

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. März 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/018837 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**,
B01J 19/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09386

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. August 2002 (22.08.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 40 651.7 24. August 2001 (24.08.2001) DE
102 19 373.8 30. April 2002 (30.04.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **ADNAGEN AG** [DE/DE]; Ostpassage 7, 30853 Han-
nover-Langenhagen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WASCHÜTZA**,

Stefanie [DE/DE]; Wiesenstrasse 46a, 30169 Hannover
(DE). **SCHNAKENBERG, Eckart** [DE/DE]; Uesener
Weserstrasse 4B, 28832 Achim (DE). **LUSTIG, Michael**
[DE/DE]; Fritz-Tecklenborg-Strasse 21, 28759 Bremen
(DE).

(74) Anwalt: **PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR**;
Mozartstrasse 17, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) Title: METHOD AND DIAGNOSTIC KIT FOR THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF PHARMACOLOGICALLY RELE-
VANT GENES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND DIAGNOSEKIT ZUR MOLEKULAREN DIAGNOSTIK PHARMAKOLOGISCH RE-
LEVANTER GENE

(57) Abstract: The invention relates to a diagnosis kit and a method for determining a person's tolerance to medicaments. Said diagnosis kit contains at least two pairs of oligonucleotides (reverse primer, forward primer). The two oligonucleotides of each pair are suitable as primers for amplification by means of a polymerase chain reaction of respectively one of the two additional strands of a sought DNA segment. Said sought DNA segment which is respectively associated with a pair of oligonucleotides is part of the gene of a human enzyme of phase I and/or phase II of the detoxification metabolism.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Diagnose-Kit und ein Verfahren zur Bestimmung der Medikamentenverträglichkeit eines Menschen. Das Diagnose-Kit enthält mindestens zwei Paare Oligonukleotide (Reversprimer, Forwardprimer), wobei die beiden Oligonukleotide jedes Paares als Primer zur Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion jeweils eines der beiden komplementären Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet sind. Der jeweils einem Paar Oligonukleotide zugeordnete gesuchte DNS-Abschnitt ist dabei Teil des Gens eines der menschlichen Enzyme der Phase I und/oder Phase II des Entgiftungsstoffwechsels.



WO 03/018837 A2

Verfahren und Diagnosekit zur molekularen Diagnostik
pharmakologisch relevanter Gene

Die vorliegende Erfindung betrifft ein diagnostisches System sowie seine Verwendung zur Bestimmung der Medikamentenverträglichkeit eines Menschen. Dieses System ermöglicht die molekulare Diagnostik relevanter Gene, die im Stoffwechsel von Medikamenten von Bedeutung sind und ermöglicht u.a. die Risikoeinschätzung hinsichtlich des Auftretens medikamentenbedingter Nebenwirkungen.

Die Stoffwechselleistung im menschlichen Organismus ist geprägt durch die katalytische Eigenschaft involvierter Enzymsysteme. Dabei ist die medikamentöse Therapie direkt abhängig von der individuellen Stoffwechselleistung. Da der menschliche Metabolismus individuell verschieden ist, zeigt sich in den unterschiedlichen therapeutischen Erfolgen und den Neben-

wirkungen, die in Folge von Medikamenten auftreten können. Neben therapeutisch relevanten Substanzen werden auch toxische und kanzerogene Substanzen über diesen Stoffwechselweg umgesetzt. Der Metabolismus hat dabei nicht nur die Detoxifizierung zur Folge. Einige Substanzen werden durch den Stoffwechsel erst in die therapeutische oder kanzerogene Form überführt.

Der Stoffwechsel im menschlichen Organismus kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der Phase I können Substanzen detoxifiziert und damit für den Körper unschädlich gemacht werden. Zusätzlich sind die Enzyme der Phase I in der Lage Substanzen in eine zelltoxisch- oder genotoxisch aktive Form zu überführen. Die Phase II ist in der Lage die aus der Phase I entstandenen reaktiven Zwischenprodukte zu binden und in eine für den Körper ausscheidbare Form umzuwandeln.

Die interindividuelle Variabilität im Stoffwechsel ist bedingt durch die Stoffwechselleistung der Enzyme, die genetisch polymorph sind. Durch die Vernetzung der Phase I und Phase II Enzymsysteme im Stoffwechsel vieler Xenobiotika ist eine umfassende Betrachtung der genetischen Determinierung beider Stoffwechselphasen von Bedeutung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren, einen Nukleotidarray sowie ein Diagnosekit zur Verfügung zu stellen, mit dem die pharmakologisch relevanten Gene auf relevante Polymorphismen untersucht und so eine Vorhersage bezüglich der Stoffwechselaktivität getroffen werden kann.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren nach Anspruch 16, 35 oder 36, dem erfindungsgemäßen Nukleotidarray nach Anspruch 31, und das erfindungsgemäße Diagnosekit nach Anspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen dieses erfindungsgemäßen Verfahrens, des erfindungsgemäßen Nukleotidarrays, sowie des erfindungsgemäßen Diagnosekits werden in den jeweiligen abhängigen Ansprüchen gegeben.

Erfindungsgemäß beschreibt die vorliegende Erfindung ein Diagnosekit bzw. ein Nukleotidarray mit dem eine minimal invasive, sichere und zuverlässige Bestimmung der Stoffwechselleistung der Phase 1- und Phase 2-Enzyme eines Menschen auf molekularbiologischer Ebene, beispielsweise aus einer Blutprobe, möglich ist. Erfindungsgemäß werden dabei die in Tabelle 1 dargestellten SNPs untersucht. Die Erfindung besteht nun darin, den relevanten Satz an SNPs erkannt und zusammengefaßt zu haben. Weiterhin werden aus diesem Satz nicht etwa einzelne SNPs untersucht sondern eine Kombination von mindestens zwei der Enzym polymorphismen. Durch diese erfindungsgemäße Auswahl der relevanten Polymorphismen sowie die Analyse mehrerer der in diesem Set enthaltenen Polymorphismen können insbesondere potentielle pharmakokinetische Interaktionen bei der Verstoffwechselung von Arzneimitteln bei der Beurteilung der Pharmakokinetik berücksichtigt werden.

So sind z.B. am Medikamentenstoffwechsel von Phenytoin die Cytochrome CYP2C9 und CYP2C19 beteiligt. Dabei haben CYP2C9 und CYP2C19 einen Anteil von 90% bzw. 10% am tatsächlichen Clearance. Eine Beurteilung des therapeutischen Erfolgs kann demzufolge nur durch die genetische Analyse beider Enzymsysteme gewährleistet werden.

Ziel derartiger labormedizinischer Diagnosen ist es, den Genotyp der im Folgenden benannten Gene insbesondere mittels des Verfahrens der Real-time PCR oder DNA-Chiptechnologie zu bestimmen, insbesondere um bei Gabe von Medikamenten die Zahl und Schwere der Nebenwirkungen (schwere Blutbildveränderungen bis hin zu Todesfällen) zu reduzieren bzw. zu vermeiden. Darüber hinaus ermöglicht es eine sichere Genotypisierung der benannten Gene.

Das in dieser Erfindung enthaltene Set von Enzymen bzw. SNPs erlaubt eine größtmögliche Information über genetisch bestimmte und bedingte Stoffwechseleigenschaften bezüglich möglicher Wirksubstanzen für beide Stoffwechselphasen (Phase 1 und Phase 2). Insbesondere ist neben der Vermeidung von Arzneimittel-Nebenwirkungen auch eine Dosis-Individualisierung in der Arzneimitteltherapie aufgrund der erfindungsgemäß getroffenen Vorhersagen möglich.

Tabelle 1 Übersicht der erfindungsgemäß analysierten SNP's

Gen	SNP-Anzahl	SNP-Bezeichnung
NAT2	7 SNPs	G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G, G857A
CYP2D6	10 SNPs	C100T, G1661C, 1707delT, G1758T, G1846A, 2549delA, 2613_2615delAGA, C2850T, A2935C, G4180C
CYP1A2	2 SNPs	G-3858A, C-164A
CYP3A4	6 SNPs	A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C
MEH	2 SNPs	T337C, A416G
TPMT	3 SNPs	G238C, G460A, A719G
MTHFR	2 SNPs	C677T, A1298C
Paraoxonase	2 SNPs	L55M (Aminosäureaustausch), Q192R (Aminosäureaustausch)
CYP2C9	2 SNPs	C430T, A1075C
CYP2C19	2 SNPs	G636A, G681A
CYP2E1	3 SNPs	G-1293C, C-1053T, T7632A
DPD	1 SNP	IVS 14 + 1G > A

Das Diagnose-Kit enthält in einer vorteilhaften Ausführungsform bis zu 35 Oligonukleotidpaare, die als Reverse- und Forward-Primer bei der Amplifikation mittels PCR eingesetzt werden. Durch diese werden spezifische Sequenzbereiche amplifiziert, die insgesamt 42 zu analysierende Mutationen enthalten. Zum Nachweis der insgesamt 42 Mutationen werden vorteilhafterweise 42 SNP-spezifische Hybridisierungsproben verwendet die für die Signalgabe einer sich anschließenden Schmelzkurven-Analyse erforderlich sind. Für die Diagnose mit Oligonukleotidarrays werden SNP-spezifische Oligonukleotide als Kontrollsonden auf einem Substrat immobilisiert, wobei die für jeweils ein SNP spezifischen Sonden in einem eigenen Feld auf dem Substrat immobilisiert werden, so daß jeweils ein Feld zur Erfassung eines bestimmten SNP geeignet ist.

Im Folgenden werden für jedes der genannten Enzyme und SNP's in Einzelbeispielen die Primersequenzen sowie die Sondersequenzen sowie die zur Diagnostik erforderlichen Vorgehensweisen und Beispiele der Chip-Diagnostik sowie konkrete beispielhafte Meßergebnisse dargestellt.

25 NAT2

Die N-Acetyltransferase 2 (NAT2, E.C.2.3.1.5) besitzt große klinische Bedeutung in der Entgiftung von Xenobiotika. Die hier nachgewiesenen Mutationen führen zu jeweils einem Aminosäureaustausch, mit Ausnahme der Mutation C282T und C481T, der die katalytische Eigenschaften und damit die Acetylierungskapazität des Enzyms der N-Acetyltransferase 2 ändert. Mutation der N-Acetyltransferase 2 (NAT2) lassen sich an den Nukleotidpositionen nt 191, nt 282, nt 341, nt 481, nt 590, nt 803 und nt 857 mit den hier beschriebenen

Verfahren nachweisen. Die Mutation nt 481 führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, dient aber als Indikator für die Mutation(en) nt 341 und/oder nt 803. Nur in seltenen Fällen (ca. < 1%) liegt eine Kopplung zwischen nt 481 und nt 341 vor, die für sich genommen zu einem Aminosäureaustausch führt. Etwas häufiger (ca. > 1%) kann eine Kopplung zwischen nt 481 und nt 803 fehlen, weswegen der Nachweis dieser Mutation in dem hier beschriebenen Verfahren aufgenommen wurde.

Personen, die Träger keiner oder einer der o.g. Mutationen im heterozygoten Zustand sind, zählen zu den so genannten Schnellacetylierern, vorausgesetzt sie weisen keine weitere Mutation auf dem zweiten Allel auf. Träger einer dieser Mutationen im homozygoten Zustand sind Langsamacetylierer. Personen, die zu den Langsamacetylierern zählen, verstoffwechseln NAT2-spezifischen Substrate langsamer, was zu einer Anreicherung toxischer Metaboliten im Körper führen kann. Schnellacetylierer verstoffwechseln z.B. zahlreiche Medikamente besonders schnell und können dadurch die therapeutische Wirksamkeit eines Wirkstoffes verfehlen. Zu den typischen Substraten der N-Acetyltransferase zählen pharmakologisch relevante Substanzen wie z.B. Isoniazid, Sulfonamide, Dapson, Procainamid sowie die umwelt- und arbeitsmedizinisch relevanten Karzinogene Benzidine, 2-Aminofluoren und β -Naphthylamin. Somit kommt der N-Acetyltransferase 2 auch eine wichtige Bedeutung in der Disposition von Tumorerkrankungen zu.

Die Primer H230 und H231 werden für die Herstellung eines PCR-Produkts in unmarkierter Form eingesetzt. Dieses Primerpaar ist die Basis für alle nachstehenden Real time PCRs mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

Tabelle 2 Sequenz der Primer H230 und H231 zur Amplifizierung der NAT2

Primernamen	Primersequenz	Grösse (bp)
H230	5' - TTCTTgAgCACCAgATCCgg	885
H231	5' - ACgTgAgggTAgAgAggATAT	

Zusätzlich zu den Primer H230 und H231 werden fluoreszenzmarkierte, mutationsspezifische Nukleotide (sog. Hybridization Probes) in die PCR eingesetzt, wobei einer der beiden Primer die zu detektierende Mutation abdeckt. Die nachfolgend aufgelisteten Hybprobes sind spezifisch für den jeweiligen SNP.

Tabelle 3 Nachweis der NAT2-Mutation G191A

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H132	5' - tctccaggtcaatcaacttctgtactgggc	5' -LC-Red640
H131	5' - aagaaaccAgggtgggtg	3' -Fluorescein

Tabelle 4 Nachweis der NAT2-Mutation C282T

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H134	5' - tcctaacattgtgggtctg	5' -LC-Red640
H133	5' - tggagggatGtaaaaata	3' -Fluorescein

Tabelle 5 Nachweis der NAT2-Mutation T341C

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H136	5' - gcaggagaaggtgaaccatgcc	5' -LC-Red705
H135	5' - tcctgccgtcAatgggtca	3' -Fluorescein

Tabelle 6 Nachweis der NAT2-Mutation C481T

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H81	5' -aggagagagcagtatattacaaa- caaagaattt	5' -LC-Red640
H82	5' -aatctgtgtacctggaccaa	3' -Fluorescein

Tabelle 7 Nachweis der NAT2-Mutation G590A

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H79	5'-taaataagttatTTTTTGGTgTtTctTctTtgGca	5'-LC-Red640
H80	5'-ttcaattgttcgaggttcaa	3'-Fluorescein

Tabelle 8 Nachweis der NAT2-Mutation A803G

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H77	5'-aacctcttcctcagtgagag	5'-LC-Red640
H78	5'-aatatatttctcagcacttc	3'-Fluorescein

5

Tabelle 9 Nachweis der NAT2-Mutation G857A

Primernamen	Primersequenz	Markierung
H76.2	5'-tagaataaggaacaaaaaaccttGtg	5'-LC-Red705
H75	5'-tggtgatGAatcccttact	3'-Fluorescein

Der Pipettieransatz ist für den Nachweis aller NAT2 SNPs gleich und ist in der Tabelle 10 aufgelistet.

10

Tabelle 10 Pipettierschema für alle Mutationsanalysen der NAT2 sieht wie folgt aus

	Endkonz.
DNA-Template	50 - 100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer H230	0,5 µM
Primer H231	0,5 µM
Hybridization Probes der jeweiligen Mutation	0,15 µM
Hybridization Probes der jeweiligen Mutation	0,15 µM

Die Programmierung des LightCycler ist für den Nachweis jeder NAT2 Mutation gleich der Tabelle 11.

15

Tabelle 11 PCR-Schema zum Nachweis aller Mutation mittels LightCycler-PCR

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	240	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	65	10	20	0	0	0	Single
3	72	40	20	0	0	0	None

Tabelle 12 Schema der Schmelzkurvenanalyse für den SNP-Nachweis aller NAT2-Mutationen

Melting							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,25	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Die im Anschluss der PCR folgende Schmelzkurve ergibt in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen Schmelzpunkte, die eine Unterscheidung in homozygote Wildtypen und Mutationen, sowie den heterozygoten Genotyp zulassen. Daraus ergeben sich für die einzelnen Muta-

tionen die in den Fign. 1 bis 7 dargestellten Schmelzkurven und Schmelzpunkte. Dabei bezeichnen hier wie in allen folgenden Figuren die senkrechten Linien die Position der Spitzen der Schmelzkurven für den Wildtyp bzw. die bezeichnete Mutation.

Die Lage der Schmelzpunkte ergibt sich wie folgt:

		Wildtyp	Mutation
10	Schmelzpunkt (°C): nt 191	ca. 51	ca. 60
	Schmelzpunkt (°C): nt 282	ca. 52	ca. 43
	Schmelzpunkt (°C): nt 341	ca. 62,5	ca. 54,5
	Schmelzpunkt (°C): nt 481	ca. 59	ca. 50,5
	Schmelzpunkt (°C): nt 590	ca. 57,5	ca. 48
15	Schmelzpunkt (°C): nt 803	ca. 45	ca. 55
	Schmelzpunkt (°C): nt 857	ca. 50,5	ca. 57,5

Die Bestimmung des Phänotyps erfolgt durch die Auswertung der einzelnen Mutationen. Dabei wird die aktuelle Nomenklatur herangezogen.

In den in Fig. 43 dargestellten Tabellen werden die Auswirkungen der einzelnen Punkt-Mutationen auf den Phänotyp eines Menschen angegeben. Dabei gibt Figur 43 A eine Liste der nachweisbaren NAT2-Allele, wobei mit „+“ das Vorhandensein der jeweiligen Mutation und mit „-“ das Vorhandensein des Wildtyps angegeben wird. In Spalte 1 wird jeweils eine Bezeichnung dieser NAT2-Allele angegeben und in der letzten Spalte der phänotypische Schnell- bzw. Langsamacetylierer-Typ, d.h. die Kombination einzelner Allele auf den beiden menschlichen Chromosomensätzen.

Figur 43 B gibt potenzielle Schnellacetylierer an während Figur 43 C potenzielle Langsamacetylierer an-

gibt. So ist beispielsweise ein homozygoter Träger des Allels 4 bzw. ein heterozygoter Träger des Allels 4 und 6A ein Schnellacetylierer.

5 CYP2D6

Das Enzym CYP2D6 (EC 1.14.14.1) metabolisiert einen Anteil von etwa 25% aller in der klinischen Praxis relevanten Pharmaka, wie z.B. Antiarrhythmika (z.B. Spartein, Propafenon), Neuroleptika (z.B. Fluvoxamin, TrimipraminAmitriptylin) und Opiode (z.B. Codein, Dextromethorpan). Das Enzym CYP2D6 katalysiert substratspezifisch unterschiedliche oxidative Reaktionen. Die Genotypisierung von CYP2D6 ist für die klinische Pharmakologie von großer Bedeutung, da damit eine mögliche Vorhersage der individuellen metabolischen Kapazität eines Patienten getroffen werden kann und damit ein wesentlicher Beitrag zur Dosisindividualisierung der Arzneimitteltherapie und zur Vermeidung von Arzneimittelnebenwirkungen geleistet werden kann.

Von den zahlreichen Mutationen (bisher 48 bekannt) führen einige zu einer Veränderung der Enzymaktivität. Aufgrund der unterschiedlichen Enzymaktivität gibt es eine Einteilung in PM's (es wird kein funktionelles CYP2D6-Enzym exprimiert (PM 5-10%), mittlere Metabolisierer (IM 5%) schnelle Metabolisierer (EM) und als Untergruppe der EM's (80%) die ultraschnellen Metabolisierer (UM 5%).

Durch den Nachweis von 10 hier ausgewählten wichtigen Mutationsstellen kann nach der Genotypisierung eine 90%ige Aussage zum gesamt Phänotyp und über 98%ige Aussage über PM und IM gemacht werden.

Die Mutation C100T, G1661C, C2850T, G4180C, A2935C führt zu einem Aminosäureaustausch, die Mutation nt G1846A zu einem Spleißdefekt, die Deletionen 1707delT und del2549A zu einem Frameshift sowie de 2613_2615delAGA zu einem Verlust der Aminosäureaktivität und die Mutation G1758T zu einem Stop Coden.

Die hier untersuchten 10 Mutationsstellen führen zur Veränderung der Enzymaktivität des CYP2D6 Proteins. Die durch die Mutationen beschriebenen Allele defizienten Phänotypen (Allele *3, *4, *5, *6, *39) und zu intermediären Phänotypen (*2, *7, *8, *9, *10, *34,).

Mutation	Allele
Keine	CYP2D6*1A
2613 2615del	CYP2D6*9
2850C>T; 4180G>C	CYP2D6*2D
2549A>del	CYP2D6*3A
100C>T; 1661G>C; 1846G>A; 4180G>C	CYP2D6*4E
100C>T; 1661G>C; 1846G>A; 2850C>T; 4180G>C	CYP2D6*4K
CYP2D6 deleted	CYP2D6*5
1707T>del	CYP2D6*6A
2935A>C	CYP2D6*7
1661G>C; 1758G>T; 2850C>T; 4180G>C	CYP2D6*8
2613-2615delAGA	CYP2D6*9
100C>T; 1661G>C; 4180G>C	CYP2D6*10A
2850C>T	CYP2D6*34
1661G>C; 4180G>C	CYP2D6*39

Alle Analysen werden im LightCycler durchgeführt. Nachfolgend sind die Primersequenzen, Sondensequenzen und die Pipettierschemas aufgelistet.

C100T

Mit den spezifischen Primern H121/H122 wird ein Teil des CYP2D6-Gens amplifiziert, der die Mutation an der Position C100T enthält.

Tabelle 13 Primersequenzen zur Amplifizierung der spezifischen CYP2D6 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H121	CCCATTGGTAGTGAGGCAGGTAT	350 Bp
H122	AAATGCCCTTCTCCAGGACGT	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position C100T dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H153/154.

Tabelle 14 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation C100T

Sondenname	Primersequenz	Markierung
H153	tgacgctacCcaccagg	Fluorescein
H154	Cctgccactgcccggt	LC 640

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 15 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation C100T

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H 121	0,5 µM
Primer H 122	0,5 µM
Hybridization Probes H 153	0,15 µM
Hybridization Probes H 154	0,15 µM

5 Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse aufgezeigt.

Tabelle 16 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	150	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	Single
3	72	18	20	0	0	0	None

Tabelle 17 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

5

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,1	0	0	0	Continuous

10

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

15

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 8 ist die Analyse für die Mutationen C100T graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	nt ca. 67,5	ca.58
100		

G1661C und 1707delT

Mit den spezifischen Primern H236/H237 wird ein Teil des CYP2D6-Gens amplifiziert, der die Mutation an den Positionen G1661C und 1707delT enthält.

Tabelle 18 Primersequenzen zur Amplifizierung der spezifischen CYP2D6 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H236	GTCTTCCCTGAGTGCAAAGGC	380 Bp
H237	ATCACCCACCGGAGTGGTT	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Nukleotide an den Positionen G1661C und 1707delT dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H169.3/170.3 für G1661C und H212/213 für 1707delT.

Tabelle 19 Sondensequenzen für den Nachweis der Mutationen G1661C und 1707delT

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H169.3	CgcttctccgtCtccacc	Fluorescein
H170.3	Cgcaacttgggcctgggcaaga	LC 640
H212	gcagTgggtgaccgagga	Fluorescein
H213	cgctgcctttgtgccgctc	LC705

Das Pipettierschema für die Multiplexanalyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und eine Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 20 Pipettierschema für den Nachweis der Mutationen G1661C und 1707delT

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H236	0,5 µM
Primer H237	0,5 µM
Hybridization Probes H 169.3	0,15 µM
Hybridization Probes H 170.3	0,15 µM
Hybridization Probes H 212	0,15 µM
Hybridization Probes H 213	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse tabellarisch dargestellt.

Tabelle 21 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	Single
3	72	18	20	0	0	0	None

Tabelle 22 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,2	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In den Fign. 9 und 10 sind die Analysen für die Mutationen G1661C und 1707delT graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):nt 1661	ca. 55	ca.66
Schmelzpunkt (°C):nt 1707	ca. 66	ca. 57

G1846A und G1758T

Mit den spezifischen Primern H119/H120 wird ein Teil des CYP2D6-Gens amplifiziert, der die Mutationen an den Positionen G1846A und G1758T enthält.

Tabelle 23 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2D6 Sequenz

Primernamen	Primersequenz	Grösse (bp)
H119	AGACCAGGGGGAGCATAGGGTT	481 Bp
H120	AAAGCCCGACTCCTCCTTCAGT	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Nukleotide an den Positionen G1846A und G1758T dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H179/180 für G1846A und H234/235 für G1758T.

Tabelle 24 Sondensequenzen für den Nachweis der Mutationen G1846A und G1758T

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H179.2	TctcccacccccAagacg	Fluorescein
H180.2	Ctttcgccccaacggtctcttgga	LC 705
H234	ActccTgtgggtgatggg	Fluorescein
H235	Aagggcacaaagcgggaactgg	LC 640

Das Pipettierschema für die Multiplexanalyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und eine Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 25 Pipettierschema für den Nachweis der Mutationen G1846A und G1758T

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,0 mM
Primer H 119	0,5 µM
Primer H 120	0,5 µM
Hybridization Probes H 179.2	0,2 µM
Hybridization Probes H 180.2	0,2 µM
Hybridization Probes H 234	0,2 µM
Hybridization Probes H 235	0,2 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse dargestellt.

Tabelle 26 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	150	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	Single
3	72	20	20	0	0	0	None

Tabelle 27 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,2	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In den Fign. 11 und 12 sind die Analysen für die Mutationen G1846A und G1758T graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C): 1846	ca. 54	ca. 63
Schmelzpunkt (°C): 1758	ca. 53	ca. 60

2613 2615delAGA und 2549delA

Mit den spezifischen Primern H214/H215 wird ein Teil des CYP2D6-Gens amplifiziert, der die Deletionen 2613_2615delAGA und 2549delA enthalten.

Tabelle 28 Primersequenzen zur Amplifizierung der spezifischen CYP2D6 Sequenzen

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H214	ACCTCCTATCCACGTCAGAGAT	550 Bp
H215	AGCATACGGGACAGAAC	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Deletion 2613_2615del und der Mutation nt 2549. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H220/H221 für 2613_2615delAGA und H218/219 für 2549delA.

Tabelle 29 Sondensequenzen für den Nachweis der Mutationen 2613_2615delAGA und 2549delA

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H220	Ctcaccttctccatctct	Fluorescein
H221	Aggaaggcctcagtcaggtc	LC 705
H218	CatctcccacccccaAga	Fluorescein
H219	Ccctttcgccccaacggt	LC 640

Das Pipettierschema für die Multiplexanalyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und eine Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 30 Pipettierschema für den Nachweis der Deletionen 2613_2615delAGA und 2549delA

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H 214	0,5 µM
Primer H 215	0,5 µM
Hybridization Probes H 220	0,15 µM
Hybridization Probes H 221	0,15 µM
Hybridization Probes H 218	0,15 µM
Hybridization Probes H 219	0,15 µM

- 5 Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse dargestellt.

Tabelle 31 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C%/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	150	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C%/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	64	10	20	0	0	0	Single
3	72	20	20	0	0	0	None

Tabelle 32 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,1	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem Nachweis der Deletion und des detektierten Nukleotids. In den Fign. 13 und 14 sind die Analysen der Deletionen 2613_2615delAGA und 2549delA graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C): 2613_2615delAGA	ca. 62,5	ca. 51
Schmelzpunkt (°C): 2549delA	ca. 62,5	ca. 53

C2850T und A2935C

Mit den spezifischen Primern H238/H239 wird ein Teil des CYP2D6-Gens amplifiziert, der die Mutationen an den Positionen C2850T und A2935C enthält.

Tabelle 33 Primersequenzen zur Amplifizierung der spezifischen CYP2D6 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H238	Gttctgtccccgagtatgtctct	550 Bp
H239	Atcctgggtcaagcctgtgcttgg	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Nukleotide an den Positionen C2850T und A2935C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H143/H144 für C2850T und H232/233 für A2935C.

Tabelle 34 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation C2850T und A2935C

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H143	actatgcAcagggttctca	Fluorescein
H144	ttgaagctgctctcagggttcc	LC 640
H232	CtcatgatcctacCtccg	Fluorescein
H233	Gtgcagcgtgagccca	LC 705

Das Pipettierschema für die Multiplexanalyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und eine Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 35 Pipettierschema für den Nachweis der Mutationen C2850T und A2935C

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H 238	0,5 µM
Primer H 239	0,5 µM
Hybridization Probes H 143	0,15 µM
Hybridization Probes H 144	0,15 µM
Hybridization Probes H 232	0,15 µM
Hybridization Probes H 233	0,15 µM

- 5 Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse dargestellt.

10 **Tabelle 36 Amplifikationsschema für den LightCycler**

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

15

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	66	10	20	0	0	0	Single
3	72	17	20	0	0	0	None

Tabelle 37 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,1	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In den Fign. 15 und 16 sind die Analysen für die Mutationen C2850T und A2935C graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):2850	ca. 51	ca. 58,5
Schmelzpunkt (°C):2935	ca 49,5	ca.59

G4180C

Mit den spezifischen Primern H240/H241 wird ein Teil des CYP2D6-Gens amplifiziert, der die Mutation an der

Position G4180C enthält.

Tabelle 38 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2D6 Sequenz

Primernamen	Primersequenz	Grösse (bp)
H240	caccatggtgtcttttgctttcc	240 Bp
H241	cctcaacgtaccctgtctcaa	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position G4180C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H187/H188.

Tabelle 39 Sondensequenz

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H187.2	ggtgaccccatcccccta	Fluorescein
H188.2	gctttgtgctgtgccccgctagaa	LC 705

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 40 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation G4180C

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H 240	0,5 µM
Primer H 241	0,5 µM
Hybridization Probes H 187.2	0,15 µM
Hybridization Probes H 188.2	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler

zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse aufge-
zeigt.

5 **Tabelle 41 Amplifikationsschema für den LightCycler**

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	180	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	63	10	20	0	0	0	Single
3	72	18	20	0	0	0	None

25 **Tabelle 42 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse**

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	33	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

45 Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 17 ist die Analyse für die Mutationen

G4180C graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 55	ca.66

CYP1A2

Arylamine und heterozyklische Amine werden durch CYP1A2 (E.C.1.14.14.1) aktiviert. Aromatische Amine gehörten zu den ersten Verbindungen, für die eine Kanzerogenität festgestellt werden konnte. Mit den Mutationen an den Positionen nt-3858 und nt-164 werden auch pharmakologische relevante Mutationen nachgewiesen, die durch ihren Aminosäureaustausch eine Änderung der Proteinstruktur und damit der katalytischen Eigenschaft zur Folge hat. Dabei geht die Mutation nt-3858 mit einer verringerten Enzymaktivität einher, während die Mutation nt-146 eine erhöhte induzierte der Enzymreaktion zeigt.

Über das CYP1A2 werden etwa 15% der heute verwendeten Arzneimittel verstoffwechselt. Dazu gehören Phosphodiesterasehemmer (Theophyllin) und andere Xanthinderivate (Analeptika, Antihypoxämika), sowie mehrere Antidepressiva und Neuroleptika. CYP1A2 wird von Tabakter-Komponenten induziert (Kohlenwasserstoffverbindungen), was zu einem erhöhten und rascheren Clearance der Substrate führt.

Der Nachweis beider Mutationen wird in verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Das Programm für den LightCycler ist bei beiden gleich.

5 G-3858A

10 Mit den spezifischen Primern H103/H104 wird ein Teil des CYP1A2-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position G-3858A enthalten, die sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 43 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des 5'-UTR Region des CYP1A2-Gens

15

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H103	ACAACAGGGACTTCTTGGATGC	368 Bp
H104	CACTTGAGTGAGGCCAGGAGTT	

20

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position G-3858A dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H97/H98.

Tabelle 44 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation G-3858A

Sondennamen	Sondensequenz	Markierung
H97	catgcccagcttcccg	LC 640
H98	cctctcagattcaagcaat	Fluorescein

25

30

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 45 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation G-3858A

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer H 103	0,5 µM
Primer H 104	0,5 µM
Hybridization Probes H 97	0,15 µM
Hybridization Probes H 98	0,15 µM

- 5 Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse aufgezeigt.

Tabelle 46 Amplifikationsschema für den LightCycler

10

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

15

20

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	68	10	20	0	0	0	Single
3	72	20	20	0	0	0	None

25

Tabelle 47 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 18 ist die Analyse für die Mutationen G-3858A graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	Ca. 49	ca. 59

C-164A

Mit den spezifischen Primern H105/H106 wird ein Teil des CYP1A2-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position C-164A enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 48 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP1A2

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H105	GAATCCTGGTCCCTTGGGT	340 Bp
H106	TGCGTGTTCTGTGCTTGGC	

Zusätzlich werden Hybridisierungs sonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position C-164A dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H229/H228.

Tabelle 49 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation C-164A

Sondennamen	Sondensequenz	Markierung
H229	atggagcttagtctttctggtatccagctggg	LC 705
H228	ggcccaggacgcattgga	Fluorescein

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 50 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation C-164A

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer H 105	0,5 µM
Primer H 106	0,5 µM
Hybridization Probes H 229	0,15 µM
Hybridization Probes H 228	0,15 µM

Tabelle 51 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	68	10	20	0	0	0	Single
3	72	20	20	0	0	0	None

Tabelle 52 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 19 ist die Analyse für die Mutationen C-164A graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 67	ca. 59

CYP3A4

Die CYP3A4 wird hauptsächlich in der Leber gebildet und verstoffwechselt über die Hälfte aller auf den Markt befindlichen therapeutischen Substrate. Sie sind häufig verantwortlich für eine präsystemische Biotransformation (first pass). Bislang wurden mehr als zwanzig Mutationen beschrieben, von denen mindestens fünfzehn zu einem Aminosäureaustausch führen. Das Cytochrom P450 3A4-Gen ist auf dem Chromosom 7q22.1 lokalisiert und besteht aus 13 Exons. Zu den typischen Substraten des Cytochrom P450 3A4-Enzyms zählen weitverbreitete Wirkstoffe wie z.B. Carbamazepin, Nifedipin, Diazepam, Phenytoin, Haloperidol, Testosteron u.a.. Vorteilhafterweise geben die folgenden insgesamt 6 SNPs (A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C) Aufschluss über die katalytische Stoffwechselleistung des Enzyms CYP3A4. Die Mutation A-392G hat eine Veränderung in der Promotorregion und damit in der Regulierung der Genexpression zur Folge und die Insertion 831insA verursacht einen Frameshift. Die übrigen Mutationen haben einen Aminosäureaustausch zur Folge und damit eine Veränderung der katalytischen Eigenschaft des Enzyms.

Die Mutation A352G bewirkt einen Aminosäureaustausch
 1118V wodurch die Enzymaktivität verringert ist.
 Ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch P218R führt
 die Mutation C653G die eine verminderte Enzymaktivi-
 5 tät bewirkt. Durch die Mutation T664C kommt es zu ei-
 nem Aminosäureaustausch S222P der zu einem erniedrig-
 ten tatsächlichen clearance zu CYP3A4 Substraten wie
 z.B. Nifedipin. Eine Veränderung in der Häm-Bindungs-
 region resultiert aus der Mutation T1334C, die den
 10 Aminosäureaustausch (M445T) bewirkt.

Der verursachte Frameshift durch die Insertion
 831insA bewirkt eine Verringerung der katalytischen
 Funktion der CYP3A4.

Alle hier aufgeführten Mutationsanalysen des CYP3A4-
 Gens werden mit dem gleichen Pipettierschema und dem
 gleichen Programm im LightCycler durchgeführt. Das
 Pipettierschema für alle Analysen im LightCycler ist
 20 nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf
 einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix
 in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix
 muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe einge-
 plant werden.

**Tabelle 53 Pipettierschema für den Nachweis sämtlicher Mutation im CYP3A4-
 Gen**

	Endkonz.
DNA-Template	50-100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer je Mutation (s.o.)	0,5 µM
Primer je Mutation (s.o.)	0,5 µM
Hybridization Probes je Mutation (s.o.)	0,15 µM
Hybridization Probes je Mutation (s.o.)	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler

zur Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse auf-
zeigt.

Tabelle 54 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	66	10	20	0	0	0	Single
3	72	17	20	0	0	0	None

Tabelle 55 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,25	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

A-392G

Mit den spezifischen Primern H197/H198 wird ein Teil des CYP3A4-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position A-392G enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 56 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP3A4 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H197	TCTGTCTGTCTGGGTTTGGA	325 Bp
H198	CACCTTGGAAGTTGGCAAAG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position A-392G dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H194/H193.

Tabelle 57 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation A-392G

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H194	TATGGCTGTCCTCATTCCTCAAAATACTTGAAATTCATCCCA	LC 705
H193	CCTCTCTCTCTGCCCTTGT	Fluorescein

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 20 ist die Analyse für die Mutationen A-392G graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	Ca. 50	ca. 60

5 **A352G**

10 Mit den spezifischen Primern H199/H200 wird ein Teil des CYP3A4-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position A352G enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 58 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP3A4 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H199	CCCATCACCCAGTAGACAGT	352 Bp
H200	GCAGCTCAAATTCAGTGGAC	

15 Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position A352G dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden
20 H150/H149.

Tabelle 59 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation A352G

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H150	CATAAATCCCACTGGACCAAAGGCTAGAGTTCAAA-CAG	LC 705
H149	CCTCAGCTATAGAGACGGCACT	Fluorescein

25 Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 21 ist die Analyse für die Mutationen A352G graphisch dargestellt.

30 Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte

erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

5

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	Ca. 57	ca.64

C653G und T664C

10

Mit den spezifischen Primern H195/H196 wird ein Teil des CYP3A4-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat sind die Positionen C653G und T664C enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

15

Tabelle 60 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP3A4 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H195	CACATCTTTCTCCACTCAGCG	398 Bp
H196	GATGACAGGGTTTGTGACAGG	

20

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position C653G und T664C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H192/H191 für C653G und H130/H129 für T664C.

25

Tabelle 61 Sondensequenz für den Nachweis der Mutationen C653G und T664C

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H192	AATAAGTATGTGGACTACTATTCCTT	LC 640
H191	TTTGGATCCATTCTTCT	Fluorescein
H130	Actactatttcctttaatttatctttctctc	LC 705
H129	CtttctcCcaataagtatg	Fluorescein

30

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 22 und 23 sind die Analysen für die Mutationen C653G und T664C graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C): nt653	ca. 53	ca. 43
Schmelzpunkt (°C): nt 664	ca 43,5	ca 53

831insA

Mit den spezifischen Primern H201/H202 wird ein Teil des CYP3A4-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position 831insA enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 62 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP3A4 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H201	AGAAGGGAGATCAAGGACCACGC	369 Bp
H202	AGGTTTGCTTAGGGTTGCC	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position 831insA dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H190/H189.

Tabelle 63 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation 831insA

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H190	AAAAGAACTGAGTCCCACAAAGGT	LC 640
H189	TGATGATTGACTCTCAGAA	Fluorescein

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 24 ist die Analyse für die Mutationen 831insA graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	Ca. 55	ca. 46

T1334C

Mit den spezifischen Primern H203/H204 wird ein Teil des CYP3A4-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position T1334C enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 64 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP3A4 Sequenz

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H203	AAATCTACCAACGTGGAACC	232 Bp
H204	CTCCAGAACTGAAGCACCCCT	

Zusätzlich werden Hybridisierungs sonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position T1334C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H152/H151.

Tabelle 65 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation T1334C

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H152	Gtttctgggtccacttccaaaggtgtg	LC 705
H151	AgcaaacctcGtgccaat	Fluorescein

5 Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 25 ist die Analyse für die Mutationen T1334C graphisch dargestellt.

10 Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt	Ca. 54	ca.61
(°C):		

15 Die Figuren 44 A und B geben eine Liste der nachweisbaren CYP3A4-Allele an, wobei mit „+“ das Vorhandensein der Mutation und mit „-“ der Wildtyp bezeichnet sind. In Spalte 1 in Fig. 44 A ist wiederum eine Bezeichnung und in der letzten Spalte der zu der jeweiligen Kombination von Mutation und Wildtyp gehörige Phänotyp bezüglich der Enzymaktivität der CYP3A4. Figur 45 B zeigt für die Kombination aus verschiedenen Mutationen bzw. Wildtyp für die 2 Gene der CYP3A4 den jeweiligen potenziellen Phänotyp an.

25

mEH

30 Die mikrosomale Epoxid Hydrolase (mEH) spielt eine entscheidende Rolle bei der Detoxifikation von Umweltgiften und Medikamenten. Klinisch relevante Substanzen, wie z.B Carbamazepin, Phenytoin oder Phenobarbiturate, die über P-450 Enzyme aktiviert und

somit zu Epoxide Metaboliten umgewandelt werden, erreichen über die mEH einen nicht toxischen Zustand.

Die Mutation im Exon 3 (T337C) hat einen Aminosäureaustausch (Y113H) zur Folge, der zu einer Verringerung der Enzymaktivität führt, die auf eine erniedrigte Expression beruht. Die Mutation im Exon 4 (A416G) hat ebenfalls einen Aminosäureaustausch (H139R) zur Folge. Diese bewirkt eine erhöhte Enzymaktivität durch eine höhere Stabilität des Proteins.

Die Durchführung der Untersuchung wird durch eine Multiplex-Analyse im LightCycler durchgeführt werden.

T337C und A416G

Spezifisch werden im Exon3 mit den Primern H125/H126 und im Exon4 mit den Primern H127/H128 im Exon4 Abschnitt des mEH-Gens amplifiziert, die für die Enzymaktivität mitverantwortlich sind. In diesem Amplifikat sind die Nukleotidpositionen T337C und A416G enthalten, die sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken.

Tabelle 66 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des mEH-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H125	GAACACATCCGCTTTGGAGTAGC	410 Bp
H126	ATACATCCCTCTCTGGCTGGC	
H127	GCACTAAGGGTGGCAGGACTCA	361 Bp
H128	CAGTTATGGAACCTCTAGCAGCC	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der an den Positionen nt 337 und nt 416 dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H178/H177 für T337C und H176/H175 für A416G.

Tabelle 67 Sondensequenz für den Nachweis der Mutationen T337C und A416G

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H178	ttgctgatggtgcacggctggc	LC 705
H177	gcaggccAtaccccgaag	Fluorescein
H176	tccacctgcttcttccag	LC 640
H175	tgagggtAtctgttgaga	Fluorescein

Das Pipettierschema für die Analysen im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 68 Pipettierschema für den Nachweis beider Mutationen im mEH-Gen

	Endkonz.
DANN-Template	50-100 ng
DANN Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer H 125	0,5 µM
Primer H 126	0,5 µM
Primer H 127	0,5 µM
Primer H 128	0,5 µM
Hybridization Probes H 178	0,15 µM
Hybridization Probes H 177	0,15 µM
Hybridization Probes H 176	0,15 µM
Hybridization Probes H 175	0,15 µM

Die Analyse wird in einem Multiplexansatz durchgeführt. Nachfolgend ist die Programmierung des Light-Cycler aufgelistet.

Tabelle 69 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	68	10	20	0	0	0	Single
3	72	20	20	0	0	0	None

5

Tabelle 70 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	180	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

15

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

20

25

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In den Fign. 26 und 27 sind die Analysen für die Mutationen T337C bzw. A416G graphisch dargestellt.

30

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C) nt 337	ca. 56	ca. 49
Schmelzpunkt (°C): nt 416	Ca. 65	ca. 57

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)

Die Thiopurin S-Methyltransferase spielt eine besondere Rolle im Stoffwechsel von Medikamenten, insbesondere bei Zytostatika zur Behandlung von Leukämien und Lymphomen. Die genetisch polymorphe Thiopurin S-Methyltransferase ist auf Chromosom 6p22.3 lokalisiert. Das Enzymprodukt wird unterschiedlich gebildet, in Abhängigkeit von den im Exom befindlichen Mutationen. Diese Punktmutationen führen zu jeweils einem Aminosäureaustausch.

Mutationen der Thiopurin S-Methyltransferase (TPMT) lassen sich an den Nukleotidpositionen nt 238, nt 460 und nt 719 mittels des hier beschriebenen chiptechnologischen Verfahrens nachweisen.

Phänotypisch wird zwischen Personen mit hoher, intermediärer und sehr niedriger bzw. keiner Enzymaktivität in Erythrozyten unterschieden. Personen, die Träger einer Mutation im homozygoten Zustand sind, wiesen sehr niedrige bzw. keine Enzymaktivität auf.

Die Chemotherapeutika 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin werden über Xanthinoxidase oxidiert oder durch Thiopurin-S-Methyltransferase methyliert, wobei die TPMT im hämatopoetischen System der einzige katalytische Weg darstellt. Die TPMT-Aktivität unterliegt einem genetischen Polymorphismus, der durch die Mutationen nt G238C, nt G460A, nt A719G beschrieben wird.

In der weißen Bevölkerung wird eine um 75 % reduzierte Enzymaktivität bei etwa 10 % der Untersuchten beobachtet, während bei 1 von 300 Untersuchten keine Enzymaktivität mehr messbar ist. Durch die reduzierte Enzymaktivität kann es zu erheblichen Nebenwirkungen während der Therapie mit Thiopurinen kommen.

Eine auftretende der Mutation im Nukleotid nt G238C hat eine ca. 100 fache Verminderung der Enzymaktivität zur Folge während die Mutationen nt G460A und A719G zu einer 9 fachen Verminderung bzw. 1,4 fachen Verminderung der Enzymaktivität. Die Kombination der Mutation nt G460A und A719G führen zu einer Verminderung der Enzymaktivität um das ca. 200 fache.

Mittels der hier beschriebenen Verfahren ist es möglich bereits vor Beginn der Medikamententherapie die Verträglichkeit zu bestimmen und somit durch stark reduzierte Medikamentendosis bzw. alternative Therapieschemata die Rate der Nebenwirkungen drastisch zu reduzieren.

G238C

Mit den spezifischen Primern H258/H259 wird ein Teil des TPMT-Gens amplifiziert, der die Position G238C enthalten.

Tabelle 71 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des TPMT-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H258	ATAAGTCAGTTTTTCAGAAT	370 Bp
H259	GTGGGGATATGGATACA	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position G238C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H137/H138.

Tabelle 72 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation G238C

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H137	ggtctgcaaacctgcata	Fluorescein
H138	tcatacatTTTACacttaattatgTTTTCAAatgac-taaataga	LC 705

5

10

Das Pipettierschema für die Analysen im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 73 Pipettierschema für den Nachweis beider Mutationen im TPMT-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	50-100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H258	0,3 µM
Primer H259	0,3 µM
Hybridization Probes H137	0,15 µM
Hybridization Probes H138	0,15 µM

15

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 74 Amplifikationsschema für den LightCycler

20

25

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None			Fluorescence Display Mode =			F2
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

30

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification			Fluorescence Display Mode =			F2
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	Single
3	72	20	20	0	0	0	None

Tabelle 75 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	30	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,1	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 28 ist die Analyse für die Mutation G238C graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 64	ca. 51

G460A und A719G

Mit den Primern H260/H261 und H167/168 werden spezifisch die Positionen G460A und A719G enthaltenen TPMT-Genabschnitte amplifiziert.

Tabelle 76 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des TPMT-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse(bp)
H260	cgctgctcatcttcttaaagattt	Bp
H261	gaggtggtgatgattgtgttagtatt	
H167	ATACGTTGTCTTGAGAAGGTTGATG	Bp
H168	CAGGTAACACATGCTGATTGGTAA	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Nukleotide an den Positionen G460A und A719G dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H139/H140 für G460A und H141/H142 für A719G.

Tabelle 77 Sondensequenz für den Nachweis der Mutationen G460A und A719G

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H139	aactaatgctcctctatc	Fluorescein
H140	aatcatgtcaaatttgccaatatt	LC 640
H141	tctgtaagtagaCataac	Fluorescein
H142	tcaaaaagacagtcaattccccaat	LC 705

Das Pipettierschema für die Analysen im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix

muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

5 **Tabelle 78 Pipettierschema für den Nachweis beider Mutationen im TPMT-Gen**

	Endkonz.
DNA-Template	50-100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H260	0,5 µM
Primer H261	0,5 µM
Primer H167	0,5 µM
Primer H168	0,5 µM
Hybridization Probes H139	0,15 µM
Hybridization Probes H140	0,15 µM
Hybridization Probes H141	0,15 µM
Hybridization Probes H142	0,15 µM

Die Analyse wird in einem Multiplexansatz durchgeführt. Nachfolgend ist die Programmierung des Light-Cycler aufgelistet.

Tabelle 79 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	64	10	20	0	0	0	Single
3	72	18	20	0	0	0	None

Tabelle 80 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	30	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,1	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In den Fign. 29 und 30 sind die Analysen für die Mutationen G460A bzw. A719G graphisch dargestellt.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C): nt 640	ca. 55,5	ca 45
Schmelzpunkt (°C): nt 719	ca. 41	ca. 53

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

Die Figuren 45 A und 45 B geben eine Liste der nachweisbaren TPMT-Allele, wobei mit „+“ das Vorhandensein der Mutation und mit „-“ der Wildtyp bezeichnet sind. Hier ist wiederum in der linken Spalte eine Benennung und in der rechten Spalte der zu der jeweiligen Allelkombination gehörende Phänotyp bezeichnet. Figur 45 B gibt für verschiedene Kombinationen der

beiden Gene eines Menschen den zugehörigen potenziellen Phänotyp an.

MTHFR

Der MTHFR Polymorphismus wird assoziiert mit einer Erniedrigung der Enzymaktivität. Bei einer homozygoten Mutation für die Mutation nt C667T besteht eine Restaktivität von ca. 30% und bei heterozygoten Träger von 65%.

Ebenso ist die Restaktivität bei einer Mutation nt A1298C für homozygote Genotypträger auf 65% reduziert und bei heterozygoten wird ebenfalls eine Verminderte Enzymaktivität beschrieben.

Kombinierte heterozygote Genotypen mit A1298C und C677T wird mit einer 50 - 60%igen Enzymaktivitätsmin- derung assoziiert gegenüber einem alleinigen Hetero- zygoten C677T Träger.

C677T und A1298C

Mit den Primern H111/H112 und H113/114 werden spezi- fisch der die Positionen C677T und A1298C enthaltenen MTHFR-Genabschnitte amplifiziert.

Tabelle 81 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des MTHFR-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse(bp)
H111	GCCTCTCCTGACTGTCATCCCT	266 Bp
H112	AGTGGGGTGGAGGGAGCTTA	
H113	TGCCTTTGGGGAGCTGAAG	352 Bp
H114	CAGGCTGTCTTTGCCTCCCTA	

Zusätzlich werden Hybridisierungs-sonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Nukleotide an der Positionen C677T und A1298C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im

Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H163/H164 für C677T und H165/H166 für A1298C.

5 **Tabelle 82 Sondensequenz für den Nachweis der Mutationen C677T und A1298C**

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H163	cgggagCcgatttcatca	Fluorescein
H164	cgcagcttttctttgaggctgacaca	LC 640
H165	agtgaagCaagtgtcttt	Fluorescein
166	gtctttgttctttacctctcggga	LC 705

Das Pipettierschema für die Analysen im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 83 Pipettierschema für den Nachweis beider Mutationen im MTHFR-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	50-100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	2,5 mM
Primer H 111	0,3 µM
Primer H 112	0,3 µM
Primer H 113	0,3 µM
Primer H 114	0,3 µM
Hybridization Probes H 163	0,15 µM
Hybridization Probes H 164	0,15 µM
Hybridization Probes H 165	0,15 µM
Hybridization Probes H 166	0,15 µM

Die Analyse wird in einem Multiplexansatz durchgeführt. Nachfolgend ist die Programmierung des Light-Cycler aufgelistet.

Tabelle 84 Amplifikationsschema für den LightCycler

5	Denaturation							
	Cycles	1						
	Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
	Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
	1	95	120	20	0	0	0	None
10	Amplification							
	Cycles	45						
	Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
	Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
	1	95	1	20	0	0	0	None
15	2	61	10	20	0	0	0	Single
	3	72	18	20	0	0	0	None

20

Tabelle 85 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

25	Melting Curve							
	Cycles	1						
	Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
	Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
	1	95	10	20	0	0	0	None
30	2	35	150	20	0	0	0	None
	3	85	0	0,2	0	0	0	Continuous
35	Cooling							
	Cycles	1						
	Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
	Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
	1	40	30	20	0	0	0	None

40

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In den Fign. 31 und 32 sind die Analysen für die Mutationen C677T bzw. A1298C graphisch dargestellt.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C): nt 677	ca. 61,5	ca. 52,5
Schmelzpunkt (°C): nt 1298	ca. 43	ca. 56,5

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

10 **Paraoxonase**

Die Paraoxonase hydrolysiert Organophosphate (Insektenvertilgungsmittel und Nervengase). Diese Aryldialkylphosphatase kann mit der Anfälligkeit menschlicher Leberkarzinome möglicherweise in Verbindung stehen.

Für die Paraoxonase wurde starke Expressionsunterschiede beobachtet.

20 Die Mutation im Exon3 (Aminosäureaustausch L55M) hat eine erniedrigte Enzymaktivität bei reduziertem mRNA Level zur Folge.

25 Der Wildtyp im Exon6 (Aminosäureaustausch Q192R) geht einher mit einer Substrat abhängigen kinetischen Variation des Enzyms. Es zeigt einen erhöhten Vmax für Diazoxon- und Sarin-Hydrolyse gegenüber der Mutation im Gegensatz zum Substrat Paraoxon. Zudem hat die Mutation 192R (Arginin) eine höhere Aktivität der Paraoxonase gegenüber den 192Q (Glutamin).

30

L55M und Q192R

Mit den Primern H115/H116 und H117/118 werden spezifisch, der die Veränderung der Aminosäure L55M und Q192R enthaltenen Paraoxonase-Genabschnitte, amplifiziert.

Tabelle 86 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des Paraoxonase-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse(bp)
H115	TAGCCCCAGTTTCAAGTGAGG	243 Bp
H116	GTGGGCATGGGTATACAGAAAG	
H117	GTCTAAGGATTGTATCGGCAGG	377 Bp
H118	TGCCATCGGGTGAAATGT	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung der Nukleotide an den Positionen L55M (T>A) und Q192R (A>G) dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H171/H172 (L55M) und H173/H174 (Q192R).

Tabelle 87 Sondensequenz für den Nachweis der Aminosäureveränderungen L55M und Q192R

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H171	tggctctgaagacAtgga	Fluorescein
H172	actgcctaattggactggctt	LC 705
H173	ctcccaggatCgtaagta	Fluorescein
H174	gtcaagaaaatagtgatcatttgtgcca	LC 640

Das Pipettierschema für die Analysen im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

**Tabelle 88 Pipettierschema für den Nachweis beider Mutationen im
Paraoxonase-Gen**

	Endkonz.
DNA-Template	50-100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,5 mM
Primer H 115	0,3 µM
Primer H 116	0,3 µM
Primer H 117	0,3 µM
Primer H 118	0,3 µM
Hybridization Probes H 171	0,15 µM
Hybridization Probes H 172	0,15 µM
Hybridization Probes H 173	0,15 µM
Hybridization Probes H 174	0,15 µM

Die Analyse wird in einem Multiplexansatz durchge-
führt. Nachfolgend ist die Programmierung des Light-
Cycler aufgelistet.

Tabelle 89 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	61	10	20	0	0	0	Single
3	72	18	20	0	0	0	None

Tabelle 90 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	150	20	0	0	0	None
3	85	0	0,2	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

In den Fig. 33 und 34 sind die Analysen für die Mutationen L55M (T>A) bzw. Q192R (A>G) graphisch dargestellt.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C): L55M	ca. 45,5	ca. 57,0
Schmelzpunkt (°C): Q192R	ca. 47,5	ca. 59

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

CYP2C9

Das CYP2C9 ist an der Biotransformation von zahlreichen therapeutischen Substraten, wie z.B. Satinen, beteiligt. Die Allele CYP2C9*2 und CYP2C9*3 die die Mutationen C430T bzw. A1075C tragen, sind ursächlich

an der Veränderung der katalytischen Enzymaktivität beteiligt ("poor metabolizers-PM"). Die Mutation C430T führt zu einem Aminosäureaustausch R144C und damit zu einer verringerten Umsatzgeschwindigkeit. Die zweite wichtige Mutation A1075C führt zu dem Aminosäurewechsel I359L. Die Folge ist eine stereospezifische Konformationsänderung und damit zu einer verminderten Enzymaktivität. Die aus den beiden Mutationen resultierenden Genotypen kommen mit einer Häufigkeit von 6 - 8 % vor.

C430T

Mit den spezifischen Primern H183.1/H184.1 wird ein Teil des CYP2C9-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position C430T enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 91 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2C9-Gens

Primernamen	Primersequenz	Größe (bp)
H183.1	CAGCAATGGAAAGAAATGGAAG	226 Bp
H184.1	ATGGCCACCCCTGAAATG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position C430T dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H223/H222.

Tabelle 92 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation C430T

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H223	gaagcccgtgccttg	LC 640
H222	attgaggacCgtgttcaa	Fluorescein

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 93 Pipettierschema für den Nachweis der Mutationen nt 430 im CYP2C9

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer H 183.1	0,4 µM
Primer H 184.1	0,4 µM
Hybridization Probes H 223	0,15 µM
Hybridization Probes H 222	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 94

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	150	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	61	10	20	0	0	0	Single
3	72	16	20	0	0	0	None

Tabelle 95

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	45	60	10	0	0	0	None
3	35	60	0,5	0	0	0	Continuous
4	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 35 ist die Analyse für die Mutationen C430T graphisch dargestellt.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 59	ca. 49

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

A1075C

Mit den spezifischen Primern H248/H249.2 wird ein Teil des CYP2C9-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position A1075C enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 96 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2C9-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H 248	GTCCAGGAAGAGATTGAACGTG	229 Bp
H 249.2	GGGACTTCGAAAACATGGAG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position A1075C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H225/H226.

Tabelle 97 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation A1075C

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H 225	cccaccagcctgcccc	LC 705
H 224	cagagatacCttgacctt	Fluo- rescein

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 98 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation nt 1075 im CYP2C9-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3 mM
Primer H 248	0,4 µM
Primer H 249.2	0,4 µM
Hybridization Probes H 225	0,15 µM
Hybridization Probes H 224	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 99 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	63	8	20	0	0	0	Single
3	72	12	20	0	0	0	None

Tabelle 100 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,1	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 36 ist die Analyse für die Mutationen A1075C graphisch dargestellt.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 44,5	ca. 55,5

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

CYP2C19

Ein weiteres wichtiges Isoenzym des Arzneimittel-Stoffwechsels wird durch das CYP2C19-Gen codiert. Es ist im Stoffwechsel bekannter Antikonvulsiva wie S-Mephénytoin involviert. Dieses Enzym fungiert teil-

weise als alternativer Stoffwechselweg neben CYP2D6. Die Mutationen nt G636A und nt G681A führen zu einem PM-Phänotyp (langsame Metabolisierer). In der kaukasischen Bevölkerung haben ca. 5% einen PM-Phänotyp. Die Mutationen nt G636A hat einen vorzeitiges Stop Codon zur Folge, während die Mutation nt G681A einen Splissedefekt im Exon5 nach sich zieht.

G636A

Mit den spezifischen Primern H181/H182 wird ein Teil des CYP2C19-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position G636A enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 101 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2C19-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H181	CCAATCATTTCAGCTTCACCCTG	2613Bp
H182.2	CTTCAGGGCTTGGTCAATATAG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position 636A dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H227/H226.

Tabelle 102 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation G636A

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H262	accccctgAatccaggta	LC 640
H263	ccaagttttttgcttcctga-gaaaccac	Fluorescein

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 103 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation G636A im CY2C19-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	4 mM
Primer H 181	0,3 µM
Primer H 182	0,3 µM
Hybridization Probes H 127	0,15 µM
Hybridization Probes H 126	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 104 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	62	10	20	0	0	0	Single
3	72	16	20	0	0	0	None

Tabelle 105 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 37 ist die Analyse für die Mutationen G636A graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	Ca. 50,5	ca.

G681A

Mit den spezifischen Primern H244.2/H245.2 wird ein Teil des CYP2C19-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position G681A enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 106 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2C19-Gens

Primernamen	Primersequenz	Grösse (bp)
H244.2	AATTACAACCAGAGCTTGGC	169Bp
H245.2	TATCACTTTCATATAAAGCAAG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position G681A dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H243/H242.

Tabelle 107 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation nt 681

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H243	agtgggaaaattattgca-tatctaagag	LC 705
H242	tccCgggaaataatcaat	Fluorescein

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 108 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation G681A im CYP2C19-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	4 mM
Primer H 244.2	0,3 µM
Primer H 245.2	0,3 µM
Hybridization Probes H 243	0,15 µM
Hybridization Probes H 242	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

5 **Tabelle 109 Amplifikationsschema für den LightCycler**

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	62	10	20	0	0	0	Single
3	72	16	20	0	0	0	None

10 **Tabelle 110 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse**

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

25 Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 38 ist die Analyse für die Mutationen G681A graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 44,5	ca. 53

CYP2E1

Das CYP2E1 ist maßgeblich in dem Metabolismus bekannte Medikamente (z.B. Paracetamol und Enfluran) involviert. Zusätzlich ist es an der Biotransformation kleiner Moleküle (z.B. von Ethanol) beteiligt. Die Mutationen in der 5' flankierenden Region G-1293C und C-1053T führen zu einem veränderten Expressionslevel. Die Auswirkung der Mutation T7632A ist bislang nicht beschrieben worden allerdings mit dem Polymorphismus der G-1293C und C-1053 gekoppelt. Bei etwa 99% tritt in der europäischen Bevölkerung der Wildtyp im CYP2E1 Polymorphismus auf.

G-1293C

Mit den spezifischen Primern H256.1/H257.1 wird ein Teil des CYP2E1-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position G-1293C enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 111 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2E1-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H256.1	CCAAGGCTTCAATTCAGTC	832 Bp
H257.1	TCTTGTCTTGTTGATCCCG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position G-1293C dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H208/H209.

Tabelle 112 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation G-1293C

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H208	taacactgcaCctctcct	Fluo- rescein
H209	ccaagaaggggcgttggc	LC 705

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen.

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 113 Pipettierschema für den Nachweis der Mutationen nt -1293 im CYP2E1-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,0 mM
Primer H 256.1	0,25 µM
Primer H 257.1	0,25 µM
Hybridization Probes H 208	0,15 µM
Hybridization Probes H 209	0,15 µM

5

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 114 Amplifikationsschema für den LightCycler

10

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

15

20

25

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	62	10	20	0	0	0	Single
3	72	16	20	0	0	0	None

Tabelle 115 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

30

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

35

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 39 ist die Analyse für die Mutationen G-1293C graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt	ca. 54,5	ca. 61,5
(°C):		

C-1053T

Mit den spezifischen Primern H244/H245 wird ein Teil des CYP2E1-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position C-1053T enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 116 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2E1-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H256.1	CCAAGGCTTCAATTTTCAGTC	832 Bp
H257.1	TCTTGTCTTTGTTGATCCCG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position C-1053T dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H206/H207.

Tabelle 117 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation C-1053T

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H206	taaaagtaCaaaattgca	Fluo- rescein
H207	tatgaattaagaacttctatatattg	LC 640

5 Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler
ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich
auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-
Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix
muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe einge-
10 plant werden.

Tabelle 118 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation C-1053T im CYP2E1-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,0 mM
Primer H 256.1	0,25 µM
Primer H 257.1	0,25 µM
Hybridization Probes H 206	0,15 µM
Hybridization Probes H 207	0,15 µM

15 Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler
aufgelistet.

Tabelle 119 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	62	10	20	0	0	0	Single
3	72	16	20	0	0	0	None

Tabelle 120 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 40 ist die Analyse für die Mutationen C-

1053T graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 61	ca. 52,5

T7632A

Mit den spezifischen Primern H204/H205 wird ein Teil des CYP2E1-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die Position T7632A enthalten, der sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 121 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des CYP2E1-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H204.1	CTGCTGCTAATGGTCACTTG	808 Bp
H205.1	TTGGCTCCTTCACCCTTCAC	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position T7632A dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H208/H209.

Tabelle 122 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation T7632A

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H210	ctgattaaaaattAaaaaaaaa	Fluo- rescein
H211	ttttggctgggcacagt	LC 705

5 Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen.

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe eingeplant werden.

Tabelle 123 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation T7632A im CYP2E1-Gen

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,0 mM
Primer H 204.1	0,25 µM
Primer H 205.1	0,25 µM
Hybridization Probes H 208	0,15 µM
Hybridization Probes H 209	0,15 µM

20 Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 124 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	2	20	0	0	0	None
2	62	10	20	0	0	0	Single
3	72	16	20	0	0	0	None

Tabelle 125 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	35	120	20	0	0	0	None
3	85	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2 / F3	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	35	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 41 ist die Analyse für die Mutationen T7632A graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation

/ Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt (°C):	ca. 38	ca. 51

5

DPD

Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Katabolismus der Pyrimidinbasen Uracil und Thymin. Ebenso katalysiert es den physiologischen Abbau des strukturell dem Pyrimidin ähnlichen Antimetabolit 5-Fluoruracil (5-FU). Im Normalfall (extensive metabolizer) werden mehr als 80 % des verabreichten 5-FU innerhalb kurzer Zeit abgebaut. Hinsichtlich der leukozytären DPD-Aktivität kann die Verstoffwechselung des 5-FU jedoch patientenabhängig um einen Faktor 10 variieren. Bei ca. 3-5 % aller mit 5-FU therapierten Patienten werden toxisch bedingte Störungen (Mukositis, Kardiotoxizität, neurologische Störungen) beobachtet. Auch Todesfälle infolge eines Multiorganversagens nach 5-FU Therapie sind bereits aufgetreten. Ursache ist eine erniedrigte Aktivität der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, die bei ca. der Hälfte aller Patienten auf eine fehlerhafte Reifung der mRNA zurückzuführen ist. Eine solche mRNA enthält nicht mehr das kodierende Exon 14. Hierbei ist eine Konsensussequenz für korrektes Spleissen der RNA am Übergang Exon14/Intron 14 im Gen der DPD mutiert. Es entsteht eine um 165 bp verkürzte mRNA und in der Folge ein um 55 Aminosäuren verkürztes und inaktives Enzym. In Untersuchungen zeigten Patienten starke 5-FU Toxizitäten, von denen ca. 20 % heterozygot und ca. 4 % homozygot für die Exon 14-Skipping Mutation waren (gesamt ca. 20-25 %).

10

15

20

25

30

IVS 14 + 1G > A

Mit den spezifischen Primern H264/H265 wird ein Teil des DPD-Gens amplifiziert, der für die Enzymaktivität mitverantwortlich ist. In diesem Amplifikat ist die mögliche Mutation IVS 14 + 1G > A enthalten, die sich bei Veränderung auf die Enzymaktivität auswirken kann.

Tabelle 126 Primersequenz zur spezifischen Amplifizierung des DPD-Gens

Primername	Primersequenz	Grösse (bp)
H264	GCAAAAATGTGAGAAGGGACC	326 Bp
H265	CACCAACTTATGCCAATTCTCTTG	

Zusätzlich werden Hybridisierungssonden eingesetzt, die zur Bestimmung des Nukleotids an der Position IVS 14 + 1G > A dienen. Dieser Nachweis erfolgt im Anschluss an die PCR mittels Schmelzkurvenanalyse mit den Sonden H266/H267.

Tabelle 127 Sondensequenz für den Nachweis der Mutation IVS 14 + 1G > A des DPD-Gens

Sondenname	Sondensequenz	Markierung
H266	aatcacacttaCgttgctc	Fluo- rescein
H267	aaagtcagccttttagttcagt	LC 640

Das Pipettierschema für die Analyse im LightCycler ist nachfolgend aufgeführt. Der Ansatz bezieht sich auf einen 1x Ansatz. Für die Messung kann ein Master-Mix in x-facher Menge angesetzt werden. Für jeden Mix muss eine Negativprobe (H₂O) und Positivprobe einge-

plant werden.

Tabelle 128 Pipettierschema für den Nachweis der Mutation IVS 14 + 1G > A des DPD-Gens

	Endkonz.
DNA-Template	100 ng
DNA Master Hybridization Probes (10x) (Roche)	1 x
MgCl ₂	3,0 mM
Primer H 264	0,5 µM
Primer H 265	0,5 µM
Hybridization Probes H 266	0,15 µM
Hybridization Probes H 267	0,15 µM

Nachfolgend ist die Programmierung des LightCycler aufgelistet.

Tabelle 129 Amplifikationsschema für den LightCycler

Denaturation							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	120	20	0	0	0	None

Amplification							
Cycles	45						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	1	20	0	0	0	None
2	64	10	20	0	0	0	Single
3	72	18	20	0	0	0	None

Tabelle 130 Bedingung für die Schmelzkurvenanalyse

Melting Curve							
Cycles	1						
Type:	Melting Curve		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	30	10	20	0	0	0	None
3	80	0	0,4	0	0	0	Continuous

Cooling							
Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/F1 bzw. F3/F1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp(°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

Der Genotyp ergibt sich aus dem detektierten Nukleotid. In Fig. 42 ist die Analyse für die Mutationen
IVS 14 + 1G > A graphisch dargestellt.

Die sich aus der Schmelzkurve ergebenden Schmelzpunkte erlauben die Einteilung in den homozygoten (Mutation / Wildtyp) und heterozygoten Genotypen. Der Genotyp ergibt sich aus den detektierten Mutationen und der in der Literatur beschriebenen Nomenklatur.

	Wildtyp	Mutation
Schmelzpunkt	ca. 57	ca. 47
(°C):		

Im folgenden werden nun Beispiele für chipbasierende Diagnosesysteme gegeben, mit denen eine minimalinvasive, sichere und zuverlässige Bestimmung der oben beschriebenen Mutationen durchgeführt werden kann.

Figur 46 zeigt einen Diagnosechip, auf dem in einzelnen Feldern, diese sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet, Hybridisierungssonden jeweils zu dem Wildtyp bzw. zur jeweiligen Mutante der einzelnen SNP's der NAT2, der TPMT und der CYP3A4 angeordnet wurden. Die Position der Hybridisierungssonden für die einzelnen Allele sind in Fig. 46 eingetragen. Fig. 46 zeigt dabei ein Beispiel für den Nachweis der SNPs 1334T>C (Heterozygot) und 664T>C (Wildtyp) im CYP3A4-Gen, 460G>A (Wildtyp) im TPMT-Gen, sowie 282C>T (Wildtyp) und 857G>A (Wildtyp) im NAT2-Gen. Die Hybridisierungssonden sind in der nachfolgenden

Tabelle 131 angegeben, wobei in der zweitletzten Spalte jeweils der Vorwärtsprimer und der Rückwärtsprimer zur PCR-Amplifikation des für das Allel relevanten Sequenzabschnittes angegeben sind und in der letzten Spalte für jedes Allel zuoberst die Sondensequenz zur Erfassung des Wildtyps und darunter die Sondensequenz zur Erfassung der Mutation angegeben sind.

Tabelle 131

Chip-Position	Gen	Mutation	Nukleotidaustausch	Detektion	Primersequenz	Sondensequenz
1334	CYP3A4	1334	T>C	T/C	TTGAAGGAGAAGTCTGAAGGAC	ACTTATTGAGAG
					GAAGTGGACCCAGAACTGCATT	CTTATTGGGAGA
460	TPMT	460	G>A	G/G	CCATTTCGATCACCTGGATTA	CTAATGCTCCTC
					GGACGCTGCTCATCTTCTAAAGA	CTAATGTCCTC
664	CYP3A4	664	T>C	T/T	CCATTTCGATCACCTGGATT	ATTGAGAGAAAG
					GGGGACGCTGCTCATCTTCTTAA	ATTGGGAGAAAG
282	NAT2	282	C>T	C/C	AGACCCAGCATCGACAATGT	CTGGAGGGATGT
					CGGTTTTCAGACCACAATGTTAGG	CTGGAGGGATAT
857	NAT2	857	G>A	G/G	GGGTGATACATACACAAGGGTTATTT	TCCATCACCAGG
					TAAAACTCTCACTGAGGAAGAGGTTG	GGGATTCATCAC

In der linken und rechten Reihe in Figur 46 befinden sich Kontroll-Spots. Die Sonden zur Bestimmung eines SNP's sind immer Vierfach im Rechteck angeordnet. Dadurch wird für jede Mutation eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Weiterhin sind neben der Sonde zur Bestimmung der Mutation auch eine Sonde zur Bestimmung des Wildtyps aufgetragen, das heißt ein Oligonukleotid immobilisiert, daß mit dem Wildtyp, nicht jedoch mit dem mutierten Typ hybridisiert. Somit ergeben sich für jeden zu bestimmenden SNP 8 Positionen. Da jeder Proband zwei Allele jedes Gens aufweist, bedeutet dies, daß das Auftreten von lediglich vier im Viereck angeordneten Signalen zwischen der linken und der rechten Reihe von Kontroll-Spots einen homozygoten Träger entweder des Wildtyps oder der Mutation andeutet. Sind alle acht Signal-Spots erkennbar, so

ist der Proband ein heterozygoter Träger der Mutation. Im Falle des Probanden der Fig. 46 handelt es sich also um einen heterozygoten Träger der Mutation CYP3A4 T1334G sowie homozygoten Träger der Allele TPMT 460G, CYP3A4 664T, NAT2 282C und NAT2 857G.

Die einzelnen Spots in diesem Nukleotidarray haben eine Größe von 50-200 µm, wobei die Proben auf den Chip erst nach PCR-Amplifizierung, mit Primern wie in Tabelle 131 beschrieben, und Aufreinigung aufgetragen wurden. Dadurch wird die Zahl der Probenmoleküle erhöht.

Der Chip ist als Glas-Slide ausgeführt, der anschließend automatisch ausgewertet werden kann. Selbst die Erstellung des Befundes kann anschließend nach Erfassung der einzelnen Spots automatisch erfolgen.

Das Verfahren zur chipbasierenden SNP-Diagnostik beinhaltet die Methode der DNA-Oligonukleotid Microarrays. Auf dem DNA-Chip werden spezifische Nukleotidsequenzen auf eine definierte Position hybridisiert und immobilisiert. Die genomische DNA der zu untersuchenden Probe wird spezifisch durch PCR-Methoden amplifizierte und auf den DNA-Chip hybridisiert. Die Detektion geschieht über signalgebende Hybridisierung. Dabei wird der über Biotin-Streptavidin-Cy5 gekoppelte Hybrid mittels Laser angeregt. Die Signalgebung wird anschließend vollautomatisch ausgewertet und als Befund dem Arzt übermittelt.

Durchführung

Über herkömmliche DNA-Extraktionsverfahren wird DNA aus Vollblut gewonnen. 100-500 ng DNA werden in einer

asymmetrischen PCR mit spezifischem Primern eingesetzt. Die für die Hybridisierung notwendige HybLösung setzt sich aus 50 µl PCR-Produkt und 50 µl Hybridisierungslösung (0,25xSSCT(0,02%)) zusammen. Nachfolgend ist das Hybridisierungsprotokoll aufgeführt.

Schritt 1: Hybridisierung

Die HybLösung wird für 5 min auf 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. 45 µl der denaturierten HybLösung wird auf den DNA-Chip gegeben, mit einem CoverSlip abgedeckt und für 3 Std. bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Schritt 2: Waschen 1

Der CoverSlip wird in 0,1xSSC/0,1%SDS vom DNA-Chip runtergespült und anschließend in 37°C vorgewärmte Waschlösung 1 (0,1xSSC/0,1%SDS) für 20 min/ 37°C unter leichtem Schütteln gewaschen.

Waschen 2

Der DXA-Chip wird dann in 37°C vorgewärmter Waschlösung 2(0,1xSSC) für 20 min/ 37°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend wird der DNA-Chip getrocknet.

30

Schritt 3: Färben

50 µl von Färbelösung (Streptavidin - label. z.B. Cy5) wird auf den DNA-Chip gebracht und mit einem CoverSlip abgedeckt. Die Inkubation erfolgt anschließend für 30 min bei 37°C in einer Feuchtkammer.

Schritt 4: Waschen

Schritt 2 wiederholen.

5

Schritt 5: Scannen

Chipdesign

10 Ein beispielhaftes Chipdesign und die Anordnung der immobilisierten Nukleotide auf dem DNA-Chip sind nachfolgend beispielhaft für 7 SNPs der NAT2 dargestellt.

15 Cluster 1

Leiter	191 Wt	191 Mt	590 Wt	590 Mt	Leiter
Leiter	282 Wt	282 Mt	803 Wt	803 Mt	Leiter
Leiter	341 Wt	341 Mt	857 Wt	857 mt	Leiter
Leiter	481 Wt	481 Mt	Leiter	Leiter	Leiter

Links und rechts von den Zielsequenzen ist eine Leiter anliegend, die Positivkontrollen mit beinhaltet.
 20 Auf dem DNA-Chip ist sowohl die Wildtyp- als auch die Mutationssequenz des entsprechenden SNPs immobilisiert. Bei der Hybridisierung und den anschließenden Waschschritten bleiben spezifisch nur die 100 %igen Homologien zwischen dem PCR-Produkt und den immobilisierten Nukleotiden auf dem DNA-Chip bestehen.
 25 Dadurch ist nach anschließender Anregung des Cy5 an bestehenden Hybriden eine Diskriminierung für den Wildtyp, den Heterozygoten oder die Mutation möglich.

30 Zur zusätzlichen Überprüfung auf reproduzierte Ergebnisse wird der Cluster 1 in vierfacher Wiederholung nach unten wiederholend auf den DNA-Chip angeordnet.

Beispiele von single PCR-Hybridisierungen sind in Figur 47 dargestellt für die Mutation 481C>T, 590G>A, 803A>G und 857G>A.

5

Fig. 47 zeigt insgesamt 3 (Array-Zeilen) x 4 (Array-Spalten) Arrays von jeweils 4 (Spot-Zeilen) x 6 (Spot-Spalten) Spots. In jeder Arrayspalte ist dabei viermal untereinander derselbe Array wiederholt. Jeder Array besitzt dabei als linke und rechte Spot-Spalte eine Leiter.

10

Die Arrays der linken Arrayspalte weisen in der 4ten Spot-Zeile in der zweiten Spot-Spalte einen positiven Spot zur Erfassung des Allels 481G (Wildtyp) und in der dritten Spot-Spalte einen positiven Spot zur Erfassung des Allels 481T (Mutation) auf. Die Arrays der mittleren Arrayspalte weisen in Spot-Zeile 1 in Spot-Spalte 4 bzw. 5 je einen positiven Spot zur Erfassung des Allels 590G (Wildtyp) bzw. 590A (Mutation) auf. Die Arrays der rechten Arrayspalte weisen in Spot-Zeile 2 bzw. 3 in Spot-Spalte 4 bzw. 5 einen Spot zur Erfassung des Allels 803A (Zeile 2 Spalte 4), 803G (Zeile 2 Spalte 5), 857G (Zeile 3 Spalte 4) bzw. 857A (Zeile 3 Spalte 5) auf. Bei dem Proband der Fig. 47 handelt es sich offensichtlich um einen heterozygoten Träger der Allele 481G, 481T, 590G, 590A, 803A, 803G und homozygoten Träger des Allels 857G.

15

20

25

30

Patentansprüche

- 5 1. Diagnose-Kit für die Bestimmung der Medikamenten-
 verträglichkeit eines Menschen mit
 mindestens zwei Paaren Oligonukleotiden (Reverse-
 primer, Forwardprimer),
 wobei die beiden Oligonukleotide jedes Paares als
10 Primer zur Amplifikation mittels Polymeraseketten-
 reaktion jeweils eines der beiden komplementären
 Stränge eines gesuchten DNS-Abschnittes geeignet
 sind, und
 wobei der jeweils einem Paar Oligonukleotide zuge-
15 ordnete gesuchte DNS-Abschnitt Teil des Gens eines
 der menschlichen Enzyme der Phase I und/oder Phase
 II des Entgiftungsstoffwechsels und vom dem dem
 anderen Paar Oligonukleotide zugeordneten gesuch-
 ten DNS-Abschnitt verschieden ist.
- 20
2. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, da-
 durch gekennzeichnet, daß der jeweils einem Paar
 Oligonukleotide zugeordnete gesuchte DNS-Abschnitt
 Teil des Gens eines der menschlichen Enzyme NAT2,
25 CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, mEH, TPMT, MTHFR, Paraoxo-
 nase, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 und/oder DPD ist und
 mindestens zwei der folgenden Polymorphismen
 G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G, G857A
 des Gens der NAT2,
30 C100T, G1661C, 1707delT, G1758T, G1846A, 2549delA,
 2613_2615delAGA, C2850T, A2935C, G4180C des Gens
 der CYP2D6,

- G-3858A, C-164A des Gens der CYP1A2,
 A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C des
 Gens der CYP3A4,
 T337C, A416G des Gens der MEH,
 5 G238C, G460A, A719G des Gens der TPMT,
 C677T, A1298C des Gens der MTHFR,
 L55M (Aminosäureaustausch), Q192R (Aminosäureaus-
 tausch) des Gens der Paraoxonase,
 C430T, A1075C des Gens der CYP2C9,
 10 G636A, G681A des Gens der CYP2C19,
 G-1293C, C-1053T, T7632A des Gens der CYP2E1
 und/oder IVS 14 + 1G > A des Gens der DPD
 enthält.
- 15 3. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprü-
 che, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein
 Primerpaar enthaltend oder bestehend aus den fol-
 genden Sequenzen(in 5'- 3'-Richtung):
 TTCTTGAGCACCAGATCCGG und ACGTGAGGGTAGAGAGGATAT ;
 20 CCCATTTGGTAGTGAGGCAGGTAT und AAATGCCCTTCTCCAGGACGT ;
 GTCTTCCCTGAGTGCAAAGGC und ATCACCACCGGAGTGGTT ;
 AGACCAGGGGAGCATAGGGTT und AAAGCCCGACTCCTCCTTCAGT ;
 ACCTCCTATCCACGTCAGAGAT und AGCATACGGGACAGAAC ;
 GTTCTGTCCCGAGTATGCTCT und ATCCTGGTCAAGCCTGTGCTTGG ;
 25 CACCATGGTGTCTTTGCTTTCC und CCTCAACGTACCCCTGTCTCAA ;
 ACAACAGGGACTTCTTGATGC und CACTTGAGTGAGGCCAGGAGTT
 GAACTCCTGGTCCCTTGGGT und TGCGTGTCTGTGCTTGGC ;
 TCTGTCTGTCTGGGTTTGA und CACCTTGAAGTTGGCAAAG ;
 CCCATCACCCAGTAGACAGT und GCAGCTCAAATTCAGTGGAC ;
 30 CACATCTTTCTCCACTCAGCG und GATGACAGGGTTTGTGACAGG ;
 AGAAGGGAGATCAAGGACCACGC und AGGTTTGCTTAGGGTTGCCC ;
 AAATCTACCAACGTGGAACC und CTCCAGAACTGAAGCACCT ;
 GAACACATCCGCTTTGGAGTAGC und ATACATCCCTCTCTGGCTGGC ;
 GCACCTAAGGGTGGCAGGACTCA und CAGTTATGGAACCTCTAGCAGCC;

ATAAGTCAGTTTTTCAGAAT und GTGGGGATATGGATACA;
CGCTGCTCATCTTCTTAAAGATTT und GAGGTGGTGATGATTGTGTAGTATT;
ATACGTTGTCTTGAGAAGGTTGATG und CAGGTAACACATGCTGATTGGTAA;
GCCTCTCCTGACTGTCATCCCT und AGTGGGGTGGAGGGAGCTTA ;
5 TGCCTTTGGGGAGCTGAAG und CAGGCTGTCTTTGCCTCCCTA ;
TAGCCCCAGTTTCAAGTGAGG und GTGGGCATGGGTATACAGAAAG ;
GTCTAAGGATTGTATCGGCAGG und TGCCATCGGGTGAAATGT;
CAGCAATGGAAAGAAATGGAAG und ATGGCCACCCCTGAAATG ;
GTCCAGGAAGAGATTGAACGTG und GGGACTTCGAAAACATGGAG ;
10 CCAATCATTTAGCTTCACCCTG und CTTCAGGGCTTGGTCAATATAG ;
AATTACAACCAGAGCTTGGC und TATCACTTTCCATAAAAGCAAG ;
CCAAGGCTTCAATTTAGTC und TCTTGTCTTTGTTGATCCCG ;
CCAAGGCTTCAATTTAGTC und TCTTGTCTTTGTTGATCCCG ;
CTGCTGCTAATGGTCACTTG und TTGGCTCCTTCACCCTTCAC;
15 sowie
GCAAAAATGTGAGAAGGGACC und CACCAACTTATGCCAATTCTCTTG.

4. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
gekennzeichnet durch mindestens zwei weitere
20 Paare Oligonukleotide (),
wobei die beiden Oligonukleotide je eines Paares
als Hybridisierungs sonden zum Nachweis einer Nu-
kleotidsequenz je einer der gesuchten DNS-
Abschnitte geeignet sind.

5. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, da-
durch gekennzeichnet, daß die beiden Hybridisie-
rungs sonden Sequenzen aufweisen, die aneinander
anschließend und komplementär zu einem Einzel-
30 strang eines Allels des Gens eines der menschli-
chen Enzyme NAT2, CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, mEH,
TPMT, MTHFR, Paraoxonase, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1
und/oder DPD ist und

mindestens eines der Oligonukleotide in hybridisiertem Zustand sich über den Locus eines der folgenden Polymorphismen

G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G, G857A

5

des Gens der NAT2,

C100T, G1661C, 1707delT, G1758T, G1846A, 2549delA,

2613_2615delAGA, C2850T, A2935C, G4180C des Gens

der CYP2D6,

G-3858A, C-164A des Gens der CYP1A2,

10

A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C des

Gens der CYP3A4,

T337C, A416G des Gens der mEH,

G238C, G460A, A719G des Gens der TPMT,

C677T, A1298C des Gens der MTHFR,

15

L55M (Aminosäureaustausch), Q192R (Aminosäureaustausch) des Gens der Paraoxonase,

C430T, A1075C des Gens der CYP2C9,

G636A, G681A des Gens der CYP2C19,

G-1293C, C-1053T, T7632A des Gens der CYP2E1

20

und/oder IVS 14 + 1G > A im Intron 14 des Gens der DPD erstreckt.

6. Diagnose-Kit nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens zwei Paare Oligonukleotide als Hybridisierungssonden bestehend oder enthaltenden folgende Sequenzpaare (in 5'-3'-Richtung):

25

TCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTACTGGGC und AAGAAACCAGGGTGGGTG ;

TCCTAACATTGTGGTCTG und TGGAGGGATGTAAAATA;

30

GCAGGAGAAGGTGAACCATGCC und TCCTGCCGTCAATGGTCA;

AGGAGAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTT und AATCTGGTACCTGGACCAA;

TAAATAAGTATATTTTTTGGTGTCTCTTTGGCA und TTCAATTGTTTCGAGGTTCAA;

AACCTCTTCCTCAGTGAGAG und AATATATTTCTCAGCACTTC;

TAGAATAAGGAACAAAATAAACCCCTTGTG und TGGTGATGAATCCCTTACT;
TGCACGCTACCCACCAGG und CCTGCCACTGCCCCGGGCT;
CGCTTCTCCGTCTCCACC und CGCAACTTGGGCCTGGGCAAGA;
GCAGTGGGTGACCGAGGA und CGCCTGCCTTTGTGCCGCTC;
5 TCTCCCACCCCAAGACG und CTTTCGCCCCAACGGTCTCTTGGACA;
ACTCCTGTGGGTGATGGG und AAGGGCACAAAGCGGGAAGTGG;
CTCACCTTCTCCATCTCT und AGGAAGGCCTCAGTCAGGTC;
CATCTCCCACCCCAAGA und CCCTTTCGCCCCAACGGT;
ACTATGCACAGGTTCTCA und TTGAAGCTGCTCTCAGGGTTCC;
10 CTCATGATCCTACCTCCG und GTGCAGCGTGAGCCCA;
GGTGACCCCATCCCCCTA und GCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAA;
CATGCCCCAGCTTCCCCG und CCTCTCAGATTCAAGCAAT;
ATGGAGCTTAGTCTTTCTGGTATCCAGCTGGG und GGCCCAGGACGCATGGTA;
TATGGCTGTCTCATTTCCAAAATACTTGAAATTCATCCCA und CCTCTCTCCTGCCCTTGT;
15 CATAAATCCCACTGGACCAAAAGGCTAGAGTTCAAAGCAG und CCTCAGCTATAGAGACGGCACT;
AATAAGTATGTGGACTACTATTTCTT und TTTTGGATCCATTCTTTCT;
ACTACTATTTCTTTAATTTATCTTTCTCTC und CTTTCTCCCAATAAGTATG;
AAAAGAACTGAGTCCCACAAAGGT und TGATGATTGACTCTCAGAA;
GTTTCTGGGTCCACTTCCAAAGGGTGTG und AGCAAACCTCGTGCCAAT;
20 TTGCTGATGGTGCACGGCTGGC und GCAGGCCATACCCCGAAG;
TCCACCTGCTTCTTCCAG und TGAGGGTATCTGTTGAGA;
GGACACAGTGTAGTTGGTGTGG und TTTATGCAGGTTTCCAGACC;
AACTAATGCTCCTCTATC und AATCATGTCAAATTTGCCAATATT;
TCTGTAAGTAGACATAAC und TCAAAAAGACAGTCAATTTCCCAAT;
25 CGGGAGCCGATTTTCATCA und CGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACA;
AGTGAAGCAAGTGTCTTT und GTCTTTGTTCTTTACCTCTCGGGA;
TGGCTCTGAAGACATGGA und ACTGCCTAATGGACTGGCTT;
CTCCCAGGATCGTAAGTA und GTCAAGAAAATAGTGATCATTTGTGCCA;
GAAGCCCCTGCTTGG und ATGGCCACCCCTGAAATG;
30 CCCACCAGCCTGCCCC und CAGAGATACCTTGACCTT;
ACCCCCTGAATCCAGGTA und CCAAGTTTTTTGCTTCCTGAGAAACCAC;
AGTGGGAAAATTATTGCATATCTAAGAG und TCCCGGGAAAATAATCAAT;
TAACACTGCACCTCTCCT und CCAAGAAGGGGCGTTGGC;
TAAAAGTACAAAATTGCA und TATGAATTAAGAACTTCTATATATTG;
35 CTGATTAAAAATTAAAAAAA und TTTTGGCTGGGCACAGT; sowie
AATCACACTTACGTTGTC und AAAGTCAGCCTTTAGTTCAGTG.

- 5 7. Diagnose-Kit nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide der Hybridisierungsproben mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind, die ein anderes Signal abgeben, wenn sie aneinander anschließend mit einem DNS-Einzelstrang hybridisiert sind als im nicht hybridisierten Zustand.
- 10 8. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Hybridisierungssonden mindestens eines der Oligonukleotidpaare mit dem Fluorophor 5'-LC-Red640, 5'-LC-Red705 oder 3'-Fluorescein markiert ist.
- 15 9. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zumindest teilweise die zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderlichen Substanzen enthält.
- 20 10. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Durchführung einer Polymerasekettenreaktion erforderliche Substanzen eine Pufferlösung, Magnesiumchlorid, Desoxynukleotid-Triphosphate und/oder eine hitzestabile Polymerase enthält.
- 25 11. Diagnose-Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß es als hitzestabile Polymerase eine Polymerase aus *Thermus aquaticus*
- 30

(Taq-Polymerase) enthält.

12. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es als Positivkontrolle eine DNS-Probe mit mindestens einem der gesuchten DNS-Abschnitte enthält.

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

14. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Anleitung zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion und/oder eine Anleitung zur Durchführung einer Fragmentanalyse enthält.

15. Diagnose-Kit nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Schema zur Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse enthält.

16. Verfahren zur Bestimmung der Bestimmung der Medikamentenverträglichkeit eines Menschen, dadurch gekennzeichnet, daß die allelische Variabilität mindestens zweier Polymorphismen der Gene der menschlichen Enzyme der

Phase I und/oder Phase II des Entgiftungsstoffwechsels in einer Blut-, Gewebe- oder sonstigen Probe des Menschen erfaßt und aus dem Vorhandensein oder Fehlen der Allele der erfaßten Polymorphismen die Medikamentenverträglichkeit des Menschen bestimmt wird.

17. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß Polymorphismen der Gene eines der menschlichen Enzyme NAT2, CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, MEH, TPMT, MTHFR, Paraoxonase, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 und/oder DPD erfaßt werden, und wobei mindestens zwei der folgenden Polymorphismen
- G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G, G857A des Gens der NAT2,
- C100T, G1661C, 1707delT, G1758T, G1846A, 2549delA, 2613_2615delAGA, C2850T, A2935C, G4180C des Gens der CYP2D6,
- G-3858A, C-164A des Gens der CYP1A2, A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C des Gens der CYP3A4,
- T337C, A416G des Gens der mEH,
- G238C, G460A, A719G des Gens der TPMT, C677T, A1298C des Gens der MTHFR, L55M (Aminosäureaustausch), Q192R (Aminosäureaustausch) des Gens der Paraoxonase, C430T, A1075C des Gens der CYP2C9, G636A, G681A des Gens der CYP2C19, G-1293C, C-1053T, T7632A des Gens der CYP2E1 und/oder

IVS 14 + 1G > A im Intron 14 des Gens der DPD
erfaßt werden.

- 5 18. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß aus der Probe die DNS isoliert wird und anschließend die DNS-Fraktion untersucht wird.
- 10 19. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-haltigen Bestandteile der Gewebe- oder Blutprobe zuerst aufkonzentriert werden und anschließend diese Fraktion untersucht wird.
- 15 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS der Probe durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird.
- 20 21. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß zur Vervielfältigung der DNS eines oder mehrere Oligonukleotid-Paare (Forwardprimer und Reverseprimer) verwendet werden, die die folgenden Sequenzen (in 5'-3'-Richtung)
- 25 enthalten oder daraus bestehen:
- TTCTTGAGCACCAGATCCGG und ACGTGAGGGTAGAGAGGATAT ;
- CCCATTGGTAGTGAGGCAGGTAT und AAATGCCCTTCTCCAGGACGT ;
- GTCTCCCTGAGTGCAAAGGC und ATCACCACCGGAGTGGTT ;
- AGACCAGGGGAGCATAGGGTT und AAAGCCCGACTCCTCCTTCAGT ;
- 30 ACCTCCTATCCACGTCAGAGAT und AGCATACGGGACAGAAC ;
- GTTCTGTCCCGAGTATGCTCT und ATCCTGGTCAAGCCTGTGCTTGG ;

CACCATGGTGTCTTTGCTTCC und CCTCAACGTACCCCTGTCTCAA ;
ACAACAGGGACTTCTTGGATGC und CACTTGAGTGAGGCCAGGAGTT
GAACTCCTGGTCCCTTGGGT und TCGTGTTCTGTGCTTGGC ;
TCTGTCTGTCTGGGTTTGA und CACCTTGAAGTTGGCAAAG ;
5 CCCATACCCAGTAGACAGT und GCAGCTCAAATTCAGTGGAC ;
CACATCTTTCTCCACTCAGCG und GATGACAGGGTTTGTGACAGG ;
AGAAGGGAGATCAAGGACCACGC und AGGTTTGCTTAGGGTTGCCC ;
AAATCTACCAACGTGGAACC und CTCCAGAACTGAAGCACCCCT ;
GAACACATCCGCTTTGGAGTAGC und ATACATCCCTCTCTGGCTGGC ;
10 GCACTAAGGGTGGCAGGACTCA und CAGTTATGGAACCTCTAGCAGCC;
ATAAGTCAGTTTTTCAGAAT und GTGGGGATATGGATACA;
CGCTGCTCATCTTCTTAAAGATTT und GAGGTGGTGATGATTGTGTTAGTATT;
ATACGTTGTCTTGAGAAGGTTGATG und CAGGTAACACATGCTGATTGGTAA;
GCCTCTCCTGACTGTCATCCCT und AGTGGGGTGGAGGGAGCTTA ;
15 TGCCTTTGGGGAGCTGAAG und CAGGCTGTCTTTGCCTCCCTA ;
TAGCCCCAGTTTCAAGTGAGG und GTGGGCATGGGTATACAGAAAG ;
GTCTAAGGATTGTATCGGCAGG und TGCCATCGGGTGAAATGT;
CAGCAATGGAAAGAAATGGAAG und ATGGCCACCCCTGAAATG ;
GTCCAGGAAGAGATTGAACGTG und GGGACTTCGAAAACATGGAG ;
20 CCAATCATTTAGCTTCACCCTG und CTTCAGGGCTTGGTCAATATAG ;
AATTACAACCAGAGCTTGGC und TATCACTTTCCATAAAAGCAAG ;
CCAAGGCTTCAATTCAGTC und TCTTGTCTTTGTTGATCCCCG ;
CCAAGGCTTCAATTCAGTC und TCTTGTCTTTGTTGATCCCCG ;
CTGCTGCTAATGGTCACTTG und TTGGCTCCTTCACCCTTCAC;
25 sowie
GCAAAAATGTGAGAAGGGACC und CACCAACTTATGCCAATTCTCTTG.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 21, da-
durch gekennzeichnet, daß der allelische Status
30 der Polymorphismen mittels eines Paares Oligonu-
kleotide als Hybridisierungs sonden erfaßt wird.

23. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß Hybridisierungs-
sonden verwendet werden, die paarweise Sequenzen aufweisen, die sich aneinander anschließend und komplementär zu einem Einzelstrang eines Allels des Gens
eines der menschlichen Enzyme NAT2, CYP2D6,
CYP1A2, CYP3A4, mEH, TPMT, MTHFR, Paraoxonase,
CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 und/oder DPD ist und
mindestens eines der Oligonukleotide in hybridisiertem Zustand sich über den Locus eines der folgenden Polymorphismen
G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G, G857A
des Gens der NAT2,
C100T, G1661C, 1707delT, G1758T, G1846A, 2549delA,
2613_2615delAGA, C2850T, A2935C, G4180C des Gens
der CYP2D6,
G-3858A, C-164A des Gens der CYP1A2,
A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C des
Gens der CYP3A4,
T337C, A416G des Gens der mEH,
G238C, G460A, A719G des Gens der TPMT,
C677T, A1298C des Gens der MTHFR,
L55M (Aminosäureaustausch), Q192R (Aminosäureaustausch) des Gens der Paraoxonase,
C430T, A1075C des Gens der CYP2C9,
G636A, G681A des Gens der CYP2C19,
G-1293C, C-1053T, T7632A des Gens der CYP2E1
und/oder IVS 14 + 1G > A im Intron 1 des Gens der
DPD
erstrecken
und anschließend die Bindungsstärke des sich über
den Locus erstreckenden Oligonukleotids erfaßt

wird.

24. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nach Hybridisierung der Hybridisierungsproben an die DNS die Temperaturabhängigkeit der Ablösung der Hybridisierungsproben von der DNS (Schmelzkurve) ermittelt wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens zwei der folgenden Paare Oligonukleotide als Hybridisierungssonden (in 5'-3'-Richtung) verwendet werden, die die folgenden Sequenzen enthalten oder daraus bestehen:

TCTCCAGGTCAATCAACTTCTGTACTGGGC und AAGAAACCAGGGTGGGTG ;
TCCTAACATTGTGGTCTG und TGGAGGGATGTAAAATA;
GCAGGAGAAGGTGAACCATGCC und TCCTGCCGTCAATGGTCA;
AGGAGAGAGCAGTATATTACAAACAAAGAATTT und AATCTGGTACCTGGACCAA;
TAAATAAGTATATTTTTTGGTGTCTTCTTTGGCA und TTCAATTGTCGAGGTTCAA;
AACCTCTTCCTCAGTGAGAG und AATATATTTCTCAGCACTTC;
TAGAATAAGGAACAAAATAAACCTTGTG und TGGTGATGAATCCCTTACT;
TGCACGCTACCCACCAGG und CCTGCCACTGCCCCGGGCT;
CGCTTCTCCGTCTCCACC und CGCAACTTGGGCCTGGGCAAGA;
GCAGTGGGTGACCGAGGA und CGCCTGCCTTTGTGCCGCTC;
TCTCCCACCCCCAAGACG und CTTTCGCCCCAACGGTCTCTTGACA;
ACTCCTGTGGGTGATGGG und AAGGGCACAAAGCGGGAAGTGG;
CTCACCTTCTCCATCTCT und AGGAAGGCCTCAGTCAGGTC;
CATCTCCCACCCCCAAGA und CCCTTTCGCCCCAACGGT;
ACTATGCACAGGTTCTCA und TTGAAGCTGCTCTCAGGGTTCC;
CTCATGATCCTACCTCCG und GTGCAGCGTGAGCCCA;
GGTGACCCCATCCCCCTA und GCTTTGTGCTGTGCCCCGCTAGAA;
CATGCCCCAGCTTCCCG und CCTCTCAGATTCAAGCAAT;
ATGGAGCTTAGTCTTTCTGGTATCCAGCTGGG und GGCCCAGGACGCATGGTA;

- TATGGCTGTCTCATTCCAAAATACTTGAAATTCATCCCA und CCTCTCTCCTGCCCTTGT;
 CATAAATCCCACTGGACCAAAGGCTAGAGTTCAAAGCAG und CCTCAGCTATAGAGACGGCACT;
 AATAAGTATGTGGACTACTATTTTCCTT und TTTTGGATCCATTCTTTCT;
 ACTACTATTTTCCTTTAATTTATCTTTCTCTC und CTTTCTCCCAATAAGTATG;
 5 AAAAGAAACTGAGTCCCACAAAGGT und TGATGATTGACTCTCAGAA;
 GTTCTGGGTCCACTTCCAAAGGGTGTG und AGCAAACCTCGTGCCAAT;
 TTGCTGATGGTGCACGGCTGGC und GCAGGCCATACCCGAAG;
 TCCACCTGCTTCTTCCAG und TGAGGGTATCTGTTGAGA;
 GGACACAGTGTAGTTGGTGTGG und ;
 10 AACTAATGCTCCTCTATC und AATCATGTCAAATTTGCCAATATT;
 TCTGTAAGTAGACATAAC und TCAAAAAGACAGTCAATTCCTCAAT;
 CGGGAGCCGATTTTCATCA und CGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACA;
 AGTGAAGCAAGTGTCTTT und GTCTTTGTTCTTTACCTCTCGGGA;
 TGGCTCTGAAGACATGGA und ACTGCCTAATGGACTGGCTT;
 15 CTCCCAGGATCGTAAGTA und GTCAAGAAAATAGTGATCATTTGTGCCA;
 GAAGCCCGCTGCCTTG und ATTGAGGACCGTGTTCAA;
 CCCACCAGCCTGCCCC und CAGAGATACCTTGACCTT;
 ACCCCCTGAATCCAGGTA und CCAAGTTTTTTGCTTCCTGAGAAACCAC;
 AGTGGGAAAATTATTGCATATCTAAGAG und TCCCGGGAAATAATCAAT;
 20 TAACACTGCACCTCTCCT und CCAAGAAGGGGCGTTGGC;
 TAAAAGTACAAAATTGCA und TATGAATTAAGAACTTCTATATATTG;
 CTGATTAAAAATTAAAAAAA und TTTTGGCTGGGCACAGT; sowie
 AATCACACTTACGTTGTC und AAAGTCAGCCTTTAGTTCAGTG.
- 25 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, da-
 durch gekennzeichnet, daß als Hybridisierungsson-
 den Paare von Oligonukleotiden verwendet werden,
 die derart mit verschiedenen Fluorophoren markiert
 sind, daß sie ein anderes Signal abgeben, wenn die
 30 Oligonukleotide eines Paares aneinander anschlie-
 ßend mit einem DNS-Einzelstrang hybridisiert sind
 als im nicht hybridisierten Zustand.
27. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, da-

durch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Hybridisierungssonden mindestens eines der Oligonukleotidpaare mit dem Fluorophor 5'-LC-Red640, 5'-LC-Red705 oder 3'-Fluorescein markiert ist.

5

28. Verfahren nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis der amplifizierten DNS die von der amplifizierten und mit den Hybridisierungssonden hybridisierten DNS abgegebenen Fluoreszenzstrahlung erfaßt wird.

10

29. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die vervielfältigte DNS durch geeignete Restriktionsenzyme verdaut und anhand der erzeugten DNS-Bruchstücke die allelische Variabilität bestimmt wird.

15

30. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der erzeugten DNS-Bruchstücke mittels Gelelektrophorese und/oder Kapillarelektrophorese erfolgt.

20

31. Microarray, beispielsweise DNS-Chip, mit einer Anordnung von mehreren, voneinander getrennten Zellen (Felder),
dadurch gekennzeichnet, daß in mindestens zwei Zellen des Microarrays ein oder mehrere für jede Zelle identische Oligonukleotide angeordnet sind, die Oligonukleotide jeder Zelle jeweils mit einem gesuchten DNS-Abschnitt hybridisierbar sind,
die Oligonukleotide der mindestens zwei Zellen mit

25

30

verschiedenen gesuchten DNS-Abschnitten hybridisierbar sind und der der jeweiligen Zelle zugeordnete gesuchte DNS-Abschnitt Teil des Gens eines der menschlichen Enzyme der Phase I und/oder Phase II des Entgiftungsstoffwechsels ist.

32. Microarray nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide verschiedener Zellen mit DNS-Abschnitten verschiedener Gene hybridisierbar sind.

33. Microarray nach einem der beiden vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide verschiedener Zellen mit verschiedenen DNS-Abschnitten desselben Gens hybridisierbar sind, die verschiedene Positionen von Genmutation enthalten.

34. Microarray nach einem der drei vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide verschiedener Zellen mit verschiedenen DNS-Abschnitten hybridisierbar sind, die zwei verschiedenen Allele desselben Gens darstellen.

35. Microarray nach einem der Ansprüche 31-34, dadurch gekennzeichnet, daß der gesuchte DNS-Abschnitt jeder Zelle Teil des Gens eines der menschlichen Enzyme NAT2, CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, mEH, TPMT, MTHFR, Paraoxonase, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 und/oder DPD ist und die gesuchten DNS-Abschnitte der mindestens zwei Zellen jeweils mindestens eine von dem jeweils anderen gesuchten DNS-Abschnitt verschiedene Position eines Polymor-

phismus der folgenden Polymorphismen

G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G, G857A

des Gens der NAT2,

C100T, G1661C, 1707delT, G1758T, G1846A, 2549delA,

2613_2615delAGA, C2850T, A2935C, G4180C des Gens
der CYP2D6,

G-3858A, C-164A des Gens der CYP1A2,

A-392G, A352G, C653G, T664C, 831insA, T1334C des
Gens der CYP3A4,

T337C, A416G des Gens der MEH,

G238C, G460A, A719G des Gens der TPMT,

C677T, A1298C des Gens der MTHFR,

L55M (Aminosäureaustausch), Q192R (Aminosäureaus-
tausch) des Gens der Paraoxonase,

C430T, A1075C des Gens der CYP2C9,

G636A, G681A des Gens der CYP2C19,

G-1293C, C-1053T, T7632A des Gens der CYP2E1

und/oder IVS 14 + 1G > A des Gens der DPD
enthält.

36. Diagnosekit,

dadurch gekennzeichnet, daß es einen Microarray
nach einem der Ansprüche 31-35 enthält.

37. Diagnosekit nach einem der Ansprüche 1 bis 15,

dadurch gekennzeichnet, daß es einen Microarray
nach einem der Ansprüche 31-34 enthält.

38. Verwendung eines Verfahrens, eines Microarrays
und/oder eines Diagnose-Kits nach einem der vor-
hergehenden Ansprüche zur Bestimmung der individu-
ellen Medikamentenverträglichkeit, zur Bestimmung
der individuell erforderlichen wirksamen Dosis ei-
nes Medikamentes und/oder zur Bestimmung der Prä-

disposition für Nebenwirkungen bei Applikation eines Medikamentes.

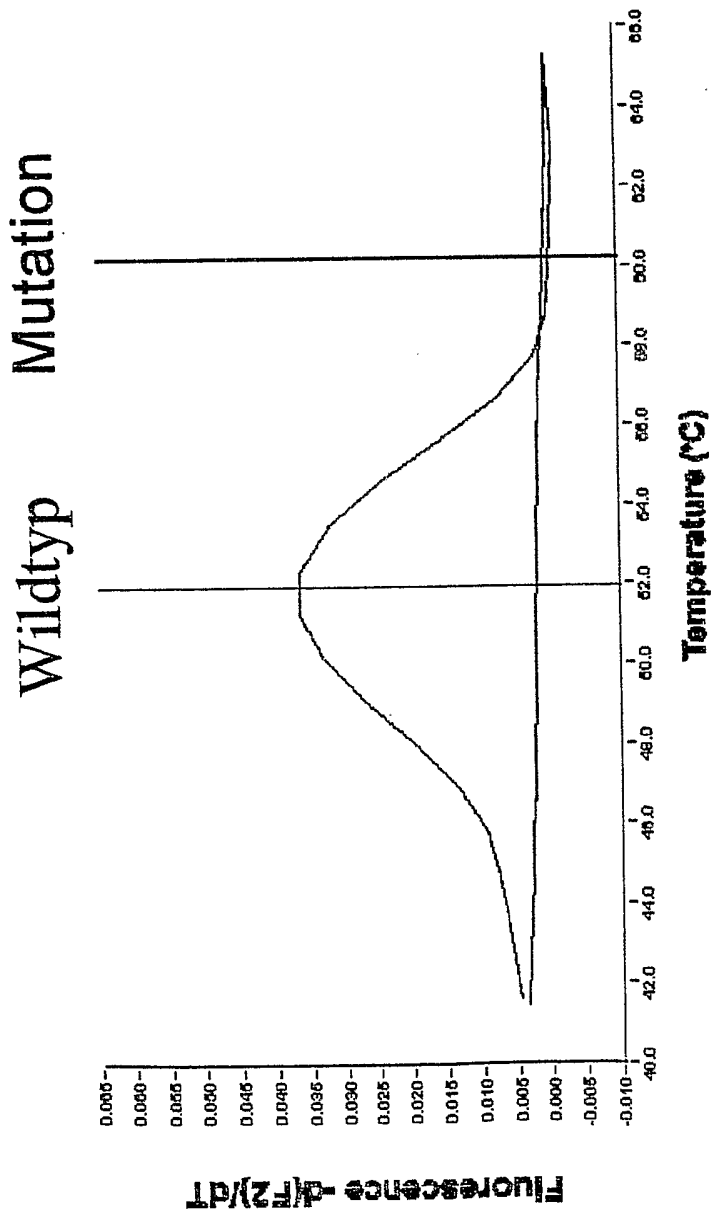
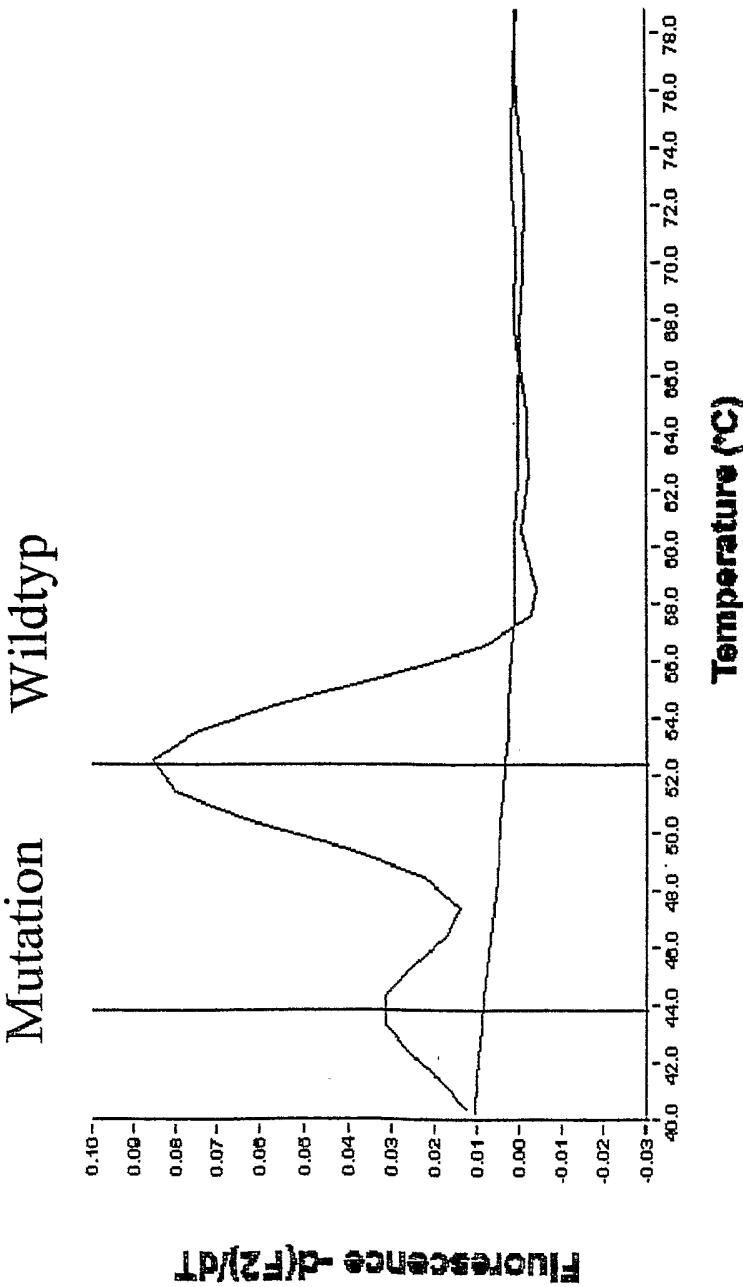


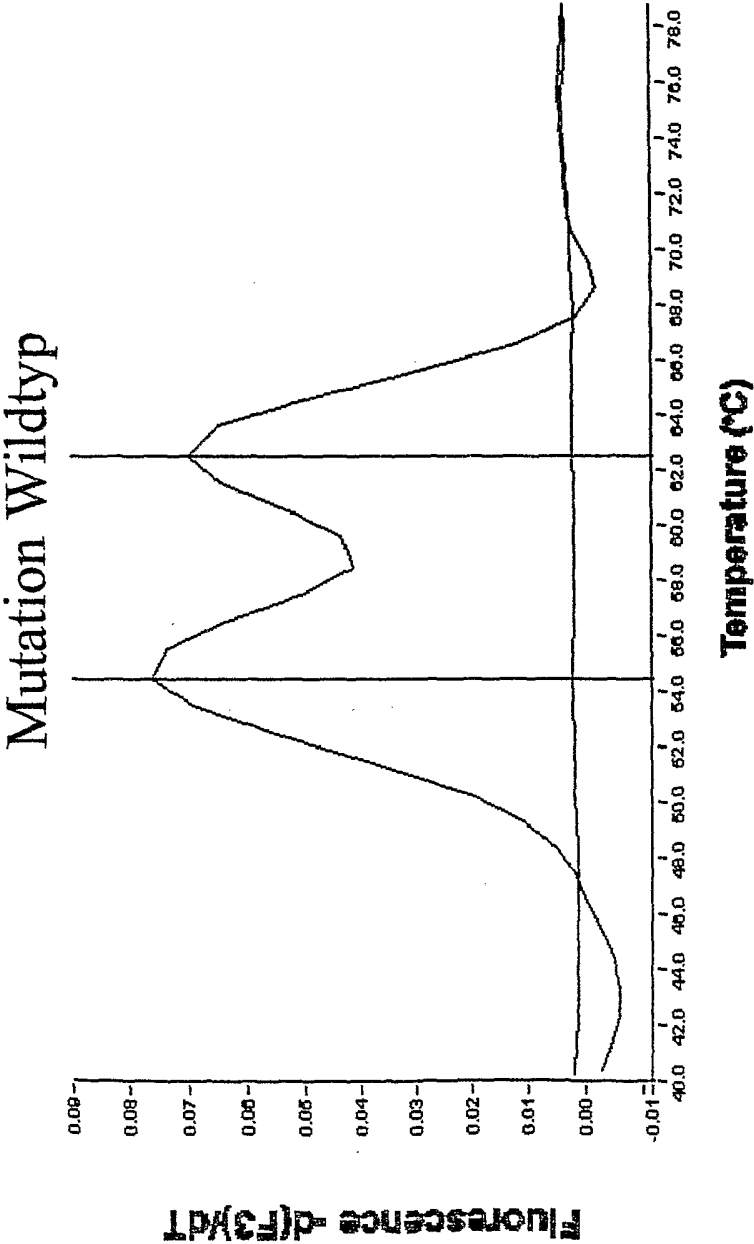
Figure 1

2/48



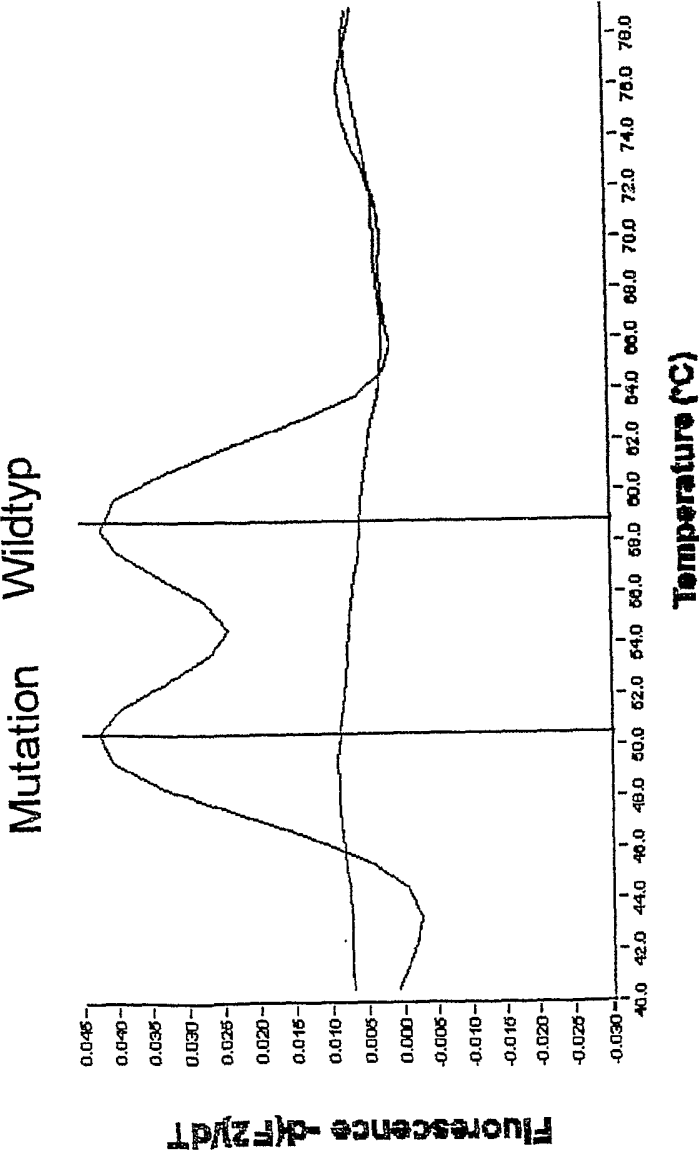
Figur 2

3/48



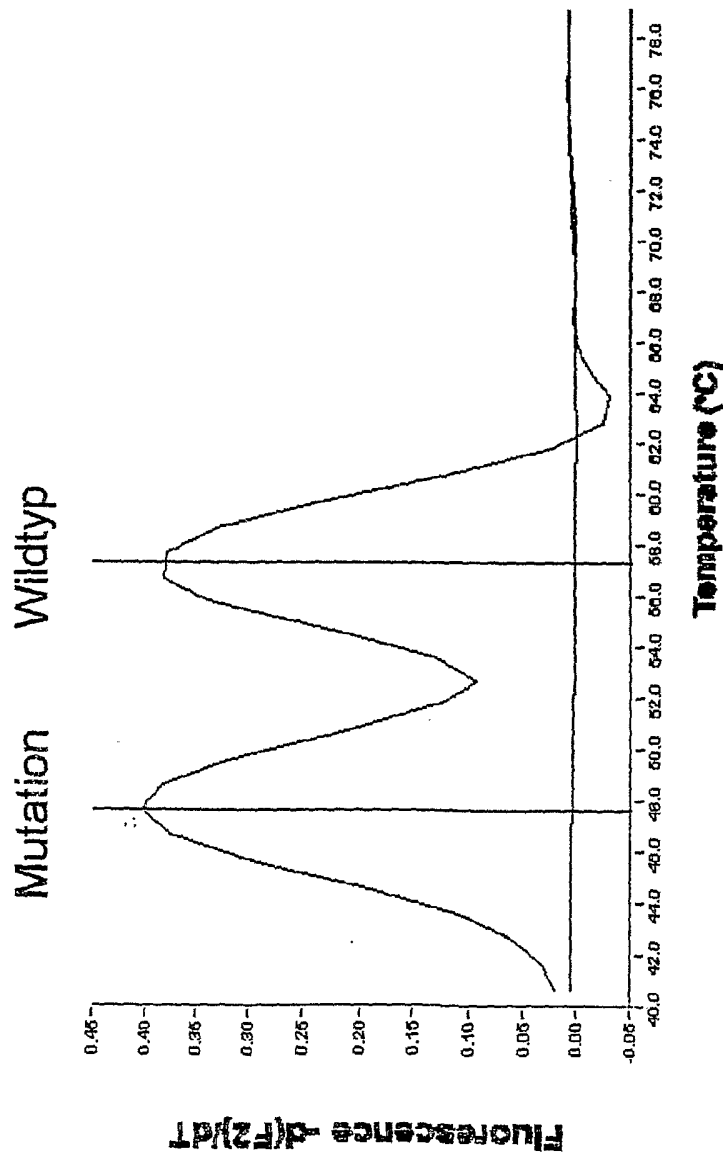
Figur 3

4/48



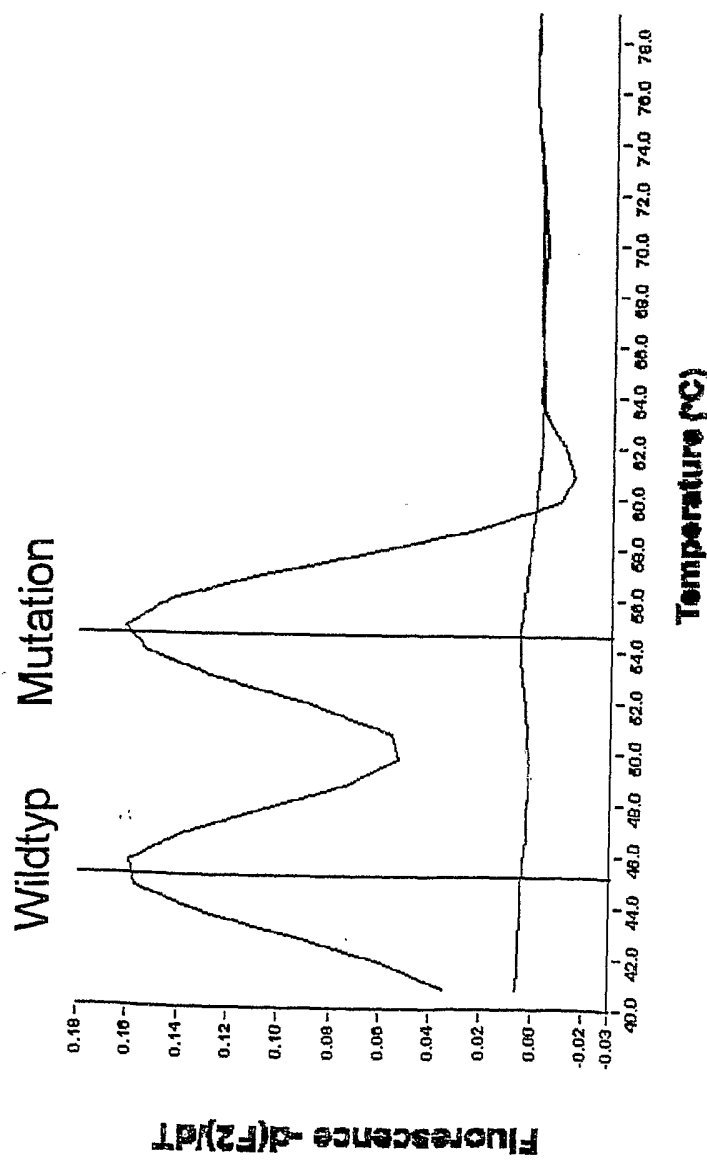
Figur 4

5/48



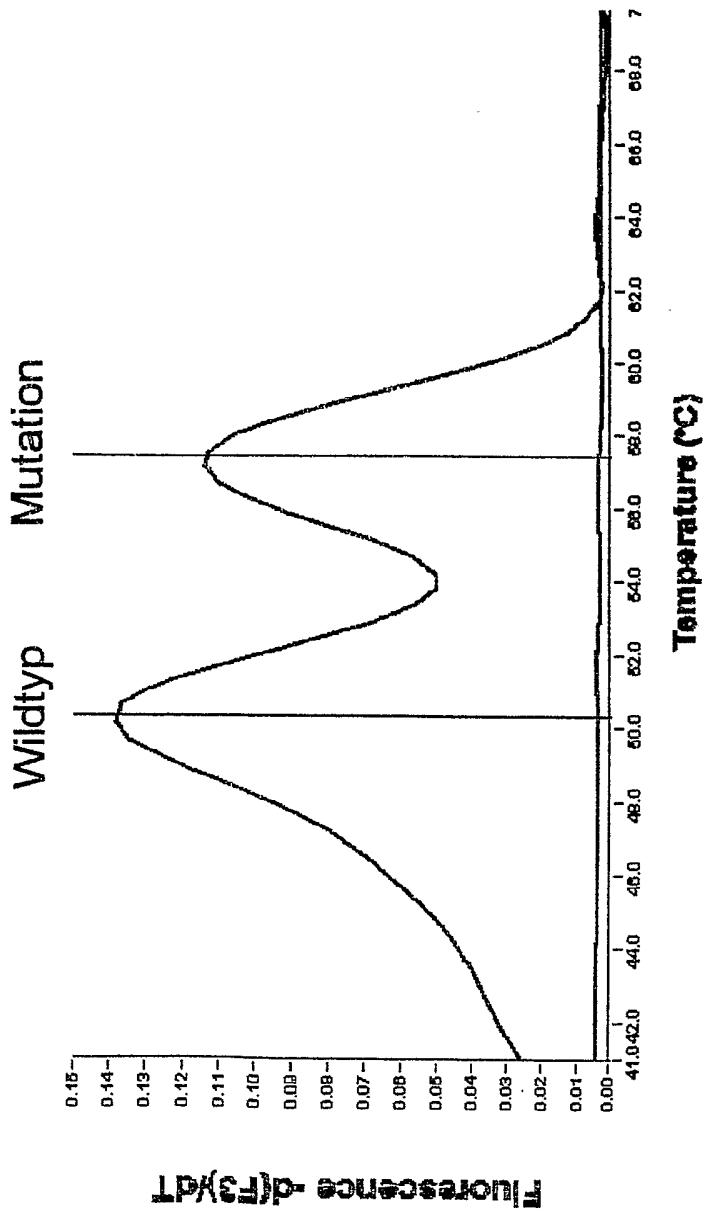
Figur 5

6/48



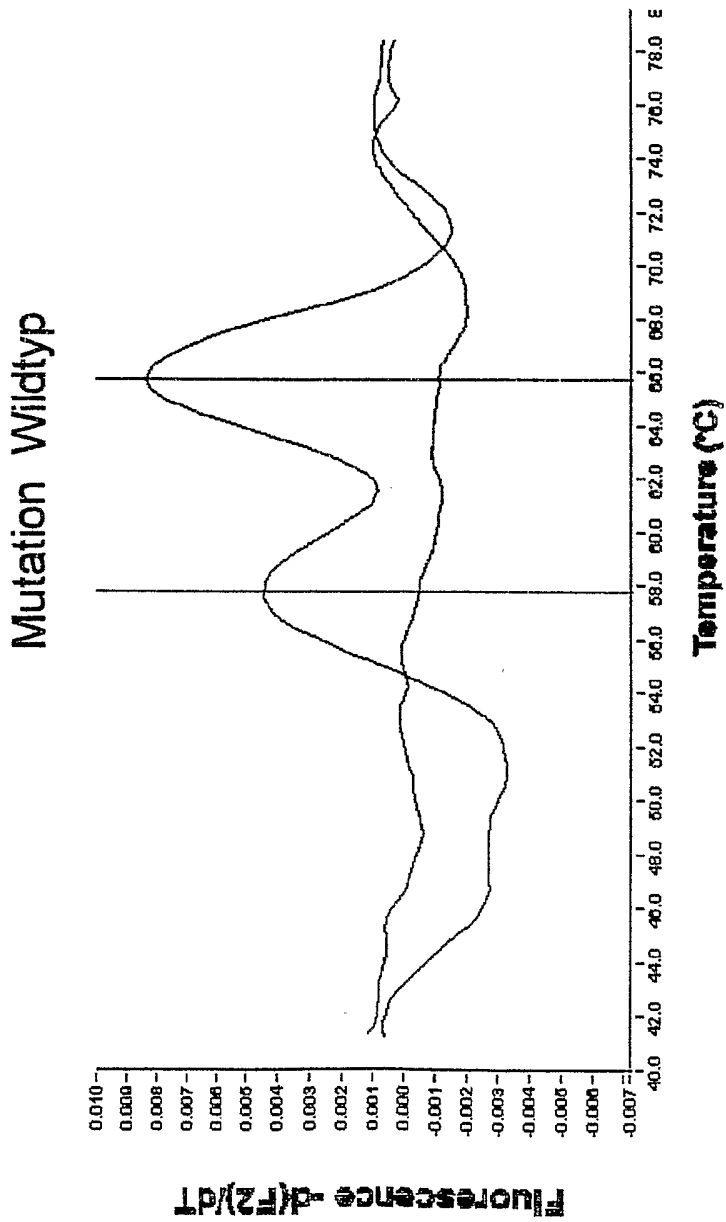
Figur 6

7/48



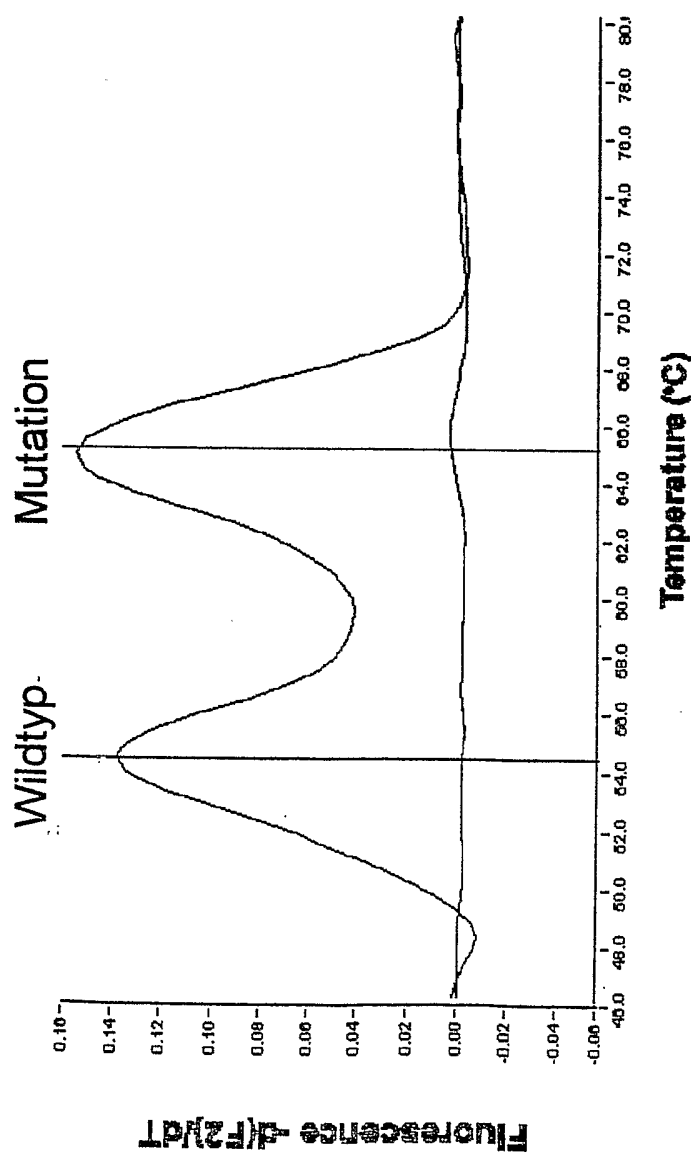
Figur 7

8/48



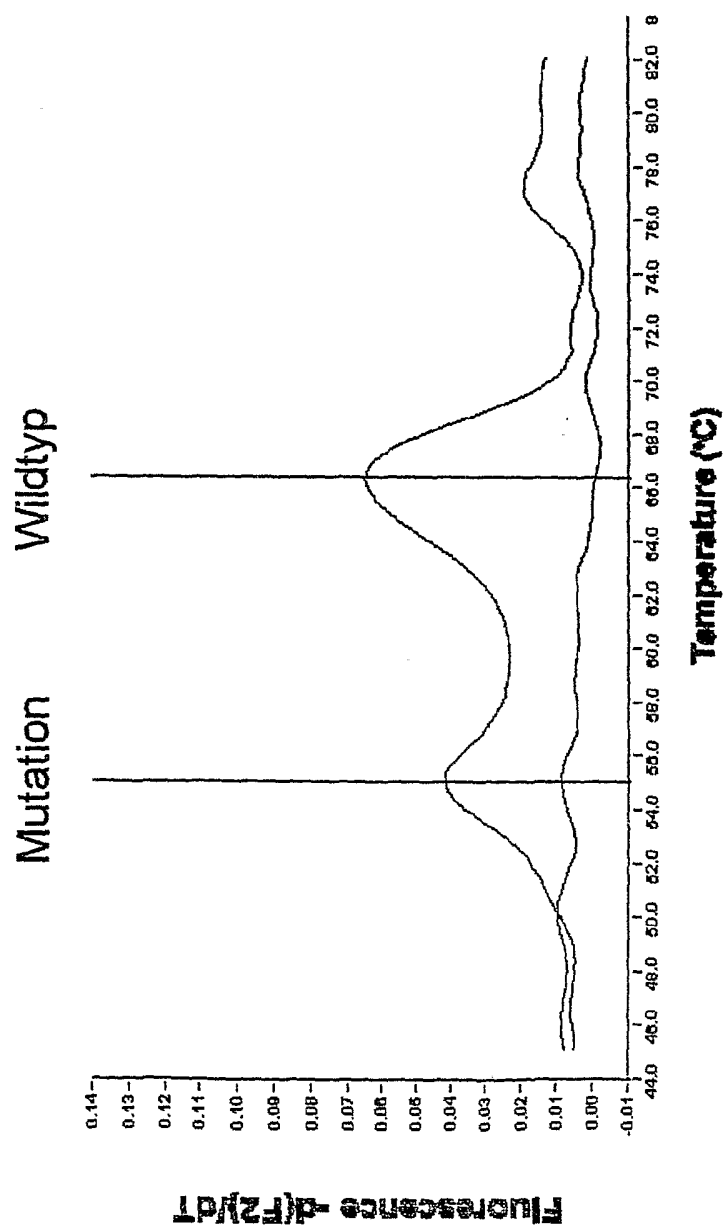
Figur 8

9/48



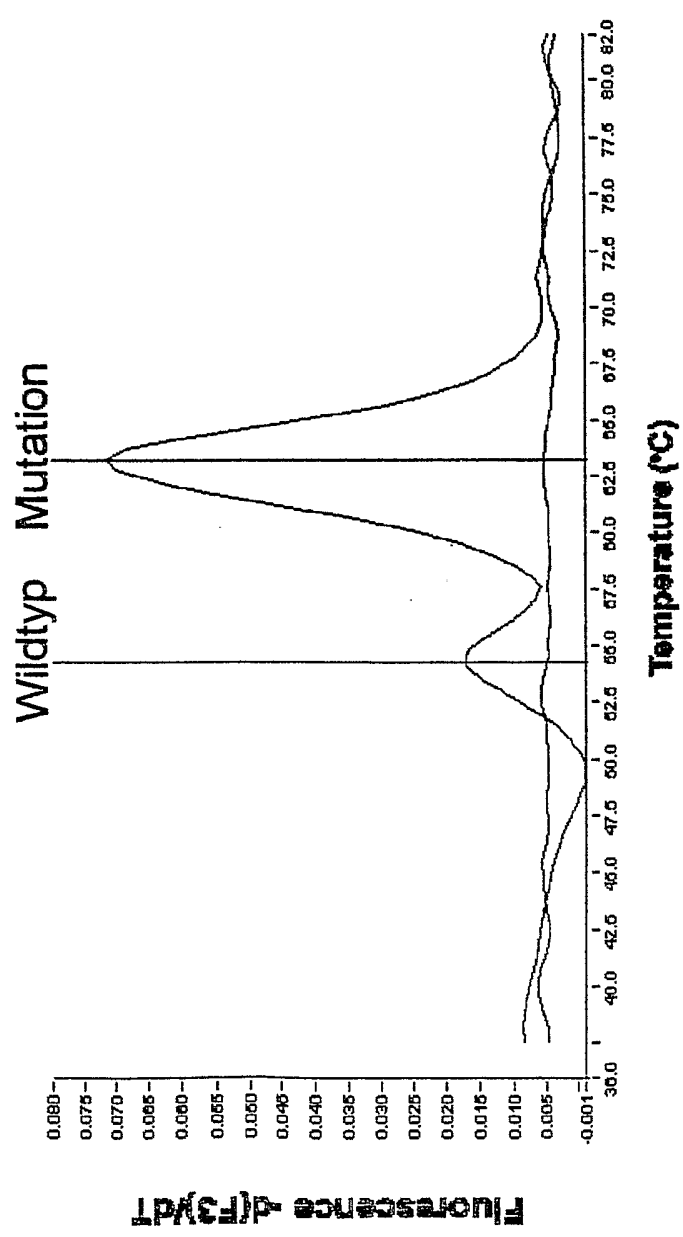
Figur 9

10/48



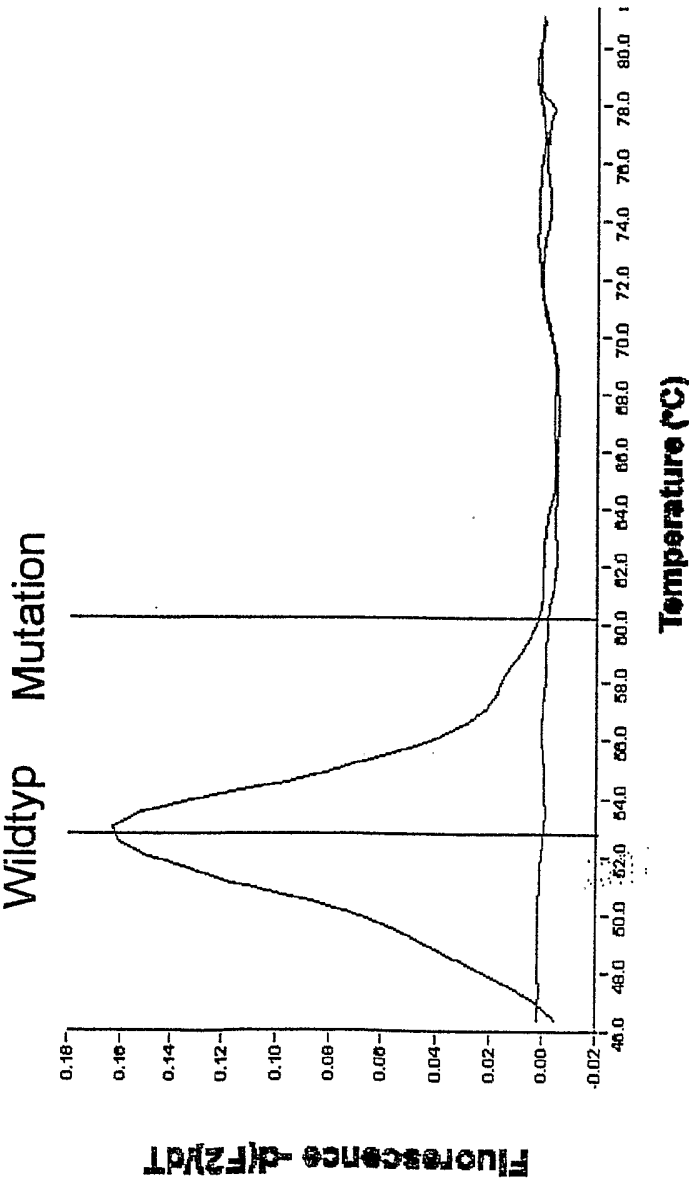
Figur 10

11/48



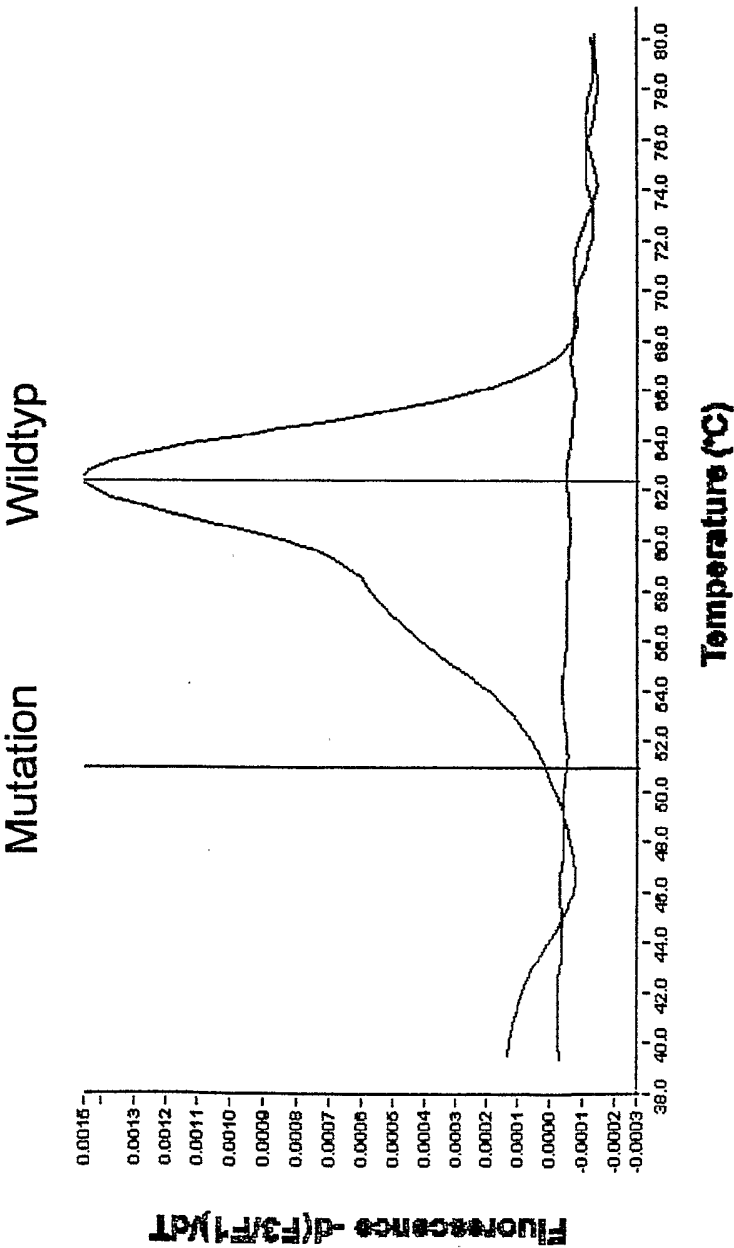
Figur 11

12/48



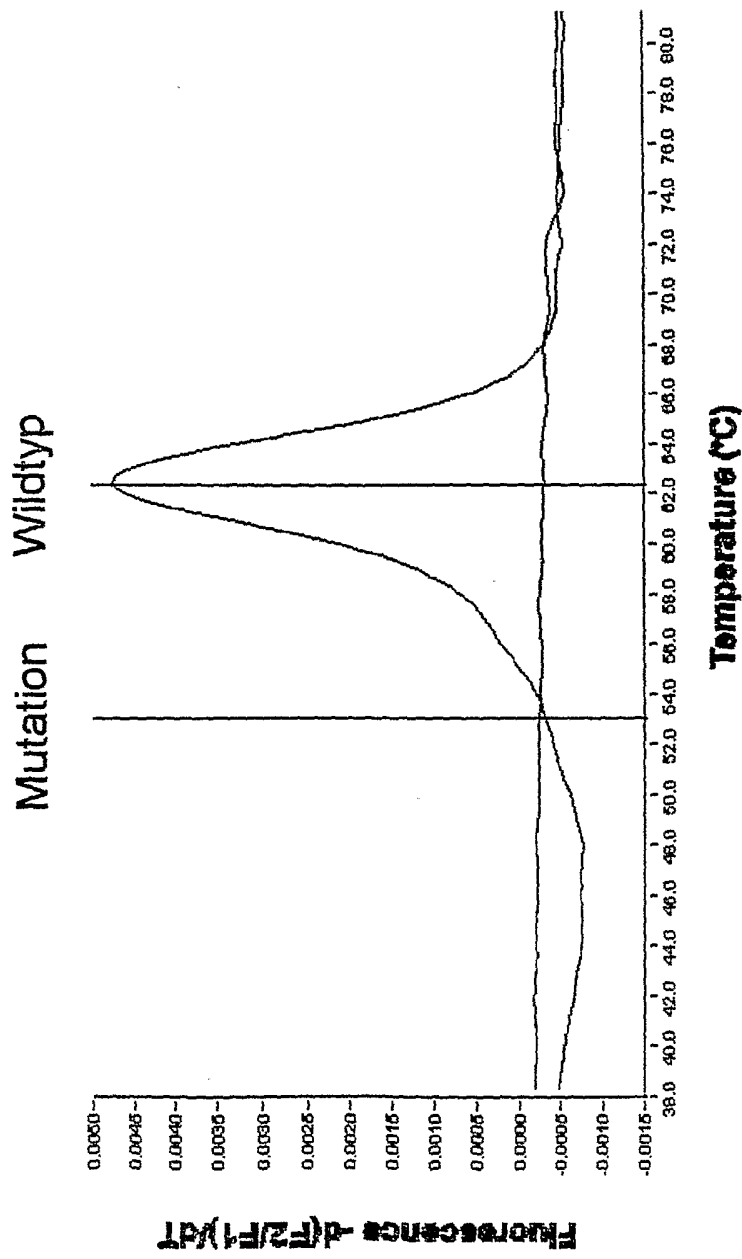
Figur 12

13/48



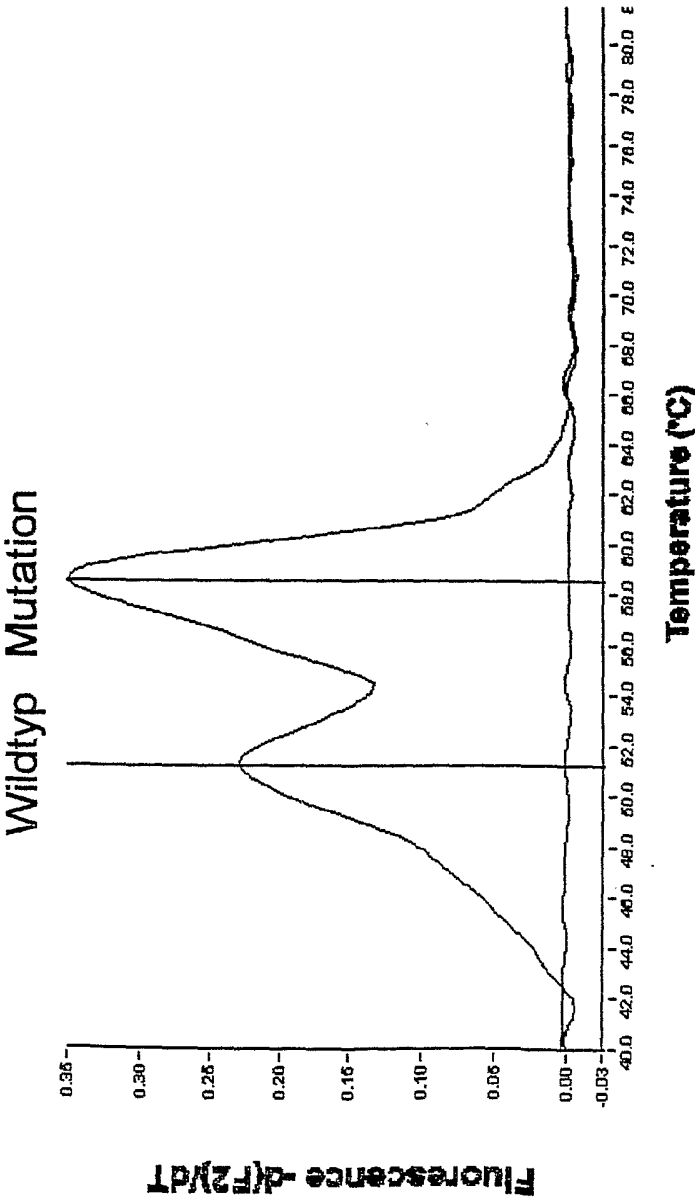
Figur 13

14/48



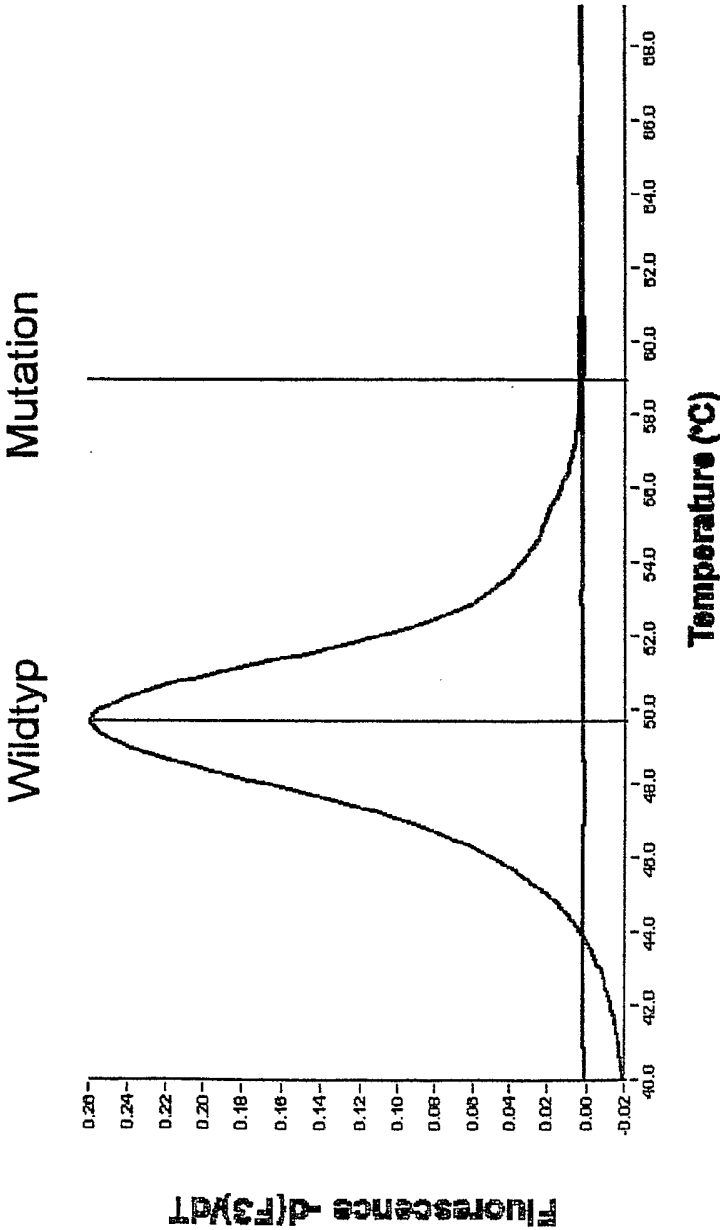
Figur 14

15/48



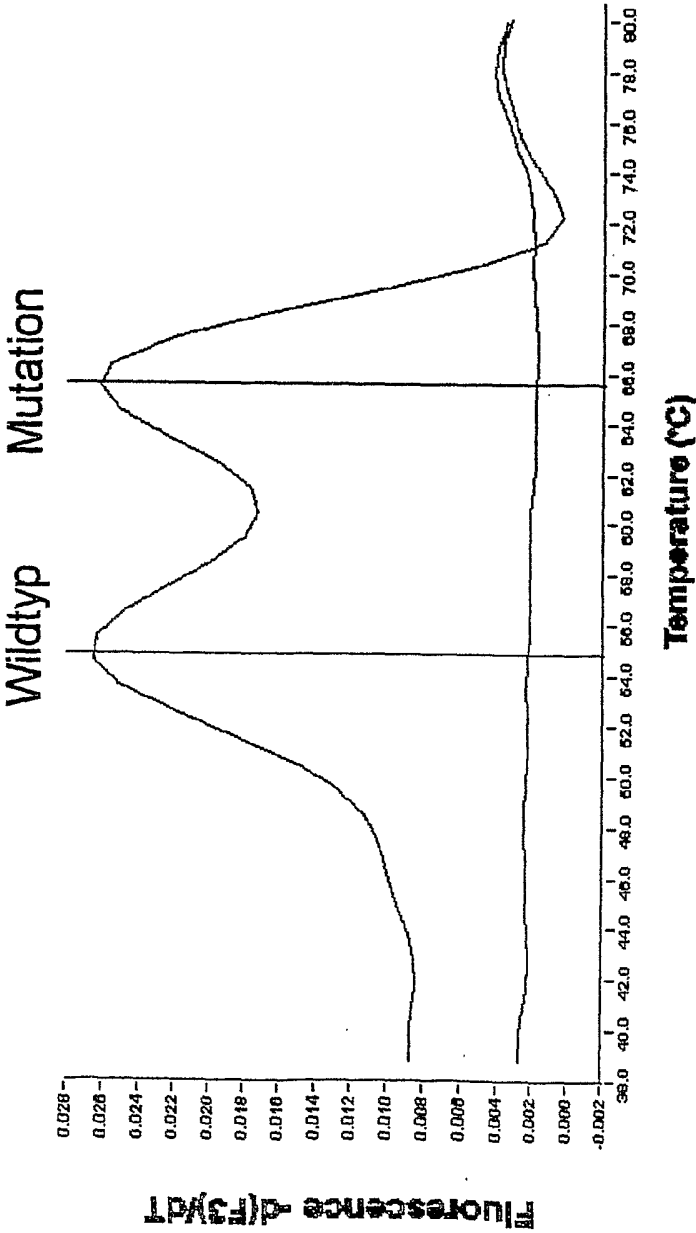
Figur 15

16/48



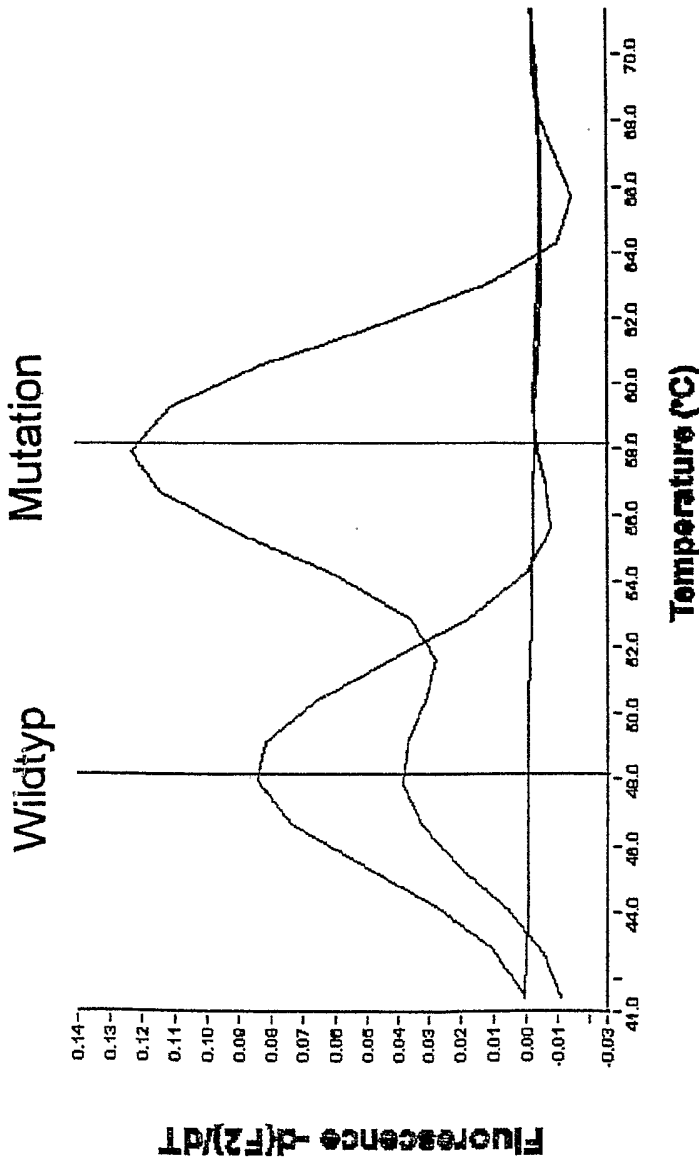
Figur 16

17/48



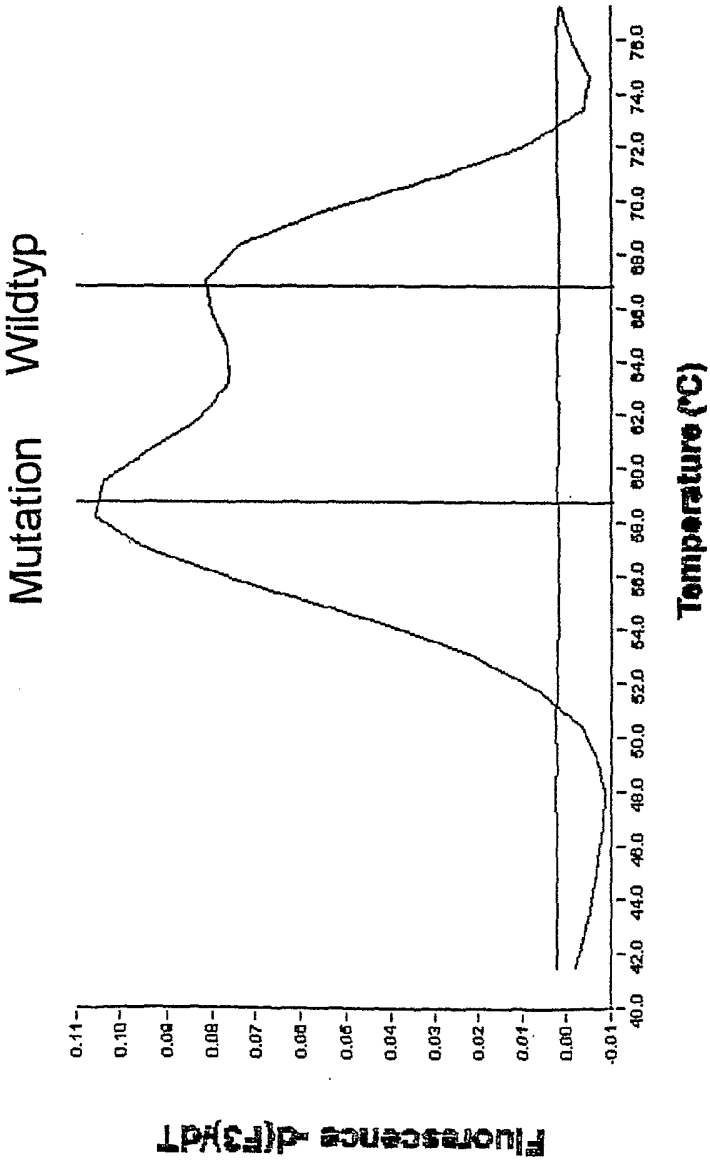
Figur 17

18/48



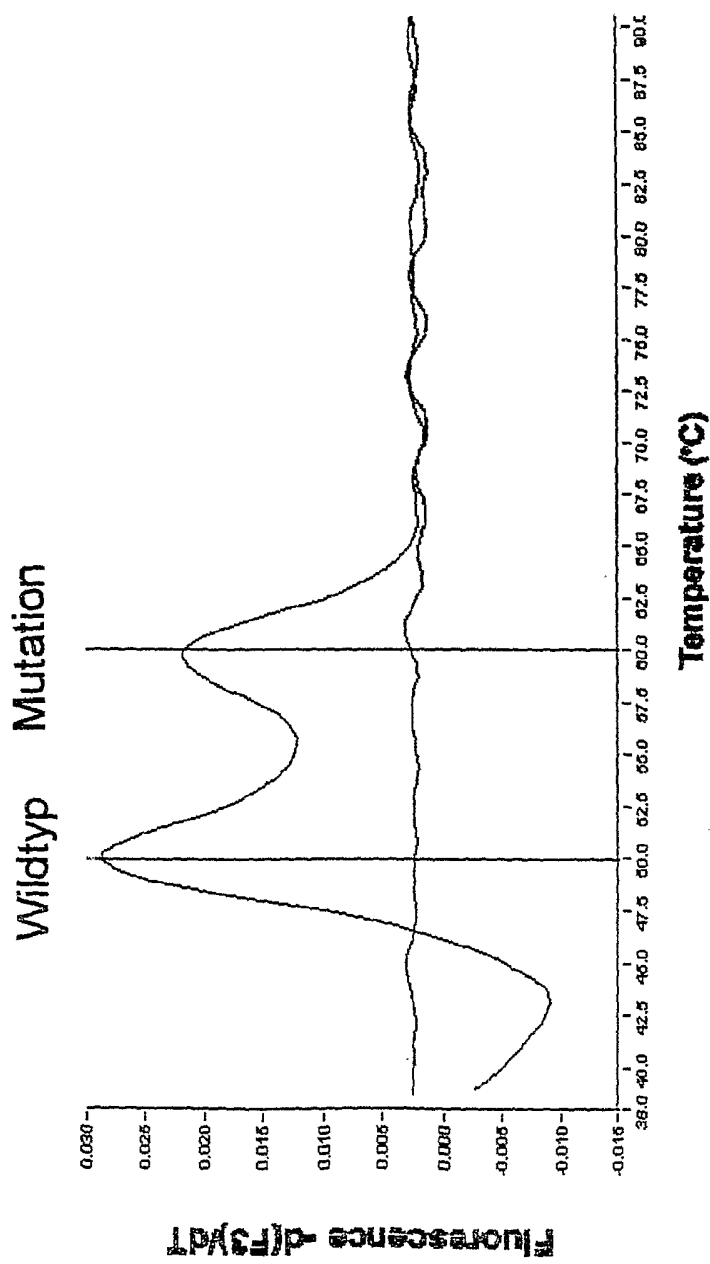
Figur 18

19/48

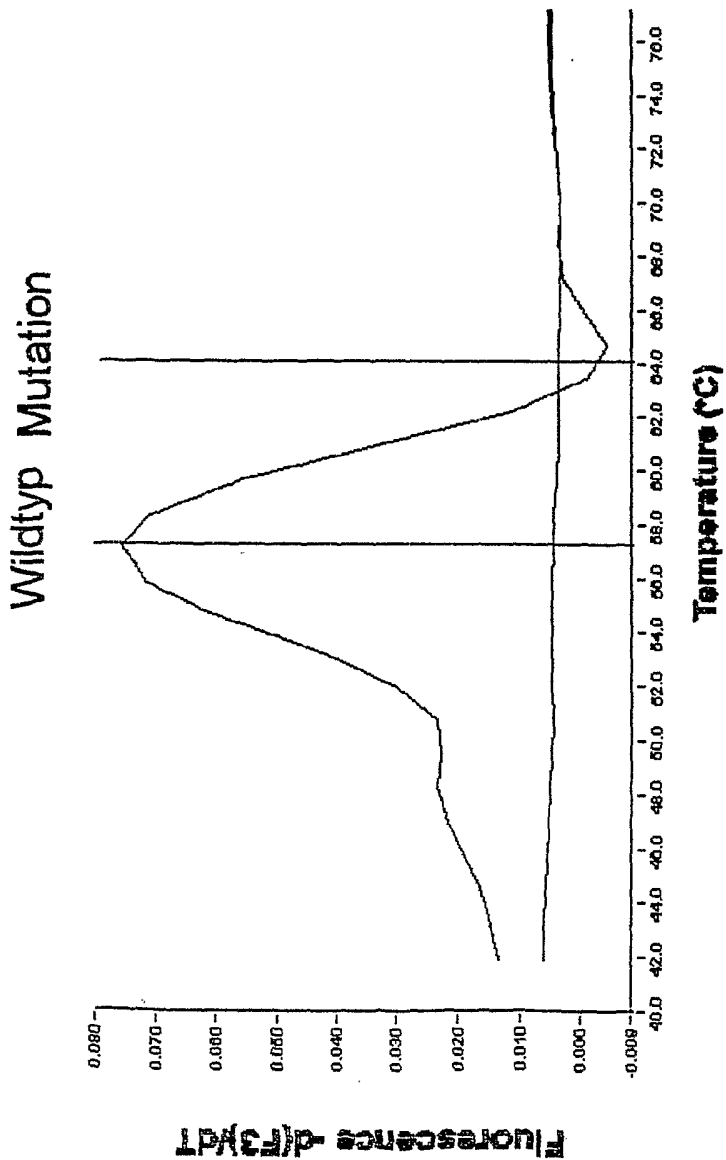


Figur 19

20/48

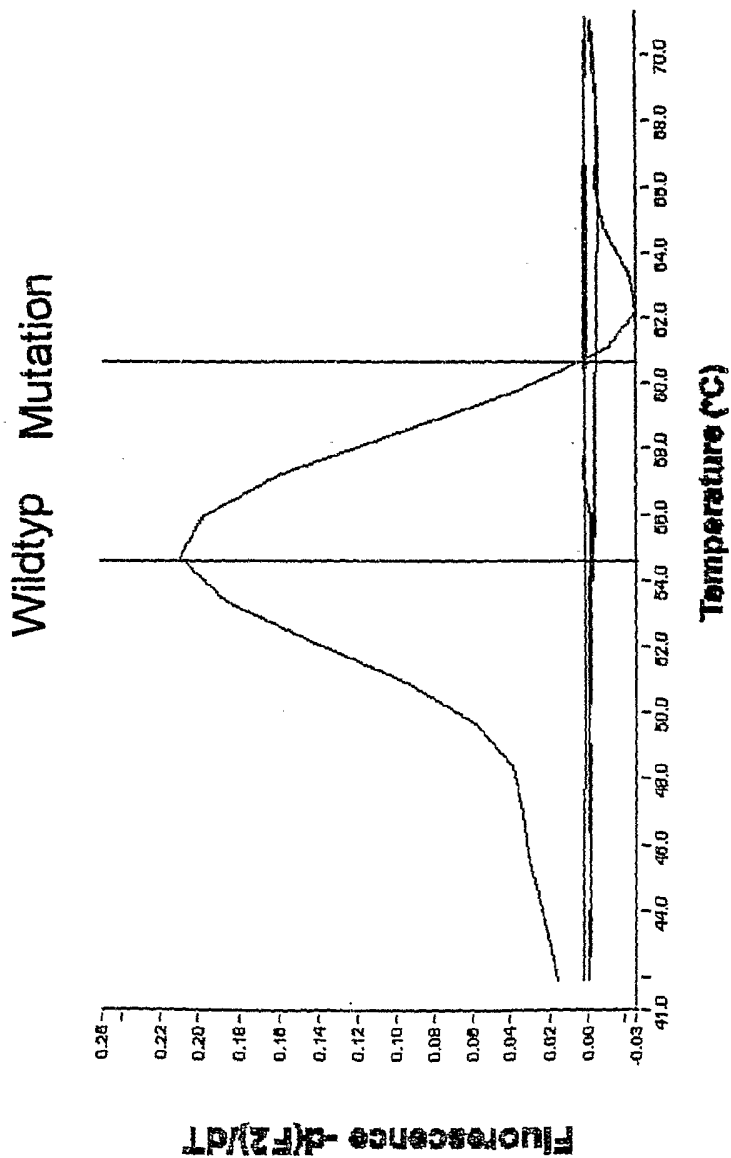


Figur 20



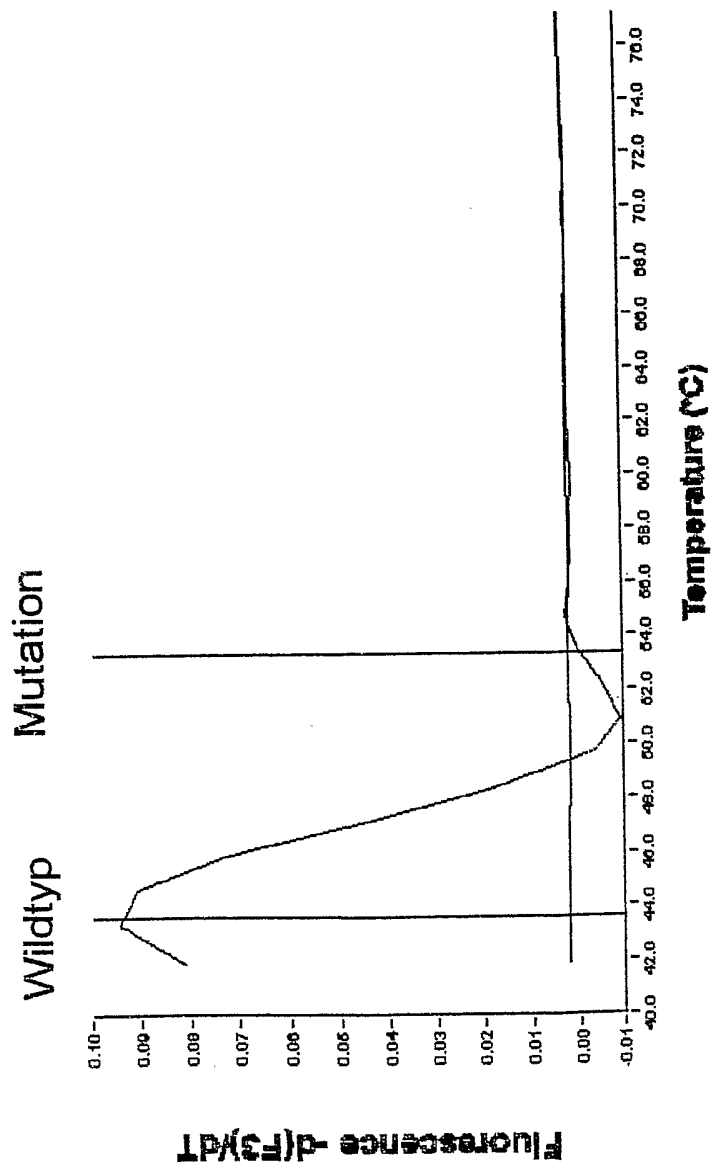
Figur 21

22/48

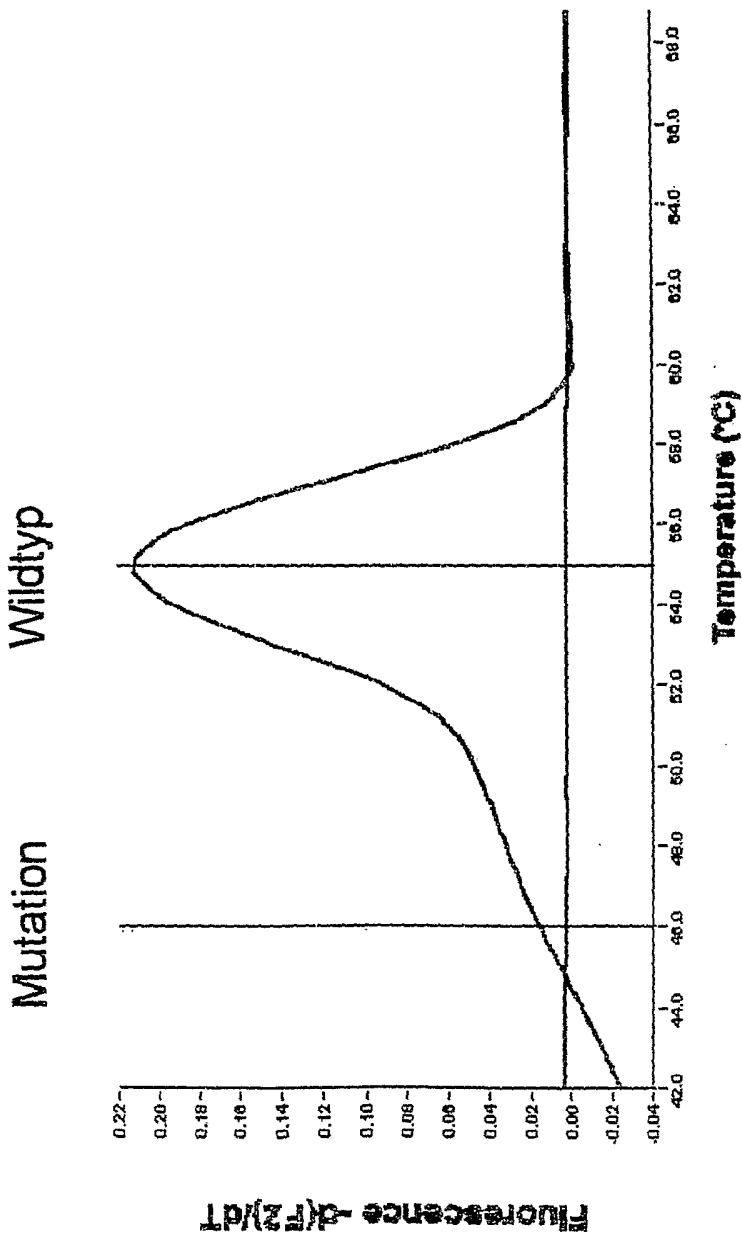


Figur 22

23/48

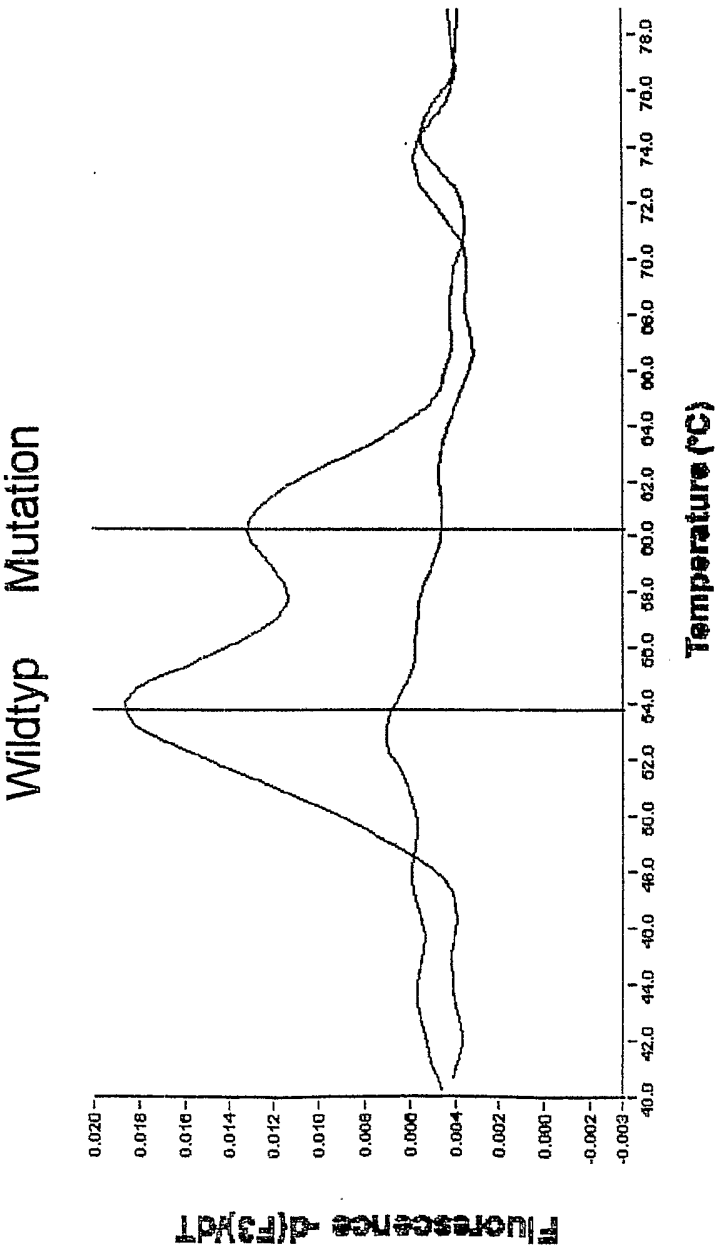


Figur 23

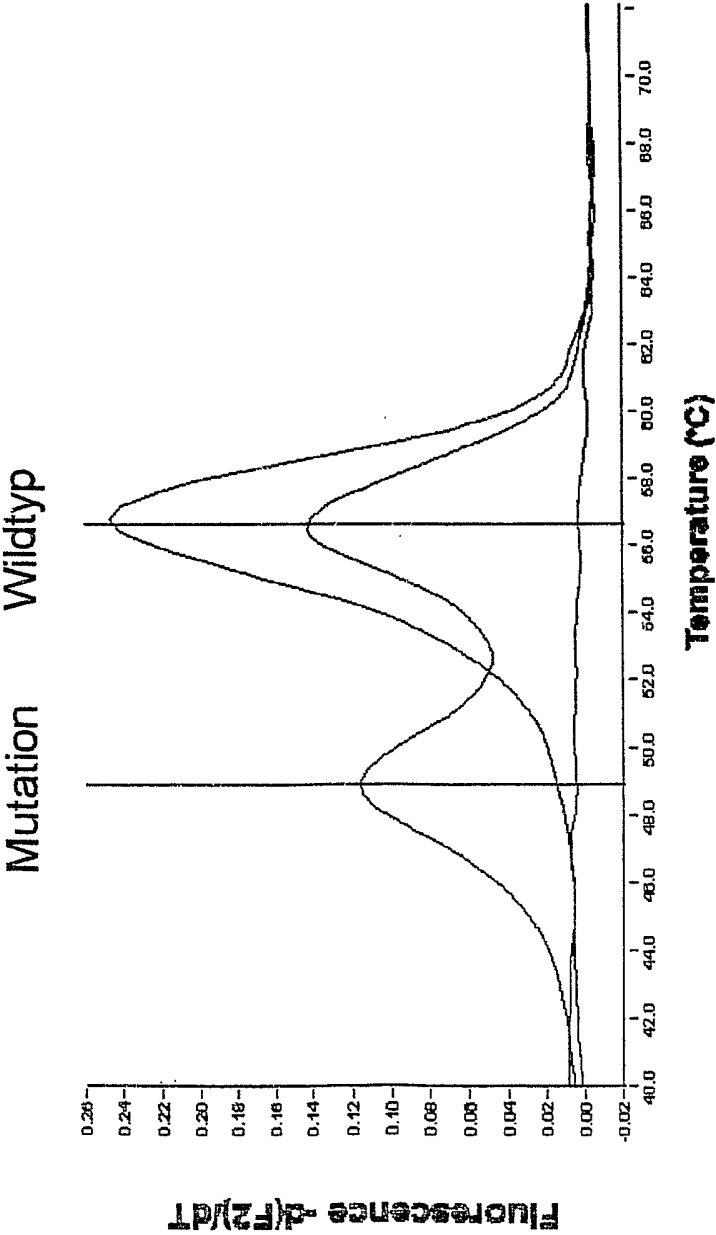


Figur 24

25/48

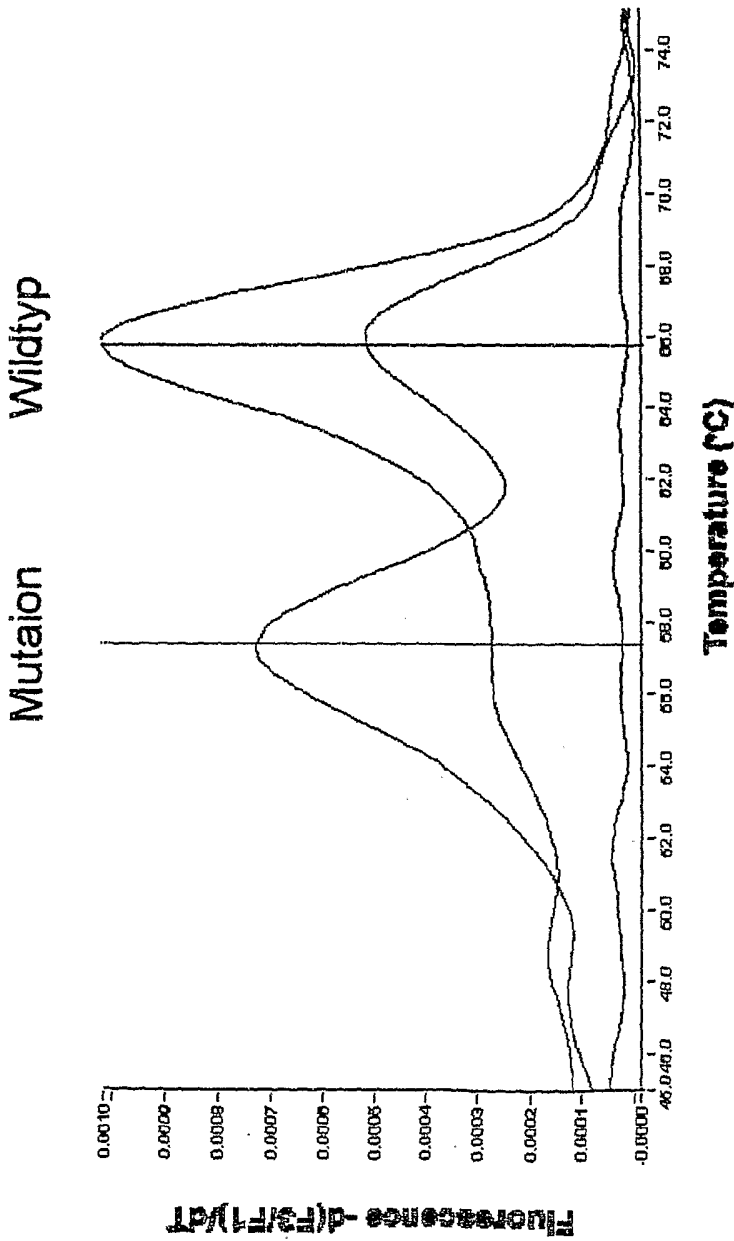


Figur 25

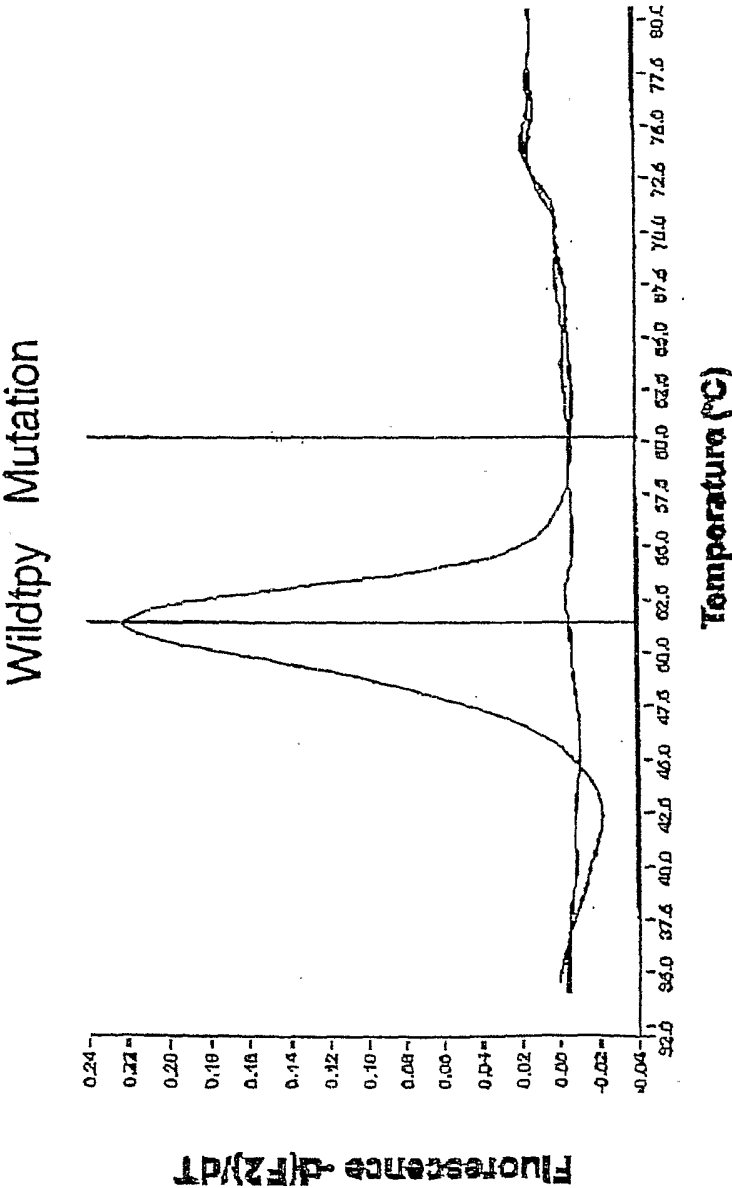


Figur 26

27/48

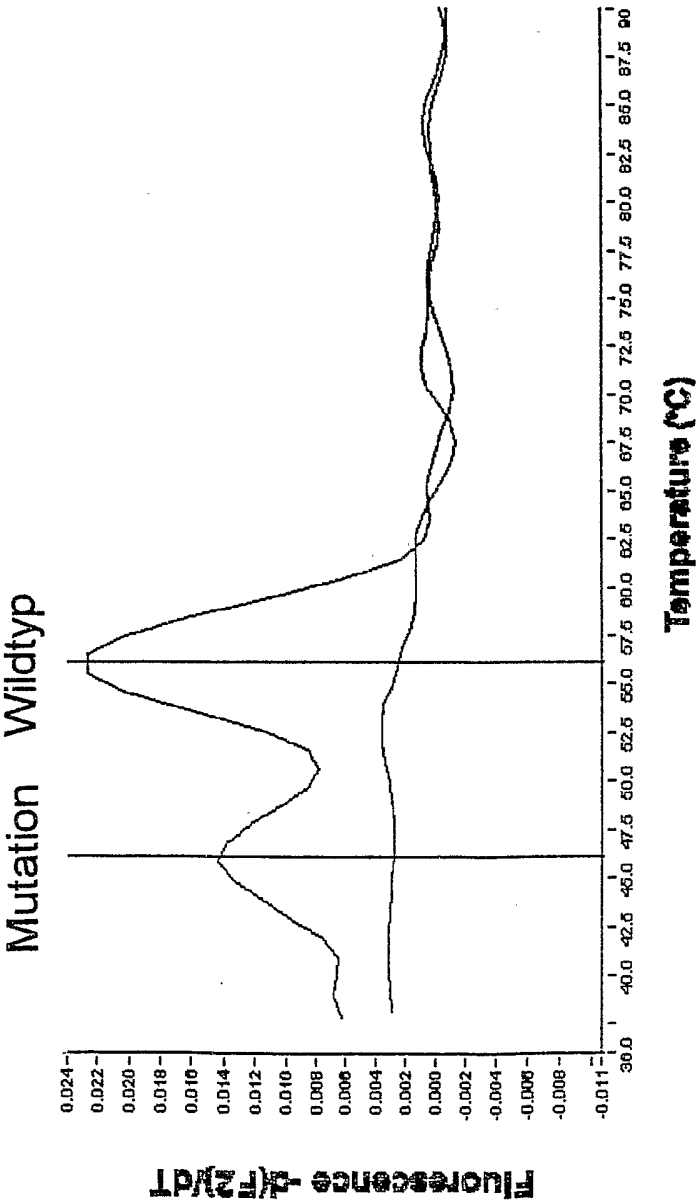


Figur 27

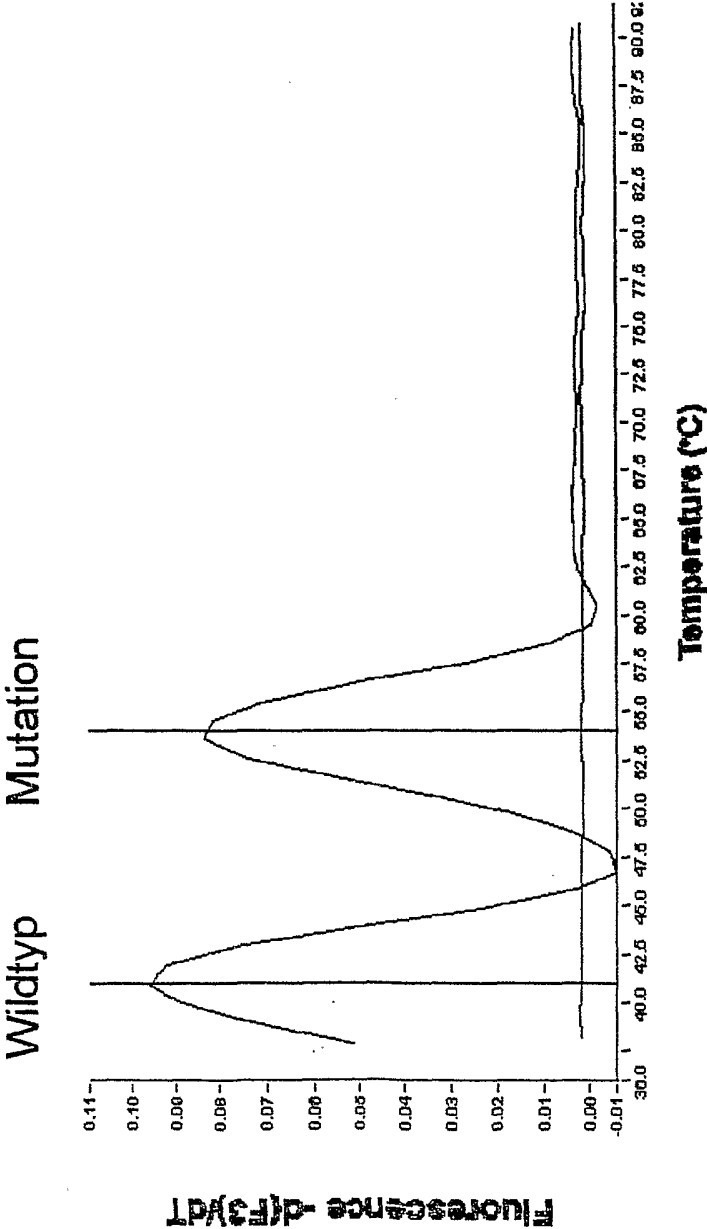


Figur 28

29/48

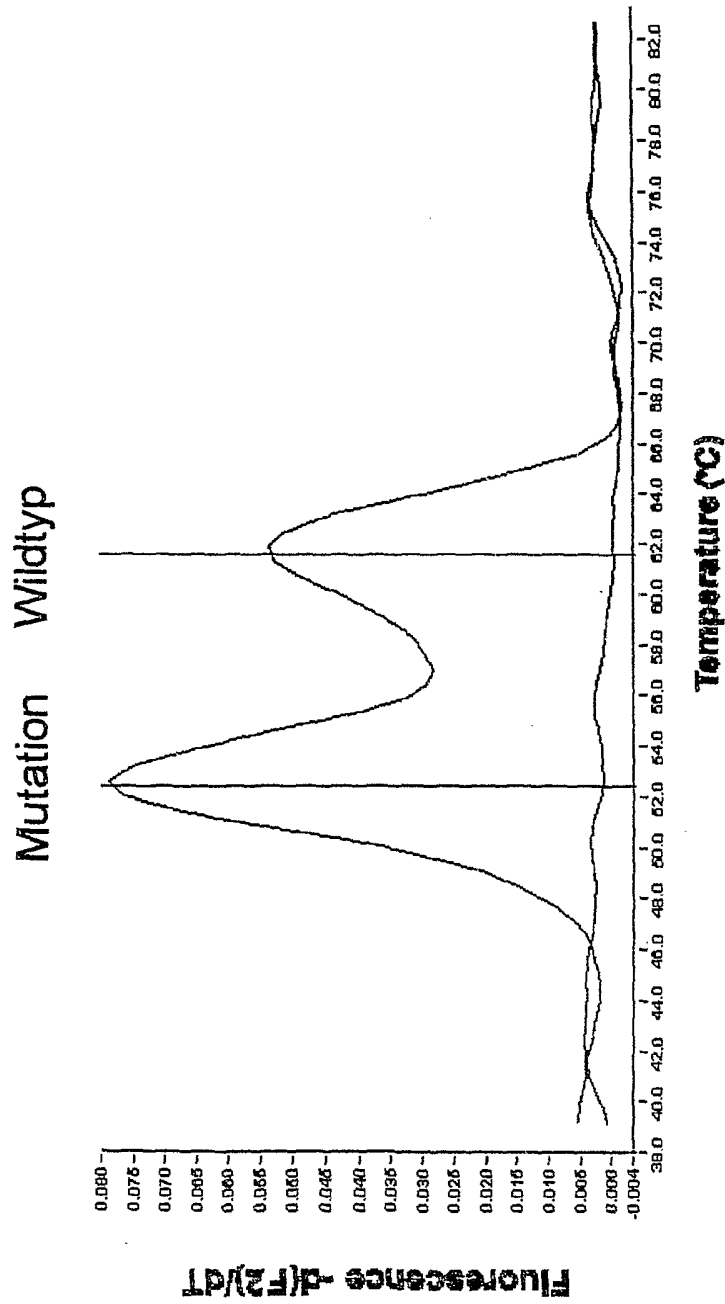


Figur 29



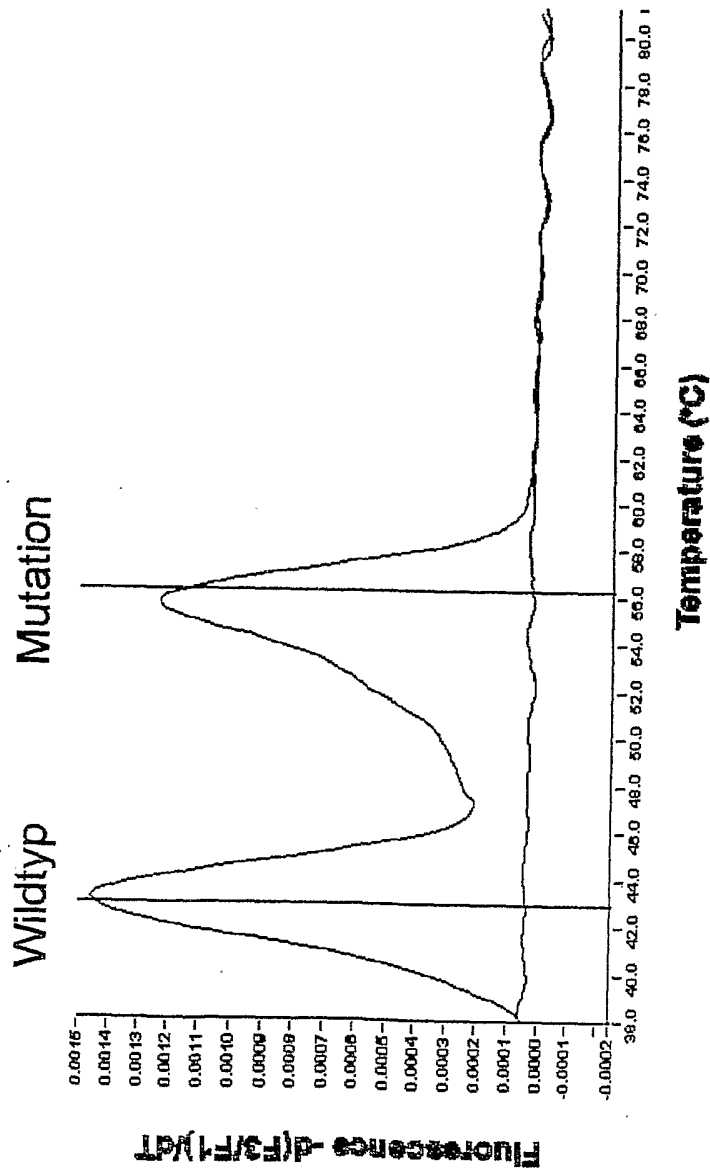
Figur 30

37148



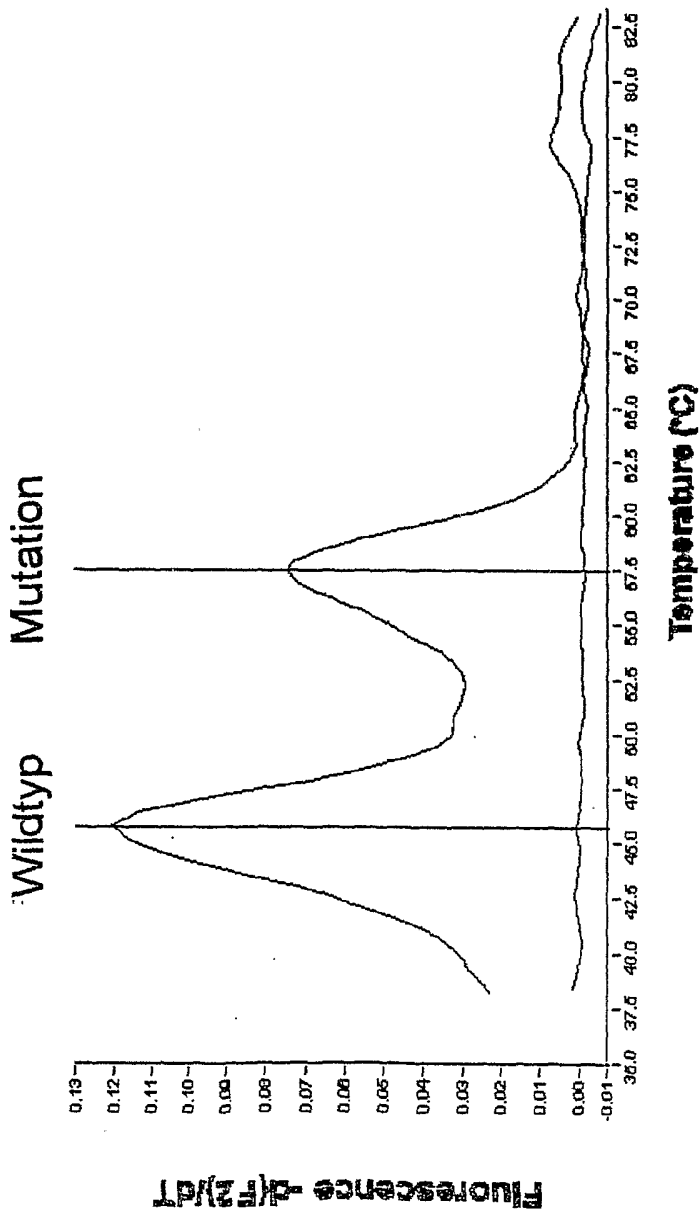
Figur 31

32/48

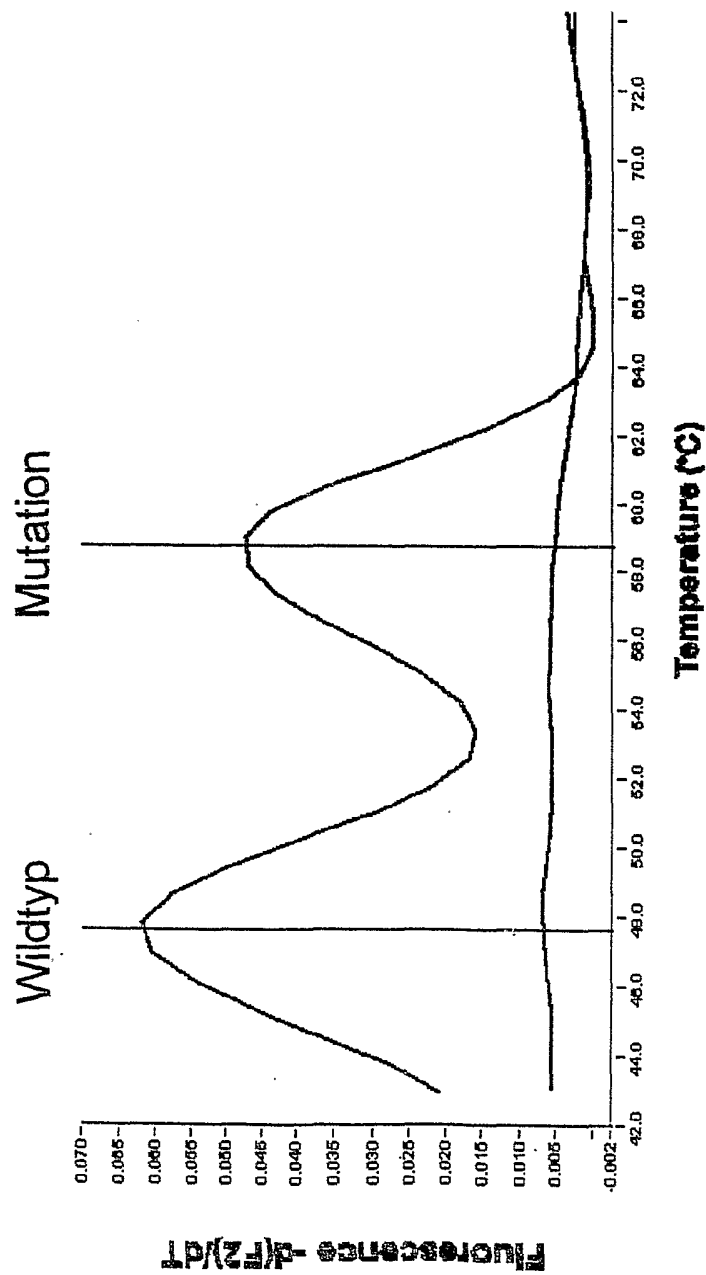


Figur 32

33/48

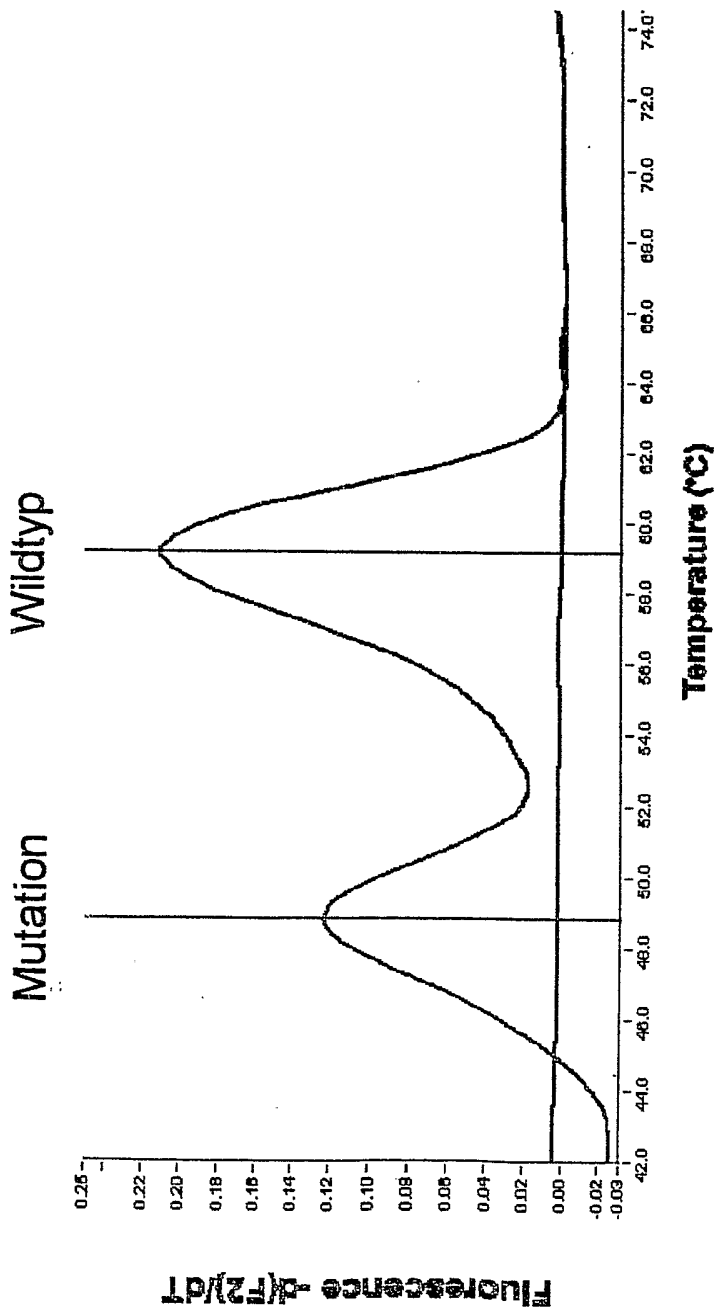


Figur 33



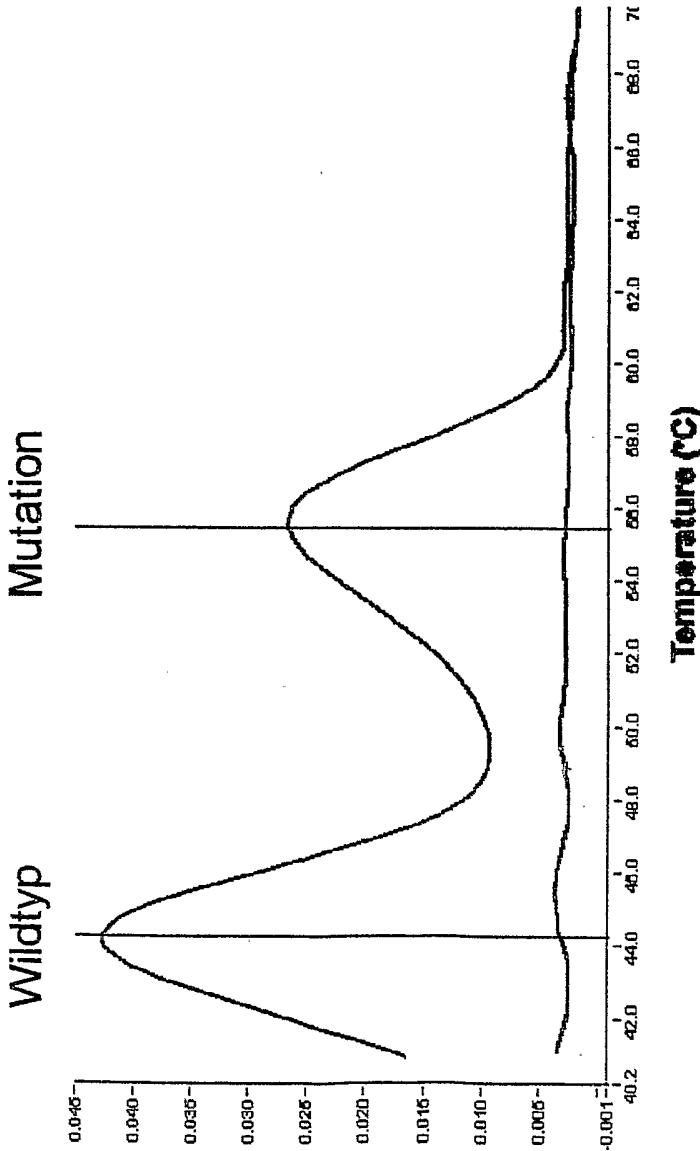
Figur 34

35/48

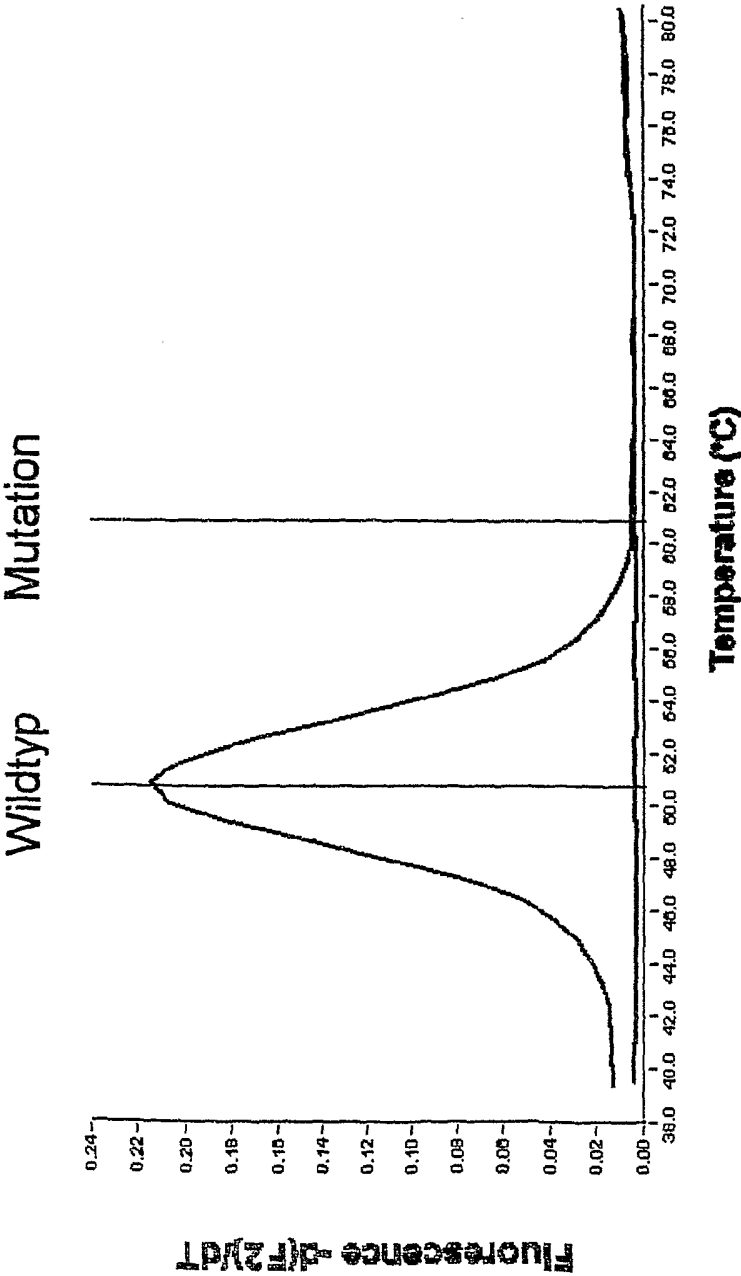


Figur 35

36/48

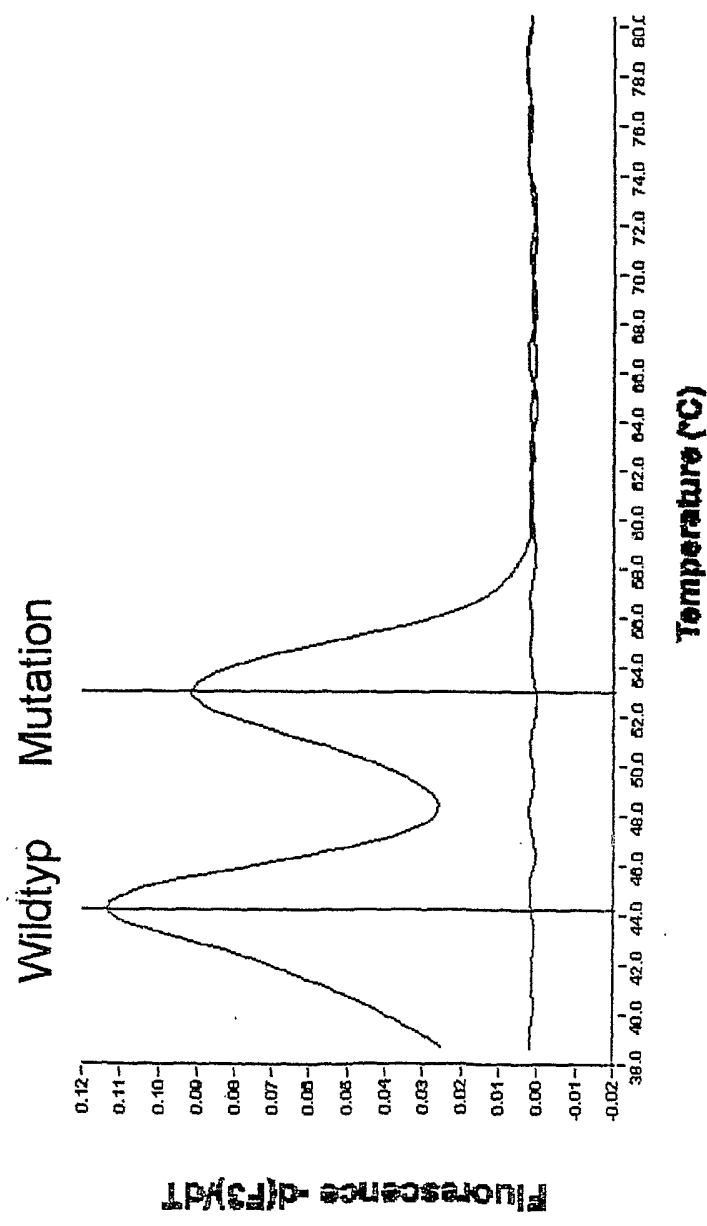


Figur 36



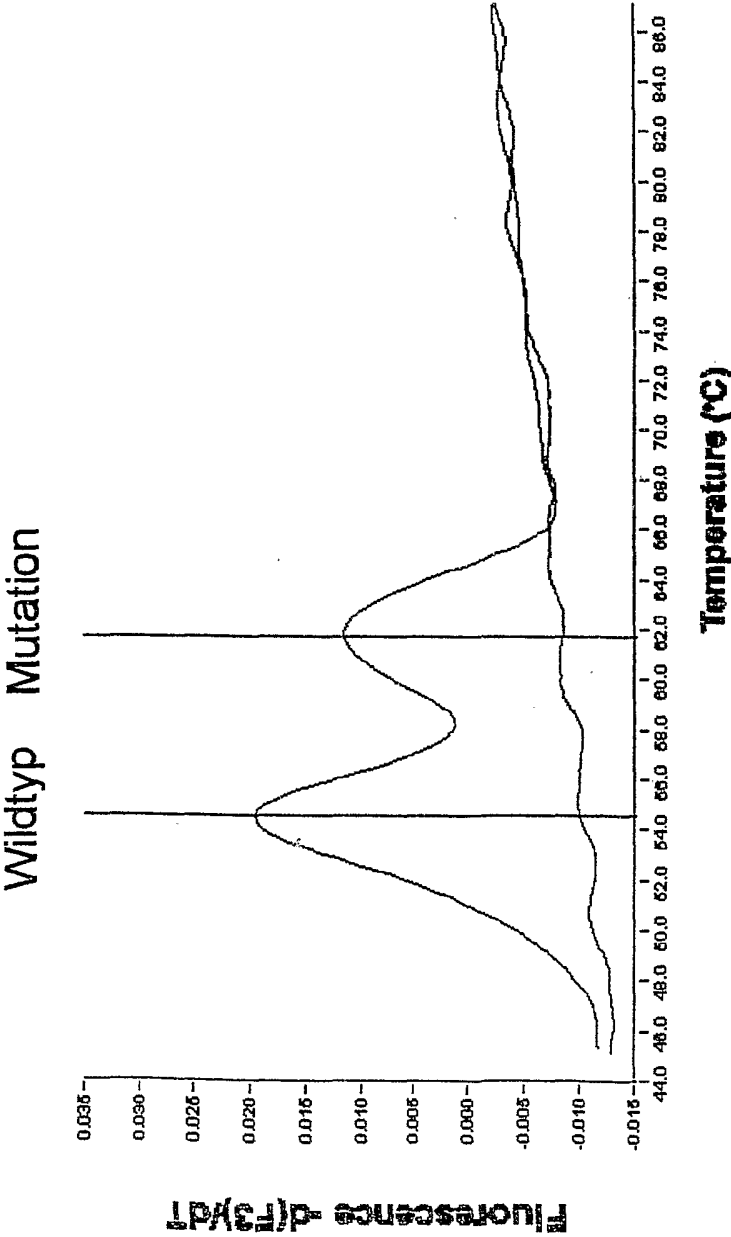
Figur 37

38/48



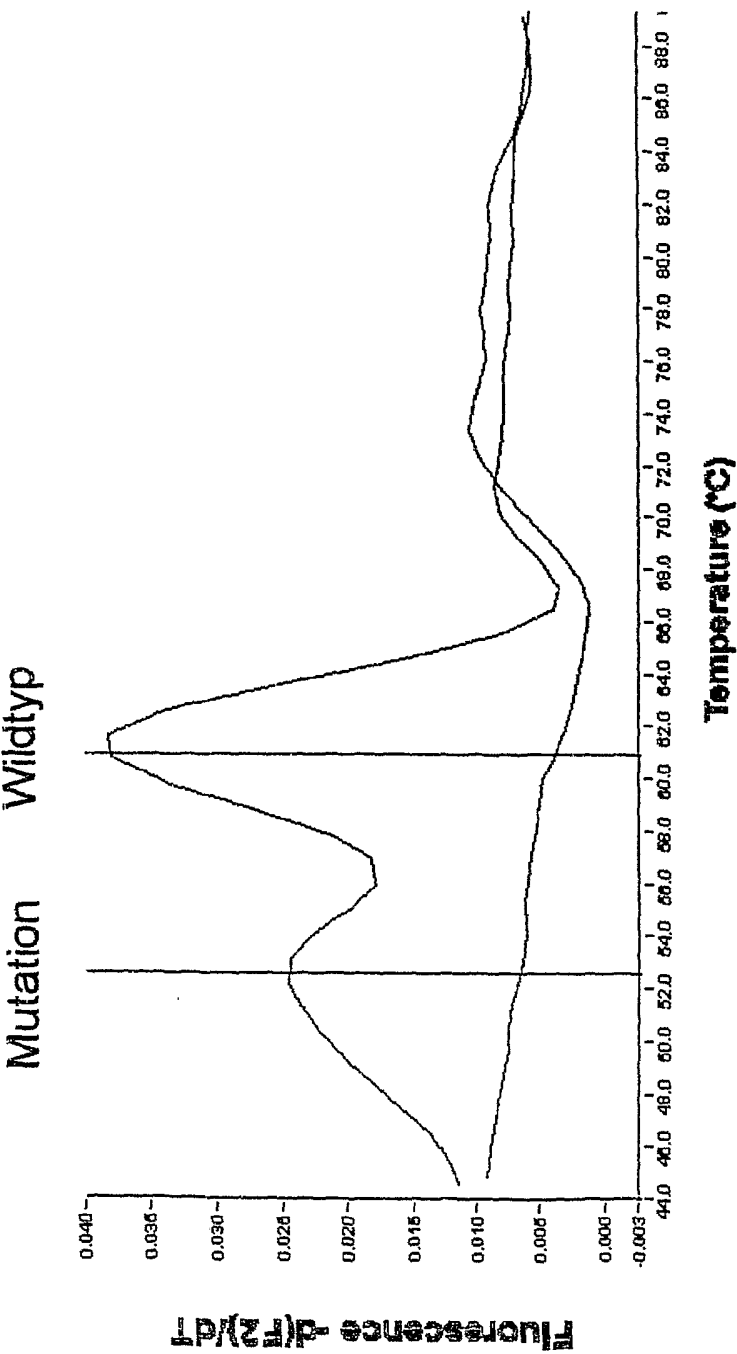
Figur 38

39/48



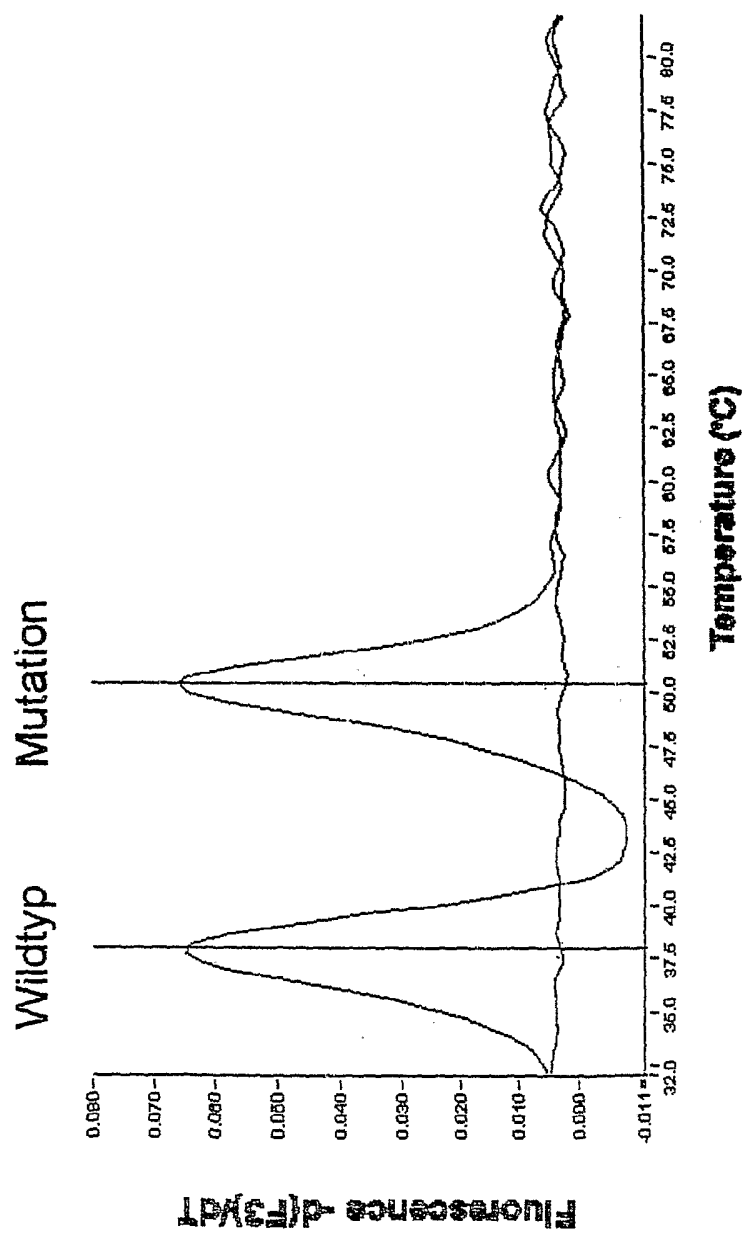
Figur 39

40/48



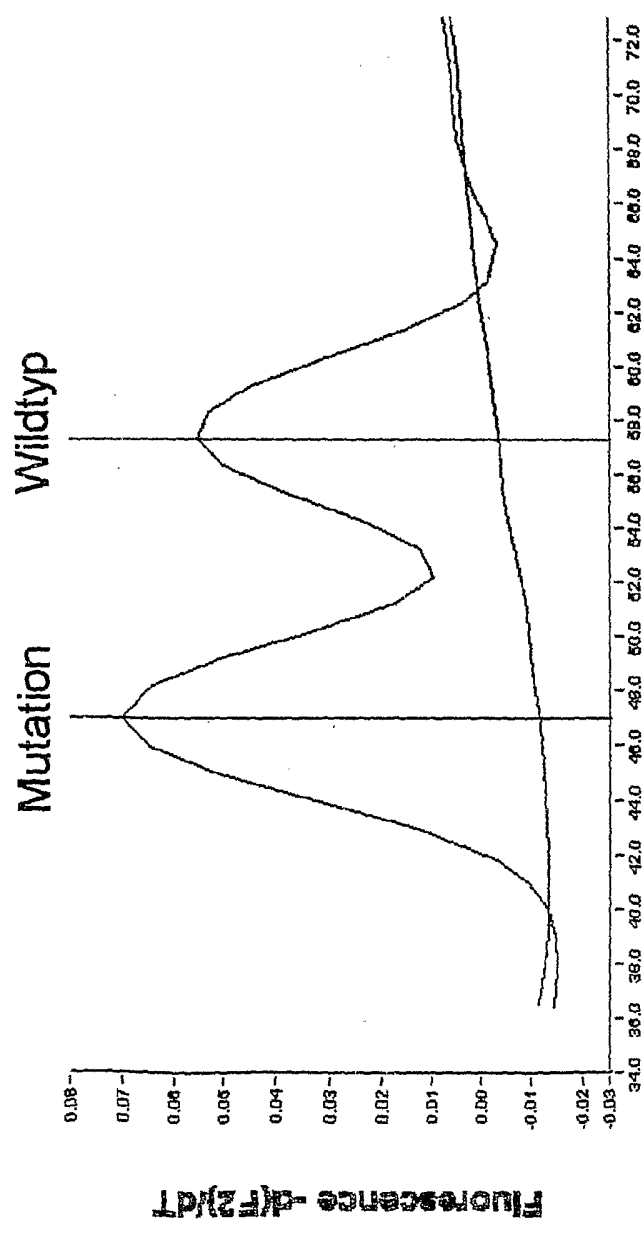
Figur 40

471/48



Figur 41

42/48



Figur 42

43/48

Figur 43 A

NAT2-Allel	191 G>A	282C>T	341T>C	481C>T	590G>A	803A>G	857G>A	Phänotyp
*4	-	-	-	-	-	-	-	Schnell
*5A	-	-	+	+	-	-	-	Langsam
*5B	-	-	+	+	-	+	-	Langsam
*5C	-	-	+	-	-	+	-	Langsam
*6A	-	+	-	-	+	-	-	Langsam
*6B	-	-	-	-	+	-	-	Langsam
*7A	-	-	-	-	-	-	+	Langsam
*7B	-	+	-	-	-	-	+	Langsam
*12A	-	-	-	-	-	+	-	Schnell
*12B	-	+	-	-	-	+	-	Schnell
*13	-	+	-	-	-	-	-	Schnell
*14A	+	-	-	-	-	-	-	Langsam
*14B	+	+	-	-	-	-	-	Langsam

Figur 43 B

4/4	4/5A	4/5B	4/5C	4/6A	4/6B	4/7A	4/7B	4/12A
4/12B	4/13	4/14A	4/14B	12A/12A	12A/12B	12A/13	12B/12B	13/12B
13/13	12A/5A	12A/5B	12A/5C	12A/6A	12A/6B	12A/7A	12A/7B	12A/14A
12A/14B	12B/5A	12B/5B	12B/5C	12B/6A	12B/6B	12B/7A	12B/7B	12B/14A
12B/14B	13/5A	13/5B	13/5C	13/6A	13/6B	13/7A	13/7B	13/14A
12B/14B								

44/48

Figur 43 C

5A/5A	5A/5B	5A/5C	5A/6A	5A/6B	5A/7A	5A/7B	5A/14A	5A/14B
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------

5B/5B	5B/5C	5B/6A	5B/6B	5B/7A	5B/7B	5B/14A	5B/14B
-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------

5C/5C	5C/6A	5C/6B	5C/7A	5C/7B	5C/14A	5C/14B
-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------

6A/6A	6A/6B	6A/7A	6A/7B	6A/14A	6A/14B
-------	-------	-------	-------	--------	--------

6B/6B	6B/7A	6B/7B	6B/14A	6B/14B
-------	-------	-------	--------	--------

7A/7A	7A/7B	7A/14A	7A/14B
-------	-------	--------	--------

7B/7B	7B/14A	7B/14B
-------	--------	--------

14A/14A	14A/14B
---------	---------

14B/14B

45/48

Fig. 44 A

TPMT-Allel	238 G>C	460G>A	719A>G	Phänotyp
*1.	-	-	-	Normal
*2	+	-	-	Reduziert
*3A	-	+	+	Fast keine
*3B	-	+	-	Reduziert
*3C	-	-	+	Reduziert

Fig. 44 B

*1/*1	*1/*2	*1/*3A	*1/*3B	*1/*3C	normal
*2/*2	*2/*3A	*2/*3B	*2/*3C		reduziert
*3A/*3B	*3A/*3C	*3B/*3B	*3B/*3C	*3C/*3C	reduziert
*3A/*3A					keine

46/48

Fig. 45 A

CYP3A4-Allel	-392 G>C	664 G>A	1334 A>G	Phänotyp
*1A	-	-	-	Normal
*1B	+	-	-	(Reduziert)
*2	-	+	-	Reduziert
*3	-	-	+	(Reduziert)

Fig. 45 B

*1A/*1A	*1A/*1B	*1A/*2	*1A/*3	normal	
*1B/*1B	*1B/*2	*1B/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
					reduziert

47/48

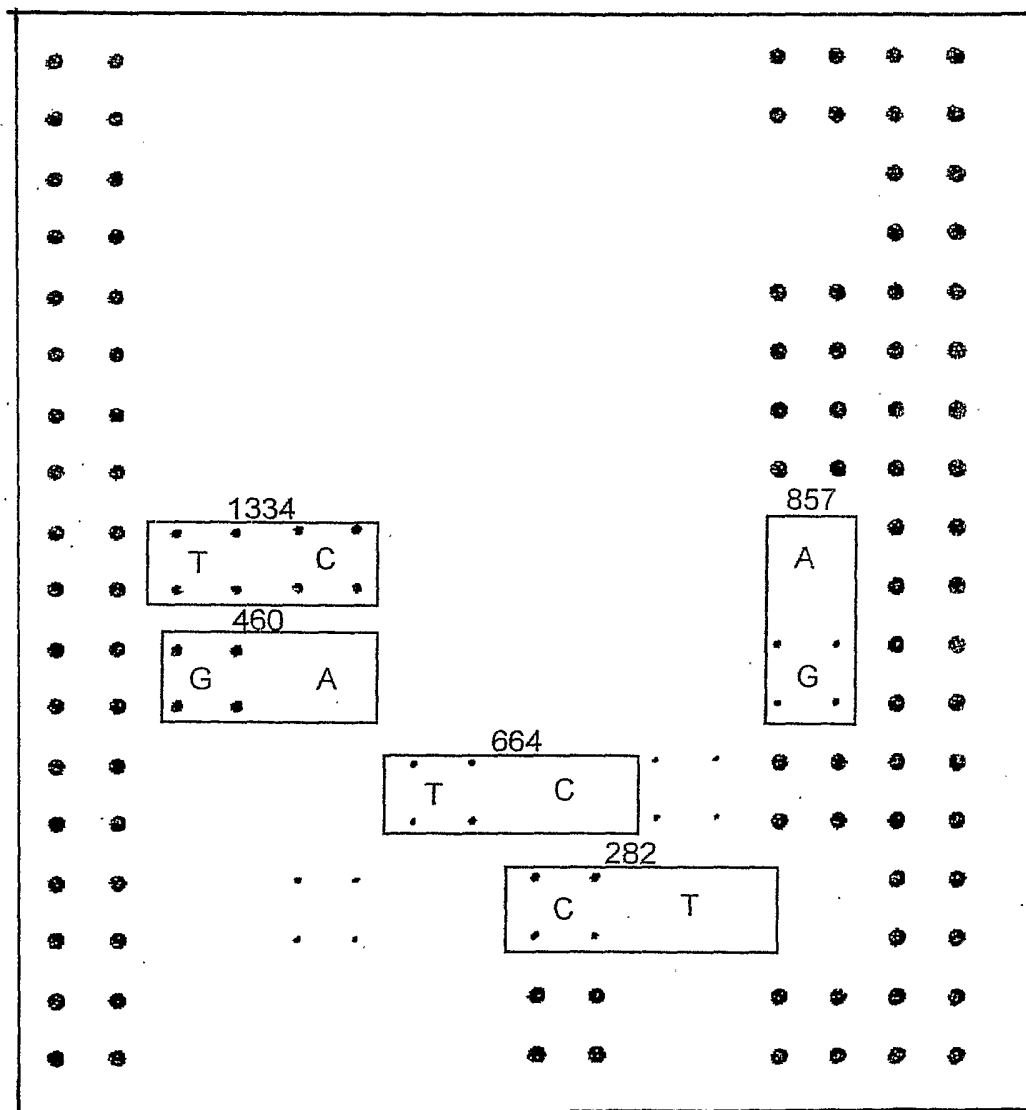
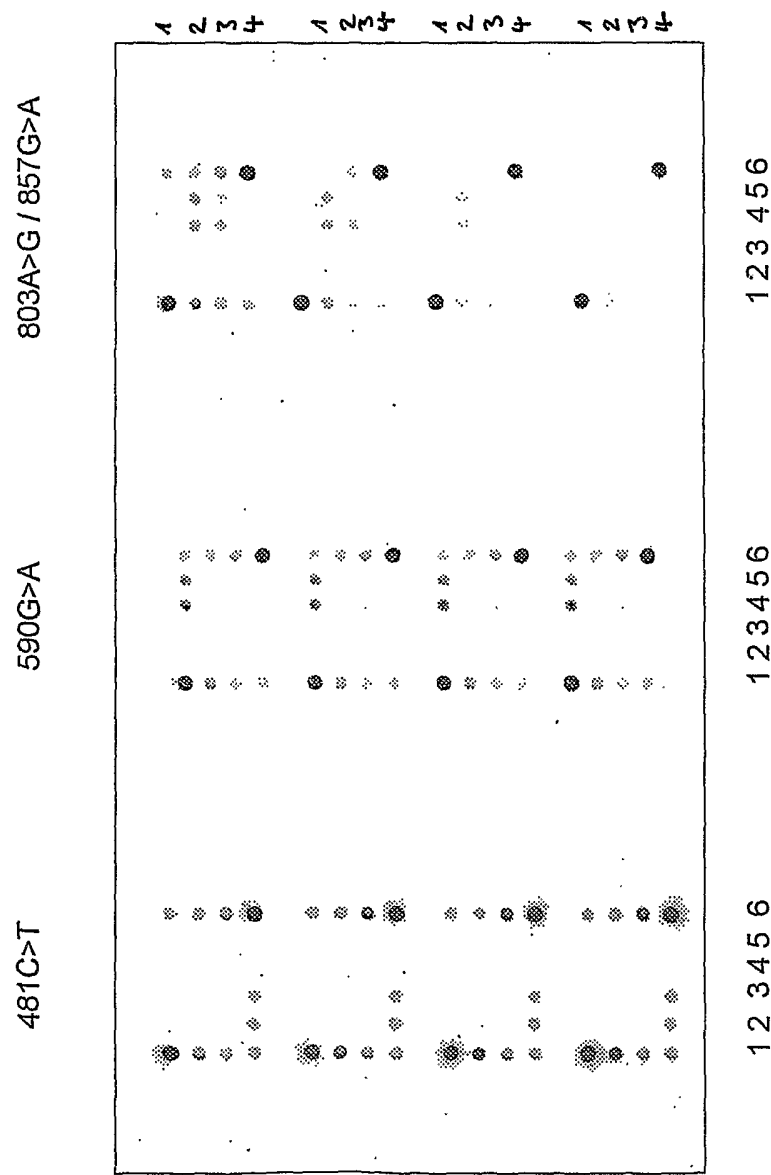


Fig. 46

48/48



Figur 47