können die Genotypisierungsverfahren der vorliegenden Erfindung nützliche Informationen zur Beurteilung des Risikos bestimmter durch Th1 vermittelter Krankheiten, wie beispielsweise multipler Sklerose und Typ-1-Diabetes, oder durch Th2 vermittelter Krankheiten, wie beispielsweise Asthma und Atopie, für ein Individuum liefern. Individuen, die mindestens ein "A"-Allel aufweisen, besitzen einen Faktor, der zum Risiko einer durch Th1 vermittelten Krankheit beiträgt. Individuen, die wenigstens ein "C"-Allel aufweisen, besitzen einen Faktor, der zum Risiko einer durch Th2 vermittelten Krankheit beiträgt.

[0013] Da TCF-1 eine Komponente des komplexen Systems von Genen, die die T-Zelldifferenzierung steuern, darstellt und da zahlreiche andere Gene an einer Immunantwort beteiligt sind, handelt es sich bei dem TCF-1-Genotyp der Immunantwort um einen aus einer Reihe von Komponenten, die die Art der T-Zellantwort und die Wahrscheinlichkeit einer durch Th1 oder Th2 vermittelten Krankheit bestimmen. Dementsprechend ist

zu erwarten, daß der Effekt des TCF-1-Locus gering ist. Andere Faktoren, wie beispielsweise der HLA-Genotyp eines Individuums können dominierende Effekte ausüben, die in machen Fällen den Effekt des TCF-1-Genotyps maskieren können. So ist beispielsweise bekannt, daß bestimmte HLA-Genotypen einen wesentlichen Effekt auf die Wahrscheinlichkeit von Typ-1-Diabetes haben (siehe Noble et al., 1996, Am. J. Hum. Genet. 59:1134-1148). Der TCF-1-Genotyp ist wahrscheinlich aussagekräftiger als Indikator für eine Prädisposition gegenüber Typ-1-Diabetes unter Individuen, die HLA-Genotypen aufweisen, durch welche weder ein erhöhtes noch ein reduziertes Risiko verliehen wird. Man erwartet, daß derartige dominierende Effekte bei anderen immunvermittelten Krankheiten beobachtet werden und daß sich eine ähnliche Stratifikation von Individuen in solchen Fällen als nützlich erweist. Da Allelhäufigkeiten an anderen für Krankheiten in Verbindung mit dem Immunsystem relevanten Loci zwischen Populationen unterschiedlich sind und somit Populationen unterschiedliche Risiken gegenüber Krankheiten in Verbindung mit dem Immunsystem zeigen, wird erwartet, daß der Effekt des TCF-1-Genotyps nicht in allen Populationen offensichtlich ist. Obwohl der Beitrag des TCF-1-Genotyps selbst relativ gering sein kann, werden durch die Genotypisierung am TCF-1-Locus nichtsdestoweniger Informationen beigesteuert, die sich für eine Charakterisierung der Prädisposition eines Individuums gegenüber entweder durch Th1 oder Th2 vermittelten Krankheiten nützlich sind. Die TCF-1-Genotyp-Informationen können insbesondere in Kombination mit Genotyp-Informationen von anderen Loci nützlich sein.

[0014] Durch die vorliegende Erfindung werden bevorzugte Verfahren, Reagentien und Kits zur Genotypisierung in Bezug auf die an der Nukleotidposition 883 vorliegenden Sequenzvariante bereitgestellt. Der Genotyp läßt sich mit einem beliebigen Verfahren, mit dem das an einer Einzelnukleotidpolymorphismus-Stelle vorliegende Nukleotid identifiziert werden kann, bestimmen. Dabei stellt das jeweilige verwendete Verfahren keinen kritischen Aspekt der Erfindung dar. Eine Reihe geeigneter Verfahren wird nachfolgend beschrieben.

[0015] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Genotypisierung unter Verwendung von für die eine oder die andere Variantensequenz spezifischen Oligonukleotidsonden durchgeführt. Vorzugsweise wird dabei ein Bereich des TCF-1-Gens, der den Sondenhybridisierungsbereich umfaßt, vor oder gleichzeitig mit der Sondenhybridisierung amplifiziert. Ein für eine der Variantensequenzen spezifisches Oligonukleotid ist genau oder weitgehend komplementär zu einem der Strände eines TCF-1-Gens in einem Bereich des Gens, der die polymorphe Stelle umfaßt, und an der polymorphen Stelle genau komplementär zu einer der Variantensequenzen. Tests auf Sondenbasis sind im Fachgebiet allgemein bekannt.

[0016] Als Alternative wird die Genotypisierung unter Verwendung einer allel spezifischen Amplifikation oder Verlängerungsreaktion durchgeführt, wobei ein allel spezifischer Primer verwendet wird, der die Primerverlängerung nur dann unterstützt, wenn die Zielvariantensequenz vorhanden ist. Typischerweise hybridisiert dabei ein allel spezifischer Primer an das TCF-1-Gen, so daß das 3'-Terminalnukleotid mit der polymorphen Position eine Linie bildet. Allel spezifische Amplifikationsreaktionen sowie allel spezifische Verlängerungsreaktionen sind im Fachgebiet allgemein bekannt.

[0017] Ein weiterer erfindungsgemäßer Aspekt betrifft Oligonukleotide mit der in Anspruch 6 angegebenen Bedeutung, die sich als Amplifikationsprimer, Nachweissonden oder positive Kontrollsequenzen eignen, die Reaktionen hinzugefügt werden, so daß eine bekannte Zielsequenz bereitgestellt wird. Zur Verwendung als positive Kontrollsequenz ist das Oligonukleotid vorzugsweise in einem DNA-Vektor, wie beispielsweise einem Plasmid, enthalten. Zur Verwendung bei der sequenzspezifischen Amplifikation bzw. dem sequenzspezifischen Nachweis beträgt die Länge des Oligonukelotids vorzugsweise etwa 10 bis etwa 35 Nukleotide, stärker bevorzugt etwa 15 bis etwa 35 Nukleotide.

[0018] Kits können in verschiedenen Formen vorliegen, beinhalten aber jeweils ein oder mehrere Reagentien zur Durchführung der erfindungsgemäßen Genotypisierungsverfahren, wie beispielsweise ein Oligonukleotid, das für eine der Sequenzvarianten spezifisch ist. Die Kits können ebenso ein oder mehrere Amplifikationsreagentien, z.B. Primer, Polymerase, Puffer und Nukleosidtriphosphate, umfassen.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0019] Als Hilfe zum Verständnis der Erfindung werden nachfolgend mehrere Begriffe definiert.

[0020] Der Begriff "TCF-1-Gen" bezieht sich auf die genomische Nukleinsäuresequenz, die für das T-zellspezifische Transkriptionsfaktorprotein codiert, insbesondere auf die bei GenBank unter der Zugangsnummer X63901 erhältliche und in **Fig. 1** dargestellte Gensequenz, sowie allelische Varianten davon. Die Nukleotidsequenz des Gens, wie sie hier verwendet wird, umfaßt sowohl codierende Bereiche, die als Exons bezeichnet werden, als auch dazwischenliegende, nicht codierende Bereiche, die als Introns bezeichnet werden.

[0021] Der Begriff "Allel" bezieht sich auf eine Nukleotidsequenzvariante des Gens.

[0022] Ein "C-Allel", wie es hier verwendet wird, bezieht sich auf Sequenzvarianten, die ein Cytosin an der polymorphen Position, bei der es sich um die Nukleotidposition 883 des in **Fig. 1** dargestellten TCF-1-Genstrangs handelt, enthalten. Ein "A-Allel", wie hier verwendet, bezieht sich auf Sequenzvarianten, die ein Adenosin an der Nukleotidposition 883 des in **Fig. 1** dargestellten TCF-1-Genstrangs enthalten. Dabei ist ersichtlich, daß in einer doppelsträngigen Form der jeweils komplementäre Strang eines jeden Allels die komplementäre Base an der polymorphen Position enthält.

[0023] Der Begriff "Genotyp" bezieht sich auf eine Beschreibung der Allele eines in einem Individuum oder einer Probe enthaltenen Gens. Dabei wird bei seiner Verwendung hier keine Unterscheidung zwischen dem Genotyp eines Individuums und dem Genotyp einer aus dem Individuum stammenden Probe gemacht. Zwar wird ein Genotyp typischerweise von Proben diploider Zellen bestimmt, doch kann ein Genotyp auch von einer Probe haploider Zellen, wie beispielsweise einer Samenzelle, bestimmt werden.

[0024] Die Begriffe "polymorph" und "Polymorphismus", wie sie hier verwendet werden, beziehen sich auf den Zustand, in dem mindestens zwei Varianten einer spezifischen genomischen Sequenz in einer Population angetroffen werden können. Der polymorphe Bereich bzw. die polymorphe Stelle bezieht sich dabei auf einen Bereich der Nukleinsäure, wo der die Varianten unterscheidende Nukleotidunterschied auftritt.

[0025] Die Begriffe "Nukleinsäure" und "Oligonukleotid" beziehen sich auf Primer, Sonden und nachzuweisende Oligomerfragmente und sollen als Oberbegriffe für Polydesoxyribonukleotide (mit 2-Desoxy-D-ribose), Polyribonukleotide (mit D-Ribose) und alle anderen Arten von Polynukleotiden, bei denen es sich um ein N-Glykosid einer Purin- oder Pyrimidinbase oder eine modifizierte Purin- oder Pyrimidinbase handelt, dienen. Dabei wird hinsichtlich der Länge nicht zwischen den Begriffen "Nukleinsäure" und "Oligonukleotid" unterschieden, wobei diese Begriffe wechselseitig verwendet werden. Diese Begriffe beziehen sich nur auf die Primärstruktur des Moleküls. Somit fallen unter diese Begriffe doppel- und einzelsträngige DNA ebenso wie doppel- und einzelsträngige RNA sowie DNA/RNA-Hybride.

[0026] Oligonukleotide lassen sich mit einem beliebigen Verfahren, einschließlich z.B. der Klonierung und Restriktion entsprechender Sequenzen sowie direkter chemischer Synthese nach einem Verfahren, wie beispielsweise dem Phosphotriesterverfahren von Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99, dem Phosphodiesterverfahren von Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:109-151; dem Diethylphosphoramiditverfahren von Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; sowie dem Festträgerverfahren des US-Patent Nr.4,458,066, herstellen. Eine Übersicht über Syntheseverfahren findet sich bei Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry 1(3):165-187. Oligonukleotide werden typischerweise unter Verwendung von im Handel, beispielsweise bei PE Biosystems (Foster City, CA, USA) und Pharmacia (Piscataway, NJ, USA), erhältlichen Reagenzien und Geräten synthetisiert. Verfahren zum Einbau eines Oligonukleotids in einen DNA-Vektor, wie beispielsweise zur Verwendung als positive Kontrollzielsequenz, sind im Fachgebiet allgemein bekannt und in den hier angegebenen Literaturstellen beschrieben.

[0027] Der Begriff "Hybridisierung" bezieht sich auf die Ausbildung einer Duplexstruktur aus zwei einzelsträngigen Nukleinsäuren, auf Grund der komplementären Basenpaarung. Dabei kann ein Hybridisierung zwischen genau komplementären Nukleinsäuresträngen oder zwischen Nukleinsäuresträngen, die kleinere Fehlpaarungsbereiche enthalten, erfolgen. Der Begriff "weitgehend komplementär", der hier verwendet wird, bezieht sich auf Sequenzen, die mit der Ausnahme kleinerer Fehlpaarungsbereiche, bei denen die Gesamtzahl an fehlgepaarten Nukleotiden nicht mehr als etwa drei für Sequenzen mit einer Länge von etwa 15 bis etwa 35 Nukleotiden beträgt, komplementär sind. Bedingungen, unter denen lediglich genau komplementäre Nukleinsäurestränge hybridisieren, werden als "stringente" oder "sequenzspezifische" Hybridisierungsbedingungen bezeichnet. Stabile Duplexe weitgehend komplementärer Nukleinsäuren lassen sich unter weniger stringenten Hybridisierungsbedingungen erzielen. Vom Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäuretechnologie läßt sich die Duplexstabilität empirisch unter Betrachtung einer Reihe von Variablen einschließlich beispielsweise der Länge und Basenpaarkonzentration der Oligonukleotide, Ionenstärke und Auftreten fehlgepaarter Basenpaare, bestimmen. Zur Berechnung der Duplexstabilität steht kommerzielle Computer-Software von National Biosciences, Inc. (Plymouth, MN); OLIGO Version-5-Referenzhandbuch; zur Verfügung.

[0028] Stringente, sequenzspezifische Hybridisierungsbedingungen, unter denen ein Oligonukleotid nur an die genau komplementäre Zielsequenz hybridisiert, sind im Fachgebiet allgemein bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning – a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Stringente Bedingungen sind sequenzabhängig und unterscheiden sich bei unterschiedlichen Um-

ständen. Im allgemeinen werden stringente Bedingungen so ausgewählt, daß sie etwa 5°C niedriger liegen als die Schmelzpunkttemperatur (Tm) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH-Wert. Beim Tm-Wert handelt es sich um diejenige Temperatur (bei definierter Ionenstärke und definiertem pH), bei dem 50% der Basenpaare dissoziert sind. Eine Lockerung der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen gestattet das Tolerieren von Sequenzfehlpaarungen; dabei läßt sich der Grad der tolerierten Fehlpaarungen über eine geeignete Einstellung der Hybridisierungsbedingungen steuern.

[0029] Der Begriff "Sonde" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das zur selektiven Hybridisierung an eine Zielnukleinsäure unter geeigneten Bedingungen in der Lage ist. Dabei enthält die Sonde einen "Hybridisierungsbereich" der genau oder weitgehend zur Zielsequenz komplementär ist, und ist zur Zielsequenz an einer polymorphen Stelle genau komplementär. Ein unter Verwendung der Sonde sowie unter ausreichend stringenten Hybridisierungsbedingungen durchgeführter Hybridisierungstest ermöglicht den selektiven Nachweis einer spezifischen Zielsequenz. Zur Verwendung in einem Hybridisierungstest zur Unterscheidung von Einzelnukleotidunterschieden in der Sequenz weist der Sondenhybridisierungsbereich vorzugsweise eine Länge von etwa 10 bis etwa 35 Nukleotiden, stärker bevorzugt von etwa 15 bis etwa 35 Nukleotiden auf. Die Verwendung modifizierter Basen oder Basenanaloge, die sich auf die Hybridisierungsstabilität auswirken und die im Fachgebiet allgemein bekannt sind, kann die Verwendung kürzerer oder längerer Sonden mit vergleichbarer Stabilität ermöglichen. Der Fachmann wird erkennen, daß sich im allgemeinen das genaue Komplement einer gegebenen Sonde genauso gut als Sonde eignet. Ein Sondenoligonukleotid kann entweder vollständig aus dem hybridisierenden Bereich bestehen oder zusätzliche Merkmale enthalten, die den Nachweis oder die Immobilisierung der Sonde berücksichtigen, die jedoch die Hybridisierungseigenschaften des Hybridisierungsbereichs nicht signifikant verändern. So kann der Sondenhybridisierungsbereich beispielsweise an einen poly-T-"Schwanz", der zur Immobilisierung der Sonde an einen festen Träger zur Verwendung im reversen Dot-Blot-Test verwendet wird, gebunden werden.

[0030] Der Begriff "Primer" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, das als Startpunkt für die DNA-Synthese unter Bedingungen fungieren kann, bei denen die Synthese eines zu einem Nukleinsäurestrang komplementären Primerverlängerungsprodukts induziert wird, d.h. in Gegenwart von vier unterschiedlichen Nukleosidtriphosphaten sowie einem Mittel zur Polymerisierung (d.h. DNA-Polymerase oder reverse Transkriptase) in einem entsprechenden Puffer sowie bei einer geeigneten Temperatur. Dabei handelt es sich bei einem Primer vorzugsweise um ein einzelsträngiges Oligodesoxyribonukleotid. Der Primer enthält einen "Hybridisierungsbereich", der genau oder weitgehend zur Zielsequenz komplementär ist und vorzugsweise eine Länge von etwa 15 bis etwa 35 Nukleotiden aufweist. Ein Primeroligonukleotid kann entweder vollständig aus dem hybridisierenden Bereich bestehen oder zusätzliche Merkmale enthalten, die den Nachweis, die Immobilisierung oder die Manipulation des amplifizierten Produkts berücksichtigen, die jedoch die grundlegende Eigenschaft des Primers, nämlich eine Funktion als Startpunkt für die DNA-Synthese nicht ändern. So läßt sich beispielsweise zur Erleichterung der Klonierung des amplifizierten Produkts eine kurze Nukleinsäuresequenz, die eine Restriktionsenzymeschnittstelle enthält, an das 5'-Ende des Primers binden.

[0031] Bei einem "allelspezifischen" Primer, wie er hier verwendet wird, handelt es sich um einen Primer, der an die Zielsequenz hybridisiert, so daß das 3'-Ende des Primers eine Linie mit der polymorphen Stelle, durch die die Allele definiert sind (d.h. Position 883 für die Allele TCF-1 A und C), bildet und zu einem der Allele an der polymorphen Position genau komplementär ist. Der Primer ist "spezifisch für" das Allel, zu dem er am 3'-Ende genau komplementär ist. Im allgemeinen wird die Primerverlängerung, die am 3'-Ende des Primers stattfindet, durch eine Fehlpaarung am 3'-Ende eines Primers gehemmt. Ein allelspezifischer Primer ist bei der Hybridisierung an das genau komplementäre Allel verlängerbar. Dagegen ist der gleiche Primer bei der Hybridisierung an das andere Allel nicht verlängerbar, und zwar aufgrund der Fehlpaarung am 3'-Ende des Primers im Hybridisierungsduplex. Somit ermöglicht die Verwendung eines allelspezifischen Primers eine Unterscheidung von Allelen auf der Grundlage davon, ob ein Amplifikationsprodukt gebildet wird.

[0032] Der Begriff "Zielbereich" bezieht sich auf einen Bereich einer Nukleinsäure, der analysiert werden soll, und beinhaltet üblicherweise einen polymorphen Bereich.

[0033] Herkömmliche Techniken der Molekularbiologie und Nukleinsäurechemie, die im Bereich des fachmännischen Könnens liegen, werden in der Literatur ausführlich erläutert. Siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989 Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, Hrsg., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames und S.J. Higgins. Hrsg., 1984); die Reihe Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); und die Reihe, Current Protocols in Human Genetics (Dracopoli et al., Hrsg., 1984 mit vierteljährlichen Aktualisierungen, John Wiley & Sons, Inc.).

Nukleotidsequenz des TCF-1-Gens

[0034] Die Nukleotidsequenz eines vollständigen C-Allels des TCF-1-Gens ist von GenBank unter der Zugangsnummer X63901 erhältlich und unter SEQ ID NO: 1, dargestellt in einer 5'-nach 3'-Orientierung in der nachfolgenden Tabelle 1, bereitgestellt. Der neu entdeckte Einzelnukleotidpolymorphismus findet an der optisch hervorgehobenen Position 883 statt. Die Sequenzvariante, die das A-Allel definiert, besteht aus dem Austausch des an dieser Position in der SEQ ID NO: 1 vorliegenden "C" gegen ein "A". Eine C-zu-A-Substitution an dieser Position entspricht einer Änderung der codierten Aminosäure von Prolin zu Threonin.

[0035] Zwar ist lediglich ein Strang der Nukleinsäure in Tabelle 1 dargestellt, doch erkennt der Fachmann, daß durch die SEQ ID NO:1 ein Bereich doppelsträngiger genomicscher Nukleinsäure identifiziert wird und daß die Sequenzen beider Stränge durch die bereitgestellten Sequenzangaben vollständig beschrieben sind.

Tabelle 1

SEQ ID NO: 1

```

1 GGATCCCGGG GGTCCGGGG GCCGGCGCCG GGGCCCGCGG CGAGGCCGAG GTGAGCCCCC
61 GCCGGCGCCG GCTCCCTCCCC CGCGGTCGCC GCCCCGCCCG CCCCAGTTGC GCGCCGCCCT
121 CGGGGTCTCC AGACAGAGCG TCCCTGCCCG GGCCTCGGGC CGGACCCCCG CGGTCCCCACC
181 GCCCCCTCACT CCCCTCCGGT TCTCCCTCCA GGCTCTCGGG CGGGAACACC GTGCGCAGAG
241 ACTCTTCCCG GACAAACTTC CAGAGCCCCCT GGAGGGACGGT GAGTTTCTGC CCGGCCCCGGC
301 TTCCCTTCGT CGCGCTCAGG CCCTGGCTC CGTGGGACGG GGACGCCAAG GACCGCGGGG
361 AGCCGGGTGC CTCCCCCACC GCAGCTCAGG AGGCAGCAGA ACCCAGGGGT GGAGAGTGGG
421 GGGCGNGCTT CCCGGGCGCC GCCGGGTCGA GTCACTTCCG GTGCCCTGAC CTTTATAGGA
481 GTAAACAGAC CCCCCGCCATC CCCGCTCCC CTCCCTGCCA GGTGACTGAC TAATCCGCCG
541 CCTTCAGGAG ACAGAATTGG CCAAGGTTTC TTGGTTGGAG GGTGGGGGGT GGGAGGTCAA

```

601 GTAGGGGCCA CCTCGGGGAG GCCTGCCCTC CAGGTCCCTC CCCTAAAAT TGGCACTGCC
 661 GATACTCCC GCCCGTTCT TCCCAAGTCA GGAACCTGCA GGGGACCCCT TGGCAATTCT
 721 TTTTCTCTCA AGAGCAGACA GCCTTCAGTC CCAGCCGCTG CCAGGGCTGG TGTGTCTGAC
 781 CCAGCTGTGG TTTTCCAGG CCTGAAGGCC CCGGAGTGCA CCAGCGGCAT GTACAAAGAG
 841 ACCGTCTACT CCGCCTTCAA TCTGCTCATG CATTACCCAC CCCCTCGGG AGCAGGGCAG
 901 CACCCCCAGC CGCAGCCCC GCTGGTAAGT GGACCCCGCC ACTCACCCAC CCTCCTCTC
 961 ATTTTCAGC ACAAGGCCA TCAGCCCCC CACGGTGTCC CCCAACTCTC TCTCTACGAA
 1021 CATTCAACA GCCCACATCC CACCCCTGCA CCTGCGGACA TCAGCCAGAA GCAAGGTACA
 1081 AGCCTGGGAT GCCCACTCAC TCAGCTTCTC TCCTCTGCAG TTCACAGGCC TCTGCAGACC
 1141 CCTGACCTCT CTGGCTTCTA CTCCCTGACC TCAGGCAGCA TGCGGCAGCT CCCCCACACT
 1201 GTGAGCTGGT GAGTGTGGGC CCAGCTCAGT GTTAACCTTC TTCTGCCTC CAGGTTCAACC
 1261 CACCCATCCT TGATGCTAGG TTCTGGTGT CCTGGTCACC CAGCAGGCCAT CCCCCACCCG
 1321 GCCATTGTGC CCCCCCTCAGG GAAGCAGGAG CTGCAGCCCT TCGACCGCAA CCTGTGAGTG
 1381 AAAGACAATC CTGAACAATC TGGATTTGTG CCCCTCAGGA AGACACAAGC AGAGTCCAAG
 1441 GCAGAGAAGG AGGCAAGAA GCCAACCATC AAGAAGCCCC TCAATGCCTT CATGCTGTAC
 1501 ATGAAGGAGA TGAGAGCCAA GGTCAATTGCA GAGTGCACAC TTAAGGAGAG CGCTGCCATC
 1561 AACAGATCC TGGGCCGCAG GGTGAGACCA TGGGCAGGTG GGCTGGCAGG GATGCTCCCC
 1621 GACCATCTTC AGCCTGGTGC AGCCTGCTGA CTCCCTGATG CACCCCCACCT GCCCCCTCTC
 1681 CCTGTTGCAG TGGCACGCGC TGTCGCGAGA AGAGCAGGCC AAGTACTATG AGCTGGCCCG
 1741 CAAGGAGAGG CAGCTGCACA TGCAAGCTATA CCCAGGCTGG TCAGCGCGGG ACAACTACGT
 1801 GAGTGCCTAG TGCTGAGCA TCCCTCCTT TGTTCCCTGC AGGGGAAGAA GAAGAGGCCG
 1861 TCGAGGGAAA AGCACCAAGA ATCCACCAACA GGTGAGACCT TCTCTCGCTC TACCCCTCTG
 1921 GCATGGCTGT GAGCAGACCC TGGCTCCCT AAGAAATGCC GTGCTCGCTT TGGCCTAAC
 1981 CAGCAGACGG ATTGGTGTGG TCCGTGCAGG TGGGTTGTG CCCAGGGGAA GTTCTATTCC
 2041 ATTCAATTCCA TCAGAGACAA ACTGGCCAG AGAACTCAAG GATGGTAATG GACAAGAGTC
 2101 ACTGTCCATG TCTTCTTCCT CTAGCCCAGC TTGAGGACTG GGATGGCTGG GCAAGGAAGC
 2161 CATAGGCATT GCGGCCCTT GCCTTGGTGC AGATGTGAGT CCCACAAACA CATCTGGAGA
 2221 AGCTCAAAGG CCGGACTGG GAGATGACTC CCTTGGAGA CAGGAGAGAT GACTCCCTG
 2281 GAAGACAGAT GACAGCCCAT AGGCCTAGTG ACAAAAGGCC CCTTGGGAC CTTGTTGGCTG
 2341 TTCTGGAAC TGCACCTGTC CTAGGTCTGG GCCAGACCAA GCAGAATGGC AGTCTGAGGA
 2401 CACTGACTTA CCACCCAAGT CCCAGGAAGA GAGGACAAGG AACAGGCCAG GCCTGTGCAA
 2461 AGGCAGCATT TTTGGTTGT GGTGTATGAC TATGAATTCA CCCTCTGTTT ACAGATAACT
 2521 CTCTTCACTA TTCCTAGGAG GAAAAAGAAA TGCATTGGT ACTTACCCGG AGAAGGCCGC
 2581 TGCCCCAGCC CGGTTCCCTC CGATGACAGT GCTCTAGGCT GCCCGGGTC CCCAGCTCCC
 2641 CAGGACTCAC CCTCATACCA TCTGCTGCC CGCTTCCCCA CAGAACTGCT TACTAGCCCT
 2701 GAAAAAGATT ATTGTAGTGT TCAAAATATT TTTGTATTGT TAATGCATCA TCATAGAAAA
 2761 ACTTTAAAC ATGAGAATAA AGATACTTT TACTGGTTT GTTTTCAA GCGTGACCCCT
 2821 GAGGAATAAG CTGTTTCAGT AACAGAGCAT GATAT

Genotypisierungsverfahren

[0036] Bei den Verfahren der vorliegenden Erfindung werden die in einer Probe vorhandenen Allele dadurch identifiziert, daß das an der polymorphen Stelle, nämlich der Nukleotidposition 883 der SEQ ID NO:1, vorhandene Nukleotid identifiziert wird. Zur Bestimmung des TCF-1-Genotyps eines Individuums können alle Arten von Gewebe, die TCF-1-Nukleinsäure enthalten, verwendet werden. Zur Identifizierung des an einem einzelnen Nukleotidpolymorphismus vorhandenen Nukleotids sind eine Reihe von Verfahren im Fachgebiet bekannt. Dabei stellt das jeweilige zur Identifizierung des Genotyps verwendete Verfahren keinen kritischen Aspekt der Erfindung dar. Zwar sind aufgrund von Betrachtungen hinsichtlich der Leistung, Kosten und Zweckmäßigkeit bestimmte Verfahren wünschenswerter als andere, doch ist ersichtlich, daß alle Verfahren, mit denen das vorhandene Nukleotid identifiziert werden kann, die zur Identifizierung des Genotyps notwendigen Informationen liefern. Bevorzugte Genotypisierungsverfahren beinhalten die DNA-Sequenzierung, allel spezifische Amplifika-

tion oder den Nachweis der amplifizierten Nukleinsäure auf Sondenbasis.

[0037] TCF-1-Allele lassen sich mit DNA-Sequenzierverfahren, wie beispielsweise dem Ketteterminationsverfahren (Sanger et al., 1977, Proc.Natl.Acad.Sci.74:5463-5467, identifizieren, die im Fachgebiet allgemein bekannt sind. In einer Ausführungsform wird eine die polymorphe Stelle umfassende Teilsequenz des Gens amplifiziert und entweder in ein geeignetes Plasmid kloniert und dann sequenziert oder direkt sequenziert. Eine Sequenzierung auf PCR-Basis ist im US-Patent Nr. 5,075,216; Brow, in PCR Protocols, 1990 (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego) Kapitel 24; und Gyllenstein, in PCR Technology, 1989, (Erlich, Hrsg., Stockton Press, New York) Kapitel 5 beschrieben. Typischerweise wird die Sequenzierung unter Verwendung eines der im Handel erhältlichen DNA-Sequenzautomaten, beispielsweise von PE Biosystems (Foster City, CA), Pharmacia (Piscataway, NJ), Genomyx Corp. (Foster City, CA), LICOR Biotech (Lincoln, NE), GeneSys Technologies (Sauk City, WI) und Visable Genetics, Inc. (Toronto, Canada) durchgeführt.

[0038] TCF-1-Allele lassen sich unter Verwendung von Genotypisierungsverfahren auf Amplifikationsbasis identifizieren. Es sind eine Reihe von Nukleinsäureamplifikationsverfahren beschrieben, die sich in zum Nachweis von Einzelbasenänderungen in einer Zielnukleinsäure fähigen Tests einsetzen lassen. Ein bevorzugtes Verfahren ist dabei die Polymerasekettenreaktion (PCR), die inzwischen im Fachgebiet allgemein bekannt und in den US-Patenten Nr. 4,683,195; 4,683,202; und 4,965,188 beschrieben ist. Beispiele für die zahlreichen veröffentlichten Artikel, in denen PCR-Verfahren und -anwendungen beschrieben werden, finden sich PCR-Applications, 1999 (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego), PCR Strategies, 1995 (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego); PCR Protocols, 1990 (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego) und PCR Technology, 1989, (Erlich, Hrsg., Stockton Press, New York). Kommerzielle Anbieter, wie beispielsweise PE Biosystems (Foster City, CA) vermarkten PCR-Reagenzien und veröffentlichen PCR-Protokolle.

[0039] Zu weiteren geeigneten Amplifikationsverfahren zählen die Ligasekettenreaktion (Wu und Wallace, 1988, Genomics 4:560-569); der Strangverdrängungstest (Walker et al.; 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396, Walker et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20:1691-1696, und US-Patent Nr. 5,455,166) sowie mehrere Amplifikationssysteme auf Transkriptionsbasis, einschließlich der in den US-Patenten Nr. 5,437,990; 5,409,818; und 5,399,491; beschriebenen Verfahren, das Transkriptionsamplifikationssystem (TAS)(Kwoh et al., 189, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177) sowie die sich selbst erhaltende Sequenzreplikation (3SR) (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878 und WO92/08800). Als Alternative können Verfahren, bei denen die Sonde auf nachweisbare Niveaus amplifiziert wird, verwendet werden, wie beispielsweise die Q β -Replikase-Amplifikation (Kramer und Lizardi 1989, Nature 339:401-402, und Lomeli et al., 1989, Clin.Chem.35:1826-1831. Eine Übersicht über bekannte Amplifikationsverfahren findet sich bei Abramson und Myers, 1993, Current Opinion in Biotechnology 4:41-47.

[0040] Die Genotypisierung kann auch durch Nachweisen von TCF-1-mRNA erfolgen. Die Amplifikation von RNA lässt sich durchführen, indem zunächst die Ziel-RNA beispielsweise unter Verwendung einer viralen reversen Transkriptase revers-transkribiert und anschließend die erhaltene cDNA amplifiziert wird oder unter Verwendung einer kombinierten Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) bei hoher Temperatur wie in den US-Patenten Nr. 5,310,652; 5,322,770; 5,561,058; 5,641,864 und 5,693,517 beschrieben (siehe auch Myers und Sigua, 1995, in PCR Strategies, supra, Kapitel 5).

[0041] TCF-1-Allele lassen sich unter Verwendung von allel spezifischer Amplifikation oder Primerverlängerungsverfahren, die auf dem Hemmeffekt einer terminalen Primerfehlpaarung auf die Fähigkeit einer DNA-Polymerase zur Verlängerung des Primers beruhen, identifizieren. Zum Nachweis einer Allelsequenz unter Verwendung eines allel spezifischen Amplifikationsverfahrens bzw. Verfahrens auf Verlängerungsbasis wird ein zum TCF-1-Gen komplementärer Primer gewählt, so daß das 3'-terminale Nukleotid an der polymorphen Position hybridisiert. In Gegenwart des zu identifizierenden Allels stimmt der Primer mit der Zielsequenz am 3'-Terminus überein und wird verlängert. In Gegenwart lediglich des anderen Allels weist der Primer eine 3'-Fehlpaarung relativ zur Zielsequenz auf, und die Primerverlängerung ist entweder ausgeschlossen oder signifikant reduziert. Allel spezifische Amplifikationsverfahren bzw. Verfahren auf Verlängerungsbasis sind beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5,137,806; 5,595,890; 5,639,611 sowie im US--Patent Nr. 4,851,331 beschrieben. Ein bevorzugtes Genotypisierungsverfahren auf Grundlage von allel spezifischer Amplifikation ist in den Beispielen beschrieben.

[0042] Als Alternative lässt sich eine sequenzspezifische Amplifikation unter Verwendung einer Primers durchführen, der an einen die polymorphe Stelle umfassenden Bereich hybridisiert und zu einem Allel genau komplementär ist, indem Bedingungen ausgewählt werden, unter denen ein stabiler Hybridisierungsduplex nur zwischen dem Primer und dem perfekt passenden Allel gebildet wird. Derartige Verfahren sind zur Unterscheidung

von Einzelnukleotidpolymorphismen weniger bevorzugt, und zwar aufgrund der Schwierigkeit des Ausschließens einer partiellen Hybridisierung des Primers an fehlgepaartes Allel, was zur Erzeugung eines unbeabsichtigten Amplifikationsprodukts führt. Dagegen unterscheiden Verfahren, die auf dem Vorhandensein einer 3'-terminalen Fehlpaarung beruhen, zwischen Allelen, selbst wenn der Primer an beide Allele hybridisiert.

[0043] Unter Verwendung der auf allel spezifischer Amplifikation beruhenden Genotypisierung erfordert die Identifizierung der Allele lediglich den Nachweis des Vorhandenseins bzw. der Abwesenheit amplifizierter Zielsequenzen. Verfahren zum Nachweis amplifizierter Zielsequenzen sind im Fachgebiet allgemein bekannt. So wurden beispielsweise die Gelelektrophorese (siehe Sambrook et al., 1989, *supra*) sowie die oben beschriebenen Sondenhybridisierungstests bereits verbreitet zum Nachweis des Vorhandenseins von Nukleinsäuren eingesetzt. Ein alternatives sondenfreies Verfahren, das hier als kinetisches PCR-Verfahren bezeichnet wird, bei dem die Erzeugung amplifizierter Nukleinsäure durch Verfolgen des Anstiegs der Gesamtmenge an doppelsträngiger DNA im Reaktionsansatz nachgewiesen wird, ist bei Higuchi et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 413-417; Higuchi et al., 1993, *Bio/Technology* 11:1026-1030; Higuchi und Watson, in *PCR Applications*, *supra*, Kapitel 16; den US-Patent Nr. 5,994,056; und europäische Patentveröffentlichung Nr. 487,218 und 512,334 beschrieben. Der Nachweis doppelsträngiger Ziel-DNA beruht auf der erhöhten Fluoreszenz, die Ethidiumbromid (EtBr) und andere DNA-bindende Farbstoffe zeigen, wenn sie an doppelsträngiger DNA gebunden sind. Der Anstieg doppelsträngiger DNA, der von der Synthese von Zielsequenzen herröhrt, führt zu einem Anstieg der Menge an an doppelsträngige DNA gebundenen Farbstoff und einem gleichzeitigen nachweisbaren Fluoreszenzanstieg. Zur Genotypisierung unter Verwendung der kinetischen PCR-Verfahren werden Amplifikationsreaktionen unter Verwendung eines für eines der Allele spezifischen Primerpaars durchgeführt, so daß mit jeder Amplifikation das Vorhandensein eines bestimmten Allels angezeigt werden kann. Mit der Durchführung von zwei Amplifikationen, nämlich einer unter Verwendung von für das A-Allel spezifischen Primern und einer unter Verwendung von für das C-Allel spezifischen Primern, läßt sich der Genotyp der Probe bestimmen.

[0044] Ein bevorzugtes, auf allel spezifische Amplifikation beruhendes Verfahren ist in den Beispielen beschrieben, wobei mehrere allel spezifische Primer in einer einzigen Reaktion verwendet werden. Dabei werden die Primer so ausgewählt, daß die von den Allelen produzierten Amplifikationsprodukte über ihre Größe unterscheidbar sind. Somit können in einer einzigen Probe beide Allele unter Verwendung einer einzigen Amplifikation durch Genanalyse des Amplifikationsprodukts identifiziert werden.

[0045] Allele lassen sich unter Verwendung von Verfahren auf Sondenbasis identifizieren, die auf dem Stabilitätsunterschied von zwischen der Sonde und den TCF-1-Alellen, die sich im Komplementaritätsgrad unterscheiden, gebildeten Hybridisierungsduplexen beruhen. Unter hinreichend stringenten Hybridisierungsbedingungen werden stabil Duplexe nur zwischen der Sonde und der Zielallelesequenz ausgebildet. Das Vorhandensein stabiler Hybridisierungsduplexe läßt sich mit einem beliebigen Verfahren aus einer Reihe allgemein bekannter Verfahren nachweisen. Im allgemeinen ist es dabei bevorzugt, die Nukleinsäure vor der Hybridisierung zur amplifizieren, und den Nachweis zu erleichtern. Allerdings ist dies nicht notwendig, wenn ausreichend Nukleinsäure ohne Amplifikation erhalten werden kann.

[0046] In einer Ausführungsform wird das an der polymorphen Stelle vorliegende Nukleotid identifiziert, indem eine Hybridisierung unter sequenzspezifischen Hybridisierungsbedingungen mit einer Oligonukleotidsonde, die genau zu einem der TCF-1-allele in einem die polymorphe Stelle umfassenden Bereich komplementär ist, durchgeführt wird. Die Sondenhybridisierungssequenz sowie sequenzspezifische Hybridisierungsbedingungen werden dabei so ausgewählt, daß eine einzige Fehlpaarung an der polymorphen Stellung des Hybridisierungsduplex hinreichend destabilisiert, so daß er sich effektiv nicht ausbildet. Somit werden unter sequenzspezifischen Hybridisierungsbedingungen stabile Duplexe nur zwischen der Sonde und der genau komplementären allelischen Sequenz ausgebildet. Somit liegen Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10 bis etwa 35 Nukleotiden, vorzugsweise von etwa 15 bis etwa 35 Nukleotiden, die zu einer Allelsequenz in einen bereich, der die polymorphe Stelle umfaßt, genau komplementär sind, im erfindungsgemäßen Rahmen.

[0047] In einer alternativen Ausführungsform wird das an der polymorphen Stelle vorhandene Nukleotid durch Hybridisierung mit einem Oligonukleotid, das zu einem der TCF-1-Allele in einem die polymorphe Stelle umfassenden Bereich weitgehend komplementär sowie zu dem Allel an der polymorphen Stelle genau komplementär ist, unter hinreichend stringenten Hybridisierungsbedingungen identifiziert. Da an nicht polymorphen Stellen auftretende Fehlpaarungen Fehlpaarungen mit beiden Allelsequenzen darstellen, ist der Unterschied in der Anzahl an Fehlpaarungen in einem mit der Zielallelesequenz gebildeten Duplex und in einem mit der entsprechenden Nicht-Zielallelesequenz gebildeten Duplex der gleiche, als wenn ein zur Zielallelesequenz genau komplementäres Oligonukleotid verwendet wird. In dieser Ausführungsform sind die Hybridisierungsbedingungen hinreichend gelockert, so daß die Ausbildung stabiler Duplexe mit der Zielsequenz unter Aufrechterhaltung

einer hinreichenden Stringenz zur Verhinderung der Ausbildung stabiler Duplexe mit Nicht-Zielsequenzen gestattet wird. Unter derartigen hinreichend stringenten Hybridisierungsbedingungen bilden sich stabile Duplexe nur zwischen der Sonde und dem Zielallel aus. Somit liegen Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 10 bis etwa 35 Nukleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von etwa 15 bis etwa 35 Nukleotiden, die zur einer Allelsequenz in einem die polymorphe Stelle umfassenden Bereich weitgehend komplementär und zu der Allelsequenz an der polymorphen Stelle genau komplementär sind, im Umfang der vorliegenden Erfindung.

[0048] Die Verwendung weitgehend statt genau komplementärer Oligonukleotide kann in Testformaten wünschenswert sein, bei denen die Optimierung von Hybridisierungsbedingungen beschränkt ist. So werden beispielsweise in einem typischen Testformat mit mehreren Zielen und immobilisierten Sonden Sonden für jedes Ziel auf einem einzigen festen Träger immobilisiert. Hybridisierungen werden dabei gleichzeitig durchgeführt, in dem der feste Träger mit einer Ziel-DNA enthaltenden Lösung in Kontakt gebracht wird. Da alle Hybridisierungen unter identischen Bedingungen durchgeführt werden, können die Hybridisierungsbedingungen nicht für jede Sonde getrennt optimiert werden. Der Einbau von Fehlpaarungen in eine Sonde kann zur Einstellung der Duplexstabilität verwendet werden, wenn das Testformat die Einstellung der Hybridisierungsbedingungen nicht zuläßt. Der Effekt einer bestimmten eingeführten Fehlpaarung auf die Duplexstabilität ist allgemein bekannt, wobei die Duplexstabilität sich routinemäßig sowohl abschätzen als auch empirisch bestimmen lässt, wie oben beschrieben.

[0049] Eine für die Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung auf Sondenbasis geeignete Sonde, die einen Hybridisierungsbereich enthält, der entweder weitgehend oder genau komplementär zu einem Zielbereich der SEQ ID NO: 1 oder des Komplements der SEQ ID NO: 1 ist, wobei der Zielbereich die polymorphe Stelle umfaßt, und genau komplementär zu einem der beiden Allelsequenzen an der polymorphen Stelle ist, läßt sich unter Verwendung der hier bereitgestellten Anleitung, die im Fachgebiet allgemein bekannt ist, auswählen. Auf ähnliche Weise lassen sich geeignete Hybridisierungsbedingungen, die von der genauen Größe und Sequenz der Sonde abhängen, empirisch unter der hier bereitgestellten Anleitung, die im Fachgebiet allgemein bekannt ist, auswählen. Die Verwendung von Oligonukleotidsonden zum Nachweis einzelner Basenpaar-Sequenzunterschiede ist beispielsweise bei Conner et al., 1983., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:278-282 sowie in den US-Patenten Nr. 5,468,613 und 5,604,099 beschrieben.

[0050] Die proportionale Änderung der Stabilität zwischen einem perfekt gepaarten und einem einzelbasenfehlgepaarten Hybridisierungsduplex hängt von der Länge der hybridisierten Oligonukleotide ab. Mit kürzeren Sondensequenzen gebildete Duplexe werden proportional stärker durch das Vorhandensein einer Fehlpaarung destabilisiert. In der Praxis werden Oligonukleotide mit einer Länge zwischen etwa 15 und etwa 35 Nukleotiden für den sequenzspezifischen Nachweis bevorzugt. Weiterhin destabilisiert eine Fehlpaarung an einem der beiden Enden des Hybridisierungsduplex weniger als eine innenliegende Fehlpaarung, da die Enden eines hybridisierten Oligonukleotids aufgrund thermischer Energie kontinuierlichen und zufälligen Dissoziations- und Re-Annealing-Vorgängen ausgesetzt sind. Vorzugsweise wird zur Unterscheidung einer Einzelbasenpaaränderung in der Zielsequenz diejenige Sondensequenz ausgewählt, die so an die Zielsequenz hybridisiert, daß die polymorphe Stelle im inneren Bereich der Sonde auftritt.

[0051] Die obigen Kriterien zur Auswahl einer Sondensequenz, die an die SEQ ID NO:1 hybridisiert, gelten für den Hybridisierungsbereich der Sonde, d.h. denjenigen Teil der an der Hybridisierung mit der Zielsequenz beteiligt ist. Eine Sonde kann an eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz, wie beispielsweise einen zur Immobilisierung der Sonde verwendeten Poly-T-Schwanz, gebunden werden, ohne daß dabei eine signifikante Änderung der Hybridisierungseigenschaften der Sonde eintritt. Der Fachmann erkennt, daß zur Verwendung in den vorliegenden Verfahren eine an eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz, die zur Zielsequenz nicht komplementär und somit nicht an der Hybridisierung beteiligt ist, gebundene Sonde im wesentlichen zur nichtgebundenen Sonde äquivalent ist.

[0052] In bevorzugten Ausführungsformen der Verfahren auf Sondenbasis zur Bestimmung des TCF-1-Genotyps wird eine Nukleinsäuresequenz aus dem TCF-1-Gen, die die polymorphe Stelle umfaßt, amplifiziert und an die Sonden unter hinreichend stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisiert. Auf die vorhandenen TCF-1-Allele wird aus dem Muster der Bindung der Sonden an die amplifizierte Zielsequenz geschlossen. In dieser Ausführungsform wird die Amplifikation durchgeführt, um ausreichend Nukleinsäure für die Analyse mittels Sondenhybridisierung bereitzustellen. Somit werden Primer konstruiert, so daß ein die polymorphe Stelle umfassender Bereich des TCF-1-Gens unabhängig von dem in der Probe vorhandenen Allel amplifiziert wird. Die allelunabhängige Amplifikation wird durch Verwendung von Primern erzielt, die an konservierte Bereiche des TCF-1-Gens hybridisieren. Die TCF-1-Gensequenz ist hochkonserviert, und geeignete allelunabhängige Primer lassen sich routinemäßig aus der SEQ ID NO: 1 auswählen. Der Fachmann erkennt, daß hierbei eine

experimentelle Optimierung eines Amplifikationssystems typischerweise hilfreich ist.

[0053] Geeignete Testformate zum Nachweis von zwischen Sonden und Zielnukleinsäuresequenzen in einer Probe gebildeten Hybriden sind im Fachgebiet bekannt und umfassen das Format mit immobilisiertem Ziel (Dot-Blot-Format) und Testformate mit immobilisierter Sonde (Umkehr-Dot-Blot- oder Line-Blot-Format). Die Dot-Blot- und Umkehr-Dot-Blot-Testformate sind in den US-Patenten Nr. 5,310,893; 5,451,512, 5,468,613, und 5,604,099 beschrieben.

[0054] In einem Dot-Blot-Format wird amplifizierte Ziel-DNA auf einem festen Träger, wie beispielsweise einer Nylonmembran, immobilisiert. Der Membran-Ziel-Komplex wird mit markierter Sonde unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen inkubiert, nicht hybridisierte Sonde wird durch Waschen unter geeigneten Stringenzbedingungen abgetrennt und die Membran auf das Vorhandensein gebundener Sonde hin beobachtet. Ein bevorzugter Dot-Blot-Nachtest ist in den Beispielen beschrieben.

[0055] Beim Umkehr-Dot-Blot (bzw. Line-Blot-) Format werden die Sonden auf einem festen Träger, wie beispielsweise einer Nylonmembran oder einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Ziel-DNA wird markiert, und zwar typischerweise während der Amplifikation durch den Einbau markierter Primer. Dabei kann einer oder es können beide Primer markiert werden. Der Membran-Sonde-Komplex wird mit der markierten amplifizierten Ziel-DNA unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen inkubiert, nicht hybridisierte Ziel-DNA wird durch Waschen unter geeigneten Stringenzbedingungen abgetrennt und die Membran auf das Vorhandensein gebundener Ziel-DNA hin beobachtet. Ein bevorzugter Umkehr-Line-Blot-Nachtest ist in den Beispielen beschrieben.

[0056] Die Genotypisierung auf Sondenbasis lässt sich unter Verwendung eines "TaqMan"- oder "5'-Nuklease Assay"-Tests durchführen, wie in den US-Patenten Nr. 5,210,015; 5,487,972 und 5,804,375 sowie bei Holland et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280 beschrieben. Beim TaqMan-Test werden markierte Nachweissonden, die innerhalb des amplifizierten Bereichs hybridisieren, während des Amplifikationsreaktionsgemischs zugegeben. Die Sonden werden dabei so modifiziert, daß sie daran gehindert werden, als Primer für die DNA-Synthese zu fungieren. Die Amplifikation wird unter Verwendung einer DNA-Polymerase durchgeführt, die 5'-nach-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, z.B. Tth-DNA-Polymerase. Während der einzelnen Syntheseschritte der Amplifikation werden alle Sonden, die an die Zielnukleinsäure stromabwärts vom Primer, der verlängert wird, hybridisieren, jeweils durch die 5'-nach-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut. Somit führt die Synthese eines neuen Zielstrangs auch zum Abbau einer Sonde, wobei die Anreicherung von Abbauprodukt ein Maß für die Synthese von Zielsequenzen liefert.

[0057] Im TaqMan-Test lassen sich alle zum Nachweis von Abbauprodukt geeigneten Verfahren einsetzen. Dabei werden in einem bevorzugten Verfahren die Nachweissonden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert, von denen einer zum Quenchern der Fluoreszenz des zweiten Farbstoffs fähig ist. Die Farbstoffe werden an die Sonde gebunden, wobei vorzugsweise einer an den 5'-Terminus und der andere an eine innenliegende Stelle gebunden wird, so daß ein Quenchern dann auftritt, wenn die Sonde sich in einem hybridisierten Zustand befindet, und so daß die Spaltung der Sonde durch die 5'-nach-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase zwischen den beiden Farbstoffen stattfindet. Die Amplifikation führt zur Spaltung der Sonde zwischen den Farbstoffen bei gleichzeitiger Beseitigung des Quenchers sowie einem beobachtbaren Anstieg der Fluoreszenz von dem ursprünglich gequenchten Farbstoff. Die Anreicherung von Abbauprodukt wird durch Messen des Anstiegs der Reaktionsfluoreszenz verfolgt. In den US-Patenten Nr. 5,491,063 und 5,571,673 werden alternative Verfahren zum Nachweis des Sondenabbaus, der gleichzeitig mit der Amplifikation stattfindet beschrieben.

[0058] Der TaqMan-Test lässt sich mit allel spezifischen Amplifikationsprimern verwenden, so daß die Sonde nur zum Nachweis des Vorhandenseins von amplifiziertem Produkt verwendet wird. Ein derartiger Test wird wie für die oben beschriebenen, auf kinetischer PCR beruhenden Verfahren beschrieben durchgeführt. Als Alternative kann der TaqMan-Test mit einer zielspezifischen Sonde verwendet werden.

[0059] Bei den oben beschriebenen Testformaten werden typischerweise markierte Oligonukleotide zur Erleichterung des Nachweises der Hybridduplexe eingesetzt. Oligonukleotide können durch Einbau einer mit spektroskopischen, photochemischen, biochemischen, immunchemischen oder chemischen Mitteln nachweisbaren Markierung markiert werden. Zu geeigneten Markierungen gehören ³²P, Fluoreszenzfarbstoffe, elektroendichte Reagentien, Enzyme (wie sie üblicherweise in ELISAS verwendet werden), Biotin oder Haptene sowie Proteine, für die Antiseren oder monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen. Erfindungsgemäße markierte Oligonukleotide lassen sich unter Verwendung der oben für die Synthese von Oligonukleotiden beschriebenen Techniken synthetisieren und markieren. So lässt sich beispielsweise ein Dot-Blot-Test unter Verwen-

dung von mit Biotin markierten Sonden durchführen, wie bei Levenson und Chang, 1989, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego), Seiten 99-112 beschrieben. Nach der Hybridisierung der immobilisierten Ziel-DNA mit den biotinylierten Sonden unter sequenzspezifischen Bedingungen werden Sonden, die gebunden bleiben, dadurch nachgewiesen, daß man zunächst das Biotin an Avidin-Meerrettichperoxidase (A-HRP) oder Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP) bindet, welches dann nachgewiesen wird, indem man eine Reaktion durchführt, bei der das HRP eine Farbänderung eines Farbstoffs katalysiert.

[0060] Verschiedene andere Verfahren, die sich für die Genotypisierung einsetzen lassen, sind beschrieben worden. So können beispielsweise TCF-1-Allele über durch Gelelektrophorese gemessene Änderungen in der Mobilität identifiziert werden. Typischerweise wird dabei ein kleiner Bereich des TCF-1-Allels, der die polymorphe Stelle umfaßt, amplifiziert und das Amplifikationsprodukt durch Gelelektrophorese analysiert. Als Alternative werden Fragmente des Allels durch Verdauung mit Restriktionsenzymen erzeugt und die Fragmente die die polymorphe Stelle umfassen, durch Gelelektrophorese analysiert. Verfahren zur Identifizierung von Einzel-nukleotidänderungen in DNA auf Gelbasis sind bei Sheffield et al., in PCR Protocols, 1990, (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego), Kapitel 26 beschrieben.

[0061] Der Mobilitätsunterschied läßt sich durch den selektiven Einbau von Nukleotidanalogen in die Nukleinsäuresequenz an der polymorphen Position verstärken. Im US-Patent Nr. 4,879,214 wird ein auf Primerverlängerung beruhendes Verfahren beschrieben, bei dem ein Nukleotidanalog so miteinbezogen wird, daß das Analog in das gebildete Verlängerungsprodukt unter Verwendung eines der Allele als Matrize eingebaut wird. Das Analog wird dabei so ausgewählt, daß es die Mobilität des verlängerten Produkts ändert, was die Unterscheidung der aus den unterschiedlichen Allelen gebildeten Verlängerungsprodukte erleichtert.

[0062] Der selektive Einbau von Nukleotidanalogen an der polymorphen Position läßt sich auch dazu verwenden, das Verlängerungsprodukt von einem Allel gegenüber Nukleaseabbau resistent zu machen. Im US-Patent Nr. 4,656,127 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem eine markierte DNA-Sonde an die Zielnukleinsäure so hybridisiert wird, daß das 3'-Ende der Sonde unmittelbar neben der analysierten Position positioniert wird. Ein Nukleotidanalog, wie z.B. ein Thionukleotid, wird in die Verlängerungsreaktion miteinbezogen, so daß das Analog unter Verwendung nur eines der Allele als Matrize eingebaut wird und nicht, wenn das andere Allel als Matrize vorliegt. Die verlängerte Sonde ist gegenüber der Spaltung mit Exonuklease III resistent, wenn das Nukleotidanalog eingebaut wurde. Somit deutet das Vorhandensein von unverdauter, markierter Sonde nach Behandlung mit Exonuklease III auf das Vorhandensein des spezifischen Allels hin.

[0063] Welches Verfahren auch immer zur Bestimmung davon, welche erfindungsgemäßen Oligonukleotide selektiv an TCF-1-Allelsequenzen in einer Probe hybridisieren, verwendet wird, das zentrale Merkmal des Typisierungsverfahrens beinhaltet die Identifizierung der in der Probe vorhandenen TCF-1-Allele durch Nachweis der vorhandenen Variantensequenzen.

[0064] Kits, geeignete Komponenten zur praktischen Durchführung des vorliegenden Verfahrens umfassende Behältereinheiten, können für die TCF-1-Allele spezifische Oligonukleotidsonden enthalten. In einigen Fällen können Nachweissonden dabei an eine entsprechende Trägermembran fixiert sein. Der Kit kann auch Amplifikationsprimer zur Amplifikation eines Bereichs des TCF-1-Locus, der die polymorphe Stelle umfaßt, enthalten, da derartige Primer in der bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform geeignet sind. Als Alternative können geeignete Kits einen Satz von Primern enthalten, der einen allel spezifischen Primer für die spezifische Amplifikation von TCF-1-Allelen umfaßt. Zu weiteren optionalen Komponenten des Kits gehören zusätzliche Reagenzien, die bei den Genotypisierungsverfahren, wie sie hier beschrieben sind, verwendet werden. So kann ein Kit beispielsweise zusätzlich ein Mittel zu Katalyse der Synthese von Primerverlängerungsprodukten, Substratnukleosidtriphosphate, Mittel zur Markierung und/oder zum Nachweis von Nukleinsäure (zum Beispiel ein Avidin-Enzym-Konjugat und Enzymsubstrat sowie Chromogen, falls es sich bei der Markierung um Biotin handelt), entsprechende Puffer für Amplifikations- oder Hybridisierungsreaktionen sowie Anleitungen zur Durchführung des vorliegenden Verfahrens enthalten.

[0065] Die nachfolgend dargestellten Beispiele der vorliegenden Erfindung werden lediglich zum Zwecke der Veranschaulichung bereitgestellt und stellen keine Beschränkung des Umfangs der Erfindung dar. Zahlreiche im Schutzmfang der Ansprüche, die den Beispielen folgen, liegende erfindungsgemäße Ausführungsformen werden dem Fachmann durch Lesen des vorstehenden Texts und der nachfolgenden Beispiele ersichtlich.

Beispiel 1

Genotypisierungsvorschrift

Auf sequenzspezifische Amplifikation beruhende Identifizierung von TCF-1-Allelen

[0066] Der Genotyp einer menschlichen Probe lässt sich durch sequenzspezifische Amplifikationen unter Verwendung von Primern, die die Allele auf der Grundlage des an Position 883 vorliegenden Nukleotids unterscheiden, bestimmt werden. In der nachfolgenden Vorschrift wird der Genotyp durch die Analyse des Musters von Amplifikationsprodukten bestimmt, die unter Verwendung von Primern erzeugt werden, mit denen Fragmente unterschiedlicher Längen je nach den vorhandenen Allelen amplifiziert werden.

Amplifikationsprimer

[0067] Amplifikationen werden unter Verwendung von vier Primern durchgeführt, wobei zwei der Primer stromaufwärts und zwei stromabwärts liegen. Die Sequenzen bevorzugter Primer sind nachfolgend in 5'-nach-3'-Orientierung dargestellt.

Name	SEQ ID NO:	Sequenz (5'-3')	5'-Nukleotid
GZ346B	2	CCAGGTCCTTC- CCCTAA	630
LS045B	3	TCCAGGTCCCTTC- CCCTAAAA	629
GZ351B	4	CATGCATTACCCAC- CCA	867
GZ374B	5	CCTGCTCCCGAGGG	896
GZ348B	6	GCGGGGTCCACT- TACCA	939

[0068] Der Stromaufwärts-Primer LS045B (SEQ ID NO: 3) und der Stromabwärts-Primer GZ348B (SEQ ID NO: 6) hybridisieren an einen Bereich, der den Einzelnukleotidpolymorphismus überspannt. Die Amplifikation unter Verwendung dieser beiden Primer führt zur Synthese eines 311 Basenpaar (Bp) großen Produkts, und zwar unabhängig von dem an der polymorphen Position vorliegenden Nukleotid.

[0069] Bei dem Primer GZ374B (SEQ ID NO: 5) handelt es sich um einen Stromabwärts-Primer der so an die TCF-1-Sequenz hybridisiert, daß das 3'-terminale Nukleotid an die polymorphe Stelle, Position 883, hybridisiert. Der Primer GZ374B (SEQ ID NO: 5) ist zum C-Allel genau komplementär und weist somit relativ zum A-Allel eine 3'-terminale Fehlpaarung auf. Unter geeigneten Bedingungen wie unten beschrieben, wird ein Amplifikationsprodukt nur dann erzeugt, wenn ein C-Allel in der Probe vorhanden ist. Die Amplifikation unter Verwendung der Primer LS045B (SEQ ID NO: 3) und GZ374B (SEQ ID NO: 5) führt zu einer Amplifikation eines 268 Bp großen Nukleotidprodukts, falls ein C-Allel in der Probe vorhanden ist.

[0070] Bei dem Primer GZ351B (SEQ ID NO: 4) handelt es sich um einen Stromaufwärts-Primer, der so an die TCF-1-Sequenz hybridisiert, daß das 3'-terminale Nukleotid an der polymorphen Stelle, Position 883, hybridisiert. Der Primer GZ351B (SEQ ID NO: 4) ist zum A-Allel genau komplementär und weist somit relativ zum C-Allel eine 3'-terminale Fehlpaarung auf. Unter geeigneten Bedingungen, wie unten beschrieben, wird ein Amplifikationsprodukt nur dann erzeugt, wenn ein A-Allel in der Probe vorhanden ist. Eine Amplifikation unter Verwendung der Primer GZ351B (SEQ ID NO: 4) und GZ348B (SEQ ID NO: 6) führt zu einer Amplifikation eines 73 Bp großen Produkts nur dann, wenn ein A-Allel in der Probe vorhanden ist.

[0071] Bei dem Primer GZ346B (SEQ ID NO: 2) handelt es sich um einen alternativen Stromaufwärts-Primer, der anstatt des Primers LS045B (SEQ ID NO: 3) in den obigen Paarungen verwendet werden kann.

[0072] Unter Verwendung der obigen Primer, SEQ ID NO: 3-6, sind die durch Amplifikationen der möglichen Genotypen erzeugten Produkte unterscheidbar. Die möglichen Amplifikationsergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Produktgröße	Genotyp AA	Genotyp C	Genotype CC
73 Bp	ja	Ja	nein
268 Bp	nein	Ja	ja
311 Bp	Ja	Ja	ja

Amplifikation

[0073] Die PCR-Amplifikation wird in einem Gesamtreaktionsvolumen von 25-100 µl durchgeführt, wobei der Reaktionsansatz die folgenden Reagenzien enthält:
 0,2-1 ng/µl gereinigte menschliche genomische DNA
 0,2 µM jeweils der vier Primer
 800 µM Gesamt-dNTP (jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 60 mM KCl
 12 mM Tris-HCl, pH 8,3
 2,4 mM MgCl₂,
 0,05-0,1 Einheiten/µl AmpliTaq Gold™-Polymerase (entwickelt und hergestellt von Hoffmann-La Roche und im Handel erhältlich von PE Biosystems (Foster City, CA).)

[0074] Die Amplifikation wird in einem GeneAmp®-PCR-System 9600-Thermocycler-Gerät (PE Biosystems, Foster City, CA) unter Verwendung des spezifischen, unten angegebenen Temperaturzyklusverlaufs durchgeführt.

Inkubation vor der Reaktion:	12 Minuten bei 94°C
37 Zyklen: Denaturieren:	45 Sekunden bei 95°C
Annealing:	30 Sekunden bei 61°C
Verlängern:	30 Sekunden bei 72°C
Abschließende Verlängerung:	7 Minuten bei 72°C
Haltephase:	10°C bis 15°C

Gelelektrophoretischer Nachweis

[0075] Die amplifizierte DNA wird mittels Agarosegel-Elektrophorese zur Bestimmung der Größe der amplifizierten Produkte nach Größe aufgetrennt. Dabei wird ein 3% NuSieve/1.0% Agarosegel in 0,5 × TBE (0,045 M Trisborat und 0,001 M Dinatrium-EDTA)-Laufpuffer verwendet. Sowohl das Gel als auch der Laufpuffer werden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt (als Alternative kann die Anfärbung nach der Elektrophorese durchgeführt werden). Die Elektrophorese erfolgt bei 100 Volt über einen Zeitraum von ungefähr 1 Stunde. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden von DNA werden mit UV-Bestrahlung sichtbar gemacht.

Beispiel 2

Genotypisierungsvorschrift

Identifizierung von TCF-1-Allelen auf Sondenbasis

[0076] In diesem Beispiel wird ein alternatives Genotypisierungsverfahren beschrieben. Dabei wird ein Bereich des TCF-1-Gens, der die polymorphe Stelle umfaßt, amplifiziert und das vorliegende Nukleotid durch Sondenhybridisierung identifiziert. Der Sondennachweis erfolgt entweder unter Verwendung eines Formats mit immobilisiertem Ziel (Dot-Blot) oder unter Verwendung eines Formats mit immobilisierter Sonde (Umkehr-Dot-Blot oder Line-Blot).

Amplifikationsprimer

[0077] Die Amplifikation eines Bereichs des TCF-1-Gens, der den Nukleotiden 847 bis 939 der SEQ ID NO: 1 entspricht und der die polymorphe Stelle an Position 883 umfaßt, erfolgt unter Verwendung des Stromaufwärts-Primers RR328B (SEQ ID NO: 7), wie unten angegeben, zusammen mit dem Stromabwärts-Primer GZ348B (SEQ ID NO: 6). Die Sequenz des Stromaufwärts-Primers ist in 5'->3'-Orientierung dargestellt.
 RR328B (SEQ ID NO: 7) TACTCCGCCTTCAATCTGCTCA

[0078] Zur Verwendung beim unten beschriebenen Nachweisformat mit immobilisierter Sonde wird der Primer, der in den zur Sonde komplementären Strang eingebaut wird, mit am 5'-Phosphat gebundenen Biotin markiert, was den Nachweis erleichtert. Reagenzien zur Synthese von Oligonukleotiden mit einer am 5'-Phosphat gebundenen Biotinmarkierung sind im Handel von den Firmen Clonetech (Palo Alto, CA) und Glenn Research (Sterling, VA) erhältlich. Ein bevorzugtes Reagens ist Biotin-ON von Clonetech.

Amplifikation

[0079] Die PCR-Amplifikation wird in einem Gesamtreaktionsvolumen von 25-100 µl mit den folgenden Reagenzien durchgeführt:

0,2 ng/µl gereinigte menschliche genomische DNA jeweils 0,2 µM Primer

800 µM Gesamt-dNTP (jeweils 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

50mM KCl

10 mM Tris-HCl, pH 8,3

1 mM MgCl₂

0,05 Einheiten/µl AmpliTaq GoldTM-Polymerase (entwickelt und hergestellt von Hoffmann-La Roche und im Handel erhältlich von PE Biosystems (Foster City, CA).)

[0080] Die Amplifikation wird in einem GeneAmp[®]-PCR-System 9600-Thermocycler-Gerät (PE Biosystems, Foster City, CA) unter Verwendung des spezifischen, unten angegebenen Temperaturzyklusverlaufs durchgeführt.

Inkubation vor der Reaktion:	12,5 Minuten bei 94°C
37 Zyklen: Denaturieren:	45 Sekunden bei 95°C
Annealing:	30 Sekunden bei 60°C
Verlängern:	45 Sekunden bei 72°C
Abschließende Verlängerung:	7 Minuten bei 72°C
Haltephase:	10°C bis 15°C

Nachweissonden

[0081] Bevorzugte Sonden zur Verwendung bei der Identifizierung der in der amplifizierten TCF-1-Nukleinsäure vorhandenen allelischen Sequenzvarianten sind nachfolgend beschrieben. Dabei sind die Sonden in der 5'-nach-3'-Orientierung dargestellt.

C-Allel-Sonde:

KW196 (SEQ ID NO: 8) ATTACCCACCCCCCTCGGGA

A-Allel-Sonde:

KW118 (SEQ ID NO: 9) CCGAGGTGGGTGGTAAT

Sondenhybridisierungstest, Format mit immobilisiertem Ziel

[0082] Beim Format mit immobilisiertem Ziel wird ein Teil der amplifizierten Nukleinsäure denaturiert, auf ein Nylonfilter aufgetragen und wie nachfolgend beschrieben immobilisiert.

[0083] Das Filter wird anschließend in eine Lösung mit markierter Sonde getaucht, so daß die Hybridisierung stattfinden kann. Nichtgebundene Sonde wird durch Waschen unter sequenzspezifischen Hybridisierungsbedingungen abgetrennt, und die Sonden, die an der immobilisierten Nukleinsäure gebunden bleiben, werden nachgewiesen. Die Einzelheiten des Tests sind nachfolgend beschrieben.

[0084] Zur Verwendung im Nachweisformat mit immobilisiertem Ziel, wie unten beschrieben, werden die Sonden mit Meerrettichperoxidase (HRP) zur Erleichterung des Nachweises markiert. Die Synthese von mit HRP markierten Oligonukleotiden ist bei Levenson und Chang, Kapitel 13 in PCR Protocols, 1990, (Innis et al., Hrsg., Academic Press, San Diego), hiermit durch Bezugnahme aufgenommen, beschrieben.

[0085] Zur Denaturierung der Amplifikationsprodukte werden 10 µl Amplifikationsprodukt zu 90 µl Denaturierungslösung bestehend aus 4,5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 7,2 µl auf 5 N NaOH und 78,3 µl H₂O, gegeben. Das

Gemisch wird zur vollständigen Denaturierung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

[0086] Nylonfilter (BioDyne™ B-Nylonfilter, Pall Corp., Glen Cove, NY) werden durch 5-10minütiges Einweichen in H₂O und ferner durch Spülen mit 200 µl H₂O vorbereitet. Das Gemisch mit der denaturierten Probe (100 µl) wird unter Vakuum und Verwendung eines Dot-Blot-Apparats (Bio-Dot™ von BioRad, Richmond, CA) auf die Nylonmembran aufgetragen. Anschließend werden die Vertiefungen jeweils mit 200 µl 0,4 N NaOH und danach kurz mit 2 × SSC gespült und an der Luft getrocknet, bis keine Flüssigkeitsreste mehr vorhanden sind. Die immobilisierte DNA wird mit dem Nylonfilter durch Ultraviolettbestrahlung bei einem Flux von 500 mJ/cm² unter Verwendung einer Stratalinker™ (Stratagene, La Jolla, CA) UV-Licht-Box (Einstellung "autocrossing") quervernetzt.

[0087] Die Hybridisierung wird in einem Hybridisierungspuffer (5 × SSPE, 0,5% SDS, wobei 20 × SSPE gleich 3,6 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄·H₂O, 20 M EDTA, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt), der 2 µM mit HRP markierte Sonde enthält, durchgeführt. Man läßt die Filter 25-30 Minuten bei 55°C hybridisieren. Nach der Hybridisierung werden die Filter in einem Waschpuffer (2,5 × SSPE, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur zur Abtrennung des größten Teils an überschüssiger Sonde gespült. Ein stringenter Waschschnitt wird in Waschpuffer 12 Minuten bei 55°C in einem Schüttelwasserbad durchgeführt. Durch die sequenzspezifischen Hybridisierungsbedingungen des stringenten Waschschnitts wird sichergestellt, daß lediglich Sonden, die zur Zielsequenz genau komplementär sind, gebunden bleiben.

[0088] Mit HRP markierte Sonden, die am immobilisierten Amplifikationsprodukt gebunden bleiben, werden wie folgt sichtbar gemacht. Eine Farbentwicklungslösung wird durch Mischen von 100ml Citratpuffer (0,1 M Natriumcitrat, pH 5,0), 5 ml 3,3',5',5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung (2 mg/ml TMB-Pulver von Fluka, Milwaukee, WI, gelöst in 100% EtOH) und 100 µl 3% Wasserstoffperoxid hergestellt. Die Filter werden zunächst in 100mM Natriumcitrat (pH 5,0) 5 Minuten gespült und danach in der Farbentwicklungslösung unter leichtem Schütteln 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das TMB, welches zunächst farblos ist, wird durch die sondengebundene HRP in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in einen gefärbten Niederschlag umgewandelt. Die entwickelten Filter werden in Wasser mehrere Minuten gespült und sofort fotografiert.

Sondenhybridisierungstest, Format mit immobilisierter Sonde

[0089] Beim Format mit immobilisierter Sonde werden die Sonden vor ihrer Verwendung in der Hybridisierung an einen festen Träger immobilisiert. Der Sonde-Träger-Komplex wird in eine Lösung mit denaturierter amplifizierter Nukleinsäure getaucht, so daß die Hybridisierung stattfinden kann. Nicht gebundene Nukleinsäure wird durch Waschen unter sequenzspezifischen Hybridisierungsbedingungen abgetrennt und an den immobilisierten Sonden gebunden gebliebene Nukleinsäure nachgewiesen. Der Nachweis wird unter Verwendung der gleichen chromogenen Reaktion, die im oben beschriebenen Dot-Blot-Test verwendet wurde, durchgeführt. Die Einzelheiten des Tests sind nachfolgend beschrieben.

[0090] Zur Verwendung im Nachweisformat mit immobilisierter Sonde wie unten beschrieben, wird eine Gruppierung an das 5'-Phosphat der Sonde gebunden, um die Immobilisierung auf einem festen Träger zu erleichtern. Vorzugsweise wird Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumen, BSA) an das 5'-Phosphat im wesentlichen wie bei Tung et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:464-465 beschrieben gebunden. Als Alternative wird an das 5'-Ende ein Poly-T-Schwanz angefügt, wie im US-Patent Nr. 5,451,512 beschrieben ist.

[0091] Die Sonden werden in einem linearen Format auf Nylonmembranfilme unter Verwendung eines Linear Stripper und Multispense2000™-Kontrollgeräts (IVEK, N. Springfield, VT) aufgetragen. Die Probentiter, nämlich 2 µM KW196 (SEQ ID NO: 8) und 1,75 µM KW118 (SEQ ID NO: 9), werden so gewählt, daß ein Signalgleichgewicht zwischen den allelischen Varianten erzielt wird. Die Filme werden jeweils in Streifen zwischen 0,35 und 0,5 cm Breite geschnitten. Zur Denaturierung der Amplifikationsprodukte werden 20 µl Amplifikationsprodukt (bezogen auf einen 50 µl großen Reaktionsansatz) zu 20 µl Denaturierungslösung (1,6% NaOH) gegeben und zur vollständigen Denaturierung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

[0092] Das denaturierte Amplifikationsprodukt (40 µl) wird in die Vertiefung einer typischen Schale mit 3 ml Hybridisierungspuffer (4 × SSPE, 0,5% SDS) und dem Membranstreifen gegeben. Man läßt die Hybridisierungen 15 Minuten bei 55°C in einem Rotationswasserbad ablaufen. Nach der Hybridisierung wird die Hybridisierungslösung abgesaugt, der Streifen in 3 ml warmem Waschpuffer (2 × SSPE, 0,5% SDS) durch leichtes Hin- und Herbewegen der Streifen gespült und der Waschpuffer abgesaugt. Nach dem Spülen werden die Streifen in 3 ml Enzymkonjugatlösung (3,3 ml Hybridisierungspuffer und 12 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP)) im Rotationswasserbad 5 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend werden die Streifen mit Wasch-

puffer wie oben gespült, 12 Minuten bei 55°C in Waschpuffer inkubiert (stringenter Waschschnitt) und abschließend wiederum mit Waschpuffer gespült.

[0093] Die nun mit HRP markierte Zielnukleinsäure, die am immobilisierten Amplifikationsprodukt gebunden bleibt, wird wie folgt sichtbar gemacht. Die Streifen werden zunächst in 0,1 M Natriumcitrat (pH 5,0) 5 Minuten gespült und anschließend in der Farbentwicklungslösung (oben beschrieben) unter leichtem Schütteln 8-10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das zunächst farblose TMB wird durch die an das Ziel gebundene HRP in Gegenwart von Wasserstoffperoxid in einen gefärbten Niederschlag umgewandelt. Die entwickelten Streifen werden mehrere Minuten in Wasser gespült und sofort fotografiert.

Beispiel 3

Vorliegen des A-Allels

[0094] Proben aus Individuen von vier unterschiedlichen Populationen wurden einem Screening auf das Vorhandensein des A-Allels unterzogen. Die Probenpopulationen bestanden aus 47 Afroamerikanern, 47 kaukasischen Amerikanern, 47 Hispanoamerikanern und 47 Japanern.

[0095] Die Genotypisierung wurde unter Verwendung der im wesentlichen wie in Beispiel 1 oben beschriebenen allel spezifischen Amplifikationsverfahren durchgeführt. Dabei stellt die in Beispiel 1 beschriebene Vorschrift eine verbesserte Version des tatsächlich verwendeten Tests dar. Die durchgeführten Verbesserungen beziehen sich auf die Amplifikations- und Nachweiseffizienz, würden jedoch die qualitativen Ergebnisse des Tests nicht ändern.

[0096] Als Ergebnis wurde festgestellt, daß 19 der 188 Proben das A-Allel enthielten: 2 Afroamerikaner, 11 kaukasische Amerikaner, 6 Hispanoamerikaner und 0 Japaner.

Beispiel 4

Häufigkeit des A-Allels in philippinischen Proben

[0097] Proben aus 200 Individuen von den Philippinen wurden unter Verwendung der in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren auf Sondenbasis (Format mit immobilisierter Sonde) genotypisiert. Dabei stellte sich heraus, daß alle Individuen aus dieser Population für das C-Allel homozygot waren.

[0098] Die Abwesenheit des A-Allels in dieser Population kann dabei behilflich sein, zu erklären, warum Typ-1-Diabetes auf den Philippinen seltener auftritt als in der kaukasischen Population.

Beispiel 5

Assoziation mit Typ-1-Diabetes

[0099] Die TCF-1-Genotypisierung wurde an Individuen aus 282 kaukasischen Familien durchgeführt, die aufgrund dessen, daß sie zwei an Typ-1-Diabetes leidende Nachkommen aufwiesen, ermittelt wurden. Die TCF-1-Genotypen aller Individuen wurden bestimmt. Die TCF-1-Genotypisierung erfolgte unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen auf allel spezifische Amplifikation beruhenden Genotypisierungsverfahren. Zusätzlich zu den 564 Nachkommen (jeweils 2 Geschwister in den 282 Familien) in den betroffenen Geschwisterpaaren, auf denen die Ermittlung beruht, gab es 26 andere betroffene Kinder. Unter diesen Familien befanden sich 270 nicht betroffene Nachkommen.

[0100] Die Proben auf Familienbasis wurden in Form gereinigter genomicscher DNA von HBDI (Human Biological Data Interschange) bereitgestellt, wobei es sich um eine Quelle für Zelllinien von Typ-1-Diabetes betroffene Familien handelt. Bei allen in der vorliegenden Untersuchung verwendeten HBDI-Familien handelt es sich um Kernfamilien mit nicht betroffenen Eltern und wenigstens zwei betroffenen Geschwistern. Diese Proben sind ferner bei Noble et al., 1996, Am. J. Hum. Genet. 59:1134-1148 beschrieben.

[0101] Es ist bekannt, daß der HLA-Genotyp einen signifikanten Effekt, der je nach Genotyp erhöht oder reduziert sein kann, auf das Risiko eines Typ-1-Diabetes haben kann. Insbesondere scheinen Individuen mit dem HLA-DR-Genotyp DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302 (nachfolgend als DR3/DR4 bezeichnet) dem höchsten Risiko eines Typ-1-Diabetes ausgesetzt zu sein (siehe Noble et al., 1996, Am. J. Hum. Genet.

59:1134-1148). Diese Hochrisiko-Individuen besitzen Chancen von 1:15, an Typ-1-Diabetes zu erkranken. Aufgrund des starken Effekts dieses Genotyps auf die Wahrscheinlichkeit eines Typ-1-Diabetes könnte das Vorhandensein des DR3-DQB1*0201/DR4-DQB1*0302-Genotyps den Beitrag von den allelischen TCF-1-Varianten maskieren.

[0102] Individuen in diesen Familien wurden auch an den Loci HLA DRB1 und DQB1 genotypisiert. Von den betroffenen Geschwisterpaaren weisen in 90 Familien beide Geschwister den DR3/DR4-Genotyp auf. In 144 Familien weist keines der betroffenen Geschwister den DR3/4-Genotyp auf. In den verbleibenden 48 Familien weist genau ein Teil des betroffenen Paars den DR3/4-Genotyp auf.

Statistische Methoden

[0103] Es wurden eine Reihe statistischer Assoziationstests durchgeführt, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben. Dabei sind Mitglieder der gleichen Familie keine unabhängige Beobachtungen, vor allem, wenn die alternative Hypothese eines genetischen Effekts wahr ist. Daher wurden während der gesamten Analyse zur Beurteilung der Signifikanz "Bootstrap"-Verfahren verwendet. Ein Standard-, nicht parametrisches "Resampling" der Familien, bei denen es sich um die primären Sampling-Einheiten handelt, wurde unter Verwendung von Routinen im Softwarepaket SPlus (MathSoft, Cambridge, MA) durchgeführt. Dabei wurden für jede Statistik 1000 Bootstrap-Stichproben durchgeführt. Die Konfidenzintervalle wurden auf das einfachste Prozentsatzverfahren bezogen. Die p-Werte wurden bestimmt, indem das breiteste Konfidenzintervall gefunden wurde, von dem der Wert des Parameters unter der Nullhypothese ausgeschlossen ist. Falls $1-\alpha$ gleich dem Konfidenzniveau dieses Intervalls ist, so ist der entsprechende zweiseitige p-Wert gleich α . Beispielsweise entspricht ein Konfidenzintervall von 90% einem P-Wert von 0,10.

Eltern

[0104] Die Genotypen, Allelhäufigkeiten und Genotyphäufigkeiten der Eltern aller 282 Familien sind jeweils in den nachfolgenden Tabellen dargestellt:

Genotyphäufigkeiten unter Elternpaaren

Genotypen	Anzahl Familien
CC, CC	170
AC, CC	90
AA, CC	8
AC, AC	14
AC, AA	0
AA, AA	0

[0105] Die Allelhäufigkeiten wurden bezogen auf die Anzahl an A- und C-Allelen unter den 1128 Eltern-Allelen (jeweils 2 Eltern in 282 Familien, jeweils 2 Allele pro Elternteil) berechnet.

Allelhäufigkeiten unter Eltern

Allele	Anzahl Allele	Häufigkeit
A	134	0,119
C	994	0,881

[0106] Die Genotyphäufigkeiten innerhalb der Eltern wurden mit den unter Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE) erwarteten Genotyphäufigkeiten verglichen. Dabei passen die Daten eindeutig zu den erwarteten Häufigkeiten.

Genotyphäufigkeiten unter Eltern

Genotyp	Erwartet	Beobachtet
CC	0,776	0,777
AC	0,210	0,209
AA	0,014	0,014

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)

[0107] Das HWE wurde auch getestet, indem man sich die Tabelle von übertragenen gegenüber nicht übertragenen Allelen, siehe unten, anschaut und auf die Unabhängigkeit der Reihen und Spalten testete. In diese Analyse wurden alle Eltern einbezogen, einschließlich der homozygoten Eltern, die bei einer TDT-Analyse keine Information liefern (nachfolgend beschrieben). Es werden lediglich die betroffenen Kinder verwendet.

Daten für den HWE-Test am TCF-1-Locus

Beobachtet	Nicht übertragen		Erwartet	Nicht übertragen	
	Übertragen	Nicht übertragen		Übertragen	A
A	16	140	A	17	139
C	113	911	C	112	912

[0108] Man lasse P_{AT} bzw. P_{AU} die Wahrscheinlichkeit der Übertragung bzw. der Nichtübertragung des A-Allels sein. Man definiere anloge Ausdrücke für das C-Allel.

[0109] Das Wahrscheinlichkeitsverhältnis

$$(P_{AT}P_{CU})/(P_{AU}P_{CT})$$

mißt die Abhängigkeit der übertragenen und nicht übertragenen Allele.

[0110] Wie man sehen kann, liegen die Zahlenwerte sehr nahe an den erwarteten Nullwerten. Dies unterstützt das Vorliegen von HWE am TCF-1-Locus. Ein p-Wert, bei dem die Unabhängigkeit von Kindern aus der gleichen Familie angenommen wird, beträgt 0,88. In diesem Fall wurde keine Bootstrap-Analyse zur korrekten Berücksichtigung der Abhängigkeit von Kindern durchgeführt. In diesem Fall sollte das Bootstrap-Verfahren das Signifikanzniveau noch weiter reduzieren.

Assoziation zwischen TCF-1 und DRB1

[0111] Es wurde ein Test zur Assoziation zwischen dem DRB1-Locus und TCF-1 in der allgemeinen Bevölkerung durchgeführt. Eine Assoziation würde das Vorhandensein einer mit diesen Loci verbundenen Populationsstratifikation andeuten, wodurch der Rest der Analyse beeinflußt werden könnte. Zudem kann eine Assoziation unter nicht verknüpften Loci nicht über mehr als eine Generation aufrechterhalten werden, wenn in der Population eine Zufallspaarung stattfindet. In jenem Fall könnte eine Assoziation zwischen den beiden Loci nur dann aufrechterhalten werden, wenn es andauernde Selektionsdrücke für oder gegen eine bestimmte DRB1-TCF-1-Kombination geben würde.

[0112] Die Assoziation wurde wie folgt getestet. Es wurde jeweils der nicht auf das betroffene Individuum übertragene Haplotyp beobachtet. Diese nicht übertragenen Haplotypen können als zufällige Stichprobe der Population (unter HWE) angesehen werden. Man lasse A und C für die beiden TCF-1-Allele stehen. Man lasse 3,4 und X die serologische Gruppe am DRB1 anzeigen, wobei es sich bei X um eine beliebige serologische Gruppe, die von den ersten beiden verschieden ist, handelt. Man lasse AX die Wahrscheinlichkeit für den Haplotyp A und X sein. Man lasse N_{AX} die Anzahl solcher Haplotypen sein. Man definiere ähnliche Längen für die anderen Haplotypen. Die Wahrscheinlichkeit von A bei gegebenen X läßt sich über (N_{AX}/N_{CX}) abschätzen. Das Wahrscheinlichkeitsverhältnis $(A3/C3)/(AX/CX)$ läßt sich über $(N_{A3}N_{CX})/(N_{C3}N_{AX})$ abschätzen. Ähnliche Schätzungen gelten für 4 vs. X und 4 vs. 3. Gäbe es keine Assoziationen zwischen den beiden Loci, so wären alle 3 Wahrscheinlichkeitsverhältnisse gleich 1.

[0113] Die Daten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. In der Tabelle ist das Wahrscheinlichkeitsverhältnis von A bei gegebenem 3 gegen A bei gegebenem X mit 3 vs. X abgekürzt; entsprechende Abkürzungen werden für die anderen Verhältnisse verwendet. Die Signifikanz des Wahrscheinlichkeitsverhältnisses wurde unter Verwendung einer Bootstrap-Analyse geschätzt. Die Analyse zeigte keine Assoziation zwischen TCF-1 und DRB1. Das bedeutet, daß eine eventuell vorhandene Assoziation zwischen den beiden Loci in der TDT (Transmission Disequilibrium Test)-Analyse an einer Wechselwirkung zwischen den beiden Loci in ihrem Effekt auf das Risiko liegt.

Wahrscheinlichkeitsverhältnisse: Test der Assoziation von TCF-1 mit DRB1

Wahrscheinlichkeitsverhältnis	Geschätzt	Konfidenzintervalle			
		80%	90%	95%	p-Wert
3 vs. X	0,71	0,29, 1,25	0,23, 1,50	0,17, 1,75	0,49
4 vs. X	0,71	0,35, 1,24	0,26, 1,45	0,22, 1,67	0,42
4 vs. 3	1,01	0,42, 2,49	0,33, 3,45	0,27, 4,22	1,00

[0114] Dieser Ansatz ist nicht gültig für die nicht betroffenen Geschwister von Individuen, die aufgrund ihres betroffenen Status ermittelt wurden. Die nicht betroffenen Geschwister haben wahrscheinlich nicht den gleichen Haplotyp wie ihr betroffener Bruder bzw. ihre betroffene Schwester erhalten. Daher enthalten die nicht auf die nicht betroffenen übertragenen Haplotypen wahrscheinlich eher Hochrisiko-Haplotypen als die allgemeine Population. Dies gilt umgekehrt nicht für die betroffenen Kinder, da die nicht betroffenen Geschwister im Ermittlungsschema nicht berücksichtigt werden. Für betroffene Geschwister könnte eine gewisse Neigung zum Auftreten falscher Abweichungen von einer Nichtassoziation vorliegen, da die Ermittlung eines jedes Kindes auch vom Krankheitsstatus seines Bruders bzw. seiner Schwester abhängt. Dieser Effekt würde zu falsch-positiven Ergebnissen führen und ist hier nicht offensichtlich.

Geschlechtsbezogene Effekte

[0115] Die TCF-1-Genotypverteilung in den Müttern, Vätern und Nachkommen ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

	AA	AC	CC
Mütter	6	67	209
Väter	2	51	229
Kinder	13	197	650

[0116] In Abwesenheit eines geschlechtsbezogenen Effekts würde man erwarten, daß die Mütter und Väter die gleiche Verteilung aufweisen. Die Chi-Quadrat-Statistik für die gleiche Verteilung bei den Müttern wie bei den Vätern beträgt 5,08 bei einem p-Wert von 0,08. Da die erste Spalte nur wenige Daten aufweist, wurde auch ein Chi-Quadrat-Test nur mit der zweiten und dritten Spalte durchgeführt. Dabei ergab sich eine Statistik von 2,71 mit einem p-Wert von 0,10. Dies läßt darauf schließen, daß es entweder mehr A-Allele in den Müttern als in den Vätern gibt oder das das Risiko von A größer ist, wenn das Allel von der Mutter erhalten wird. Das Ermittlungsschema würde dann die Anzahl von Müttern, die A-tragen, in der Probe erhöhen.

[0117] Unter HWE läßt sich dieser Effekt auch dadurch analysieren, daß man sich Allele anschaut, die nicht auf betroffene Kinder übertragen werden. Das Wahrscheinlichkeitsverhältnis für den Typ von nicht übertragenen Allelen relativ zum mütterlichen oder väterlichen Ursprung beträgt $(A_m \cdot C_p) / (C_m \cdot A_p)$, wobei A_m für die Anzahl an nicht übertragenen A-Allelen mütterlichen Ursprungs, A_p für die Anzahl nicht übertragender A-Allele väterlichen Ursprungs und die weiteren Bezeichnungen für das C-Allel analog definiert sind. Dieses Wahrscheinlichkeitsverhältnis mißt die Populationsweite relativer Häufigkeit von A in Frauen.

Wahrscheinlichkeitsverhältnisse (OR): Test der Assoziation von Allel A mit dem mütterlichem Ursprung

Gruppe	N	OR	Konfidenzintervall			p-Wert
			80%	90%	95%	
Gesamt	1180	1,94	1,45, 2,65	1,31, 2,94	1,20, 3,25	0,01
DR3/DR4	474	1,62	1,08, 2,46	0,95, 2,85	0,86, 3,29	0,14
Nicht-DR3/D R4	706	2,19	1,47, 3,33	1,34, 3,80	1,27, 4,22	0,01

[0118] Die Tatsache, daß das Wahrscheinlichkeitsverhältnis größer als 1 ist, deutet darauf hin, daß Frauen das A-Allel häufiger als Männer tragen. Dieser Effekt scheint bei den Müttern von Nicht-DR3/DR4-Kindern stärker ausgeprägt zu sein, die vermutlich im Durchschnitt weniger wahrscheinlich ein DRB1 3 oder 4-Allel tragen. In diesem Test gibt es ein leichtes Bias, da es in jeder Familie mindestens zwei betroffene Kinder gibt. Wie später gezeigt wird, scheint das Risiko auf den väterlichen Ursprung zurückführbar zu sein, was Männer in der Probe zu wahrscheinlicheren Trägern des A-Allels machen sollte, im Gegensatz zum vorliegenden Ergebnis.

[0119] Wahrscheinlichkeitsverhältnisse für den mütterlichen Ursprung gegenüber dem väterlichen Ursprung übertragener A-Allele wurden ebenso aus Allelübertragungen von heterozygoten Eltern, wie in den nachfolgenden Tabellen dargestellt, berechnet. Die Übertragungen auf betroffene und nicht betroffene Nachkommen wurden getrennt berechnet.

Wahrscheinlichkeitsverhältnisse (OR): Test der Assoziation von Allel A mit dem mütterlichem Ursprung

Übertragung von heterozygoten Eltern auf betroffene Nachkommen

Gruppe	N	OR	Konfidenzintervall			p-Wert
			80%	90%	95%	
Gesamt	253	0,61	0,45, 0,81	0,40, 0,88	0,38, 0,92	0,01
DR3/DR4	104	0,50	0,31, 0,73	0,26, 0,80	0,24, 0,88	0,01
Nicht-DR3/D R4	149	0,67	0,44, 1,04	0,39, 1,15	0,34, 1,24	0,25

Wahrscheinlichkeitsverhältnisse (OR): Test der Assoziation von Allel A mit dem mütterlichem Ursprung

Übertragung von heterozygoten Eltern auf nicht betroffene Nachkommen

Gruppe	N	OR	Konfidenzintervall			p-Wert
			80%	90%	95%	
Gesamt	99	1,23	0,73, 2,05	0,62, 2,39	0,56, 2,86	0,63
DR3/DR4	19	0,78	0,13, 2,88	0,02, 4,67	0,00, 9,00	0,81
Nicht-DR3/D R4	80	1,36	0,77, 2,36	0,67, 2,75	0,58, 3,25	0,48

[0120] Das aus den Übertragungen von heterozygoten Eltern auf betroffene Nachkommen berechnete Wahrscheinlichkeitsverhältnis beträgt weniger als eins, was darauf hindeutet, daß heterozygote Männer häufiger übertragen als heterozygote Frauen. Da dies lediglich auf heterozygote Eltern bezogen ist, kann dieser Effekt nicht an Unterschieden in den Genotypverteilungen von Männern und Frauen liegen. Es scheint nur ein geringer Unterschied in diesem Effekt zwischen DR3/DR4s und nicht DR3/DR4s vorzuliegen, doch gibt es nicht genügend Beweise, um sicher zu sein. Es gibt keinen sichtbaren Unterschied in der Übertragung unter den nicht betroffenen, doch liegen nur wenige Daten dazu vor.

[0121] Ein Verfahren zum Nachweis allelischer Effekte besteht in der Analyse der Allelübertragungsraten. Falls die Allele nicht mit dem Krankheitszustand assoziiert sind, so würde man erwarten, daß die A- und C-Allele beispielsweise von einem heterozygoten Elternteil auf einen betroffenen Nachkommen in einem Verhältnis von 50:50 übertragen würden. Abweichungen von den Übertragungsraten deuten auf eine Assoziation eines Allels mit dem Krankheitszustand hin.

[0122] Für die Analyse von Abweichungen der Allelübertragungsraten wurden eine Reihe statistischer Tests vorgeschlagen. So wird beispielsweise bei Spielman et al., 1993, Am. J. Hum. Genet. 52:506-516; Ewens und Spielman, 1995, Am. J. Hum. Genet. 57:455-464; und Ewens und Spielman, 1999, Supplement 20 in Current Protocols in Human Genetics (Dracopoli et al., Hrsg., 1984 mit vierteljährlichen Aktualisierungen, John Wiley & Sons, Inc.) ein TDT-Test (Transmission Disequilibrium Test) beschrieben. Insbesondere wurden von Spielman et al., 1993, die statistischen Eigenschaften des TDT bei Anwendung auf Familien mit zwei betroffenen Nachkommen diskutiert.

[0123] Im vorliegenden Fall wurde eine Analyse bezogen auf das Verhältnis der Übertragung des A-Allels zur Übertragung des C-Alles durchgeführt. Dieses Verhältnis, A/C stellt ein Maß für das relative Risiko dar, obwohl es durch die Ermittlung betroffener Paare mit nicht betroffenen Eltern etwas verzerrt wird. Zur Beurteilung der Signifikanz wurde eine Bootstrap-Analyse eingesetzt. Die Verwendung des Übertragungsverhältnisses ist dabei gleichbedeutend einer Analyse bezogen auf den Anteil von A-Übertragungen, da eine Eins-zu-eins-Entsprechung zwischen A/C und A/(A + C) vorliegt.

[0124] Im ersten Fall wurden die relativen Risiken für Untergruppen berechnet, die über den Krankheitsstatus der Nachkommen, den HLA-Genotyp der Nachkommen sowie den mütterlichen/väterlichen Ursprung des übertragenen Allels definiert sind. Die in der nachfolgenden Tabelle verwendeten Abkürzungen bedeuten: af = betroffene Nachkommen; un = nicht betroffene Nachkommen, 34 = DR3, DR4-Genotyp der Nachkommen; n34 = nicht-DR3/DR4-Genotyp der Nachkommen; m = mütterlicher Ursprung; und p = väterlicher Ursprung

Aus TDT berechnetes relatives Risiko (RR)

Gruppe	N	RR	Konfidenzintervalle			p-Wert
			80%	90%	95%	
af, 34, m	52	0,76	0,53, 1,08	0,46, 1,17	0,42, 1,28	0,38
af, 34, p	52	1,54	1,19, 2,04	1,10, 2,20	1,04, 2,45	0,05
af, n34, m	90	1,17	0,87, 1,54	0,81, 1,71	0,77, 1,94	0,46
af, n34, p	59	1,74	1,26, 2,55	1,15, 2,83	1,07, 3,11	0,02
un, 34, m	11	1,00	0,50, 2,20	0,40, 3,00	0,33, 4,00	1,00
un, 34, p	8	1,29	0,50, 5,00	0,33, 9,00	0,25, ∞	0,87
un, n34, m	58	1,64	1,12, 2,42	1,00, 2,70	0,93, 3,14	0,11
un, n34, p	22	1,20	0,74, 1,94	0,67, 2,27	0,60, 2,54	0,76

[0125] Die einzigen eindeutig signifikanten Ergebnisse gibt es bei Vätern betroffener DR3/DR4s und nicht-DR3/DR4s. Das Ergebnis für die Mütter nicht betroffener nicht-DR3/DR4s ist leicht suggestiv.

[0126] Die relativen Risiken wurden ebenso bezogen auf Untergruppen berechnet, die durch Kombinationen der obigen Kategorien, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, definiert sind.

Gruppe	N	RR	Konfidenzintervalle			p-Wert
			80%	90%	95%	
af, 34	104	1,08	0,86, 1,35	0,81, 1,44	0,75, 1,54	0,76
af, n34	149	1,37	1,10, 1,71	1,03, 1,85	1,00, 1,96	0,08
un, 34	19	1,11	0,64, 2,17	0,53, 2,75	0,43, 3,50	0,96
un, n34	80	1,50	1,08, 2,09	1,00, 2,29	0,92, 2,45	0,11
af, m	142	1,00	0,81, 1,24	0,77, 1,31	0,74, 1,39	1,00
af, p	111	1,64	1,34, 2,08	1,26, 2,24	1,22, 2,37	< 0,001
un, m	69	1,51	1,07, 2,14	0,97, 2,37	0,88, 2,64	0,15
un, p	30	1,22	0,80, 1,89	0,71, 2,16	0,63, 2,43	0,64
34, m	63	0,80	0,58, 1,08	0,52, 1,16	0,48, 1,25	0,40
n34, m	60	1,33	1,02, 1,73	0,95, 1,91	0,90, 2,10	0,18

34, p	148	1,50	1,13, 2,03	1,00, 2,23	0,94, 2,37	0,11
n34, p	81	1,57	,19, 2,16	1,09, 2,35	1,00, 2,56	0,06
af	253	1,24	1,06, 1,46	1,02, 1,52	0,98, 1,59	0,08
un	99	1,41	1,06, 1,87	0,98, 2,06	0,91, 2,21	0,13
34	123	1,08	0,87, 1,36	0,81, 1,46	0,75, 1,53	0,66
n34	229	1,41	1,15, 1,72	1,10, 1,87	1,04, 2,00	0,03
m	211	1,14	0,95, 1,38	0,89, 1,45	0,85, 1,54	0,40
P	141	1,54	1,27, 1,89	1,20, 2,05	1,12, 2,15	0,005
Gesamt	352	1,29	1,12, 1,49	1,07, 1,57	1,03, 1,62	0,03

[0127] Die erhöhte Übertragung des A-Allels von den Vätern auf betroffene Nachkommen ist hochsignifikant. Ebenso liegt eine geringfügige Signifikanz für andere Gruppen vor, zu denen einige der Väter von betroffenen gehören. Für die Väter von betroffenen wird das relative Risiko auf 1,64 geschätzt. Dies repräsentiert das Risiko, ein Teil eines Paars betroffener Geschwister zu sein. Zu beachten ist hier ebenso, daß die Zahlenwerte die zusätzlich betroffenen Kinder einschließen.

[0128] Die Übertragung unter den Betroffenen unter den nicht-DR3/DR4 ist sowie von den Vätern liegen alle im Bereich von etwas bis sehr signifikant. Das am stärksten signifikante Ergebnis weist die Übertragung von Vätern auf. Es scheint, daß die erhöhte Übertragung auf die Väter von betroffenen beschränkt ist. Die leichte Erhöhung von auf die nicht betroffenen übertragenem A könnte zufallsbedingt sein.

Trennung des Risikos

[0129] Die folgende Analyse wurde durchgeführt, um die Effekte der Verknüpfung und die Effekte der Assoziation zu trennen, um zu bestimmen, ob der TCF-1-Locus in kausaler Beziehung zum Typ-1-Diabetes steht oder im Verknüpfungsungleichgewicht mit einem bestimmten anderen kausal zusammenhängenden Locus steht. Die Analyse beruht auf den 51 heterozygoten Vätern und den entsprechenden betroffenen Geschwisterpaaren. Zusätzlich betroffene Nachkommen wurden nicht miteinbezogen.

[0130] Man lasse AA, AC, bzw. CC die Häufigkeiten repräsentieren, mit denen die heterozygoten Väter ein A-Allel auf beide Geschwister, ein A-Allel auf eines der Geschwister und ein C-Allel auf das andere der Geschwister bzw. ein C-Allel auf beide Geschwister überträgt. Falls kein genetischer Effekt vorliegt, betragen die erwarteten Übertragungshäufigkeiten 0,25 AA, 0,5 AC, bzw. 0,25 CC. Die beobachteten Übertragungshäufigkeiten betrugen 19,25 AA, 25 AC bzw. 6,75 CC. Die beobachteten Zahlenwerte sind nicht in allen Fällen ganze Zahlen, da dort, wo der väterliche Genotyp keine eindeutige Bestimmung davon, welcher Elternteil welches Allel übertrug, gestattete, eine dezimale Übertragungshäufigkeit bezogen auf die Wahrscheinlichkeit des Ereignisses zugeordnet wurde. Beispielsweise würde eine Familie, in der beide Geschwister ein A-Allel vom Vater erhielten oder mit gleicher Wahrscheinlichkeit eines der Geschwister ein A-Allel vom Vater und eines von

der Mutter erhielt, einen Wert von 0,5 zur berechneten Häufigkeit, mit der die heterozygoten Väter ein A-Allel auf beide Geschwister übertragen, AA, beitragen.

[0131] Man betrachte die folgenden Verhältnisse, die einen genetischen Effekt messen:

$$\text{AA/CC, AC/CC, AC/AA, } \frac{(\text{AA} \cdot \text{CC})}{(\text{AC} \cdot \text{AC})}, \text{ und } \frac{(\text{AA} + \text{CC})}{\text{AC}}$$

[0132] AA/CC ist ein Maß für das relative Risiko des A-Allels, gleichgültig ob es durch den TCF-1-Locus oder einen Locus im Verknüpfungsungleichgewicht mit TCF-1 verursacht wurde. AC/CC ist ein Maß für das relative Risiko mit Geschwistern mit A-Allelen, die keine Allele mit ihrem betroffenen Bruder bzw. ihrer betroffenen Schwester teilen, im Vergleich mit Geschwistern mit C-Allelen, bei denen dies der Fall ist. (AA·CC)/AC² ist ein Maß für das relative Risiko aufgrund von Verknüpfung, sobald das TCF-1-Allel bekannt ist. Diese letzteren beiden Verhältnisse liefern Erkenntnisse darüber, ob TCF-1 den kausalen Locus darstellt. (AA + CC)/AC ist ein Maß für das relative Risiko für Geschwister mit Allelen, die durch Abstammung identisch sind (Identical By Descent, IBD), im Vergleich mit nicht-IBD.

[0133] Man lasse p für das mit Allel A assoziierte Risiko und r für das mit Allel C assoziierte Risiko stehen. Diese Risiken können ihre Ursache im Allel selbst oder in einem Verknüpfungsungleichgewicht mit einem ursächlichen Allel an einem verknüpften Locus haben. Man lasse s für das zusätzliche Risiko für das Geschwisterpaar aufgrund ihrer gemeinsamen Allele an TCF-1, da der TCF-1-Genotyp bereits bekannt ist, stehen. Man lasse t für das zusätzliche Risiko für die Paare, die keine gemeinsamen Allele haben, stehen. Bei gegebenen übertragenen Allelen beträgt das Risiko für die AA-Paare p^2s , für die AA-Paare prt und für die CC-Paare r^2s .

[0134] Mehrere Verhältnisse, die in der nachfolgenden Tabelle dargestellt sind und die einen genetischen Effekt messen, wurden zum Testen der relativen Werte verschiedener Risiken verwendet. Die erwarteten Werte für die Verhältnisse, die ebenfalls in der nachfolgenden Tabelle angegeben sind, lassen sich im Sinne der obigen Werte für die Risiken für AA-Paare, AC-Paare und CC-Paare berechnen. Grenzwerte für die Ergebnisse dieser Statistiken lassen sich unter verschiedenen Hypothesen, die in der nachfolgenden Tabelle dargestellt sind, vorhersagen. Die Grenzwerte für dieser Statistiken in den Fällen, in denen sie vorhersagbar sind, sind in der anschließenden Tabelle dargestellt.

Hypothese	Annahmen
Null	Kein genetischer Effekt
A	Nur TCF-1 steht in kausaler Beziehung (unter der Annahme, daß A mit einem höheren Risiko assoziiert ist).
B	TCF-1 steht in keiner kausalen Beziehung. TCF-1 ist mit einem anderen kausal zusammenhängenden Locus verknüpft, jedoch ohne Verknüpfungsungleichgewicht
C	TCF-1 steht in keiner kausalen Beziehung. TCF-1 ist mit einem anderen kausal zusammenhängenden Locus verknüpft und im Verknüpfungsungleichgewicht (unter der Annahme das A mit einem höheren Risiko assoziiert ist).
D	TCF-1 steht in kausaler Beziehung. TCF-1 ist mit einem anderen kausal zusammenhängenden Locus verknüpft, jedoch ohne Verknüpfungsungleichgewicht
E	TCF-1 steht in kausaler Beziehung. TCF-1 ist mit einem anderen kausal zusammenhängenden Locus verknüpft und im Verknüpfungsungleichgewicht.

Vorhergesagte Ergebnisse

Hypothese	AA/CC	AC/CC	AC/AA	$\frac{(AA \cdot CC)}{(AC \cdot AC)}$	$\frac{(AA+CC)}{AC}$
Erwartet	P^2/r^2	2pt/rs	2rt/ps	$S^2/4t^2$	$(p^2s+r^2t)/2prt$
Null	1	2	2	1/4	1
A	>1	>2	<2	1/4	>1
B	1	<2	<2	>1/4	>1
C	>1	?	?	>1/4	>1
D	>1	?	?	>1/4	>1
E	?	?	?	?	>1

[0135] Dort, wo zwei kausale Loci vorliegen (Hypothese D und E), hängt die Richtung der Alternative von den reaktiven Risiken der beiden Loci, dem Grad der Verknüpfung sowie dem Grad und der Richtung eines Verknüpfungsungleichgewichts zwischen den Loci ab. Im nachfolgenden sind die aus den TCF-1-Daten berechneten Ergebnisse aufgeführt.

Trennung des Risikos für betroffene Geschwisterpaare von heterozygoten Vätern

	N=51	Konfidenzintervalle			p-Wert
		80%	90%	95%	
AA/CC	2,85	1,81, 5,25	1,57, 6,20	1,39, 8,00	0,01
AC/CC	3,70	2,37, 6,82	2,05, 8,35	1,81, 10,36	0,10
AC/AA	1,30	0,92, 1,82	0,84, 2,06	0,78, 2,24	0,13
$(AA \cdot CC)$	0,21	0,09, 0,40	0,75, 0,49	0,06, 0,59	0,61
$(AC \cdot AC)$					
$(AA+CC)$	1,04	0,75, 1,43	0,68, 1,58	0,64, 1,70	0,99
AC					

[0136] AA/CC ist höher als unter der Null-Hypothese erwartet, was eine definitive Assoziation des Risikos mit dem A-Allel zeigt, gleichgültig ob dies über den TCF-1-Locus oder einen Locus im Verknüpfungsungleichgewicht mit TCF-1 geschieht. AC/CC ist höher als unter der Null-Hypothese erwartet, was zeigt, daß Geschwister mit A-Allelen, die mit ihrem betroffenen Bruder bzw. ihrer betroffenen Schwester keine gemeinsamen Allele besitzen, einem größeren Risiko ausgesetzt sind, als Geschwister mit C-Allelen, bei denen dies der Fall ist. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei TCF-1 tatsächlich um einen ursächlichen Locus handelt. AC/AA ist niedriger als unter der Null-Hypothese erwartet, was den vorhergehenden Ergebnissen entspricht, die zeigen, daß ein IBD (Identical By Descent) A einem größeren Risiko ausgesetzt ist, als ein Nicht-IBD-C.

[0137] $(AA \cdot CC)/AC^2$ liegt geringfügig unterhalb seines erwarteten Werts unter der Null-Hypothese, was zeigt, daß kein zusätzliches Risiko aufgrund einer Verknüpfung besteht, sobald das TCF-1-Allel bekannt ist. Diese Ergebnisse stimmen damit überein, daß kein anderer verknüpfter ursächlicher Locus, und zwar weder zusätzlich zu noch an Stelle von TCF-1 vorliegt. $(AA + CC)/AC$, mißt das Risiko von IBD-Status vs. Nicht-IBD-Status. Es liegt etwas höher als unter der Null-Hypothese erwartet, stimmt jedoch mit dieser überein.

[0138] Die Werte für $(AA + CC)/AC$ und AA/CC können gelöst werden, um Schätzwerte für das relative Risiko von A zu C, bei dem es sich um den Wert p/r handelt zu finden. Man lasse S für den Wert der Statistik $(AA + CC)/AC$ stehen. Dann beträgt der Schätzwert für p/r ($S \pm \sqrt{S^2 - 1}$)r. Man lasse T für den beobachteten Wert für AA/CC stehen. Dann ist ein weiterer Schätzwert für p/r gleich \sqrt{T} .

[0139] Der auf S bezogene Schätzwert für das relative Risiko des A-Allel zum C-Allel beträgt 1,33; der auf T bezogenen Schätzwert beträgt 1,69. Beide Schätzwerte lassen auf ein mäßig erhöhtes Risiko in Assoziation mit dem A-Allel schließen. Das obere Ende der von S abgeleiteten 80, 90 und 95%-Konfidenzintervalle für p/r beträgt 2,45, 2,80 bzw. 3,70. Die unteren Enden können nicht ausgewertet werden, doch umfassen die Intervalle den Wert 1. Auf T bezogenen Konfidenzintervalle für p/r lassen sich finden, indem man die Quadratwurzel der in der Tabelle für AA/CC angegebenen Intervalle zieht. Die oberen Enden stimmen ziemlich gut mit den auf S bezogenen Intervallen überein, doch umfassen die unteren Enden nicht den Null-Wert 1. Die Konfidenzintervalle umfassen die Möglichkeit, jedoch nicht die Wahrscheinlichkeit, daß das relative Risiko fast gleich 3 sein könnte.

Schlußfolgerungen

[0140] Auf Grund der obigen Analyse wurden die folgenden Schlußfolgerungen gezogen.

1. Verteilung von TCF-1 in der allgemeinen Population.

- (a) Es gibt keine Hinweise auf ein Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht am TCF-1-Locus.
- (b) Es gibt keine Hinweise auf eine Assoziation zwischen TCF-1 und den serologischen Gruppen DRB1 03,04 und X.
- (c) Frauen scheinen das Allel A häufiger zu tragen als Männer.

2. Mit TCF-1 assoziiertes Risiko eines Typ-1-Diabetes

- (a) Insgesamt übertragen heterozygote Eltern das Allel A auf ihre betroffenen Kinder häufiger als das Allel C, was auf eine Assoziation des A-Alles mit dem Krankheitszustand hindeutet.
- (b) Die erhöhte Übertragung des A-Alles auf die nicht betroffenen Geschwister betroffener Kinder ist statistisch nicht signifikant und höchstwahrscheinlich zufallsbedingt.
- (c) Heterozygote Männer übertragen das Allel A auf ihre betroffenen Kinder häufiger als das Allel C, wahrscheinlich ohne Bezug auf den DRB1 3/4-Status des Kinds, was eine Assoziation eines A-Alles elterlichen Ursprungs mit dem Krankheitszustand andeutet.
- (d) Heterozygote Frauen übertragen beide Allele mit gleichen Raten auf ihre betroffenen Kinder.
- (e) Auf der Grundlage begrenzter Hinweise übertragen die heterozygoten Väter und Mütter betroffener Kinder beide Allele mit gleichen Raten auf ihre nicht betroffenen Nachkommen.

3. Risiko von TCF-1 vs. Risiko von anderen benachbarten Loci

- (a) Heterozygote Väter übertragen das Allel A auf beide Mitglieder des betroffenen Geschwisterpaars häufiger als das Allel C, womit ein erhöhtes Risiko in Assoziation mit dem Allel A bestätigt wird.
- (b) Heterozygote Väter eines betroffenen Geschwisterpaars übertragen beide Allele, d.h. ein A und ein C, mehr als doppelt so häufig wie sie zwei Kopien des Allels C übertragen, was häufiger als durch Zufall bedingt ist. Dies läßt darauf schließen, daß ein höheres Risiko durch das Erhalten des Allels A als durch das Erhalten des gleichen Allels wie ihr betroffener Bruder bzw. ihre betroffene Schwester besteht, was TCF-1 als den risikoinduzierenden Locus begünstigt.
- (c) Heterozygote Väter eines betroffenen Geschwisterpaars übertragen beide Allele weniger als halb so häufig wie sie zwei Kopien des Allels A übertragen, was weniger häufig als durch Zufall bedingt ist und mit den Ergebnissen 3.a und 3.b übereinstimmt.
- (d) Es gibt kein zusätzliches Risiko aufgrund der Identität durch Abstammung mit einem betroffenen Bruder bzw. einer betroffenen Schwester außer dem, das durch das Allel A beigetragen wird, was damit übereinstimmt, daß keine anderen mit einem Risiko verbundenen und mit TCF verknüpften Loci vorliegen.
- (e) Das relative Risiko durch das Erhalten eines A-Alles anstatt eines C-Alles von seinem Vater wurde mit zwei unterschiedlichen Messungen auf einen Wert von 1,33 bzw. 1,69 geschätzt. Genau gesagt handelt es sich bei dem gemessenen Risiko um das Risiko, an Typ-1-Diabetes zu erkranken und gleichzeitig einen Bruder bzw. eine Schwester mit Typ-1-Diabetes zu haben. Konfidenzintervalle lassen darauf schließen, daß die Daten mit Werten für ein relatives Risiko im Bereich von 1,2 bis fast 3 kompatibel sind.

[0141] Insgesamt stimmen die Daten am besten mit einem mäßig erhöhten Risiko eines Typ-1-Diabetes für Kinder, die ein TCF-1-A-Allel von ihren Vätern erhalten, überein. Dieses erhöhte Risiko ist wahrscheinlich nicht vom DRB1-3/4-Status abhängig. Es scheint kein zusätzliches Risiko vorzuliegen, wenn man das A-Allel von seiner Mutter erhält. Die Daten deuten darauf hin, daß es keine weiteren mit einem Risiko verbundenen und mit TCF-1 verknüpften Loci gibt. Frauen scheinen in der allgemeinen Population eine größere Häufigkeit des

TCF-1-A-Allels aufzuweisen als Männer.

[0142] Alle Proben wurden anschließend nochmals unter Verwendung der in Beispiel 2 beschriebenen Umkehr-Line-Blot-Verfahren typisiert. Mit der Ausnahme einer Probe ergaben beide Vorschriften übereinstimmende Genotypen. Es wird vermutet, daß die eine Ergebnisdiskrepanz von einer Probenvertauschung statt einem tatsächlichen Typisierungsfehler herrührte. Während dieser weiteren Analyse wurde festgestellt, daß eine geringe Anzahl der ursprünglichen bestimmten Genotypen, obwohl diese korrekt waren, in einer Computerdatenbank nicht korrekt aufgenommen wurden. Die oben beschriebene statistische Analyse wurde unter Verwendung der Daten wie sie eingegeben wurden durchgeführt. Dabei ist ersichtlich, daß so wenige Dateneintragsfehler vorlagen, daß die statistischen Schlußfolgerungen gültig bleiben.

Beispiel 6

Assoziation mit Typ-1-Diabetes in mexikanisch-amerikanischen Familien

(Vorläufige Ergebnisse)

[0143] Dreiundsechzig mexikanisch-amerikanische Familien, in denen ein von Typ-1-Diabetes betroffener Nachkomme vorkommt, wurden im wesentlichen wie im vorhergehenden Beispiel beschrieben analysiert. Alle TCF-1-Genotypisierungen wurden unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen, auf allel spezifische Amplifikation beruhenden Genotypisierungsverfahren durchgeführt. Da die Stichprobengröße deutlich geringer ist, müssen diese Ergebnisse als vorläufig angesehen werden.

Elterliche Genotypen

Genotypen der Eltern	Anzahl Familien
AA, CC	1
AC, AC	1
AC, CC	21
CC, CC	40
AA, AC	0
AA, AA	0

TCF-1-Allelhäufigkeiten in Eltern

Allel	Anzahl	Häufigkeit
A	25	0,099
C	227	0,900

[0144] Die Übertragungsraten wurden von den Genotypen von 21 betroffenen Nachkommen von AC,CC-Eltern bestimmt. Die erwarteten und beobachteten Genotypen sind zusammen mit den berechneten Übertragungsraten nachfolgend dargestellt. Die Häufigkeit des AC-Genotyps liefert die Übertragungsrate für das A-Allel und die Häufigkeit des CC-Genotyps die Übertragungsrate für das C-Allel.

Genotyp	Erwartet	Beobachtet	Häufigkeit
AC	11,5	7	33,3%
CC	11,5	14	66,7%

[0145] Die obigen Ergebnisse sind zwar statistisch nicht signifikant, können jedoch eine Tendenz vermuten lassen, die der in der im vorhergehenden Beispiel dargestellten größeren Studie beobachteten Tendenz entgegengesetzt ist. Es besteht die Möglichkeit, daß dadurch ein Unterschied in den untersuchten Populationen widergespiegelt wird. Allerdings ist es aufgrund der geringen Anzahl an genotypisierten betroffenen Geschwistern (insgesamt 21) eher wahrscheinlich, daß es sich bei den Ergebnissen um einen statistischen Artefakt han-

delt.

[0146] Die Ergebnisse im vorhergehenden Beispiel deuten darauf hin, daß der Effekt des TCF-1-Genotyps gering ist und zur eindeutigen Bestimmung des Effekts möglicherweise große Untersuchungspopulationen erforderlich sind. Weiterhin kann der Effekt durch die signifikanteren Effekte des HLA-Genotyps maskiert werden. Die vorliegende Studie war nicht groß genug, um eine Stratifikation durch den HLA-Genotyp zu gestatten, wie sie im vorhergehenden Beispiel durchgeführt wurde. Man würde erwarten, daß die Verifizierung der vorgeschlagenen Tendenz eine deutlich größere Untersuchungspopulation erfordert.

Beispiel 7

Assoziation mit multipler Sklerose

[0147] Eine TCF-1-Genotypisierung wurde an Individuen aus zwei Gruppen von Familien durchgeführt, die ermittelt wurden, da in ihnen ein einziger, von multipler Sklerose (MS) betroffener Nachkomme vorkam. Die erste Gruppe bestand aus 180 Familien vorwiegend Kaukasier, enthielt aber auch Familien anderer Ethnie. Die zweite Gruppe bestand aus 74 spanischen Familien. Die TCF-1-Genotypisierung des betroffenen Kindes und der beiden nicht betroffenen Eltern wurde unter Verwendung der in Beispiel 2 beschriebenen Genotypisierungsverfahren auf Sondenbasis durchgeführt. Die Verteilung der elterlichen Genotypen und die Häufigkeiten des A-Allels, $f(A)$, sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Gentypen der Eltern	Gruppe 1 (N = 180)	Gruppe 2 (N = 74)
CC, CC	111	47
CC, AC	50	20
CC, AA	5	3
AC, AC	11	4
Ac, AA	3	0
	$f(A) = 0,1264$	$f(A) = 0,1148$

TCF-1-Allel-Übertragung: Gruppe 1

[0148] Die Allelübertragungsraten wurden unter Berücksichtigung lediglich der Informationen liefernden Familien, d.h. der Familien, in denen wenigstens ein heterozygoter Elternteil vorkommt, analysiert. Innerhalb der Gruppe 1 enthalten 53 Familien jeweils einen heterozygoten und einen homozygoten Elternteil. Bei diesen Familien wurden die Anzahl an übertragenen A-Allelen von den 53 vom heterozygoten Elternteil übertragenen informativen Allelen gezählt; die von den homozygoten Eltern übertragenen 53 Allele lieferten keine Information und wurden nicht berücksichtigt. In 11 Familien sind beide Elternteile heterozygot. Bei diesen Familien wurde die Anzahl an A-Allelen von den 22 von beiden Eltern auf die 11 Nachkommen übertragenen Allelen gezählt. In beiden Fällen würden unter der Null-Hypothese (kein genetischer Effekt) die A- und C-Allele mit gleicher Wahrscheinlichkeit übertragen werden, was ein erwartetes Verhältnis von 50:50 ergibt. Abweichungen bei den Übertragungsraten deuten auf eine Assoziation eines Allels mit dem Krankheitszustand an. Die Signifikanz der Abweichungen wurden unter Verwendung eines Chi-Quadrat-Tests analysiert. Darüber hinaus lässt sich eine genaue Wahrscheinlichkeit bestimmen, da unter der Null-Hypothese Allelübertragungen mit einer Wahrscheinlichkeit der Übertragung eines A-Alles von 0,5 binomial verteilt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Abweichung der Übertragungsraten, die mindestens so groß ist, wie die beobachtete, Wahrscheinlichkeit $\{ |X - \mu| \geq |f(A) - \mu| \}$, mit $f(A)$ gleich der beobachteten Häufigkeit von A-Übertragungen und μ gleich dem erwarteten Wert für $f(A)$, wurde berechnet, was einem zweiseitigen Standardtest der Null-Hypothese entspricht.

[0149] Die Allelübertragungsdaten von den 64 informativen Familien von den 180 Familien der Gruppe 1 sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Allelübertragungen, Gruppe 1

Elterliche Genotypen	Anzahl Allelübertragungen	Übertragenes Allel	
		A	C
50 CC, AC	50	31	19
11 AC, AC	22	14	8
3AC, AA	3	2	1

[0150] Von insgesamt 75 Allelübertragungssereignissen wurde das A-Allel 47mal und das C-Allel 28mal übertragen. Die erwarteten Werte für Allelübertragungen unter der Null-Hypothese betrugen 37,5 für jedes Allel. Ein Chi-Quadrat-Test der Signifikanz ergab einen P-Wert von 0,028. Die direkt aus einer binomialen Verteilung erhaltene Wahrscheinlichkeit der Beobachtung einer Abweichung der Übertragungsraten, die mindestens so groß wie die beobachteten ist, ergab einen zweiseitigen P-Wert von 0,037. Die Ergebnisse deuten an, daß eine erhöhte Übertragung von A-Allelen auf betroffene Nachkommen statistisch signifikant ist.

Assoziation mit dem HLA-Genotyp

[0151] Es ist bekannt, daß der HLA-Haplotyp DRB1*1501-DQB1*0602 („DR15“) mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber MS assoziiert ist (siehe z.B. Oksenberg et al., 1993, JAMA 270:2362-2369). Um zu bestimmen, ob die Allele an diesen beiden Loci, nämlich TCF-1 und HLA, zur Festlegung der MS-Suszeptibilität Wechselwirken, wurden die HLA-Genotypen bestimmt und die Daten auf der Grundlage des HLA-Genotyps der Nachkommen stratifiziert. Von den 64 Nachkommen in den informativen Familien waren 33 DR15 und 31 nicht DR15.

[0152] Die Allelübertragungsdaten von den 33 informativen Familien, bei denen die Nachkommen den DR15-Genotyp aufwiesen, ausgewählt aus den Familien der Gruppe 1, sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Allelübertragungen auf DR15-Nachkommen

Elterliche Genotypen	Anzahl der Allelübertragungen	übertragene Allele	
		A	C
24 CC, AC	24	14	10
7 AC, AC	14	9	5
2 AC, AA	2	2	0

[0153] Von den 40 auf DR15-Nachkommen übertragenen Allelen waren 25 A-Allele und 15 C-Allele. Unter der Null-Hypothese (kein genetischer Effekt) würden jeweils 20 Übertragungen erwartet.

[0154] Die Allelübertragungsdaten von den 31 informativen Familien, bei denen die Nachkommen den DR15-Genotyp nicht aufwiesen, ausgewählt aus den Familien der Gruppe 1, sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Allelübertragungen auf nicht-DR15-Nachkommen

Elterliche Genotypen	Anzahl der Allelübertragungen	übertragene Allele	
		A	C
26 CC, AC	26	17	9
4 AC, AC	8	5	3
1 AC, AA	1	0	1

[0155] Von den 35 auf nicht-DR15-Nachkommen übertragenen Allelen waren 22 A-Allele und 13 C-Allele. Unter der Null-Hypothese (kein genetischer Effekt) würden jeweils 17,5 Übertragungen erwartet.

[0156] Im allgemeinen sind die Zufallsvariablen W und Z unabhängig, falls die durch den Wert für Z bedingte Wahrscheinlichkeit von W gleich der Wahrscheinlichkeit von W (nichtbedingt) ist. Bei Verwendung der beobachteten Häufigkeiten als Schätzwerte für Wahrscheinlichkeiten ist es offensichtlich, daß der Effekt des A-Allels und der DR15-Genotyp unabhängig sind. Insbesondere ist die bedingte Häufigkeit der Übertragung des A-Allels bei gegebenen DR15-Nachkommen ($25/40 = 0,625$) praktisch mit der nichtbedingten Häufigkeit der Übertragung des A-Allels ($47/75 = 0,627$) identisch. In ähnlicher Weise ist die bedingte Häufigkeit der Übertragung bei gegebenen nicht-DR15-Nachkommen ($22/35 = 0,629$) praktisch mit der nichtbedingten Häufigkeit der Übertragung identisch.

[0157] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Effekte der TCF-1- und DR15-Genotypen unabhängig sind. Diese Schlußfolgerung wird durch einen Chi-Quadrat-Signifikanztest auf die Unabhängigkeit der TCF-1- und DR15-Genotypen, der einen P-Wert von 0,97 ergibt (siehe 2×2 -Tabellen, unten), gestützt.

Test der Unabhängigkeit von TCF-1 und DR15

Beobachtet	A	C
DR15	25	15
nicht-DR15	22	13

Erwartet	A	C
DR15	25,07	14,93
nicht-DR15	21,93	13,07

TCF-1-Allelübertragung: Gruppen 1 und 2

[0158] Die Gruppe 2 besteht aus 74 informativen MS-simplex-Familien spanischen Ursprungs. Diese Familien wurden lediglich auf TCF-1 typisiert. Die Allelübertragungsdaten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Allelübertragungen, Gruppe 2

Elterliche Genotypen	Anzahl der Allelübertragungen	übertragene Allele	
		A	C
20 CC, AC	20	12	8
4 AC, AC	8	4	4
0 AC, AA			

[0159] Aufgrund der kleinen Zahlenwerte wurden die Daten mit den Daten der Gruppe 1 kombiniert und die Allelübertragungsraten wie oben beschrieben analysiert. Insgesamt wurden 103 Allelübertragungen beobachtet, und zwar 28 aus Familien der Gruppe 2 und 75 aus Familien der Gruppe 1. Unter der Null-Hypothese wäre die erwartete Anzahl der übertragenen A- bzw. C-Allele jeweils 51,5. Dagegen wurden 63 A-Allele und 40 C-Allele übertragen. Ein Chi-Quadrat-Signifikanztest ergab einen P-Wert von 0,023. Die Wahrscheinlichkeit der Beobachtung einer Abweichung der Übertragungsraten, die mindestens so groß wie die beobachtete ist, wurde aus einer binomialen Verteilung berechnet und ergab einen zweiseitigen P-Wert von 0,030. Die Ergebnisse stimmen mit den nur von der Gruppe 1 erhaltenen Daten überein und weisen auf eine statistisch signifikante Assoziation des A-Allels mit MS hin.

Beispiel 8

Assoziation mit Asthma und Atopie

[0160] In diesem Beispiel werden die Ergebnisse einer Untersuchung der Assoziation zwischen dem TCF-1-Genotyp und Asthma sowie Atopie beschrieben.

[0161] Bei Asthma handelt es sich um eine Entzündung der Atemwege der Lunge, die typischerweise vom Arzt diagnostiziert wird. Mit Asthma ist eine nichtspezifische bronchiale Überreaktionsfähigkeit assoziiert. Die bronchiale Reaktionsfähigkeit wird typischerweise über die dosisabhängige Reaktion des Luftstroms auf ein Bronchien verengendes Mittel, wie z.B. Methacholin, gemessen.

[0162] Atopie (häufig synonym als Allergie bezeichnet) wird durch die Immunreaktion gegenüber Allergenen verursacht und über die Intensität der IgE-Antwort auf ein Allergen verkörpert. Die Atopie wird typischerweise klinisch mit Haut-Prick-Tests erkannt, wobei das Vorhandensein von allergenspezifischem IgE über das Vorhandensein von allergenspezifischem IgE im Serum, über erhöhtes Gesamtserum-IgE oder über das Vorhandensein von Eosinophilen im Blut angezeigt wird.

[0163] Zwar wird Asthma häufig mit Atopie in Zusammenhang gebracht, doch ist es wenig wahrscheinlich, daß es sich bei Asthma um eine einzelne Erkrankung handelt. Die meisten asthmatischen Kinder sind auch atopisch. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei im Erwachsenenalter erworbenem Asthma um eine schlecht definierte Krankheit, die häufig nicht mit Atopie assoziiert ist. Weiterhin unterscheiden sich atopische Individuen hinsichtlich der Allergene, auf die sie reagieren, wobei Asthma und bronchiale Überreaktionsfähigkeit mit einer Allergie gegenüber dem Antigen von Hausstaubmilben, jedoch nicht mit Graspollen assoziiert sind.

[0164] Es ist bekannt, daß Asthma und Atopie eine genetische Grundlage besitzen und wahrscheinlich von einigen wenigen Genen mit mäßigen Effekten beeinflußt werden. Krankheiten wie Asthma sind wahrscheinlich auf allelische Varianten in Genen zurückzuführen, die die Genfunktion auf subtile Weise ändern, statt sie zu eliminieren. Allerdings muß die genetische Grundlage noch aufgeklärt werden.

Versuchspersonen

[0165] Zwei Listen von Familien wurden untersucht. Liste A bestand aus 447 britischen Individuen aus 66 Kern- und 5 erweiterten Stammbäumen, die über Familienmitglieder mit Asthma oder Rhinitis ermittelt wurden. Liste B bestand aus 401 australischen Versuchspersonen aus 88 Kernfamilien, die jeweils 2 oder mehr aus einer Zufallspopulationsstichprobe identifizierte atopische Geschwister aufwiesen. Diese Listen sind bei Moffat et al., 1994, Lancet 343:1597-1600 beschrieben. Die Population sowie die gemessenen Merkmale sind ebenso bei Daniels et al., 1996, Nature 383(19):247-250 beschrieben.

Klinische Daten

[0166] Die analysierten Variablen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Variable	Bestimmungsmethode
Asthma	Auf der Grundlage von ATS-Standardfragebögen
Atopie	Bestimmt über einen positiven Hauttest gegenüber Allergenen und/oder positiven spezifischen Serum-IgE-Tests gegenüber gemeinen Allergenen und/oder erhöhtes Gesamt-IgE. Dies kommt einer klinischen Definition von Atopie nahe.
Keuchen	Über die dosisabhängige Reaktion auf Methacholin gemessene bronchiale Überreaktivität
lige	Gesamt-IgE-Serumspiegel (log-transformiert)
dige	Nach Alter und Geschlecht zusammenpassende Gesamt-IgE-Serumspiegel, eingeteilt in 10%-Gruppen (1 = niedrigste 10%, 2 zwischen 10% und 20%, usw.)
iger	IgE, durch Regression nach Alter und Geschlecht normiert und angepaßt
psti	Hauttest-Index: die Summe der Hauttests auf Hausstaubmilbe und Graspollen
rasti	Radioabsorptionshauttest-Index (Rast-Index): die Summe spezifischer Serum-IgE-Titer gegen Hausstaubmilbe und Graspollen
Keuchen*	Bronchiale Reaktionsfähigkeit gegenüber Methacholin
Inslope*	Bronchiale Reaktionsfähigkeit, gemessen als log-transformierte Steigung der dosisabhängigen Reaktion auf Methacholin
Ineos*	Eosinophilzahlenwerte (log-transformiert)

* nur in der australischen Population gemessen:

Die obigen Variablen sind allesamt positiv korreliert. In beiden Gruppen weisen Atopie, lige, dige, iger, psti und rasti eine starke positive Korrelation zueinander auf (lige, dige und iger sind definitionsgemäß verwandt). Die Korrelationen dieser Variablen mit Asthma und Keuchen sind weniger stark ausgeprägt. Wie oben angemerkt, handelt es sich bei Asthma um eine schlecht definierte Krankheit, die mehrere Ätiologien aufweisen kann, einschließlich einer nicht mit dem atopischen Zustand assoziierten Krankheit. Damit kann die höhere Korrelation mit Variablen, die den IgE-Spiegel messen und mit dem atopischen Zustand unmittelbarer in Verbindung stehen, erklärt werden.

Genotypisierung

[0167] Der Genotyp der Individuen wurde jeweils im wesentlichen wie in Beispiel 1 oben beschrieben bestimmt, mit der Ausnahme, daß kleinere Modifikationen der Reaktionsbedingungen vorgenommen wurden, um den Test für die Verwendung mit einem anderen Thermocycler-Gerät zu optimieren. Die Unterschiede zwischen dem in Beispiel 1 beschriebenen Test und den tatsächlich verwendeten Bedingungen könnten potentiell eine Auswirkung auf die Amplifikations- und Nachweiseffizienz haben, würden aber wahrscheinlich die qualitativen Ergebnisse des Tests nicht verändern.

Analyse

[0168] Die Daten wurden analysiert, um das Vorhandensein genetischer Effekte und nicht die Größe des Effekts nachzuweisen. Dabei würde das Fehlen eines genetischen Effekts darauf hinweisen, daß weder der TCF-1-Locus noch irgendein verknüpfter Locus eine direkte Auswirkung auf irgendeine der phänotypischen Variablen oder irgendwelche anderen Eigenschaften, die zur Ermittlung der Familie führen, haben.

[0169] TDT (Transmission Disequilibrium Test)-Verfahren wurden analog zu den oben beschriebenen Verfah-

ren für die Analyse der Assoziation von TCF-1-Allelen mit Typ-1-Diabetes verwendet. Alle informativen Allelübertragungen von einem heterozygoten Elternteil auf ein Kind, bei denen gültige Genotypen für alle drei Mitglieder eines Kind-Eltern-Trios bereitgestellt wurden, wurden für den TDT-Test verwendet. Dabei wurde angenommen, daß, bedingt durch die Stammbaumstruktur und die Heterozygotie der Eltern, die Ergebnisse dieser informativen Übertragungen mehr oder weniger unabhängig unter der Null-Hypothese (kein genetischer Effekt) waren. Im allgemeinen schienen die Stichproben groß genug zu sein, um statistische Ergebnisse für große Stichproben zu verwenden.

[0170] Für die diskreten Variablen, nämlich Asthma, Keuchen und Atopie, wurden p-Werte aus einem genauen Proportionstest gewonnen. Bei kontinuierlichen Variablen, zu denen die verschiedenen Maßnahmen für die IgE-Antwort gehören, wurden t-Tests und Wilcoxon-Rangsummen-Tests verwendet, um die Werte der kontinuierlichen Variablen für Kinder, die eine A-Allel erhalten hatten, mit den Werten für Kinder, die ein C-Allel erhalten, zu vergleichen. Dabei wurden nur Kinder mit einem heterozygoten Elternteil berücksichtigt.

Ergebnisse

1. Britische Daten:

[0171] Die britischen Daten enthielten 47 informative Kind-Eltern-Trios in 17 Stammbäumen. Von diesen wiesen 3 zwei heterozygote Eltern auf, 28 hatten nur einen heterozygoten Vater und 16 eine heterozygote Mutter. Die Genotypverteilungen sind nachfolgend dargestellt.

Genotypverteilung (britisch)

	CC (%)	AC (%)	AA (%)	NA*	Gesamt
Männer	152 (80)	39 (20)	2 (1)	40	233
Frauen	149 (82)	31 (17)	2 (1)	32	214
gesamt	301 (80)	70 (19)	4 (1)	72	447

* NA: Genotyp nicht verfügbar

[0172] Diese Familien zeigen keine offensichtlichen Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Männern und Frauen.

Diskrete Variablen

[0173] Die nach dem Krankheitszustand kategorisierten Allelübertragungen von heterozygoten Eltern auf Kinder sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Dabei sind sowohl die Anzahl (#) als auch der Anteil (%) dargestellt. Die von den Vätern und Müttern übertragenen Allele sind getrennt aufgeführt. Bei der Kategorie „alle“ wurden Kinder als ein A-Allel erhaltend bewertet, wenn einer der beiden heterozygoten Elternteile ein A-Allel übertrug. Dies hat den Vorteil, daß jede Zählung unabhängig voneinander erfolgt, da keine zwei Zählungen das gleiche Kind repräsentieren. (Kinder mit zwei heterozygoten Eltern werden nicht doppelt gezählt.) Folglich ist die Summe der von Vätern und Müttern übertragenen Allele nicht gleich dem Zahlenwert in der "alle"-Kategorie.

Übertragungen von heterozygoten Eltern (britisch)

	Väter		Mütter		Alle	
	A	C	A	C	A	C
	#	#	#	#	#	#

	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
alle Kinder	15,5 (50)	15,5 (59)	9,5 (50)	9,5 (50)	25 (53)	22 (47)
Asthma						
Nein	5 (42)	7 (58)	3 (59)	3 (50)	8 (47)	9 (53)
Ja	10,5 (55)	8,5 (45)	4,5 (41)	6,5 (59)	15 (54)	13 (46)
	P = 0,71		P = 1		P = 0,76	
Atopie						
Nein	4 (44)	5 (56)	3 (50)	3 (50)	7 (50)	7 (50)
Ja	11,5 (52)	10,5 (48)	6,5 (50)	6,5 (50)	18 (55)	15 (45)
	P = 1		P = 1		P = 1	

[0174] Alle p-Werte sind genau. Es wurde keine signifikante Assoziation der Übertragung des A-Allels mit dem Asthma oder dem atopischen Zustand des Kindes beobachtet, gleichgültig, ob die Übertragung vom Vater, von der Mutter oder von beiden Eltern erfolgte.

Kontinuierliche Variablen

[0175] Die p-Werte vom t-Test und den Wilcoxon-Rangsummen-Tests für die kontinuierlichen Variablen sind nachfolgend dargestellt. Dabei sind die p-Werte vom Wilcoxon-Rangsummen-Test in Klammern angegeben. Bei beiden Tests wurde die Assoziation von IgE-Spiegeln mit der Übertragung eines A-Allels gegenüber eines C-Allels gemessen. In allen Fällen wurden größere Werte für die Variable mit der Übertragung des C-Allels assoziiert.

Kontinuierliche Variablen (britisch)

	Väter	Mütter	Alle
lige	0,12 (0,07)	0,22 (0,23)	0,06 (0,05)
dige	0,11 (0,10)	0,54 (0,75)	0,10 (0,10)
iger	0,13 (0,10)	0,51 (0,75)	0,12 (0,10)
psti	0,05 (0,13)	0,22 (0,19)	0,02 (0,05)
rasti	0,09 (0,21)	0,12 (0,11)	0,03 (0,06)

[0176] Die Daten lassen eine Assoziation mehrerer Variablen mit dem vom Vater übertragenen Allel im Vergleich zu dem von der Mutter übertragenen Allel vermuten. Die p-Werte für Väter sind niedriger (signifikanter) als die p-Werte für Mütter, und zwar bei allen Variablen mit Ausnahme von rasti. Interessanterweise sind die p-Werte für die „Alle“-Kategorie, obgleich noch unwesentlich, niedriger als die separaten p-Werte für Väter und für Mütter. Gäbe es einen Unterschied bei Vätern, jedoch nicht bei Müttern, würde man erwarten, daß die p-Werte für „Alle“ höher liegen als die p-Werte der Väter, da die Miteinbeziehung der Mütter den Effekt verwässern würde. Dies ist hier nicht der Fall. Allgemein deuten die Daten darauf hin, daß eine stärkere Assoziation mit dem vom Vater übertragenen Allel als dem von der Mutter übertragenen Allel vorliegen könnte.

2. Australische Daten:

[0177] Die australische Untersuchungspopulation enthielt 76 informative Trios in 88 Stammbäumen. Von diesen wiesen 9 zwei heterozygote Eltern auf, 27 hatten lediglich einen heterozygoten Vater und 40 eine heterozygote Mutter. Die Genotypverteilung ist nachfolgend dargestellt.

Genotypverteilung (australisch)

	CC (%)	AC (%)	AA (%)	NA*	Gesamt
Männer	164 (82)	31 (15)	6 (3)	7	208
Frauen	146 (77)	42 (22)	2 (1)	3	193
gesamt	310 (79)	73 (19)	8 (2)	10	401

* NA: Genotyp nicht verfügbar

Diskrete Variablen

[0178] Bei den in der australischen Population berücksichtigten kategorischen Krankheitsvariablen handelte es sich um Asthma, Keuchen und Atopie. Die Allelübertragungen von heterozygoten Eltern sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Dabei ist sowohl die Anzahl (#) als auch der Anteil (%) dargestellt. Die "Alle"-Kategorie besitzt die gleiche Bedeutung wie bei den britischen Daten oben.

Übertragungen von heterozygoten Eltern (australisch)

	Väter		Mütter		Alle	
	A	C	A	C	A	C
	# (%)	# (%)	# (%)	# (%)	# (%)	# (%)
alle Kinder	17,5 (49)	18,5 (51)	16,5 (34)	32,5 (66)	31 (41)	45 (59)
Asthma						
Nein	10 (50)	10 (50)	10 (29)	24 (71)	19 (39)	30 (61)
Ja	7,5 (50)	7,5 (50)	6,5 (46)	7,5 (54)	19 (39)	14 (34)
	P = 1		P = 0,32		P = 0,62	
Keuchen						
Nein	6,5 (41)	9,5 (59)	8,5 (31)	18,5 (69)	14 (36)	25 (64)
Ja	11 (55)	9 (45)	8 (36)	14 (64)	17 (46)	20 (54)
	P = 0,50		P = 0,76		P = 0,48	
Atopie						
Nein	1 (50)	1 (50)	1 (25)	3 (75)	2 (40)	3 (60)
Ja	15,5 (47)	17,5 (53)	14,5 (35)	26,5 (65)	27 (41)	39 (59)
	P = 1		P = 1		P = 1	

Kontinuierliche Variablen

[0179] Die p-Werte vom t-Test und den Wilcoxon-Rangsummen-Tests für die kontinuierlichen Variablen sind nachfolgend dargestellt. Dabei sind die p-Werte vom Wilcoxon-Rangsummen-Test in Klammern angegeben. Bei beiden Tests wurde die Assoziation von IgE-Spiegeln mit der Übertragung eines A-Allels gegenüber eines C-Allels gemessen. In allen Fällen wurden größere Werte für die Variable mit der Übertragung des C-Allels assoziiert.

Kontinuierliche Variablen (australisch)

	Väter	Mütter	Alle
lige	0,10 (0,05)	0,73 (0,67)	0,43 (0,34)
dige	0,10 (0,09)	0,64 (0,74)	0,43 (0,48)
iger	0,09 (0,06)	0,61 (0,65)	0,42 (0,35)
psti	0,11 (0,30)	0,09 (0,11)	0,06 (0,14)
rasti	0,28 (0,40)	0,09 (0,08)	0,09 (0,11)
Inslope	0,97 (1,00)	0,82 (0,72)	0,87 (0,82)
Ineos	0,78 (0,87)	0,53 (0,55)	0,57 (0,62)

[0180] Die Daten lassen eine Assoziation mehrerer Variablen mit dem übertragenen Allel vermuten. Die p-Werte sind geringfügig signifikant für psti und rasti, und zwar sowohl bei Müttern als auch Vätern. Für lige, dige und iger sind die p-Werte bei Vätern unwesentlich.

3. Gruppierte Daten:

Diskrete Variablen

[0181] Die Assoziation des übertragenen Allels mit Atopie wurde ferner unter Verwendung der kombinierten Daten analysiert. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

Übertragungen von heterozygoten Eltern (kombiniert)

	Väter		Mütter		Alle	
	A	C	A	C	A	C
	# (%)	# (%)	# (%)	# (%)	# (%)	# (%)
alle Kinder	33 (50)	34 (50)	26 (50)	42 (50)	56 (53)	67 (47)
Atopie						
Nein	5 (50)	6 (50)	4 (25)	6 (75)	9 (40)	10 (60)
Ja	27 (47)	28 (53)	21 (35)	33 (65)	45 (41)	54 (59)
	P = 1		P = 1		P = 1	

[0182] Wie oben angemerkt stimmen die Daten für die diskreten Variablen in den individuellen Populationen, einschließlich Atopie, mit dem Fehlen eines genetischen Effekts überein, wohingegen die Daten für die kontinuierlichen Variablen einen genetischen Effekt vermuten lassen. Die kontinuierlichen Variablen betreffen die IgE-Antwort und wurden bei der Bewertung eines Individuums als atopisch verwendet. Das Fehlen eines beobachteten genetischen Effekts, selbst bei den kombinierten Daten, kann auf die geringe Anzahl nicht atopischer Kinder heterozygoter Eltern in der Untersuchungspopulation hindeuten, statt eine tatsächliche Abwesenheit eines genetischen Effekts darzustellen. Die zur Analyse der kontinuierlichen Variablen verwendeten Verfahren sind von der geringen Anzahl von Individuen in dieser Kategorie weniger betroffen und sind daher wahrscheinlich zur Identifizierung eines genetischen Effekts besser geeignet.

Kontinuierliche Variablen

[0183] Die p-Werte vom t-Test und den Wilcoxon-Rangsummen-Tests für die kontinuierlichen Variablen von den kombinierten Daten sind nachfolgend dargestellt. Dabei sind die p-Werte vom Wilcoxon-Rangsummen-Test in Klammern angegeben. Bei beiden Tests wurde die Assoziation von IgE-Spiegeln mit der Übertragung eines A-Allels gegenüber eines C-Allels gemessen. In allen Fällen wurden größere Werte für die Variable mit der Übertragung des C-Allels assoziiert.

Kontinuierliche Variablen (kombiniert)

	Väter	Mütter	Alle
lige	0,02 (0,01)	0,14 (0,17)	0,03 (0,02)
dige	0,02 (0,01)	0,37 (0,39)	0,05 (0,04)
iger	0,02 (0,01)	0,34 (0,30)	0,06 (0,02)
psti	0,04 (0,10)	0,02 (0,03)	0,004 (0,01)
rasti	0,10 (0,13)	0,01 (0,01)	0,004 (0,01)

[0184] Die kombinierten Daten deuten darauf hin, daß es signifikante Assoziationen des TCF-1-Allels mit Variablenwerten gibt. Die Daten lassen einen signifikanten Effekt bei beiden Geschlechtern für psti und rasti vermuten. Es liegt ebenso ein signifikanter Effekt bei lige, dige und iger für das von Vätern übertragene Allel, jedoch nicht für das von Müttern übertragene Allel vor.

Schlußfolgerungen:

[0185] Die britischen Daten scheinen mit einem Fehlen genetischer Effekte, die zum Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von Asthma und Atopie beitragen, übereinzustimmen. Die Daten lassen einen genetischen Effekt auf spezifische Maßnahmen der IgE-Antwort, wie sie mit den kontinuierlichen Variablen gemessen wurden, vermuten. Die Daten lassen vermuten, daß es eine Assoziation zwischen dem von dem heterozygoten Elternteil beiderlei Geschlechts übertragenen Allel auf psti und rasti sowie zwischen dem vom heterozygoten Vater übertragenen Allel auf lige, dige und iger gibt.

[0186] Das Muster für die australischen Daten ist ähnlich wie das für die britischen Daten. Die Daten scheinen mit einem Fehlen genetischer Effekte, die zum Vorhandensein bzw. zur Abwesenheit von Asthma, Keuchen und Atopie beitragen, übereinzustimmen. Die Daten lassen auf einen genetischen Effekt auf spezifische Maßnahmen der IgE-Antwort schließen. Es scheint eine signifikante Assoziation zwischen dem vom heterozygoten Elternteil beiderlei Geschlechts übertragenen Allel auf psti und rasti sowie zwischen dem von dem heterozygoten Vater übertragenen Allel auf lige, dige und iger zu bestehen.

[0187] Die bei den individuellen Populationen beobachteten Tendenzen zeigen sich stärker anhand der kombinierten Daten. Wie bei den separaten Populationsdaten scheinen auch die kombinierten Daten mit einem Fehlen genetischer Effekte, die zum Vorhandensein bzw. zur Abwesenheit von Atopie beitragen, übereinzustimmen. Allerdings deuten die kombinierten Daten stärker darauf hin, daß es signifikante Assoziationen des übertragenen TCF-1-Allels mit den spezifischen Maßnahmen der IgE-Antwort gibt. Die kombinierten Daten zeigen eine signifikante Assoziation zwischen dem vom heterozygoten Elternteil beiderlei Geschlechts übertragenen Allel auf psti und rasti sowie zwischen dem vom heterozygoten Vater übertragenen Allel auf lige, dige und iger. Die Assoziation besteht zwischen dem C-Allel und einer gesteigerten IgE-Antwort.

[0188] Wie oben angemerkt handelt es sich bei Asthma um eine schlecht definierte Krankheit, die mehrere Ätiologien aufweisen kann, einschließlich einer Krankheit, die nicht mit dem atopischen Zustand assoziiert ist. Da TCF-1 Teil des die IgE-Produktion betreffenden Wegs ist, kann man die Hypothese aufstellen, daß sich ein eventueller Effekt des TCF-1-Allels nur in durch Th2 vermittelten Entzündungskrankheiten, wie beispielsweise atopischem Asthma, zeigen würde und daß der Alleleffekt keine Rolle bei anderen Formen von Asthma spielen würde. Die hier vorliegenden Daten, die eine Assoziation des TCF-1-Allels mit der IgE-Antwort andeuten, wenn auch kein Effekt auf Asthma mit der hier unpräzise angegebenen Bedeutung offensichtlich ist, stimmen mit dieser Hypothese überein.

[0189] Die signifikante Assoziation des TCF-1-Allels mit der IgE-Antwort deutet darauf hin, daß die Genotypisierung am TCF-1-Locus nützliche Informationen bei der Charakterisierung der Wahrscheinlichkeit von atopischem Asthma und anderen durch Th2 vermittelten Entzündungskrankheiten liefern kann. Insbesondere deuten die Daten darauf hin, daß Individuen, die ein väterliches C-Allel erhalten haben, mit größerer Wahrscheinlichkeit eine erhöhte IgE-Antwort produzieren, und gegebenenfalls, daß das Individuum einem erhöhten Risiko einer durch Th2 vermittelten Krankheit ausgesetzt ist.

[0190] Aufgrund der generell komplexen und noch weitgehend unbekannten genetischen Grundlage für Asthma und Entzündungserkrankungen wird erwartet, daß zusätzliche Loci identifiziert werden, die sich auf die Wahrscheinlichkeit einer durch Th2 vermittelten Krankheit auswirken. Dabei wird erwartet, daß der TCF-1-Ge-

notyp informativer in Kombination mit Genotypinformationen an einem oder mehreren anderen Loci, bei denen eine Assoziation mit einer durch Th2 vermittelten Krankheit bestimmt wurde, ist.

Sequenzprotokoll

<110> Roche Diagnostics GmbH
F.Hoffmann-La Roche AG

<120> TCF-1-Nukleotidsequenzvariation

<130> 5469/00/EP

<150> US 219812

<151> 2000-07-12

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2855

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggatccgggg ggtccgggg gccggcggcg gggccggcg cgaggccgag gtgagccccc 60
gccggcggcg gtcctccccc cggcggtcgcc gcccggcg ccccagtgc ggcggccct 120
cgggtctcc agacagacg tccctgcggc ggcgtggcc cggacccccc cggtccacc 180
gccccctact cccctccgggt tccctctcca ggcttcgggg cgggaacacc gtgcgcagag 240
acttcggcc gacaaatcc cagagccctt ggaggacggt gatgttcgtc cggggccgc 300
tcccttcgt cgcgtcagg ccctggctc ggtggggacgg ggacgccaag gaccgcgggg 360
agccgggtgc ctccccccacc gcagctcagg aggccgcaga acccagggggt ggagagtggg 420
ggcgngctt cccggggcgc gccgggtcga gtcacttcgg gtgccttcgac ctttataagga 480
gtaaacagac ccccgccatc cccgcctccc ctcttcggca ggtgactgac taatccggc 540
ccttcaggag acagaattgg ccaagggttc ttgggtggag ggtgggggggt gggaggtcaa 600
gtaggggcca ctcggggag gcgtccctc caggcccttc cccctaaaact tggcaacttc 660
gatacttcca gcccgttctc tcccaagtca ggaacttgcg gggggccct tggcaatct 720
ttttctctca agacagacaca gccttcgtcg ccagggtcg ccagggtctgg tttgtctgac 780
ccagctgtgg tttttccagg cctgaaggcc cgggatgtca ccaggccgtat gtacaaagag 840
accgtctact ccgccttcaa tctgtctatc cattacccac cccctctggg agcaggccag 900
cacccccage cgcagcccccc gctggtaagt ggaccccgcc actcaccac ccccttttc 960
atttttcagc acaaggccaa tcagcccccc cacgggtcgc cccaaacttc tctctacgaa 1020
catttcaaca gcccacatcc caccctgtca ctgcggaca tcagccagaa gcaagggtaca 1080
agcctggat gcccactcac tcagcttc tcccttcgtcgat ttccacaggcc tetgcagacc 1140
cctgacccct ctggcttctc ctcctgtacc tcaggcagca tggggcagct ccccccacact 1200
gtgagctgtt gatgtgggc ccagctcgtt gtaacttcc ttctgtctc caggttccacc 1260
caccatccct tttgtctagg ttctgggtta cttgggtcacc cagcagccat ccccccacccg 1320
gccattgtgc cccctctcagg gaagcaggag ctgcagccct tcgaccgcac cctgtgagtg 1380
aaagacaatc ctgaacaatc tggatttggtc cccctctcagg agacacaagc agagtccaaag 1440
gcagagaagg aggccaagaa gccaaccatc aagaagcccc tcaatgcctt catgtgtac 1500
atgaaggaga tgagagccaa ggtcattgtca gatgtgcacac ttaaggagag cgctgcccac 1560
aaccagatcc tggccgcag ggtgagacca tggggcagggt ggctggcagg gatgtccccc 1620
gaccatctc agcctgtgtc agcctgtca ctccctgtatc caccctccactt gccccttctc 1680
cctttgtcag tggcacgcaca tggcggaga agaggcaggcc aagtactatg agctggcccg 1740
caaggaggg cagtcgcaca tgcagctata cccaggctgg tcagcgcggg acaactacgt 1800
gatgtcctag tttgtctgatc tccctcttcc tttttcttcgtc aggggaagaa gaagaggccg 1860
tcgagggaaa agcacaaga atccaccaca ggtgagaccc tctctcgctc tacccttcgt 1920
gcattggctgt gaggcagaccc tggctcgctt aagaatgcc gtgctcgctt tggcctcaac 1980
cagcagacgg attgggtgtgg tccgtcgagg tgggttgc cccaggggaa gttctattcc 2040
attcatttcca tcagagacaa actggccctc agaactcaag gatggtaatg gacaagagtc 2100
actgtccatc tttttcttcgtc ttagccacgc ttgaggactg ggtggctgg gcaagggagc 2160
cataggcatt gcccggccctt gccttgggtgc agatgtgagt cccacaaaaca catctggaga 2220
agctcaaagg cccggactgg gagatgtact ccttggaaaga caggagagat gactcccttg 2280
gaagacagat gacagcccat aggccttagt gaaaaaggcc ctttgggac cttgtggctg 2340
ttctggaaac tggacactgtc ttaggtctgg gccagaccaa gcaaatggc agtctgagga 2400
cactgactta ccacccaaatg cccaggaaga gaggacaagg aatcagccag gctgtgcaa 2460

aggcagcatt ttttgggtgt ggtgtatgac tatgaattca ccctctgttt acagataact 2520
 ctcttcacta ttccttaggag gaaaaagaaa tgcatcggt acttaccgg agaaggccgc 2580
 tgccccagcc cggttccctc cgatgacagt gctctaggtc gccccgggtc cccagctccc 2640
 cagactcac cctcataccca tctgctgccc cgcttcccca cagaactgtct tactagccct 2700
 gaaaaagatt attgttagtgt taaaaatatt tttgtattgt taatgcatca tcatagaaaa 2760
 acttttaaac atgagaataa agatacttt tactgggtt gttttcaaa gcctgaccct 2820
 gaggaataag ctgtttca gat aacagagcat gat 2855

<210> 2
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 2
 ccaggtcctt cccctaa 17

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 3
 tccaggtcct tccccctaaaa 20

<210> 4
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 4
 catgcattac ccaccca 17

<210> 5
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 5
 cctgctcccg aggg 14

<210> 6
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 6

gcggggtcca cttacca

17

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 7

tactccgcct tcaatctgtct ca

22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sonde

<400> 8

attacccacc cccctcgggaa

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sonde

<400> 9

ccgaggtgggg tgggtaat

18

Patentansprüche

1. Verfahren zur Charakterisierung eines Individuums dahingehend, das es einen Faktor besitzt, der zu einem erhöhten Risiko einer durch Th1 vermittelten Krankheit oder zu einem erhöhten Risiko einer durch Th2 vermittelten Krankheit beiträgt, wobei man in dem Verfahren:

(a) den Genotyp des Individuums in bezug auf das an Position 883 des TCF-1-Gens vorliegende Nukleotid bestimmt, wobei die Gensequenz als SEQ ID NO:1 angegeben ist;

(b) den Patienten auf der Grundlage des aus Schritt (a) erhaltenen Ergebnisses klassifiziert, wobei die Gegenwart eines A-Allels einen zu einem erhöhten Risiko einer durch Th1 vermittelten Krankheit beitragenden Faktor anzeigt und die Gegenwart eines C-Allels einen erhöhten Risiko einer durch Th2 vermittelten Krankheit beitragenden Faktor anzeigt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Charakterisierung eines Individuums dahingehend, das es einen Faktor besitzt, der zu einem erhöhten Risiko einer durch Th1 vermittelten Krankheit beiträgt, wobei man in dem Verfahren:

(a) den Genotyp des Individuums in bezug auf das an Position 883 des TCF-1-Gens vorliegende Nukleotid bestimmt, wobei die Gensequenz als SEQ ID NO:1 angegeben ist;

(b) den Patienten auf der Grundlage des aus Schritt (a) erhaltenen Ergebnisses klassifiziert, wobei die Gegenwart eines A-Allels einen zu einem erhöhten Risiko einer durch Th1 vermittelten Krankheit beitragenden Faktor anzeigt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei es sich bei der durch Th1 vermittelten Krankheit um Diabetes Typ I oder multiple Sklerose handelt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 zur Charakterisierung eines Individuums dahingehend, das es einen Faktor besitzt, der zu einem erhöhten Risiko einer durch Th2 vermittelten Krankheit beiträgt, wobei man in dem Ver-

fahren:

- (a) den Genotyp des Individuums in bezug auf das an Position 883 des TCF-1-Gens vorliegende Nukleotid bestimmt, wobei die Gensequenz als SEQ ID NO:1 angegeben ist;
- (b) den Patienten auf der Grundlage des aus Schritt (a) erhaltenen Ergebnisses klassifiziert, wobei die Gegenwart eines C-Allels einen zu einem erhöhten Risiko einer durch Th2 vermittelten Krankheit beitragenden Faktor anzeigt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei es sich bei der durch Th2 vermittelten Krankheit um allergisches Asthma oder Atopie handelt.

6. Isoliertes Oligonukleotid, wobei das Oligonukleotid zu einem der beiden Stränge von SEQ ID NO: 1 in einem Bereich, der die polymorphe Stelle an Nukleotidposition 883 umfaßt, genau oder weitgehend komplementär ist und wobei das Oligonukleotid zu SEQ ID NO: 1 an der Nukleotidposition 883 genau komplementär ist und der Bereich eine Länge von etwa 10 bis etwa 35 Nukleotiden aufweist.

7. Isoliertes Oligonukleotid nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus (GZ351B) SEQ ID NO: 4, (GZ374B) SEQ ID NO: 5, (KW196) SEQ ID NO: 8, (KW118) SEQ ID NO: 9 sowie den genauen Komplementen davon.

8. Verwendung einer Oligonukleotidsonde, die zu einem Allel, bei dem es sich um ein A-Allel oder ein C-Allel handelt, in einem Bereich, der Position 883 des TCF-1-Gens umfaßt, genau komplementär ist, oder eines Primersatzes, umfassend einen für ein Allel, bei dem es sich um ein A-Allel oder ein C-Allel handelt, an Position 883 des TCF-1-Gens spezifischen allelspezifischen Primer, zur Bestimmung des Genotyps einer Probe in bezug auf das im TCF-1-Gen an Position 883 vorliegende Nukleotid.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die Oligonukleotidsonde ausgewählt ist aus der Gruppe (KW196) SEQ ID NO: 8 oder (KW118) SEQ ID NO: 9.

10. Verwendung nach Anspruch 8, wobei es sich bei dem allelspezifischen Primer um (GZ351B) SEQ ID NO: 4 oder (GZ374B) SEQ ID NO: 5 handelt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen