

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/32811 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juni 2000 (08.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09344 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Dezember 1999 (01.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 55 469.9 1. Dezember 1998 (01.12.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: ESSRICH, Michael [DE/DE]; Ferdinand-Porsche-Strasse 5, D-79211 Denzlingen (DE). (74) Anwälte: BENEDUM, Ulrich, Max usw.; Haseltine Lake Partners, Rosenheimer Strasse 30, D-81669 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE APOLIPOPROTEIN-E-GENOTYPE IN A HUMAN SAMPLE (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES APOLIPOPROTEIN-E-GENOTYPS IN EINER MENSCHLICHEN PROBE (57) Abstract The invention relates to a method for determining the apolipoprotein-E-polymorphism in a human sample by PCR-amplification of a selected base sequence and detection of the apolipoprotein-E-allele, using a multiplex PCR with 6 to 7 different specific primers, four of the primers in each case ending directly at the mutation-specific sites. The primers are characterised inter alia by base mismatches at the third to fifth site before the 3' end. The invention is also characterised in that the mismatch sites of ϵ II and ϵ III or ϵ V and ϵ VI are displaced in relation to the 3' end in order to improve the amplification selectivity. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des Apolipoprotein-E-Polymorphismus in einer menschlichen Probe durch PCR-Amplifikation einer ausgewählten Basensequenz und Nachweis der Apolipoprotein-E-Allele, wobei eine Multiplex-PCR mit 6 bis 7 verschiedenen spezifischen Primern verwendet wird und jeweils vier der Primer direkt an den mutationsspezifischen Stellen enden. Die Primer zeichnen sich aus unter anderem durch Basenmismatches an der dritten bis fünften Stelle vor dem 3'-Ende und dass zur Verbesserung der Amplifikationsselektivität die Mismatch-Stellen von ϵ II und ϵ III beziehungsweise von ϵ V und ϵ VI relativ zum 3'-Ende verschoben sind.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES APOLIPOPROTEIN-E-GENOTYPS IN EINER MENSCHLICHEN PROBE

5 GEBIET DER ERFINDUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Apolipoprotein-E-Allele in einer menschlichen Probe.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

10 Das sekretorische Glycoprotein Apolipoprotein-E (fortan Apo-E) wurde ursprünglich im Blutplasma entdeckt, wo es als Bestandteil von Lipoproteinen vorkommt. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass das Glycoprotein Apo-E am Cholesterinmetabolismus und Triglyceridtransport zwischen verschiedenen Zelltypen, einschließlich Nervenzellen, beteiligt ist. Es ist auch beschrieben, dass Apo-E eine Auswirkung auf das Neuritenwachstum und die
15 Cytoskelettaktivität in Neuronen hat. Es ist bspw. beschrieben, dass die Variante ApoE4 durch Einwirkung auf den Lipoprotein-Metabolismus das Neuritenwachstum und die Mikrotubulusbildung hemmt.

Zudem ist ein Zusammenhang zwischen dem ApoE4-Genotyp und Morbus Alzheimer bekannt. Verschiedene Studien zeigen, dass das ApoE4-Allel mit einem erhöhten Risiko einer
20 Alzheimererkrankung in Verbindung steht. Insbesondere bei Patienten mit einem homozygoten ApoE4-Genotyp liegt die Wahrscheinlichkeit im Alter an Morbus Alzheimer zu erkranken sehr viel höher als bei Patienten, bei denen zumindest ein anderes ApoE-Allel vorliegt. Bei Patienten, die kein ApoE4-Allel haben, kann hingegen eine sporadische Alzheimererkrankung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

25 Die Alzheimerkrankheit ist eine neurodegenerative Krankheiten, die besonders ältere Menschen betrifft und durch starken geistigen Leistungsabfall gekennzeichnet ist. Mit über 70% ist sie die häufigste Form der Altersdemenz. Eine der pathologischen Veränderungen im Krankheitsverlauf ist die fortschreitende Ablagerung von fibrillärem Amyloidprotein, das sich in den Nervenzellen des Gehirns und später auch im synaptischen Spalt ablagert und Plaques bildet.

30 Wegen der Abgeschlossenheit des menschlichen Gehirns durch die Blut/Hirnschranke können diese pathogenen Veränderungen bei *Morbus Alzheimer* bislang mit herkömmlichen labordiagnostischen Verfahren nicht nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Plaques und neurofibrillärer Nekrosen kann daher erst *post mortem* erfolgen.

Aus diesem Grund wird seit Langem nach Verfahren gesucht, die eine frühzeitige
35 verlässliche Diagnose der Alzheimererkrankung ermöglichen.

Bisher beschränken sich die Verfahren zur frühen Diagnose der Alzheimererkrankung auf die Bestimmung des ApoE4-Status des Patienten. In jüngster Zeit wurde jedoch gefunden, dass nicht allein der Nachweis des Risikoallels ApoE4 für die Diagnose einer Alzheimererkrankung

von Bedeutung ist, sondern der gesamte ApoE-Allelstatus, d. h. das Verhältnis aller ApoE-Allele zueinander.

Neben dem entwicklungsgeschichtlich ältesten Apolipoprotein-E4 (ApoE4) sind bislang weitere häufige ApoE-Isoformen nachgewiesen worden, die als ApoE2 und ApoE3 bezeichnet werden. Diese Allele beruhen jeweils auf einer Nukleinsäuremutation, die Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 112 und 158 zur Folge haben. Während bei ApoE4 an den Positionen 112 und 158 die Aminosäure Arginin vorkommt (Arg/Arg), hat ApoE3 an diesen Stellen Cys/Arg und ApoE2 Cys/Cys.

Im Gegensatz zum ApoE4-Allel sind für die ApoE2- und ApoE3-Allele Schutzfunktionen beschrieben, die auf ein verringertes Risiko einer Alzheimererkrankung hinweisen. Verschiedene Studien unterstützen bspw. die statistische Beobachtung, dass etwa 64% des Risikos einer sporadischen Alzheimererkrankung auf die Anwesenheit des Risikoallels ApoE4 entfallen und 23% auf die Abwesenheit des ApoE2-Allels. Es ist weiter beschrieben, dass das Verhältnis von ApoE4 zu ApoE2, ähnlich wie das Verhältnis von ApoE4 zu ApoE3, auf ein erhöhtes Risiko einer Erkrankung hinweist. Fig. 1 zeigt eine altersabhängige Genotypenverteilung, aus der das prozentuale Risiko einer Alzheimererkrankung in Abhängigkeit vom Genotyp abgelesen werden kann. Das statistische Erkrankungsbild 75-jähriger Patienten zeigt bspw., dass bei einem homozygoten Genotyp ApoE4/4 nur ein 20%iger Schutz vor einer Alzheimererkrankung gegeben ist, bei dem Genotyp ApoE3/3 ein etwa 70%iger Schutz und bei Patienten mit einem ApoE2/2-Genotyp eine Erkrankung zu nahezu 100% ausgeschlossen werden kann.

Eine verlässliche Diagnose der Alzheimerkrankheit und insbesondere der Ausschluss dieser Erkrankung erfordert daher, dass das gesamte ApoE-Allelbild ermittelt und die jeweiligen Einzelwerte gegeneinander abgewogen werden.

STAND DER TECHNIK

US 5 508 167 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Apolipoprotein-E4 in einer menschlichen Probe zur Verwendung als Indikator für ein erhöhtes Risiko einer Alzheimererkrankung. Das Verfahren umfasst das Vervielfältigen des Apolipoprotein-E4-Gens aus einer menschlichen Probe durch eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion (fortan PCR genannt) den anschließenden Nachweis des ApoE4-Allels durch ein Hybridisierungsverfahren oder einen Restriktionsverdau.

Nachteilig an dem Verfahren ist, dass mit der verwendeten herkömmlichen PCR im ersten Schritt nur eine schwache Amplifikation des ApoE4-Gens erreicht wird. Dies verringert die Nachweisempfindlichkeit der amplifizierten Sequenzregionen im zweiten Verfahrensschritt, der Hybridisierung bzw. dem Restriktionsverdau.

Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass bei dem Restriktionsverdau durch ApoE-unspezifische Reaktionen des Restriktionsenzym eine Vielzahl Banden entsteht. Die Interpretation

dieser Banden erweist sich folglich als schwierig, selbst wenn die Probe auf einem Gel stark aufgetrennt wird. Für eine Routineuntersuchung scheidet dieses Verfahren daher aus.

Zur Behebung dieses Problems werden zahlreiche verschiedene Oligonukleotide vorgeschlagen, die als Primer in einer PCR zur Bestimmung von ApoE geeignet sein sollen (siehe
5 WO 97/48795 A2, WO 96/25517 A1, WO 95/16791 A1, US 5 780 587, JP-Kokai 4-320700; Chem. Abstr. 130 (1999) 1632621v; Chem. Abstr. 130 (1999) 120090d; Mol. Diagn. 1997, 2(4): pp271-276; J. Neurosci. Methods 1998, 79(2) pp 229-231; J. Lipid Res. 1991, 32(1) pp183-187).
Zugleich werden verschiedene Nachweisstrategien beschrieben, einschließlich der Verwendung von wenigstens zwei Primern (JP-Kokai 4-320700), sogenannten *base-pair mismatches* am 3'-Ende
10 (J. Lipid Res. 1991, 32(1), pp 183-187), die Verwendung einer Multiplex-PCR (DE 41 29 653 A1) oder eine Restriktionstypisierung (US 5 716 828). Es sei diesem Zusammenhang angemerkt, dass die WO 96/25517 nur die Variante 113 A/Gly113Asp berücksichtigt, allerdings steht seit der Erstveröffentlichung der Untersuchung jede Verifikation durch Dritte oder die Autoren aus.
Die vorgenannten Druckschriften werden durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung
15 aufgenommen.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Es ist Aufgabe der Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, das einen schnellen, hoch spezifischen, empfindlichen Nachweis der ausgewählten Allele des Apolipoproteins-E ermöglicht.

20 Die Aufgabe wird gelöst durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung des Apolipoprotein-E-Polymorphismus in einer menschlichen Probe durch PCR-Amplifikation einer ausgewählten Basensequenz und Nachweis der Apolipoprotein-E-Allele, wobei eine Multiplex-PCR mit 6 verschiedenen spezifischen Primern verwendet wird und jeweils vier der Primer direkt an den mutationsspezifischen Stellen enden. Die zwei Basisprimer sind nicht variabel und liegen
25 vorzugsweise in Regionen, in denen keine Mutationen bekannt sind.

Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren, bei dem die Primer, die direkt an den mutationsspezifischen Stellen enden, durch Basenmismatches an der dritten bis fünften, vorzugsweise an der vierten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt sind und worin wahlfrei zur Verbesserung der Amplifikationsselektivität die Mismatch-Stellen von ϵ II und ϵ III
30 beziehungsweise von ϵ V und ϵ VI relativ zum 3'-Ende verschoben sein können.

Die Primer haben bevorzugt eine Länge von 10 bis 30 Basenpaare, besonders bevorzugt von 15 bis 28 Basenpaare.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden als Primer vorzugsweise Oligonukleotide verwendet, die die Sequenz eines Apolipoprotein-Allels aufweisen und 15 bis 28 Basenpaare
35 lang sind, und wobei vier der Primer direkt an den mutationsspezifischen Stellen der Apolipoprotein-E-Allele enden und gegebenenfalls durch Basenmismatches an der dritten bis fünften, vorzugsweise an der vierten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt sind, und die zwei Basisprimer nicht variabel sind und vorzugsweise in Regionen liegen, die keine Mutationen aufweisen.

Zudem können die Oligonukleotide einen unspezifischen Sequenzteil zur leichteren elektrophoretischen Unterscheidbarkeit haben.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Verfahren, bei dem als Primer Oligonukleotide verwendet werden mit den Sequenzen:

5

ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC, SEQ ID NO: 1

10

ε II: 5' CAC CAG GCG GCC^G TCG, SEQ ID NO: 2

ε III: 5' TTT CTA ATC TTA^A CAC CAG GCG GCC^G GCA, SEQ ID No: 3

15

ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4

ε V: 5' ^T-GGT ACA CTG CCA^A GGC G, und SEQ ID NO: 5

20

ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT^T -GGT ACA CTG CCA^C GGC A, SEQ ID NO: 6

wobei an der dritten bis fünften Stelle vor dem 3'-Ende ein Basenmismatch eingefügt sein kann und zur Verbesserung der Amplifikationsselektivität die Mismatch-Stellen von ε II und ε III beziehungsweise von ε V und ε VI relativ zum 3'-Ende verschoben sein können, bspw. wie nachstehend:

25

ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC, SEQ ID NO: 1

ε II: 5' CAC CAG GCG GCC GCG, SEQ ID NO: 7

ε III: 5' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCC GCA, SEQ ID NO: 8

30

ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4

ε V: 5' GGT ACA CTG CCA GGC G, und SEQ ID NO: 9

ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT GGT ACA CTG CCA GGC A, SEQ ID NO: 10

oder

ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC, SEQ ID NO: 1

35

ε II: 5' CAC CAG GCG GCC TCG, SEQ ID NO: 11

ε III: 5' TTT CTA ATA TTA CAC CAG GCG GCG GCA, SEQ ID NO: 12

ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4

ε V: 5' TGG TAC ACT GCC AGA CG, SEQ ID NO: 13

ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT TGG TAC ACT GCC ACG CA. SEQ ID NO: 14

40

Die Primer haben vorzugsweise Schmelzpunkte, die voneinander höchstens um 5°C, vorzugsweise um 2°C abweichen. Die Primer können auch fluoreszenzmarkiert sein, so dass der Nachweis der Allelvarianten mit einem Mehrfachfluoreszenzdetektor erfolgen kann.

5 Vorzugsweise sollte in der Multiplex-PCR des erfindungsgemäßen Verfahrens ein DMSO-freies Relaxationsreagens, vorzugsweise Solution-D® von Qiagen GmbH, Hilden, verwendet werden.

Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Verfahren, bei dem die Primer ε I und ε IV etwas weiter entfernt von den diagnostischen Codons liegen. Dieses Verfahren ist bspw. geeignet, wenn man ein Elektrophoresesystem mit niedriger Gelkonzentration verwendet, bspw. aus 10 Kostengründen oder aufgrund technischer Vorgaben. Der Primer ε IV liegt dabei bevorzugt auf der 3'-Seite des Codons 158.

Die erfindungsgemäße PCR ermöglicht auch eine wirksame Synthese längerer Amplimere mit hoher Ausbeute, bspw. Amplimere mit einer Länge von 200 bis 700 Basenpaaren. Um die Amplimere in der Elektrophorese oder der Flüssigchromatographie besser voneinander 15 unterscheiden zu können, kann man daher die Längendifferenz der Primer vergrößern, bspw. indem einzelnen codonspezifischen Primern eine Anzahl Basen als "Schwanz" oder "Anhängsel" angefügt wird.

Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Verfahren, bei dem anstelle der 5'-Primer ε I und ε IV Mischbasenoligonukleotiden eingesetzt werden. Dies betrifft Fälle, bei denen im 20 Sequenzbereich der Basisprimer ε I und ε IV alzheimerrelevante Mutationen auftreten. Solche Sequenzvarianten, die die Primerbindung beeinflussen können, können durch die Verwendung von Mischbasenoligonukleotiden neutralisiert werden. Mischbasenoligonukleotide entsprechen einem Oligonukleotidgemisch, das aus gleichen Teilen Oligonukleotide besteht, die jeweils eine der möglichen Basen an der mutationsrelevanten Position enthalten. So können auch bei 25 vorliegenden Mutationen im Bereich der Basisprimer alle Sequenzvarianten in der Multiplex-PCR erfasst werden.

Noch eine weitere Ausführungsform betrifft ein Verfahren, wobei anstelle einer Multiplex-PCR eine PCR mit zwei Oligonukleotiden als Primer verwendet wird mit den Sequenzen:

30	rE 1: 5' CCAAggAgCTgCAggCg und	SEQ ID NO: 15
	rE 2: 5' CCggCCTggTACACTgC,	SEQ ID NO: 16

und zum Nachweis eine Restriktionstypisierung erfolgt.

Die Erfindung betrifft zudem Oligonukleotide, die eine Sequenz aus einem Apolipoprotein- 35 Allel aufweisen, 15 bis 28 Basenpaare lang sind, und entweder direkt an einer mutationsspezifischen Stelle eines Apolipoprotein-E-Allels enden und gegebenenfalls durch Basenmismatches an der dritten bis fünften, vorzugsweise an der vierten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt sind, oder invariable sind und in einer mutationsfreien Region liegen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Oligonukleotide mit den nativen ApoE-Sequenzen und Oligonukleotide, worin die genannten Mismatches und Verschiebungen enthalten sind.

Erfindungsgemäß werden die vorstehenden Oligonukleotide als Primer in einer Multiplex-PCR zum Nachweis von Apolipoprotein-E-Allelen eingesetzt.

5 Die Erfindung betrifft auch Diagnosekits für die Alzheimererkrankung, umfassend
a) Oligonukleotide mit den oben angegebenen ApoE-Sequenzen bzw. den Mismatch-Sequenzen und b) PCR-Reagenzien, insbesondere Polymerase, dNTPs und Relaxationsreagens.

10 Eine Ausführungsform betrifft ein Diagnosekit, das eine Multititerplatte umfasst, in der die Reaktionsreagenzien verglast, d. h. in Zucker vernetzt enthalten sind, so dass man für den Nachweis lediglich die zu untersuchende Probe und Wasser zugeben muss. Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Kit, das Nachweisstreifen enthält, auf denen die Reaktionsreagenzien aufgebracht sind. Eine dritte Ausführungsform umfasst einen Kit, welcher ein oder mehrere der angegebenen Oligonukleotide auf einem festen Träger enthält.

15 Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, dass deutlich mehr gewünschtes PCR-Produkt gewonnen werden kann als mit herkömmlichen Verfahren und zum Nachweis der Allele kein Hybridisierungsverfahren bzw. Restriktionsverdau benötigt wird.

20 Zudem wurde erkannt, dass der entsprechende DNS-Bereich der Apolipoprotein-E-Gene aufgrund eines vergleichsweise hohen GC-Gehalts von über 70% zur Bildung unspezifischer Doppelbindungen neigt und dadurch die PCR stark beeinträchtigt. Eine spezifische PCR kann daher nur stattfinden, wenn die Tendenz zu unspezifischen Doppelstrangbildungen herabgesetzt wird. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden daher als Primer kürzere Oligonukleotide als bei den herkömmlichen Verfahren eingesetzt und zudem eine geringere Magnesiumkonzentration.

25 Es wurde auch gefunden, dass die Zugabe von DMSO ins Reaktionsgemisch die PCR-Reaktion nicht positiv beeinflusst. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wurde daher als Relaxationsreagens ein DMSO-freies Additiv verwendet, und zwar Solution-D® der Firma Qiagen. Es können auch andere DMSO-freie Relaxationsreagenzien wie Lösung-W1®, ein Gemisch aus Polyoxyethylenether der Firma Sigma, oder Mischungen aus Tween-20®, Tween-25®, Tween-30®
30 und Tween-35® verwendet werden.

Desweiteren wurde gefunden, dass durch Einführung einer Verschiebung zwischen den Primer-Sequenzen von ϵ II und ϵ III sowie ϵ V und ϵ VI die Amplifikationsselektivität in dem PCR-Verfahren überraschend erhöht wird.

35 Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft eine Multiplex-PCR, die zum Nachweis weder einen Restriktions- noch einen Hybridisierungsschritt benötigt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden in einem Schritt sechs kurze bis sehr kurze Primer eingesetzt, von denen vier jeweils direkt an den mutationsspezifischen Stellen enden und durch Basenmismatches an der vierten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt sind. Diese Oligonukleotide werden als

Stolperprimer bezeichnet. Die zwei weiteren Primer, auch "Forward"- oder Basisprimer genannt, sind nicht variabel und liegen vorzugsweise in konservierten Bereichen, in denen keine Mutationen vorliegen, bzw. bekannt sind. Durch diese Reaktion können alle in der Probe vorkommenden Allele in einem Reaktionsansatz nachgewiesen werden, und zwar direkt nach Auftrennung der

5 Banden in einem einfachen Agarosegel mit Ethidiumbromid. Die kurzen, vergleichsweise nahe beieinander liegenden Primer ermöglichen kurze Reaktionszyklen und einen hoch spezifische Nachweis. Zudem ist die erfindungsgemäße Reaktion hoch effektiv und ermöglicht, dass geringere Oligonukleotidmengen eingesetzt werden können als bei herkömmlichen Verfahren.

Als Vergleichsbeispiel wird eine Multiplex-PCR beschrieben bei der vier kurze Primer

10 eingesetzt werden, von denen drei jeweils direkt an den mutationsspezifischen Stellen enden und durch Basenmismatches an der zweiten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt sind. Diese liefern keine ausreichend spezifische Reaktion.

Das erfindungsgemäße Verfahren liefert je nach Genotyp der Patientenprobe zwei (bei einem homozygoten Genotyp) bzw. drei oder vier Banden (bei einem heterozygoten Genotyp).

15 Die jeweiligen Genotypen lassen sich dabei an der Kombination der Banden unterscheiden. Das Allel $\epsilon 2$ liefert Banden bei 85 und 110 bp (Basenpaaren), das Allel $\epsilon 3$ Banden bei 85 und 98 bp und das Allel $\epsilon 4$ Banden bei 73 und 98 bp.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

20

Es zeigt:

Fig. 1 eine altersabhängige Genotypenverteilung, aus der das prozentuale Risiko einer Alzheimererkrankung in Abhängigkeit vom Genotyp abgelesen werden kann;

25

Fig. 2 den Abschnitt der Nukleinsäuresequenz des ApoE-Proteins, der den Bereich mit den Codons 112 und 158 umfasst (SEQ ID NO: 23);

30

Fig. 3 eine Übersicht der Lokalisation der Apolipoprotein-E-Allele und der bei der Multiplex-PCR verwendeten Primer ϵI bis ϵVI auf dem Apolipoprotein-E-Gen;

Fig. 4 das Bandenmuster der amplifizierten und im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte verschiedener Patientenproben;

35

Fig. 5 die Laufstrecken der ApoE-Amplimere in der Elektrophorese.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst eine Multiplex-PCR zur Vervielfältigung ausgewählter Genfragmente des Apolipoprotein-E-Gens, die anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid nachgewiesen werden.

5 Fig. 1 zeigt eine statistische Auswertung des Risikos einer sporadischen Alzheimererkrankung von Patienten mit verschiedenen ApoE-Genotypen in Abhängigkeit vom Alter.

Fig. 2 zeigt einen Ausschnitt der Nukleinsäuresequenz des ApoE-Proteins, der den Bereich mit den Codons 112 und 158 umfasst, wo die mutationsspezifischen Stellen liegen.

Bei ApoE4 kodieren die Nukleinsäuresequenzen CgC an den Positionen 112 und 158 für die Aminosäuren Arginin (Arg/ Arg), bei ApoE3 kodieren TgC und CgC für Cys/Arg und bei ApoE2 stehen CgC an beiden Positionen für Cys/Cys.

Fig. 3 zeigt eine Übersicht der Apolipoprotein-E-Allele und die Lokalisation der zur Multiplex-PCR verwendeten Primer ϵ I bis ϵ VI auf dem Apolipoprotein-E-Gen. Das Apolipoprotein-E-Gen enthält 2 Nukleinsäurecodons, die bei den jeweiligen ApoE-Isomeren verschieden sind und anhand derer sie sich unterscheiden lassen. Für das erfindungsgemäße Verfahren wurde eine DNS-Region ausgewählt, die die beiden variablen Nukleinsäurecodons (für AS 112 und 158) enthält. Beide Einzelnukleotidwechselstellen liegen im Exon 4 des ApoE-Gens. Beide Codons kommen meist in der Form CGC (für Arginin) und TAC (für Cystein) vor. Die drei häufigsten Kombinationen, die für die neuronale Prognose bedeutsam sind, sind die Allele mit den Codons ..CGC...CGC.. in Apo ϵ 4, ..TAC... CGC.. in Apo ϵ 3 und ..TAC..TAC..in Apo ϵ 2.

Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft eine Multiplex-PCR mit sechs kurzen Primern, von denen vier jeweils direkt an den mutationsspezifischen Stellen enden und durch Basenmismatches an der vierten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt sind. Die beiden 5'-Primer ϵ I und ϵ IV sind in einem Sequenzbereich platziert, der hinsichtlich alzheimerrelevanter Mutationen nach derzeitiger Kenntnis invariabel ist. Werden in diesem Bereich Sequenzvarianten bekannt, die die Primerbindung beeinflussen, was leicht möglich ist, so werden diese durch Verwendung von Mischbasenoligonukleotiden neutralisiert.

Die erfindungsgemäßen Primer sind so entworfen, dass ihre Schmelzpunkte um 2°C aneinander angeglichen sind. Dies betrifft alle Primer, die in einer Multiplex-PCR eingesetzt werden, auch die Oligonukleotide, die einen unspezifischen oder "random" Anhang haben. Dieser Anhang von 12 bis 20 Nukleotiden ermöglicht, dass man die verschiedenen Allele nach der Auftrennung auf einem Agarosegel voneinander unterscheiden kann.

Als Primer werden Oligonukleotide mit nachstehende Sequenzen verwendet, die komplementär zum ausgewählten DNS-Bereich sind:

35

ϵ I:	5' GCT GTC CAA GGA GCT GC	SEQ ID NO: 1
ϵ II:	5' CAC CAG GCG GCG GCG	SEQ ID NO: 17
ϵ III:	5' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCG GCA	SEQ ID NO: 18

ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G SEQ ID NO: 4
 ε V: 5' GGT ACA CTG CCA CGC G SEQ ID NO: 19
 ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT GGT ACA CTG CCA CGC A SEQ ID NO: 20

- 5 oder nach dem gleichen Prinzip aufgebaute Oligonukleotide, die zusätzlich eine Verschiebung aufweisen zwischen ε II und ε III sowie zwischen ε V und ε VI aufweisen wie

ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC SEQ ID NO: 1
 ε II: 5' CAC CAG GCG GCC TCG SEQ ID NO: 11
 10 ε III: 5' TTT CTA ATA TTA CAC CAG GCG GCG GCA SEQ ID NO: 12
 ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G SEQ ID NO: 4
 ε V: 5' TGG TAC ACT GCC AGA CG SEQ ID NO: 13
 ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT TGG TAC ACT GCC ACG CA. SEQ ID NO: 14

- 15 Bei vier dieser Primer ist an der dritten, vierten oder fünften Stelle vom 3'-Ende des Oligonukleotids ein Basenmismatch eingefügt, das beim Anlagern des Primers zu einem Wobbeleffekt führt und den Primer zu einem sogenannten Stolperprimer macht. Von den vorstehenden erfindungs-
- 20 gemäßen Oligonukleotiden sind ε II, ε III und ε V, ε VI Stolperprimer. Bei Ihnen ist an der vierten Stelle vom 3'-Ende (siehe markierte Base) ein Basenmismatch eingefügt. Bei den Primern ε II und ε III ist das sequenzgemäße C gegen ein G ausgetauscht. Der Austausch kann auch gegen eine andere Base, bspw. T erfolgen. Bei den Primern ε V und ε VI ist das sequenzgemäße G gegen ein C ausgetauscht. Der Austausch kann auch gegen eine andere Base, bspw. T erfolgen.

- Es wurde gefunden, dass die Position des Basenmismatches für den Wobbeleffekt entscheidend ist. Eine Stolperbase an der ersten oder zweiten Stelle vom 3'-Ende des Primers
- 25 führt dazu, dass das 3'-Ende beim "Annealingschritt" der PCR "flattert", d. h. sich das Oligonukleotid nicht ausreichend an die DNS anlagert, und folglich die Polymerase nicht ansetzen kann. Eine Stolperbase an der Position 6 oder an einer anderen Stelle, die weiter 5' liegt, liefert hingegen keine ausreichende Selektivität zur Unterscheidung der Allele. Zur Unterscheidung zweier Allele, die nur in einer Base voneinander abweichen, benötigt man eine sehr hohe Selektivität. Diese
- 30 wird erfindungsgemäß erreicht durch Einfügen einer Stolperbase an der dritten bis fünften Stelle vom 3'-Ende. Dadurch wird die Bedeutung der letzten Base vor der mutationsspezifischen Stelle erhöht und der Primer bindet nur solche Moleküle, zu denen auch die letzte Base komplementär ist.

- Desweiteren hat sich bewährt, wenn bei der PCR-Amplifikation ein weiteres 15 bis 50
- 35 Nukleotide langes Oligonukleotid zugesetzt wird, dessen 3'-Ende durch eine Dideoxi-Eigenschaft oder einen vergleichbaren Polymerisationsblock charakterisiert ist und mit einer Sequenz zwischen den Amplimerpaaren hybridisiert. Figur 3 zeigt die Position dieses Stopper-Oligos,

welches verhindert, dass die Polymerase erheblich über das ϵ I - ϵ III-Amplimer hinauslesen kann. Das weitere Oligonukleotid hat bevorzugt folgende Sequenz:

ϵ VII: 5' GTG CAG GCC ATG CTC GG^{dd}. SEQ ID NO: 21

5

Durch diese Reaktion können in einem Ansatz alle in der Probe vorkommenden Allele nachgewiesen werden. Dabei erhält man für jedes der verschiedenen Codons eine eigene Bande. Die Banden werden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Je nach Genotyp der Patientenprobe erhält man zwei (bei einem homozygoten Genotyp) oder drei bis vier Banden (bei einem heterozygoten Genotyp), die den verschiedenen Allelen zugeordnet werden können.

Wenn die Primer ϵ I und ϵ II bei der Multiplex-PCR zum Einsatz kommen, erzeugen sie ein Amplimer mit einer Länge von 73 bp; spezifisch für Arg 112. Kommen die Primer ϵ I und ϵ III bei der Multiplex-PCR zum Einsatz, entsteht ein Amplimer mit einer Länge von 85 bp, spezifisch für Cys 112. Wenn die Primer ϵ IV und ϵ V bei der Multiplex-PCR zum Einsatz kommen, erzeugen sie ein Amplimer mit einer Länge von 98 bp; spezifisch für Arg 158 und kommen die Primer ϵ IV und ϵ VII zum Einsatz, entsteht ein Amplimer mit einer Länge von 110 bp, spezifisch für Cys 158. Die drei unterschiedlichen Genmorphen ergeben folgende Amplimerkonfigurationen:

Allel ϵ 4 (Arg 112, Arg 158): bp 73 und bp 98,
Allel ϵ 3 (Cys 112, Arg 158): bp 85 und bp 98, und
Allel ϵ 2 (Cys 112 und Cys 158): bp 85 und bp 110.

Anhand der Kombination der Amplimere können dann wie oben beschrieben die jeweiligen Genotypen unterschieden werden. Daraus ergibt sich im diploiden Genom der Genotyp je nach Amplimerkombination wie folgt:

Genotyp:	Banden mit Basenpaaren:
ϵ 4/4:	73 und 98,
ϵ 4/3:	73, 85 und 98,
ϵ 4/2:	73, 85, 98 und 110,
ϵ 3/3:	85 und 98,
ϵ 3/2:	85, 98 und 110 und
ϵ 2/2:	85 und 110.

35

Fig. 4 zeigt das Bandenmuster des amplifizierten und im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkts einer Patientenprobe. In den Bahnen 1 und 8 sind als Referenz Größenmarker aufgetragen, in Bahn 1 ein 100 bp-Marker und in Bahn 8 ein 20 bp-Marker. Die Bahnen 2-7 zeigen

das aufgetrennte PCR-Produkt verschiedener Patientenproben. Über die Laufstrecke läßt sich zunächst die Größe der Banden ermitteln, aus der man nach dem vorstehend genannten Schlüssel den vorliegenden ApoE-Genotyp bestimmen kann. Die Probe in Bahn 2 zeigt 2 Banden von 73 und 98 bp, die dem Genotyp $\epsilon 4/4$ entsprechen. Die Banden in Bahn 3 haben eine Größe von 85 bzw. 98 bp und stehen für den Genotyp $\epsilon 3/3$. Bahn 4 zeigt zwei Banden von 85 und 110 bp, entsprechend dem Genotyp $\epsilon 2/2$. Bahn 5 zeigt 3 Banden mit 73, 85 bzw. 98 bp, die dem Genotyp $\epsilon 4/3$ entsprechen. Die Probe in Bahn 6 enthält 4 Banden, jeweils bei 73, 85, 98 und 110 bp, was dem Genotyp $\epsilon 4/3$ entspricht. Die Probe in Bahn 7 zeigt 3 Banden bei 85, 98 und 110, was für den Genotyp $\epsilon 3/2$ steht.

Fig. 5 zeigt die Auswertung einer Gelelektrophorese erfindungsgemäß vorbereiteter Patientenproben 1 bis 6. Die Fig. zeigt die Laufstrecken (in Zentimetern) der ApoE-Amplimere der jeweiligen Proben in der Elektrophorese. Anhand der in der Gelelektrophorese mitgeführten DNS-Längenmarker A und B wurden die ApoE-Amplimere den verschiedenen ApoE-Genotypen zugeordnet. Der Marker A ist ein 100-Basenpaar-DNS-Marker. Bei diesem Elektrophoresegele entspricht eine Laufstrecke des Markers A von 0,9 cm 400 Basenpaaren, eine Laufstrecke von 4,5 cm 100 Basenpaaren. Der zweite Marker B ist ein 20-Basenpaar-DNS-Marker. Eine Laufstrecke von 1,8 cm entspricht hierbei 260 Basenpaaren, eine Laufstrecke von 2,5 cm 200, eine Laufstrecke von 4,5 cm 100 und eine Laufstrecke von 5,2 cm 80 Basenpaaren. Die gemessenen Laufstrecken der Patienten sowie die daraus abgeleiteten ApoE-Genotypen sind in nachstehender Tabelle wiedergegeben:

Probe	ApoE-Genotyp	Laufstrecke (cm)
A	100 bp-Marker	0,9; 1,45; 2,55; 4,5
25 1	ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$	4,5; 5,55
2	ApoE $\epsilon 4/\epsilon 3$	4,5; 4,9
3	ApoE $\epsilon 4/\epsilon 2$	4,15; 4,9
4	ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$	4,55; 4,9; 5,55
5	ApoE $\epsilon 3/\epsilon 2$	4,15; 4,5; 4,9; 5,55
30 6	ApoE $\epsilon 2/\epsilon 2$	4,15; 4,5; 4,9
B	20 bp-Marker	1,8; 2,0; 2,2; 2,5; 2,8; 3,15; 3,5; 4,0; 4,5; 5,2; 6,2; 7,45; 8,9

Anhand des ermittelten ApoE-Genotyps in der Probe kann eine Diagnose erfolgen hinsichtlich des Risikos einer Alzheimererkrankung.

Die Erfindung umfasst zudem den Nachweis des gesamten pathogenitätsrelevanten Sequenzsets aus Apolipoprotein E von

S1= 5' TAC GGC (cd. 112:e2/3),
 S2= 5' CGC GGC (cd. 112: e4),
 S3= 5' CGC CTG (cd. 158: e3/4/ und
 S4= 5' TAC CTG (cd. 158: e2)

5

durch Amplifikation der Proben-DNS mit dem oben genannten speziellen Primer ϵ I und dem ebenfalls nativen kurzen, optimiert in einer konservierten Region bei cd. 158 und vor den variablen Codons 212, 224 etc. platzierten Primer

10

ϵ VIII = 5' CGC TCG GCG CCC TCG C

SEQ ID NO: 22

15

zum Erhalt eines 240mers im Exon 4 bei den genannten Synthesebedingungen unter Verwendung einer Substanz Q[®], wobei diese Primer am 5'-Ende eine Markierungsgruppe zum Nachweis tragen können, wie etwa Biotin oder vergleichbares und die anschließende Hybridisierung an die je in einzelnen definierten "array spots" lokalisierten Nachweisprimer mit den Sequenzen S1-S4 für die kombinierte Bestimmung von S1-S4 bei einem Mikroarray-Experiment, wobei die Detektionsprimer rechnerisch durch verschiedene Verfahren und bevorzugt experimentell in ihrem Schmelzpunkt angeglichen sind durch Variation ihrer Länge und Verschiebung ihrer Sequenzen relativ zur zu detektierenden Kernsequenz S1-S4. Oder durch Hybridisierung mit den Nachweissequenzen von genomischer DNS oder RNS oder cDNS einer Probe.

20

25

30

35

Desweiteren umfasst die Erfindung die Verwendung der speziell entwickelten Eigenschaften des oben genannten Oligonukleotids ϵ II, - spezifisch für den Nachweis von cd. 112C (ϵ 4-Allel) - für die partielle Suppression oder Blockade der Translation bzw. Expression des Apolipoprotein-E- ϵ 4-Gens, speziell seiner mRNA, bei gleichzeitiger freier Expression der eventuell vorhandenen ϵ 2- oder ϵ 3-Allele mit cd. 112T, bei Patienten mit erkennbarem krankheitserzeugenden Einfluss von deren ϵ 4-Allel, zum Beispiel aber nicht ausschließlich bei Erkrankung von homozygoten ϵ 4-Trägern mit spätem sporadischem *morbus Alzheimer*. Entsprechend, falls dies sich als therapeutisch wünschenswert erweisen sollte, auch der Suppression der ϵ 3-mRNA mittels der speziellen Primer ϵ III (bei Patienten ϵ 3/3 oder ϵ 4/3) oder ϵ V (bei Patienten mit ϵ 2/3 oder ϵ 3/3), je ohne den unspezifischen Verlängerungsanhang der Primer. Und entsprechend der ϵ 2-mRNA, zum Beispiel bei kongenital homozygoten Patienten zur Therapie der Hypertriglyzeridämie, etwa bei gleichzeitiger Gabe von substitutiven Agentien. Gegebenenfalls erweiterbar durch die von Lucotte (1996, WO 96/25517) berichtete alzheimer-irrelevante Variante 113A in ϵ 4 oder ihrer häufigeren Form ϵ 3-113A mittels des Antisense-Oligonukleotids ϵ III"kurz" (ohne den unspezifischen Anhang) zum Zweck der teilweisen oder vollständigen Suppression des Schadallels eventuell bei gleichzeitiger gentherapeutischer Gabe von ϵ 2- oder ϵ 3-Sequenz oder anderer pharmazeutischer MA-Kurativa.

Verwendung zur Suppression bedeutet systemische Applikation zum Beispiel beim Menschen in einer chemisch stabilisierend modifizierten Form, wie Phosphothioat-Koppelung

oder Polyamid-Nukleinsäure (PNA) und in einer dem Bluthirnschrankentransport förderlichen Form, wie etwa von Boado et al. (J. Pharmaceutical Sci. 1998, 87(11): pp1308-1315) oder Tyler et al. (PNAS 1999, 96(12): pp7053-58) berichtet und entsprechend der Maßgabe der facheigenen Kunstfertigkeit. Außerdem in einer physiologisch sinnvollen pharmazeutischen Darreichungsform hinsichtlich der Verdünnungsmittel bzw. Carrier (Lipofektin, SA-MA OX26 o.ä.), Konzentration (Gaben von 10-100 mg entspr. 3-4 mg/kg Körpergewicht/Tag zur Erreichung einer wirksamen Konzentration von 0,1 - 10 µM im Liquor/vor Ort), Dauer und Applikationsroute, wie etwa von Hybridon (WO 97/48795) diskutiert.

BEISPIELE

Beispiel 1: *Bestimmung der Sequenzvarianten der Apo-E-Allele*

Für die Multiplex-PCR wurde Ausgangs-DNS hoher Reinheit eingesetzt. Es wurde ein Reaktionsansatz von 50 µl zusammengestellt mit 1 x Reaktionspuffer des Polymeraseherstellers, 1 mM MgCl₂, 4 x 12,5 µM dNTPs, 0,01% BSA, 1 x Relaxationsreagens, 6 Oligonukleotide in einer Konzentration von 2 µM (Primer eI bis eVI), 0,1 U Taq-Polymerase von Perkin-Elmer sowie 1-2 µl DNS-Extrakt (100-200 ng). Es wurde als Relaxationsreagens ein DMSO-ähnliches Mittel verwendet, das jedoch kein DMSO enthielt. So wurde eine spezifischere Doppelstrangbildung der Primer erreicht und gleichzeitig die Bindungsstärke verringert. Die eingesetzten Primer hatten die Sequenzen:

e I:	5' GCT GTC CAA GGA GCT GC	SEQ ID NO: 1
e II:	5' CAC CAG GCG GCG GCG	SEQ ID NO: 7
e III:	5' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCG GCA	SEQ ID NO: 18
e IV:	5' CGA GGA GCT GCG GGT G	SEQ ID NO: 4
e V:	5' GGT ACA CTG CCA CGC G	SEQ ID NO: 19
e VI:	5' TTC TAA TCT TAT GGT ACA CTG CCA CGC A.	SEQ ID NO: 20

Für die PCR wurden folgende Zyklierbedingungen eingesetzt:

5 Minuten bei 95°C, und dann
 40 Zyklen mit: 94°C, 1 Minute,
 64°C, 1 Minute,
 72°C, 1 Minute,
 74°C, 10 Minuten, und
 (4°C bis zur Entnahme).

Die PCR-Produkte wurden in einem 4%igen Metaphoragarosegel (hergestellt aus einer modifizierten Agarose der Firma FMC) in der Flachbettelektrophorese in ethidiumbromidhaltigem 1x TBE-Puffer für 600 Vh aufgetrennt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 311 nm.

5

Beispiel 2: *Bestimmung der Sequenzvarianten der ApoE-Allele aus DNS-Ausgangsmaterial geringerer Reinheit*

Es wurde eine PCR über die Gesamtlänge des ausgewählten Bereichs. Es wurden zwei
10 Primer eingesetzt mit den Sequenzen:

rE 1: 5' CCAAggAgCTgCAggCg und SEQ ID NO: 15

rE 2: 5' CCggCCTggTACACTgC. SEQ ID NO: 16

15 Es wurden die gleichen PCR-Bedingungen wie in der Kombireaktion aus Beispiel 1 verwendet, außer dass die Konzentration der dNTPs 4 x 17 µM und die von MgCl₂ 1,4 mM betrug. Die Annealingtemperatur lag bei 66°C. Die Amplimerlänge war 214 bp. Die Sensitivität lag bei dieser Reaktion etwa 50% höher.

Anschließend erfolgte eine Restriktionstypisierung. Dazu wurde das PCR-Produkt mit
20 zwei Restriktionsenzymen geschnitten, jeweils spezifisch für Codon 112 und 158. Für jeden Ansatz wurden 30 µl PCR-Produkt mit 4 U BstH2 I und 5 U Afl III in 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, mit einem pH-Wert von 7,8 2 Stunden bei 37°C verdaut. Die Proben wurden in 3,75% Metaphor in einer Horizontalelektrophorese in 1 X TBE mit Ethidiumbromid für 500 Vh aufgetrennt. Es wurden folgende Fragmente nachgewiesen:

25 ε4 194 bp,
 ε3 145 bp und
 ε2 165 bp.

30 Beispiel 3: *Bestimmung der Sequenzvarianten der Apo-E-Allele einer größeren Probenzahl*

Es wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben, wobei jedoch vier mutationsspezifische Primer verwendet wurden, die gleich lang waren und jeweils mit vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert waren. Das jeweilige codonspezifische
35 Primerpaar unterschied sich damit nur in der 3'-Base und dem fluoreszierenden Molekül am 5'-Ende. Die Primer e I und e IV entsprechen denen aus Beispiel 1.

Die PCR-Reaktion wurde dementsprechend vereinfacht, da die Primer praktisch identische Schmelzpunkte hatten. Zudem ermöglichte die Fluoreszenzmarkierung der Primer, dass der

Nachweis der Allelfragmente automatisiert werden konnte, bspw. mit einer HPLC-Anlage mit Mehrfachfluoreszenzdetektor. Die Gelelektrophorese aus Beispiel 1 entfiel.

Vergleichsbeispiel:

5

Bei diesem Versuch wurden als Primer 4 Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen verwendet:

ε I:	5 ' GCT GTC CAA GGA GCT GC	SEQ ID NO: 1
ε II:	5 ' CAC CAG GCG GCG GCG	SEQ ID NO: 17
10 ε III:	5 ' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCG GCA	SEQ ID NO: 18
ε IV:	5 ' CGA GGA GCT GCG GGT G,	SEQ ID NO: 4

von denen drei jeweils direkt an den mutationsspezifischen Stellen endeten und durch Basenmismatches an der zweiten Stelle vor dem 3'-Ende spezifitätsverstärkt waren. Es wurden
15 die gleichen Versuchsbedingungen eingesetzt wie in Beispiel 1. Das Ergebnis zeigte jedoch eine Vielzahl unspezifischer Banden, die keine verlässliche diagnostische Auswertung ermöglichten.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung des Apolipoprotein-E-Polymorphismus in einer menschlichen
5 Probe durch PCR-Amplifikation einer ausgewählten Basensequenz und Nachweis der Apolipoprotein-E-Allele, dadurch gekennzeichnet, dass eine Multiplex-PCR verwendet wird, bei der die Primer Oligonukleotide sind mit den nativen ApoE-Sequenzen und unspezifischen Basen oder Sequenzanhängen:

10 ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC, SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 2
 5' CAC CAG GCG GCC TCG,

A
G
SEQ ID NO: 3

ε III: 5' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCC GCA,

ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4

T
A
SEQ ID NO: 5
 ε V: 5' -GGT ACA CTG CCA GGC G, und

20
 T C
 ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT -GGT ACA CTG CCA GGC A, SEQ ID NO: 6

25 wobei an der dritten bis fünften Stelle vor dem 3'-Ende ein Basenmismatch eingefügt sein kann und zur Verbesserung der Amplifikationsselektivität die Mismatch-Stellen von ϵ_{II} und ϵ_{III} beziehungsweise von ϵ_V und ϵ_{VI} relativ zum 3'-Ende verschoben sein können.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Primer Oligonukleotide verwendet werden mit den Sequenzen:

30
 SEQ ID NO: 1
 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC,

ε ||: 5' CAC CAG GCG GCG GCG, SEQ ID NO: 7

ε |||: 5' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCG GCA, SEQ ID NO: 8

ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4

35 ε V: 5' GGT ACA CTG CCA CGC G, und SEQ ID NO: 9

ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT GGT ACA CTG CCA CGC A. SEQ ID NO: 10

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Primer Oligonukleotide verwendet werden mit den Sequenzen:

ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC, SEQ ID NO: 1
 5 ε II: 5' CAC CAG GCG GCC TCG, SEQ ID NO: 11
 ε III: 5' TTT CTA ATA TTA CAC CAG GCG GCG GCA, SEQ ID NO: 12
 ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4
 ε V: 5' TGG TAC ACT GCC AGA CG, SEQ ID NO: 13
 ε VI: 5' TTC TAA TCT TAT TGG TAC ACT GCC ACG CA. SEQ ID NO: 14

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in die PCR-Amplifikation ein weiteres 15 bis 50 Nukleotide langes Oligonukleotid zugesetzt wird, dessen 3'-Ende durch eine Dideoxi-Eigenschaft oder einen vergleichbaren Polymerisationsblock charakterisiert ist und mit einer Sequenz zwischen den Amplimerpaaren hybridisiert.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das weitere Oligonukleotid folgende Sequenz besitzt:

ε VII: 5' GTG CAG GCC ATG CTC GG^{dd}. SEQ ID NO: 21

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erfassung mehrerer Sequenzvarianten anstelle der Basisprimer ε I und ε IV Mischbasenoligonukleotide eingesetzt werden können.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei für die Multiplex-PCR ein DMSO-freies Relaxationsreagens verwendet wird.

8. Oligonukleotide als Primer für eine Multiplex-PCR zum Nachweis von Apolipoprotein-E-Allelen mit den Sequenzen:

30 ε I: 5' GCT GTC CAA GGA GCT GC, SEQ ID NO: 1
 ε II: 5' CAC CAG GCG GCC GCG, SEQ ID NO: 7
 ε II': 5' CAC CAG GCG GCC TCG, SEQ ID NO: 11
 ε III: 5' TTT CTA ATC TTA CAC CAG GCG GCC GCA, SEQ ID NO: 8
 ε III': 5' TTT CTA ATA TTA CAC CAG GCG GCG GCA, SEQ ID NO: 12
 35 ε IV: 5' CGA GGA GCT GCG GGT G, SEQ ID NO: 4
 ε V: 5' GG TAC ACT GCC AGG CG, SEQ ID NO: 9

ε V':	5' TGG TAC ACT GCC AGA CG,	SEQ ID NO: 13
ε VI:	5' TTC TAA TCT TAT GGT ACA CTG CCA GGC A,	SEQ ID NO: 11
ε VI':	5' TTC TAA TCT TATTGGT ACA CTG CCA GGC A,	SEQ ID NO: 14
ε VII:	5' GTG CAG GCC ATG CTC GG ^{dd}	SEQ ID NO: 21

5

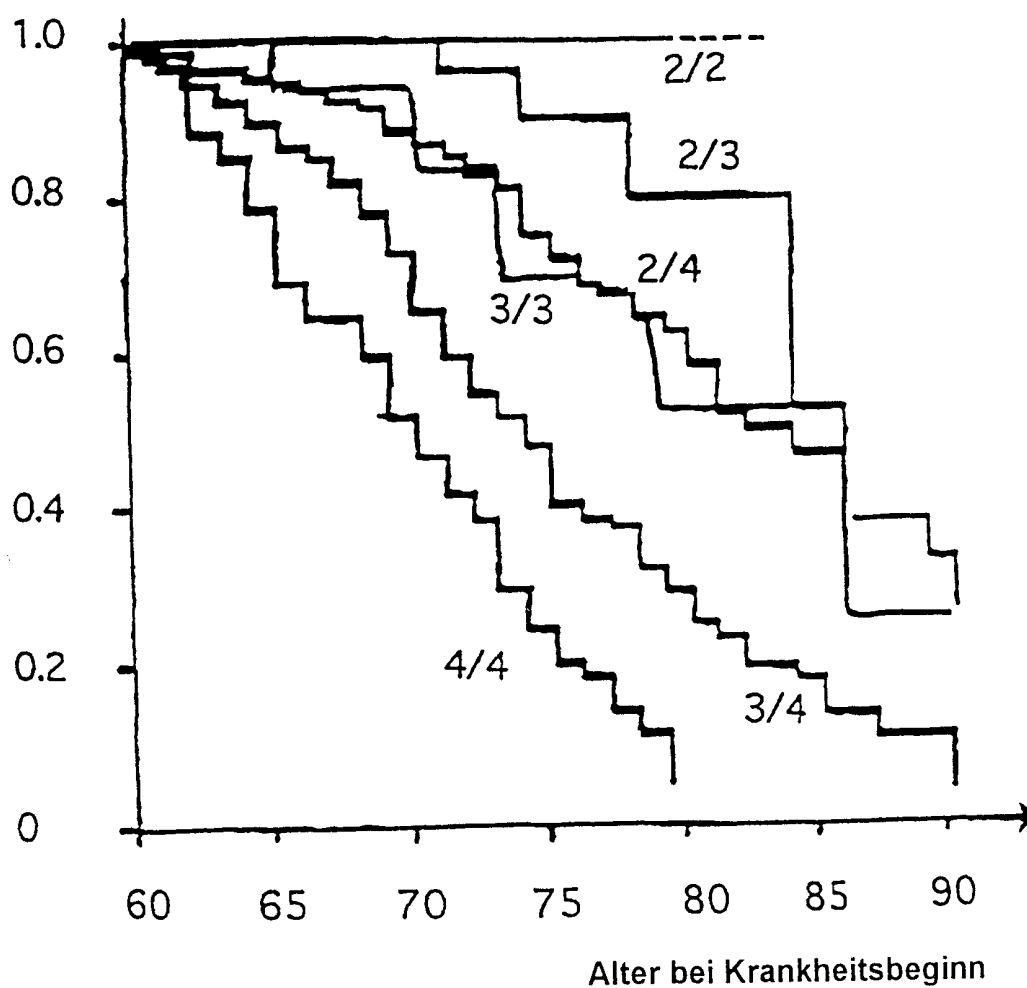
9. Verwendung ein oder mehrerer Oligonukleotide aus Anspruch 8 als Primer oder Polymerisationsstopp für eine Multiplex-PCR zur Bestimmung des Apolipoprotein-E-Polymorphismus in einer menschlichen Probe.
- 10 10. Verwendung ein oder mehrerer Oligonukleotide aus Anspruch 8 in einem Diagnosekit auf Alzheimererkrankungen, Hypertriglyzeridämie, Atherosklerose und andere ApoE-reaktiven/responsible Erkrankungen.
- 11 11. Diagnosekit, dadurch gekennzeichnet, ein oder mehrere Oligonukleotide aus Anspruch 8, übliche PCR-Reagenzien und DMSO-freies Relaxationsreagens enthält.
- 15 12. Diagnosekit nach Anspruch 11, wobei ein oder mehrere Oligonukleotide gemäß Anspruch 8 auf einem festen Träger oder auf einem Chip oder an Beads gebunden sind.
- 20 13. Diagnosekit nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Kit eine Multititerplatte umfasst, in der die Reaktionsreagenzien verglast enthalten sind.
14. 14. Diagnosekit nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Kit Nachweisstreifen umfasst, die Reaktionsreagenzien enthalten.

1 / 5

Fig. 1

Zusammenhang von Ausbruchsalter des
Morbus Alzheimer (sporadischer Typ) und
Apolipoprotein E-Allelen

Anteil vor MA geschützter Personen



2 / 5

Fig. 2

.....cggaggagacgcggggcacggctgtccaagg agctgcaggc ggcgagggcc

C (e4)

cggctgggcg cggacatgga ggacgtgTgc ggccgcctgg tgcagtaccg

cd. 112

cggcgaggtg caggccatgc tcggccagag caccgaggag ctgcgggtgc

gcctcgcttc ccacctgcgc aagctgcgta agcggctcct ccgcgatgcc

T (e2)

gatgacctgcagaagCgcct ggcagtgtac caggccgggg cccgcgaggg

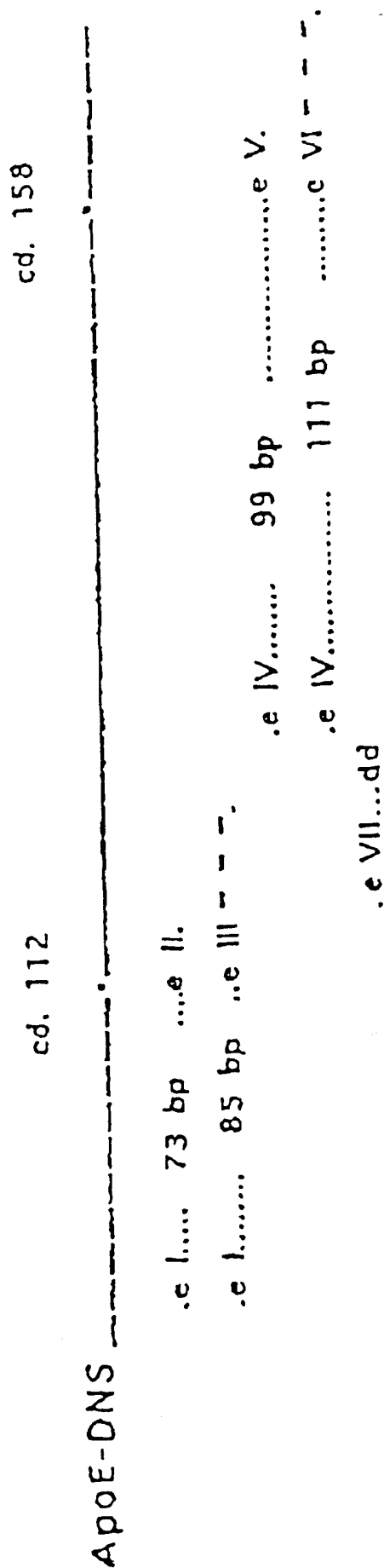
cd. 158

cgccgagcgc.....

SEQ ID NO: 23

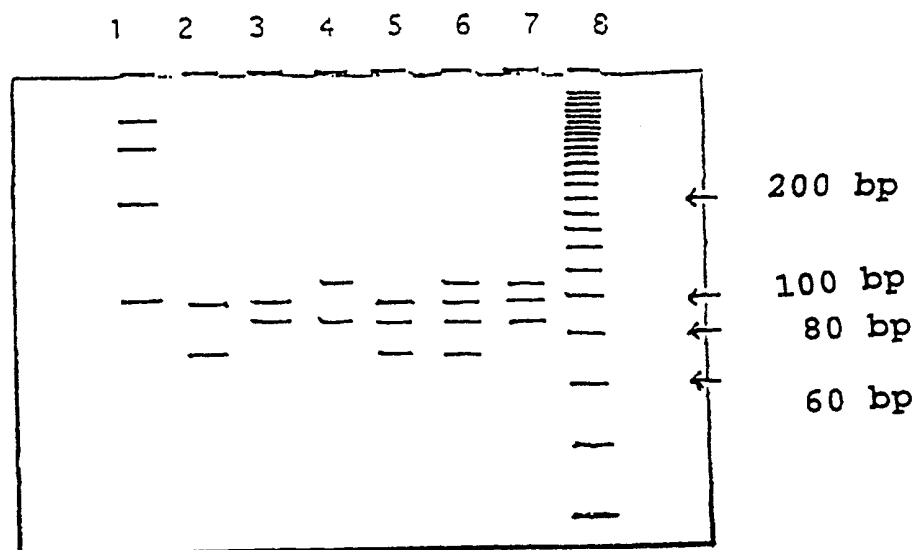
Fig. 3

Übersichtsskizze der Kombireaktion für die Genotypisierung im Apolipoprotein E-Gen



4 / 5

Fig. 4



5 / 5

Fig. 5

Laufstrecken der ApoE-Amplimere in der Elektrophorese

