

***N*-Acetyltransferase 2 (Genotypisierung)**

Anwendbarkeit Bestimmung in genomischer DNA aus Blutzellen

Analyt. Messprinzip PCR-RFLP

Zusammenfassung

Die *N*-Acetyltransferase 2 (NAT2) ist ein Phase-II-Enzym, dessen Bedeutung im Fremdstoffmetabolismus auch in Kapitel 12 der allgemeinen Vorbemerkungen dieses Werkes dargestellt wurde. Für dieses Enzym wurden bisher 16 SNPs (single nucleotide polymorphisms) beschrieben [1]. Von diesen können mit der nachfolgenden Methode, aufbauend auf verschiedenen Arbeiten, sieben Mutationsstellen nachgewiesen werden [2–5].

Aus einer Human-Blutprobe wird die Lymphozyten-DNA isoliert. Mittels PCR (polymerase-chain-reaction) erfolgt die Amplifikation der DNA für zwei Fragmente mit 442 und 559 bp (Basenpaare) (Abbildung 2). Das Amplifikat der 1. PCR wird mit drei, das der 2. PCR mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Nach anschließender Gelelektrophorese unter Zusatz von Ethidiumbromid werden die verschiedenen DNA-Fragmente im UV-Licht nachgewiesen. Die Dokumentation erfolgt fotografisch, die Zuordnung der Allele anhand eines Auswerteschemas.

***N*-Acetyltransferase 2**

N-Acetyltransferasen (NAT) sind Fremdstoff-metabolisierende Enzyme der Phase II. Gegenwärtig sind beim Menschen die NAT1 und die NAT2 nachgewiesen, die sich sowohl in der Substratspezifität als auch in der Ausprägung in den verschiedenen Geweben unterscheiden. Beide Enzyme werden polymorph exprimiert und ha-

Analytische Methoden Band 2
Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe
der Deutschen Forschungsgemeinschaft – Arbeitsgruppe „Analytische Chemie“

ben hohe toxikologische und klinische Relevanz, wobei die NAT2 umfangreicher erforscht ist [6–10].

Für die humane *N*-Acetyltransferase 2 (EC 2.3.1.5) ist bereits seit mehr als 40 Jahren ein Polymorphismus bekannt. Die interindividuellen Unterschiede im Isoniazid-Metabolismus gaben hierfür einen wichtigen Hinweis. Für einen erheblichen Anteil von Personen erfolgte die *N*-Acetylierung dieses Medikaments in einem deutlich geringerem Maß, so dass die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt werden konnten, die sogenannten schnellen und langsamen Acetylierer. Die Eliminationshalbwertszeit für Isoniazid ist beim schnellen Acetylierer deutlich kürzer. Die Acetylierung führt bei der überwiegenden Zahl der Substanzen zur Verringerung ihrer biologischen Aktivität. Bei einzelnen Stoffen kann es jedoch auch zu einer Steigerung der Reaktivität kommen. Typische Substrate gehören in die Gruppen der Arylamine und heterozyklischen Amine, hier meist *N*-Hydroxy-Derivate. Im menschlichen Organismus ist die NAT2 in der Leber, in Geweben des Gastrointestinaltrakts, in der Harnblase und in der Lunge nachgewiesen [11].

NAT2-Genotypen

Das *NAT2*-Gen ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert, enthält nur ein Exon bestehend aus 870 Nucleotiden, die für ein Protein mit 290 Aminosäuren codieren. Bis heute sind 16 SNPs (single nucleotide polymorphism) identifiziert, die alleine oder in Kombination auftreten und zu derzeit 34 bekannten varianten Allelen führen. Von den 16 SNPs haben vier (¹⁹¹*NAT2*, ³⁴¹*NAT2*, ⁵⁹⁰*NAT2*, ⁸⁵⁷*NAT2*) einen Aminosäureaustausch zur Folge, der zu einer Verringerung der Enzymaktivität führt. Bei drei SNPs (²⁸²*NAT2*, ⁴⁸¹*NAT2*, ⁸⁰³*NAT2*) bleibt die Enzymaktivität unverändert (hoch) und für neun SNPs (¹¹¹*NAT2*, ¹⁹⁰*NAT2*, ³⁶⁴*NAT2*, ⁴³⁴*NAT2*, ⁴¹¹*NAT2*, ⁴⁹⁹*NAT2*, ⁷⁵⁹*NAT2*, ⁸⁴⁵*NAT2*, ⁸⁵⁹*NAT2*) ist die (phänotypische) Auswirkung noch nicht bekannt (Tabelle 1) [1].

Das Allel *NAT2**4 codiert für eine Enzymvariante mit höherer Aktivität und wurde traditionell als „Wildtyp“ des humanen *NAT2*-Allels bezeichnet. Für die phänotypische Ausprägung wurde der Begriff „schneller Acetylierer“ eingeführt. Es ist das am häufigsten vorkommende Allel in einigen, aber nicht in allen ethnischen Gruppen. So sind 95% der Eskimos, 78–85% der Chinesen, 17% der Ägypter und 10% der Marokkaner schnelle Acetylierer. In Mitteleuropa sind ca. 40% der Bevölkerung schnelle Acetylierer. Daher ist die Bezeichnung Wildtyp-Allel etwas zufällig und abhängig von der ethnischen Gruppe in der untersuchten Population [1]. Wegen dieser deutlichen Unterschiede wurde von Nebert die Bezeichnung Wildtyp-Allel, die von der Erstbeschreibung des Allels ausgeht, in Frage gestellt. Als Alternative wurde der Ausdruck *Referenzsequenz* vorgeschlagen [12]. In vielen Publikationen wird jedoch nach wie vor die Bezeichnung Wildtyp-Allel verwendet.



In der Population der Kaukasier¹ ist das Referenz-Allel mit einer Häufigkeit von 20% vertreten. Von den varianten Allelen kommen das *NAT2*5B* zu 45% und *NAT2*6A* zu 30% vor. *NAT2*5A*, *NAT2*5C* und *NAT2*7B* haben nur eine Häufigkeit von 1, 3 bzw. 1%. Im Gegensatz zu den Kaukasiern fehlt das *NAT2*5B* Allel in einer japanischen Population nahezu vollständig, während hier *NAT2*6A* und *NAT2*7B* häufig auftretende variante Allele sind [8].

Tab. 1. Humane *NAT2* Allele (Stand: 05. 06. 2003 [1]).

Allele*	Nukleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch	Phänotyp
<i>NAT2*4</i>	Referenz	Referenz	schnell
<i>NAT2*5A</i>	341T>C 481C>T	Ile114Thr kein	langsam
<i>NAT2*5B</i>	341T>C 481C>T 803A>G	Ile114Thr kein Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*5C</i>	341T>C 803A>G	Ile114Thr Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*5D</i>	341T>C	Ile114Thr	langsam
<i>NAT2*5E</i>	341T>C 590G>A	Ile114Thr Arg197Gln	langsam
<i>NAT2*5F</i>	341T>C 481C>T 759C>T 803A>G	Ile114Thr kein Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*5G</i>	282C>T 341T>C 481C>T 803A>G	kein Ile114Thr kein Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*5H</i>	341T>C 481C>T 803A>G	Ile114Thr kein Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*5I</i>	341T>C 411A>T 481C>T 803A>G	Ile114Thr Leu137Phe kein Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*5J</i>	282C>T 341T>C 590 G>A	kein Ile114Thr Arg197Gln	langsam

¹ Im angelsächsischen Sprachraum wird die aus Europa stammende Ethnie als *Caucasians* bezeichnet.

Tab. 1. (Fortsetzung)

Allele*	Nukleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch	Phänotyp
<i>NAT2*6A</i>	282C>T 590G>A	kein Arg197Gln	langsam
<i>NAT2*6B</i>	590G>A	Arg197Gln	langsam
<i>NAT2*6C</i>	282C>T 590G>A 803A>G	kein Arg197Gln Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*6D</i>	111T>C 282C>T 590G>A	kein Arg197Gln	langsam
<i>NAT2*6E</i>	481C>T 590G>A	kein Arg197Gln	langsam
<i>NAT2*7A</i>	857G>A	Gly286Glu	langsam
<i>NAT2*7B</i>	282C>T 857G>A	kein Gly286Glu	langsam
<i>NAT2*10</i>	499G>A	Glu167Lys	
<i>NAT2*11A</i>	481C>T	kein	schnell
<i>NAT2*11B</i>	481C>T 859 Del	Kein Ser287Frameshift	schnell
<i>NAT2*12A</i>	803A>G	Lys268Arg	schnell
<i>NAT2*12B</i>	282C>T 803A>G	kein Lys268Arg	schnell
<i>NAT2*12C</i>	481C>T 803A>G	kein Lys268Arg	schnell
<i>NAT2*12D</i>	364G>A 803A>G	Asp122Asn Lys268Arg	schnell
<i>NAT2*13</i>	282C>T	kein	schnell
<i>NAT2*14A</i>	191G>A	Arg64Gln	langsam
<i>NAT2*14B</i>	191G>A 282C>T	Arg64Gln kein	langsam
<i>NAT2*14C</i>	191G>A 341T>C 481C>T 803A>G	Arg64Gln Ile114Thr kein Lys268Arg	langsam langsam
<i>NAT2*14D</i>	191G>A 282C>T	Arg64Gln kein	langsam
<i>NAT2*14E</i>	590G>A 191G>A	Arg197Gln Arg64Gln	langsam langsam
<i>NAT2*14F</i>	803A>G 191G>A 341T>C 803A>G	Lys268Arg Arg64Gln Ile114Thr Lys268Arg	langsam langsam



Tab. 1. (Fortsetzung)

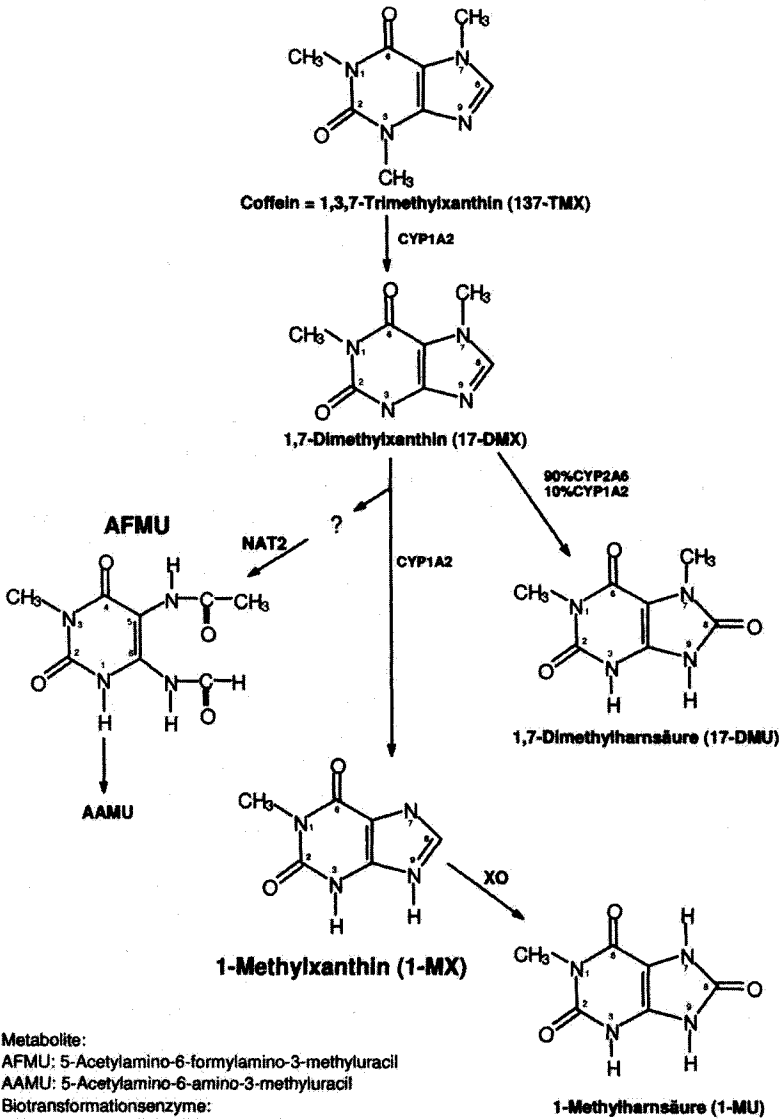
Allele*	Nukleotid-Austausch	Aminosäure-Austausch	Phänotyp
<i>NAT2*14G</i>	191G>A 282C>T 803A>G	Arg64Gln kein Lys268Arg	langsam
<i>NAT2*17</i>	434A>C	Gln145Pro	
<i>NAT2*18</i>	845A>C	Lys282Thr	
<i>NAT2*19</i>	190C>T	Arg64Trp	

NAT2-Phänotypen

Für die Bestimmung der NAT2-Phänotypen werden Metabolitenmuster im Urin der zu untersuchenden Person analysiert. Dabei wird das Verhältnis eines Amins zu seiner acetylierten Form [13] oder das Verhältnis zweier Coffeinmetaboliten zueinander bestimmt [14]. Aufgrund von Abweichungen der mit verschiedenen Phänotypisierungsmethoden erhaltenen Ergebnisse wird von Lewalter et al. [15] für arbeitsmedizinische Untersuchungen die Bestimmung des Metabolitenverhältnisses von freiem zu acetyliertem Amin für die NAT2-Phänotypisierung bei bekannter Exposition gegen ein aromatisches Amin vorgeschlagen. Bei unbekannter Exposition allerdings, insbesondere in der Umweltmedizin, sollte der Coffeintest eingesetzt werden. Verschiedene Autoren betonen die Validität der Coffeinmetabolitenbestimmung bei der Einhaltung der für das Substrat Coffein üblichen Randbedingungen (Dosis, Sammelzeitpunkt / Sammelintervall) zur Phänotypisierung für alle toxikologischen Fragestellungen. Diese Ansicht wird zum einen durch die Übereinstimmung der mit Coffein, Dapson und Sulfamethazin erhaltenen Phänotypisierungsergebnisse [16, 17] und zum anderen durch Vergleiche von Phänotypisierungs- und Genotypisierungsergebnissen in großen Kollektiven unterstützt, die eine Übereinstimmung von Genotypen und Phänotypen von > 90% zeigen [4, 18].

Zur Durchführung der NAT2-Phänotypisierung mit Hilfe des Coffeintestes nimmt die Testperson eine definierte Dosis Coffein auf. Das Coffein wird in der Leber durch Cytochrom-P450-Enzyme, die NAT2 und die Xanthinoxidase metabolisiert. Die Metaboliten werden mit einer Halbwertszeit von 2 bis 5 Stunden zum größten Teil über den Harn ausgeschieden. Beim Erwachsenen werden bis zu 4% des aufgenommenen Coffeins unverändert über den Harn eliminiert [19]. Die für eine Enzymdiagnostik wesentlichen Metaboliten des Coffeins sind in der Abbildung 1 dargestellt [20].

Aus dem molaren Verhältnis der Coffeinmetabolite AFMU zu 1-MX im Harn kann die individuelle Aktivität der NAT2 bestimmt und zwischen zwei Phänotypen, dem



Metabolite:
 AFMU: 5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil
 AAMU: 5-Acetylamino-6-amino-3-methyluracil
 Biotransformationsenzyme:
 CYP: Cytochrom-P450-Enzymkomplex
 XO: Xanthinoxidase
 NAT2: N-Acetyltransferase 2

Abb. 1. Ausschnitt des Stoffwechsels von Coffein im Menschen mit den zur NAT2-Phänotypisierung verwendeten Metaboliten AFMU und 1-MX.

langsamen und dem schnellen Acetylierer, differenziert werden [4, 15, 21]. Eine zusätzliche Differenzierung in „mittlere“ bzw. „induzierbare Acetylierer“ wurde bisher nur von einzelnen Autoren beobachtet und beschrieben [13].

Neben der NAT2 können weitere relative Aktivitäten der am Coffeinstoffwechsel beteiligten Enzyme aus den molaren Verteilungsmustern der Coffeinmetabolite abgeschätzt werden [21].

Diskussion

In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass langsame Acetylierer statistisch signifikant häufiger an Tumoren der ableitenden Harnwege erkranken (BK-Ziffer 1301), insbesondere nach Umgang mit Aminoaromaten der Kategorie 1 Abschnitt III der MAK- und BAT-Werte-Liste, wie 4-Aminodiphenyl, Benzidin, 4-Chlor-*o*-toluidin oder 2-Naphthylamin. Im Hinblick auf Harnblasenkarzinome besitzen schnelle Acetylierer offenbar eine höhere Toleranzschwelle gegenüber Aminoaromaten-Belastungen, da sie statistisch weniger häufig erkranken [22–24]. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass schnelle Acetylierer ein etwas höheres Risiko für das Auftreten von Kolonkrebs haben [25]. Es wurden Vermutungen angestellt, dass der Fleischkonsum eine Rolle spielt, hier wären die aromatischen Heterozyklen, die bei der Zubereitung entstehen, die verantwortlichen Agenzien. Die Assoziationen zwischen dem Acetylierstatus und dem Kolonkrebsrisiko stützen sich im Wesentlichen auf die Ergebnisse von NAT2-Phänotypisierungen. Basierend auf NAT2-Genotypisierungen konnten die Zusammenhänge zwischen *NAT2*-Sequenzvariationen und dem Kolonkrebs in einer Metaanalyse nicht deutlich bestätigt werden [25]. Metaanalysen von Blasenkrebsstudien ergaben nur eine geringe Risikoerhöhung für die langsamen Acetylierer [26, 27]. Für mögliche Interaktionen zwischen Blasenkrebs oder Lungenkrebs, Zigarettenkonsum und Acetylierertyp bestehen begründete Hinweise auf einen Zusammenhang [z. B. 28].

Interessant ist der mögliche Synergismus zwischen dem NAT2-Status und dem NAT1-Status. So könnte eine Kombination von *NAT2*-Allelen, die geringe *NAT2*-Aktivitäten determinieren, mit einem *NAT1*-Allel, das eine gesteigerte Aktivität kodiert [29], das Risiko für Tumore der Harnblase erhöhen. Eine niedrige *NAT2*-Aktivität in der Leber würde nämlich zu einer erhöhten Konzentration an freiem Arylamin führen. Dieses könnte nach Oxidation zum Hydroxylamin mit Hilfe von CYP P450 durch eine gesteigerte *NAT1*-Aktivität in der Blase in den labilen Arylamin-Acetoxyester überführt werden. Dieser würde rasch zum ultimal kanzerogenen Nitrenium-Ion zerfallen, welches die DNA alkylieren kann [30].

Daneben deutet sich ein Synergismus zwischen dem NAT2-Status und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (G-6-PDH) an. So weisen Personen mit erniedrigten G-6-PDH- und *NAT2*-Aktivitäten erhöhte Proteinaddukt- und IgE-Gesamt-Spiegel auf (s. G-6-PDH, diese Lieferung).

Die dargestellten Zusammenhänge sind Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion und weiterer Untersuchungen.

Empfehlungen

Der Grundsatz G33 der Berufsgenossenschaftlichen Grundsätze arbeitsmedizinischer Vorsorgeuntersuchungen [31] empfiehlt die Bestimmung des individuellen Acetylierer-Status. Dieser sollte vorzugsweise über das Verhältnis eines Arbeitsplatz-relevanten Aminoaromaten zu seiner acetylierten Form durchgeführt werden [13].

Der alternative Einsatz von Arzneimitteln, wie Sulfonamiden oder Dapson, ohne therapeutische Notwendigkeit allein zur Phänotypisierung des Acetyliererstatus, wird in Deutschland wegen möglicher Nebenwirkungen aus ethischen Gründen abgelehnt. In seltenen Fällen ist nach Sulfonamidgabe das Auftreten einer toxischen Epidermiolyse (Lyell-Syndrom) [32] aufgetreten, eine schwerwiegende Erkrankung mit potenziell tödlichem Ausgang. Insofern ist der erstmals von Grant et al. [21] beschriebene Coffein-Test zur NAT2-Phänotypisierung, insbesondere im Vorfeld möglicher Aminoaromaten-Belastungen zu empfehlen.

Als Alternative zur Phänotypisierung besteht die Möglichkeit der *NAT2*-Genotypisierung. Nach ihrer Einführung wurden, u. a. wegen der noch unvollständig bekannten Mutationen im relevanten Gen, erhebliche Diskrepanzen zwischen Acetyliererphänotyp und Acetylierer-genotyp beobachtet [15]. In der neueren Literatur wird dagegen eine Übereinstimmung von mindestens 90% zwischen Genotyp und Phänotyp der NAT2 beschrieben [18, 33, 34]. In der bislang größten Untersuchung an 563 nicht miteinander verwandten Probanden berichteten Cascorbi et al. [4] eine Übereinstimmung in 93,3% der Fälle. Die von ihnen beobachteten diskrepanten Fälle wurden sequenziert und wiesen keine zusätzlichen SNPs auf.

Die Differenzierungskriterien des Coffeintests zwischen langsamen und schnellen Acetyliererphänotyp differieren aus bisher ungeklärten Gründen von Labor zu Labor. Der Cut-off-Punkt sollte in jedem Labor durch die gleichzeitige Bestimmung der Acetylierer-Phänotypen und Acetylierer-Genotypen in einer hinreichend großen Zahl von Probanden festgelegt werden.

Die Phänotypisierung der NAT2 mit Hilfe des Coffein-Tests ist immer dann zu empfehlen, wenn eine Blutentnahme nicht erwünscht und/oder Bedenken gegen Untersuchungen der DNA bestehen. Gegenüber der Genotypisierung bietet der Coffein-Test den Vorteil, dass er nicht die komplexe genetische Anlage, sondern ausschließlich die dadurch bedingte – letztendlich aber bedeutsame – biologisch wirksame Aktivität der NAT2 misst.

Autoren: *M. Blaszkewicz, D. Dannappel, R. Thier, J. Lewalter*

Prüfer: *T. Schulz*

N-Acetyltransferase 2 (Genotypisierung)

Anwendbarkeit Bestimmung in genomischer DNA aus Blutzellen

Analyt. Messprinzip PCR-RFLP

Inhaltsverzeichnis

- 1 Grundlage des Verfahrens
- 2 Geräte, Chemikalien, Lösungen, Gele
 - 2.1 Geräte
 - 2.2 Chemikalien
 - 2.2.1 DNA-Isolierung
 - 2.2.2 Reagenzien für die PCR
 - 2.2.3 Primer
 - 2.2.4 Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese
 - 2.3 Lösungen
 - 2.4 Gele
- 3 Probenaufarbeitung
 - 3.1 Lagerung
 - 3.2 DNA-Isolierung
 - 3.3 Bestimmung der Reinheit und Konzentration der DNA
- 4 Vorbereitung und Durchführung der PCR
 - 4.1 1. PCR (nt –69 bis 373)
 - 4.1.1 Elektrophorese 1 (Erfolgskontrolle der 1. Amplifikation)
 - 4.1.2 Restriktionsschritte der 1. PCR
 - 4.1.3 Elektrophorese 2
 - 4.2 2. PCR (nt 342 bis 900)
 - 4.2.1 Elektrophorese 3 (Erfolgskontrolle der 2. Amplifikation)
 - 4.2.2 Restriktionsschritte der 2. PCR
 - 4.2.3 Elektrophorese 4
- 5 Kalibrierung
- 6 Auswertung
- 7 Qualitätskontrolle

- 8 Störeinflüsse
- 9 Diskussion der Methode
- 10 Literatur
- Anlage 1: Auswertebogen
- Anlage 2: Auswerteschablone

1 Grundlage des Verfahrens

Aus einer Human-Blutprobe wird die Lymphozyten-DNA isoliert. Mittels PCR (polymerase-chain-reaction) erfolgt die Amplifikation der DNA für zwei Fragmente mit 442 und 559 bp (Basenpaare) (Abbildung 2). Das Amplifikat der 1. PCR wird mit drei, das der 2. PCR mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Nach anschließender Gelelektrophorese mit Zusatz von Ethidiumbromid werden die verschiedenen DNA-Fragmente im UV-Licht nachgewiesen. Die Dokumentation erfolgt fotografisch (Abbildung 3), die Zuordnung der Allele anhand eines Auswerteschemas (siehe Anlagen 1 und 2).

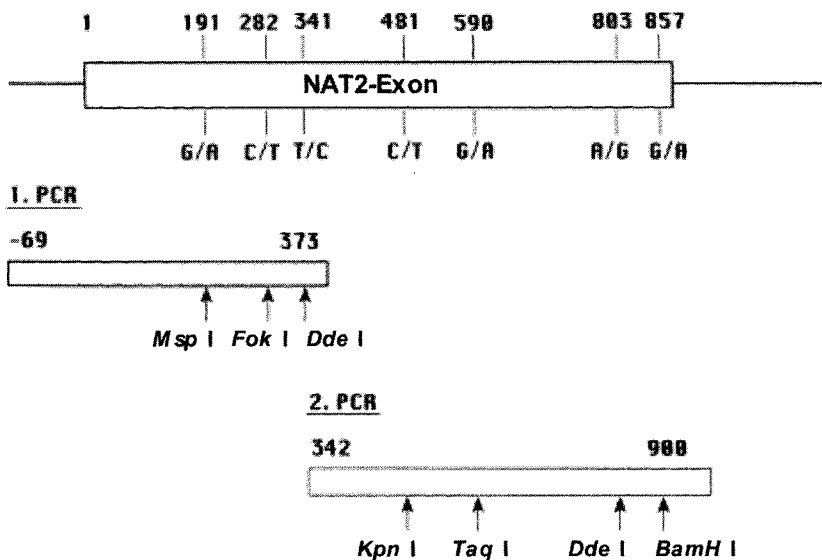


Abb. 2. Amplifikation und Restriktionsschnitte.

2 Geräte, Chemikalien, Lösungen, Gele

2.1 Geräte

- 10-mL-Schraubgläser mit Deckel
- 96er-Lochplatten (z. B. Micro Amp Optical 96, well-plates Perkin-Elmer)
- Autoklavierbare Plattenabdeckung (z. B. full plate cover, Perkin-Elmer)
- Dampfsterilisator (z. B. Varioklav, Typ 500E, H+P Labortechnik)
- Dokumentationssystem (z. B. Gel-Pro, Matrix-vision)
- Horizontal-Elektrophorese und Stromversorgung, (z. B. Subcell Model 192 und Power Pac 300, Biorad)
- Kühlblock für Lochplatten (z. B. PlexiCooler, Biozym)
- Kühlblock für PCR-Reagenzien (z. B. ZeroCooler, Biozym)
- Magnetrührer mit Heizung
- Mikroliterpipetten, 0,1–2,5 μL , 0,5–10 μL , 2–20 μL , 20–200 μL , 100–1000 μL (z. B. Abimed)
- Mikroschraubgefäße, 2 mL (z. B. Sarstedt)
- Mikrowelle, 600 Watt (z. B. Sharp)
- PCR-caps, 8er-strips (z. B. Biozym)
- pH-Einstabmesskette (pH-Meter)
- Pipettenspitzen, steril, mit Aerosol dichten Filtern (z. B. Biorad)
- Reaktionsgefäße mit Deckel, 1,5 und 2,0 mL (z. B. Eppendorf Safe-Lock™)
- Schüttelgerät Vortex (z. B. Heidolph)
- Spektralphotometer (z. B. Hewlett-Packard 8452A)
- Thermocycler (z. B. Gene Amp, PCR-System 9700, PE Applied Biosystems)
- UV-Transilluminator, 312 nm (z. B. Saur)
- Wasserbad (z. B. mge; Lauda CS20)
- Zentrifuge (z. B. Megafuge 1,0R Kendro)
- Zentrifuge für Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf 5415C)
- Zentrifugen-Röhrchen, 50 mL (z. B. Falcon von Greiner)

2.2 Chemikalien

2.2.1 DNA-Isolierung

DNA-Isolierung erfolgt mittels kommerzieller Kits für 5 mL oder 2 mL Blut (z. B. QIAamp-Blood-Kit der Firma Qiagen).

2.2.2 Reagenzien für die PCR

10-fach konzentrierter PCR-Puffer inklusive Magnesiumchlorid (15 mM MgCl₂; wird vom Hersteller der DNA-Taq-Polymerase mitgeliefert; Q-Solution und zusätzliches MgCl₂ werden nicht eingesetzt (z. B. Qiagen))

bidestilliertes Wasser (autoklaviert, DNase-frei)

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) (z. B. Qiagen)

Restriktionsenzyme: *Msp* I, *Fok* I, *Dde* I, *Kpn* I, *Taq* I, *BamH* I (z. B. New England Biolabs)

Restriktionsenzym-Puffer, 10-fach konzentriert, wird vom Hersteller der Restriktionsenzyme mitgeliefert

Rinderserumalbumin (BSA), 100 µg/mL, wird, wenn erforderlich, vom Hersteller der Restriktionsenzyme mitgeliefert

steriles Wasser für die Amplifikation, 10 mL Ampullen (z. B. aus der Apotheke)

Thermostabile DNA Taq-Polymerase (5 U / µL z. B. von Qiagen)

2.2.3 Primer

NAT2-P1: 5'-GTCACACGAGGAAATCAAATGC-3'

NAT2-P2: 5'-ACCCAGCATCGACAATGTAATTCCTGCCCTCA-3'

NAT2-P3: 5'-ACACAAGGGTTTATTTTGTTC-3'

NAT2-P4: 5'-AATTACATTGTCGATGCTGGGT-3'

(Hersteller: z. B. MWG-Biotech, Ebersberg)

Die Primer werden in sterilem Wasser so gelöst, dass Konzentrationen von 100 pmol/µL zur Verfügung stehen. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. Unter diesen Bedingungen sind die Primer ca. 1–2 Jahre haltbar.

2.2.4 Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

Agarose (z. B. Invitrogen, Karlsruhe)

Borsäure H₃BO₃ (z. B. Merck)

Bromphenolblau, Natriumsalz (z. B. Sigma)

DNA-Standards: 100 bp- und 1Kb-Leiter (z. B. Life Technologies, New England Biolabs)

Ethidiumbromid in Tablettenform (z. B. 10 mg/Tablette von Sigma). **Dunkel lagern! Mutagen!**

Ficoll, Type 400 (z. B. Sigma)

Na₂-EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat) p.a. (z. B. Merck)

NuSieve GTG Agarose (z. B. Biozym Diagnostik)

TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), p.a. (z. B. Merck)

2.3 Lösungen

Die nachfolgend genannten Einwaagen, Ansätze und Volumina wurden abgestimmt auf den hier verwendeten Thermocycler (96 PCR-Analysen). Diese Angaben sind auf die jeweiligen Gerätegegebenheiten im Labor des Anwenders anzupassen.

0,5 M EDTA-Lösung pH 8

In ein 200-mL-Becherglass werden 18,612 g Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Na₂-EDTA × 2 H₂O) genau eingewogen. Unter Rühren werden 90 mL H₂O und 5 mL NaOH (10 mol/L) hinzugefügt. Der pH-Wert der Lösung wird durch vorsichtige, tropfenweise Zugabe von NaOH auf pH 8 eingestellt. Nach vollständiger Lösung der EDTA-Salzes wird die Lösung in einen 100-mL-Messkolben überführt und mit H₂O bis zur Marke aufgefüllt.

Diese Lösung ist im Kühlschrank bei ca. 6 °C mehrere Monate haltbar.

5-fach konzentrierter TBE-Puffer (TRIS-Borsäure-Elektrophorese-Puffer)

In einen 1-L-Messkolben werden 54 g (446 mmol) TRIS eingewogen. Man fügt etwa 500 mL bidestilliertes Wasser hinzu und schwenkt den Kolben bis eine klare Lösung entstanden ist. Anschließend fügt man 27,5 g (445 mmol) Borsäure hinzu und schwenkt erneut um bis eine klare Lösung entstanden ist. Man pipettiert 20 mL einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8) hinzu und füllt anschließend den Messkolben mit bidestilliertem Wasser bis zu Marke auf. Diese Lösung ist mehrere Monate haltbar.

1-fach konzentrierter TBE-Puffer

200 mL des 5-fach konzentrierten TBE-Puffers (s.o.) werden in einen 1-L-Messkolben gegeben. Der Kolben wird unter gelegentlichem Umschwenken mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Dieser Puffer ist 6–8 Wochen haltbar.

Ficoll-Gelladepuffer mit Bromphenolblau

In ein 100-mL-Becherglas werden 7,5 g Ficoll (Typ 400) eingewogen. Man fügt 50 mL steriles, bidestilliertes Wasser hinzu und löst das Ficoll unter leichtem Rühren und gelinder Wärmezufuhr auf (Magnetrührer). Anschließend werden der Lösung 125 mg Bromphenolblau zugesetzt und unter leichtem Umschwenken gelöst. Von diesem Material werden 1 mL Aliquote (ausreichend für jeweils 200 Analysen) in verschließbare Reaktionsgefäße pipettiert und bei ca. -18°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Kalibrierlösungen der DNA-Leitern

Für die Erfolgskontrollen wird der 1Kb-DNA-Standard ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), für die Restriktionsschnitte die 100 bp-DNA-Standard ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) verwendet. Dazu werden 100 μL des jeweiligen Standards mit 200 μL Ficoll-Gelladepuffer mit Bromphenolblau und 700 μL 1-fach konzentriertem TBE-Puffer verdünnt. Von den Verdünnungen werden 10–15 μL in die Geltaschen geladen.

Ethidiumbromid-Lösung

10 mg Ethidiumbromid (oder 1 Tablette mit 10 mg) werden in ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel gegeben. Man pipettiert 1 mL bidestilliertes Wasser hinzu, verschließt das Gefäß und schüttelt bis die Lösung klar geworden ist. Beim Umgang mit Ethidiumbromid ist auf äußerste Sorgfalt zu achten, es sind Vinylhandschuhe zu tragen. Ethidiumbromid ist mutagen! Ethidiumbromid ist lichtempfindlich.

Mastermix 1. PCR für 100 Proben

Im Mastermix 1. PCR werden all diejenigen Lösungen und Chemikalien vereinigt, die für die 1. PCR benötigt werden. Das Volumen des Mastermixes ist so ausgelegt, dass mit ihm etwa 100 DNA-Proben (bzw. eine 96er Wellplatte) vermessen werden können. Ein solcher Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen.

In ein 10-mL-Schraubgläschen mit Deckel werden dazu die in Tabelle 2 aufgeführten Reagenzienvolumina pipettiert. Anschließend wird das Ganze durch intensives Schütteln gut vermischt.



Tab. 2. Ansatz Mastermix 1. PCR.

Reagenzien	Reagenzienvolumina	Endkonzentration*
10-fach-PCR-Puffer (inkl. MgCl ₂)	500 µL	1-fach PCR-Puffer (1,5 mM MgCl ₂)
25 mM dNTPs	40 µL	200 µM pro dNTP
10 µM Primer <i>NAT2</i> P1	160 µL	0,32 µM
10 µM Primer <i>NAT2</i> P2	160 µL	0,32 µM
DNA Taq Polymerase (5 U / µL)	25 µL	1,25 U
H ₂ O bidest. (steril!)	3615 µL	–

* Die hier angegebene Endkonzentration bezieht sich auf das Volumen nach zusätzlicher Zugabe von jeweils 5 µL DNA-Probe zu 45 µL Mastermix in einer Einzelprobe.

Mastermix 2. PCR für 100 Proben

Im Mastermix 2. PCR werden all diejenigen Lösungen und Chemikalien vereinigt, die für die 2. PCR benötigt werden. Das Volumen des Mastermixes ist so ausgelegt, dass mit ihm etwa 100 DNA-Proben (bzw. eine 96er Wellplatte) vermessen werden können. Ein solcher Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. Er unterscheidet sich vom Mastermix für die 1. PCR durch die Art der zugesetzten Primer. In ein 10-mL-Schraubgläschen mit Deckel werden dazu die in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzienvolumina pipettiert. Anschließend wird das Ganze durch intensives Schütteln gut vermischt.

Tab. 3. Ansatz Mastermix 2. PCR.

Reagenzien	Reagenzienvolumina	Endkonzentration*
10-fach-PCR-Puffer (inkl. MgCl ₂)	500 µL	1-fach PCR-Puffer (1,5 mM MgCl ₂)
25 mM dNTPs	40 µL	200 µM pro dNTP
10 µM Primer <i>NAT2</i> P3	160 µL	0,32 µM
10 µM Primer <i>NAT2</i> P4	160 µL	0,32 µM
DNA Taq Polymerase (5 U / µL)	25 µL	1,25 U
H ₂ O bidest. (steril!)	3615 µL	–

* Die hier angegebene Endkonzentration bezieht sich auf das Volumen nach zusätzlicher Zugabe von jeweils 5 µL DNA-Probe zu 45 µL Mastermix in einer Einzelprobe.

Das Volumen der nachfolgend dargestellten Zusammensetzungen der Mastermixes für die Restriktionsenzyme ist so gewählt, dass ca. 100 Proben (96er Well-Platte) bearbeitet werden können.

Mastermix Restriktionsenzym *Msp* I (1. PCR)

In ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel werden 50 µL *Msp* I, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer und 750 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Mastermix Restriktionsenzym *Fok* I (1. PCR)

In ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel werden 100 µL *Fok* I, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer und 700 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Mastermix Restriktionsenzym *Dde* I (1. PCR)

In ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel werden 50 µL *Dde* I, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer und 750 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Mastermix Restriktionsenzym *Kpn* I (2. PCR)

In ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel werden 100 µL *Kpn* I, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer, 20 µL Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) und 680 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Mastermix Restriktionsenzym *Taq* I (2. PCR)

In ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel werden 50 µL *Taq* I, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer, 20 µL Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) und 730 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Mastermix Restriktionsenzym *Dde* I (2. PCR)

In ein 2-mL-Reaktionsgefäß mit Deckel werden 50 µL *Dde* I, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer und 750 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das



Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Mastermix Restriktionsenzym *BamH I* (2. PCR)

In ein 2-ml Reaktionsgefäß mit Deckel werden 50 µL *BamH I*, 200 µL 10-fach Restriktionsenzym-Puffer, 20 µL Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) und 730 µL bidestilliertes, steriles Wasser pipettiert. Das Gefäß wird verschlossen und intensiv geschüttelt. Dieser Mastermix ist analysentäglich frisch herzustellen. (Siehe auch Tabelle 4)

Tab. 4. Pipettierschema des Mastermixes Restriktionsenzyme.

	Volumina für 100 Proben						
	<i>Msp I</i>	<i>Fok I</i>	<i>Dde I</i>	<i>Kpn I</i>	<i>Taq I</i>	<i>Dde I</i>	<i>BamHI</i>
Restriktionsenzym	50 µL 1000U	100 µL 400U	50 µL 500U	100 µL 1000U	50 µL 1000U	50 µL 500U	50 µL 1000U
10-fach-Restriktionsenzym-Puffer	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
BSA	–	–	–	20 µL	20 µL	–	20 µL
H ₂ O bidest. (steril!)	750 µL	700 µL	750 µL	680 µL	730 µL	750 µL	730 µL

2.4 Gele

Agarose-Gel (1,5%)

1,5 g Agarose werden in 100 mL 1-fach TBE-Puffer durch Erhitzen bis zum Siedepunkt gelöst (Mikrowelle 600 Watt, 500 mL Gewindeflasche aus z.B. Duranglas verwenden). Dabei ist auf Siedeverzüge zu achten (zwischendurch schwenken). Anschließend werden 10 µL (10 mg/mL) Ethidiumbromid-Lösung (Vinylhandschuhe tragen, Vorsicht: mutagen!) pro 100 mL Gesamtvolumen zugesetzt. Die hergestellte Agaroselösung wird unter leichtem Rühren auf etwa 60–80 °C abgekühlt und in den vorher vorbereiteten Gelgießstand (Einsetzen des Geltablets und der Gelkämme) gegossen. Das Gel steht für zwei Stunden bei RT zum Erstarren. Für die angegebenen Mengen kann ein Gel von 25 cm Breite und 7,5 cm Höhe mit 50 Taschen hergestellt werden. Zur Aufbewahrung kann es in Frischhaltefolie für Lebensmittel verpackt und bis zu 5 Tage im Kühlschrank gelagert werden.

NuSieve-Agarose : Agarose 3:1 (3,2%)

2,4 g NuSieve-Agarose und 0,8 g Agarose werden wie oben beschrieben durch kräftiges Schütteln und wiederholtes Aufkochen in 100 mL 1-fach TBE-Puffer gelöst, mit 10 µL (10 mg/mL) Ethidiumbromid-Lösung versetzt, auf etwa 60–80°C abgekühlt und in den Gelgießstand gegossen. Gelgröße und Lagerung sind identisch mit denen des Agarose-Gels (1,5%).

3 Probenaufarbeitung**3.1 Lagerung**

EDTA-Vollblutproben können zunächst ohne weitere Aufarbeitung bei –20°C eingefroren werden. Sie sind so über mehrere Monate stabil. Nach dem Auftauen muss die Probe zur Homogenisierung gründlich geschwenkt werden.

3.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgt mit einem kommerziellen Kit nach Vorschrift des jeweiligen Herstellers.

Bei dem hier von den Autoren eingesetzten, kommerziellen System wird Vollblut mit einem Puffer lysiert und zur Denaturierung der Proteine mit Protease inkubiert. Das Lysat wird mit Ethanol versetzt und auf eine Silica-Säule gegeben. Dort bindet die DNA an der Silica-Matrix unter Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen und Ethanol sowie bei niedrigem pH-Wert. Nach dem Waschen der Säule (Entfernung der Proteine und Auswaschung der hohen Salzkonzentration) wird die DNA mit dem Elutionspuffer, der einen pH-Wert von 7 bis 9 hat, von der Säule eluiert. In diesem Puffer kann die DNA 1–2 Jahre im Kühlschrank aufbewahrt werden. Ein Aliquot des Eluats kann direkt in die PCR eingesetzt werden.

3.3 Bestimmung der Reinheit und Konzentration der DNA

Die Reinheit und Konzentration der DNA kann durch Messung der optischen Dichte (OD) der DNA-Probe erfolgen. Dazu werden 20 µL der DNA in Elutionspuffer mit 680 µL Wasser (autoklaviert) für die Messung verdünnt. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm; der Quotient dieser beiden Messwerte ist daher ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte für doppelsträngige (ds) DNA 1,6–2,0 betragen.



Zucker absorbieren bei 230 nm, so dass das Verhältnis OD_{230}/OD_{260} ebenfalls ein Maß für die Reinheit ist (Soll: 0,3–0,9).

Mit der Extinktion bei 260 nm lässt sich die Konzentration der DNA berechnen:

$$1 A_{260} = 50 \mu\text{g ds-DNA/mL}$$

4 Vorbereitung und Durchführung der PCR

Allgemeine Hinweise für die PCR-Technik finden sich bei H. J. Müller und C. Mühlhardt [35, 36].

Alle Reagenzien werden, sofern nicht anders beschrieben, in Aliquoten bei -20°C eingefroren, benötigte Mengen werden vor der PCR aufgetaut und im Kühlblock für PCR-Reagenzien bis zum Pipettieren aufbewahrt. Beim Ansetzen der PCR sind Handschuhe zu tragen, um eine Kontamination der Probe mit Fremd-DNA und DNAsen, die zum Abbau von DNA führen, zu vermeiden.

4.1 1. PCR (nt – 69 bis 373)

Pro Well einer 96er-Lochplatte, die in einen Kühlblock für Lochplatten eingesetzt wird, mischt man 45 μL Mastermix 1. PCR intensiv mit 5 μL DNA-Probe (100 ng DNA / μL), indem man mit einer Pipette die Proben mehrfach aufsaugt und zurückpipettiert.

Nach dem Pipettieren und Mischen aller Reagenzien wird die Well-Platte mit einer geeigneten Gummimatte (full plate cover) abgedeckt. Die Platte wird kurz zentrifugiert (800 U/min), um eventuelle Luftblasen zu beseitigen und die Flüssigkeitsvolumina in den Bodenvertiefungen zu sammeln. Anschließend wird die Wellplatte in das PCR-Gerät gestellt. Dies wird gemäß der nachfolgenden Tabelle 5 programmiert und anschließend gestartet. Im letzten Schritt wird das Amplifikat bis zur Verwendung in der Erfolgskontrolle (Abschnitt 4.1.1) im Gerät gekühlt aufbewahrt.

Tab. 5. Thermocycler-Programm für die 1. PCR.

Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	0,5 min	35 Zyklen
Annealing	60 °C	1 min	
Extension	72 °C	1 min	
Abschließende Extension	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

4.1.1 Elektrophorese 1 (Erfolgskontrolle der 1. Amplifikation)

Durch Elektrophorese erfolgt eine Kontrolle für das PCR-Produkt auf 1,5%igem Agarose-Gel. Dazu werden 5 µL Amplifikat, 5 µL 1-fach TBE-Puffer und 2 µL Gelladepuffer (inkl. Bromphenolblau) gemischt und in die Geltaschen geladen. Durch den schwereren Ladepuffer bleiben die Proben in den Auftragungstaschen. Alle nachfolgenden Elektrophoresen werden bei 160 V (konstant) in ca. 60 bis 80 min durchgeführt (Laufstrecke ca. 5 cm). Die Trennungen sind beendet, wenn die Bromphenolblau-Front die Gelgrenze beinahe erreicht hat. Das Elektrophorese-Ergebnis sollte dem Ausschnitt Kontrolle 1. PCR in der Abb. 3 entsprechen.

4.1.2 Restriktionsschnitte der 1. PCR

Nach erfolgreicher Amplifikation (positiver Amplifikationskontrolle) werden pro Probe insgesamt drei 10 µL Aliquote der PCR-Produkte der 1. Amplifikation getrennt voneinander (entsprechend Tabelle 6) weiterverarbeitet und den Restriktionsschnitten unterzogen.

Dazu versetzt man jeweils getrennt 10 µL des Produkts der 1. PCR mit jeweils 10 µL des entsprechenden Restriktionsenzym-Mastermixes und inkubiert die Proben bei 37 °C in einem thermostatisierbaren Wasserbad für die in Tabelle 5 angegebenen Inkubationszeiten. Diese Zeiten ergeben sich aus den Angaben der Enzym-Hersteller und den Erfahrungen der Autoren.

Tab. 6. Restriktionsschnitte für die Amplikate der 1. PCR.

		Volumina für <i>eine</i> Probe		
		<i>Msp</i> I	<i>Fok</i> I	<i>Dde</i> I
Produkt 1. PCR		10 µL	10 µL	10 µL
Mastermix	Restriktionsenzym	0,50 µL (10U)	1,0 µL (4U)	0,50 µL (5U)
	10-fach Restriktionsenzym-Puffer	2 µL	2 µL	2 µL
	H ₂ O steril	7,50 µL	7,0 µL	7,50 µL
Inkubationszeit		2 h	2 h	4 h
Inkubationstemp.		37 °C	37 °C	37 °C
Agarose-Gel		3,2% NuSieve 3 : 1	1,5% Agarose	3,2% NuSieve 3 : 1



4.1.3 Elektrophorese 2

Die Produkte der Restriktionsschnitte werden sofort der Gelelektrophorese zugeführt.

Es sind die in Tabelle 6 angegebenen Agarose-Gele zu verwenden. Vor dem Auftragen der Proben wird das Gel mit dem Geltaflet in die Elektrophorese-Einheit gelegt, die mit 1-fach TBE-Puffer gefüllt ist. Das Gel muss mit Puffer bedeckt sein. Zur Probenauftragung werden in der 96-Well-Platte 4 µL Ficoll-Gelladepuffer mit 20 µL Produkt der Restriktionsschnitte gemischt und ca. 15 µL davon in die Geltaflet pipettiert. Die Elektrophorese-Ergebnisse sollten den Ausschnitten *Msp* I, *Fok* I und *Dde* I (1. PCR) in der Abb. 3 entsprechen.

4.2 2. PCR (nt 342 bis 900)

Pro Vertiefung einer 96er-Lochplatte, die in einen Kühlblock für Lochplatten eingesetzt wird, mischt man 45 µL Mastermix 2. PCR intensiv mit 5 µL DNA-Probe (100 ng DNA / µL), indem man mit einer Pipette die Proben mehrfach aufsaugt und zurückpipettiert.

Nach dem Pipettieren und Mischen aller Reagenzien wird die Well-Platte mit einer geeigneten Gummimatte (full plate cover) abgedeckt. Die Platte wird kurz zentrifugiert (800 U/min), um eventuelle Luftblasen zu beseitigen und die Flüssigkeitsvolumina in den Bodenvertiefungen zu sammeln. Anschließend wird die Wellplatte in das PCR-Gerät gestellt. Dies wird gemäß der nachfolgenden Tabelle 7 programmiert und anschließend gestartet. In den nachfolgenden Tabellen sind die Zusammensetzung und das Temperaturprogramm für die 2. PCR zusammengestellt. Im letzten Schritt wird das Amplifikat bis zur Verwendung in der Erfolgskontrolle (Abschnitt 4.2.1) im Gerät gekühlt aufbewahrt.

Tab. 7. Thermocycler-Programm für die 2. PCR.

Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	0,5 min	35 Zyklen
Annealing	55 °C	1 min	
Extension	72 °C	1 min	
Abschließende Extension	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

4.2.1 Elektrophorese 3 (Erfolgskontrolle der 2. Amplifikation)

Durch Elektrophorese erfolgt eine Kontrolle für das PCR-Produkt auf 1,5%igem Agarose-Gel. Dazu werden 5 µL Amplifikat, 5 µL 1-fach TBE-Puffer und 2 µL Gelladepuffer (inkl. Bromphenolblau) gemischt und in die Geltaschen geladen. Das Elektrophorese-Ergebnis sollte dem Ausschnitt Kontrolle 2. PCR in der Abb.3 entsprechen.

4.2.2 Restriktionsschnitte der 2. PCR

Nach erfolgreicher Amplifikation werden pro Probe insgesamt vier 10 µL Aliquote der PCR-Produkte der 2. Amplifikation getrennt voneinander (entsprechend Tabelle 8) weiterverarbeitet und den Restriktionsschnitten unterzogen.

Dazu versetzt man jeweils getrennt 10 µL des Produkts der 2. PCR mit jeweils 10 µL des entsprechenden Restriktionsenzym-Mastermixes und inkubiert die Proben bei 37 °C (65 °C bei *Taq I*) in einem thermostatisierbaren Wasserbad für die in Tabelle 7 angegebenen Inkubationszeiten. Diese Zeiten ergeben sich aus den Angaben der Enzym-Hersteller und den Erfahrungen der Autoren.

Tab. 8. Restriktionsschnitte für die Amplifikate der 2. PCR.

		Volumina für <i>eine</i> Probe			
		<i>Kpn I</i>	<i>Taq I</i>	<i>Dde I</i>	<i>BamHI</i>
Produkt 2. PCR		10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Mastermix	Restriktionsenzym	1,00 µL (10U)	0,50 µL (10U)	0,50 µL (5U)	0,50 µL (10U)
	10-fach Restriktions-enzym-Puffer	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
	BSA	0,20 µL	0,20 µL	ohne	0,20 µL
	H ₂ O steril	6,80 µL	7,30 µL	7,50 µL	7,30 µL
Inkubationszeit		2 h	18 h (über Nacht)	4 h	2 h
Inkubationstemp.		37 °C	65 °C	37 °C	37 °C
Agarose-Gel		1,5% Agarose	3,2% NuSieve	3,2% NuSieve	1,5% Agarose

4.2.3 Elektrophorese 4

Die Produkte der Restriktionsschnitte sollten möglichst sofort der Gelelektrophorese zugeführt werden, da die entstandenen DNA-Fragmente nicht lagerfähig sind. Es sind die in Tabelle 8 angegebenen Agarose-Gele zu verwenden. Vor dem Auftragen der Proben wird das Gel mit dem Gellablett in die Elektrophorese-Einheit

gelegt, die mit 1-fach TBE-Puffer gefüllt ist. Das Gel muss mit Puffer bedeckt sein. Zur Probenauftragung werden in der 96-Well-Platte 4 μL Ficoll-Gelladepuffer mit 20 μL Produkt der Restriktionsschnitte gemischt und ca. 15 μL davon in die Gelta-schen pipettiert. Die Elektrophorese-Ergebnisse sollten den Ausschnitten *Kpn* I, *Taq* I, *Dde* I und *Bam*H I (2. PCR) in der Abb. 3 entsprechen.

5 Kalibrierung

Für die Fragmentlängen-Kalibrierung werden „DNA-Leitern“ verwendet. Dies sind Mischungen von DNA-Fragmenten mit definierter Basenpaarzahl. In jeder Gelelektrophorese werden diese Standards in den äußeren Taschen jeder Reihe mit-analysiert. Bei der Kontrolle der Amplifikate wird die 1 Kb DNA-Leiter, bei den Proben nach Restriktionsschnitt die 100 bp DNA-Leiter verwendet.

6 Auswertung

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das feuchte Gel auf den UV-Transilluminator gelegt (Vinyl-Handschuhe tragen!) und bei 312 nm wird das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt. Das erscheinende Bandenmuster wird mit der Kamera des Auswertegeräts fotografiert und ausgedruckt (Beispiel siehe Abbildung 3).

Für jede Allel-Variante, die sich aus den gefundenen DNA-Fragmenten nachweisen lässt (Tabelle 9), werden die Ergebnisse der untersuchten Probe durch eine Markierung im zugeordneten Feld in einen Auswertungsbogen eingetragen (siehe Anlage 1). Durch die Auswerteschablone gleichen Maßstabs, diese sollte auf Folie kopiert werden (Anlage 2), können die Allelkombinationen in den Proben ermittelt werden. Die Auswertung ist abgeschlossen, wenn die von der Schablone vorgegebenen Varianten (Referenzsequenz = Wildtyp oder Sequenzvariation = Mutant) in *allen* Punkten zugeordnet werden können. Stimmt nur eine Schablonenzeile mit den Eintragungen in der Auswertezeile überein, handelt es sich um einen homozygoten Allelträger. Lassen sich zwei und mehr Zeilen des Auswertebogens mit den Schablonenzeilen zur Deckung bringen, ist der Allelträger heterozygot. Dabei sind unterschiedliche Allelkombinationen möglich. Im Auswertebogen sind Beispiele für verschiedene Genotypen genannt. Die ersten drei zeigen homozygote, die weiteren heterozygote Allelträger. Bei Letzteren ist nur für den Genotypen 5B,7B die Allelkombination eindeutig zuzuordnen (Beispiel 4). Bei den anderen Heterozygoten sind die Allelkombinationsmöglichkeiten durch Schrägstriche getrennt dargestellt. Hier ist keine eindeutige Zuordnung möglich, welches der genannten Allele wirk-

lich vorhanden ist. Für das 7. Beispiel im Auswertebogen heißt dies, dass 3 Allelkombinationen möglich sind.

Tab. 9. DNA-Fragmentlängen aus den Restriktionsschnitten.

Restriktionsschnitt	Mutationsstelle	Sequenz	Fragmentlängen (bp)
<i>Msp I</i> (aus 1. PCR)	191	Referenzsequenz	181 168 93
		Sequenzvariation	274 168
<i>Fok I</i> (aus 1. PCR)	282	Referenzsequenz	337 105
		Sequenzvariation	442
<i>Dde I</i> (aus 1. PCR)	341	Referenzsequenz	221 163 58
		Sequenzvariation	189 163 58 32
<i>Kpn I</i> (aus 2. PCR)	481	Referenzsequenz	424 135
		Sequenzvariation	559
<i>Taq I</i> (aus 2. PCR)	590	Referenzsequenz	226 170 142 21
		Sequenzvariation	396 142 21
<i>Dde I</i> (aus 2. PCR)	803	Referenzsequenz	345 124 90
		Sequenzvariation	345 97 90 27
<i>BamHI</i> (aus 2. PCR)	857	Referenzsequenz	515 44
		Sequenzvariation	559
1. PCR = 442 bp			2. PCR = 559 bp

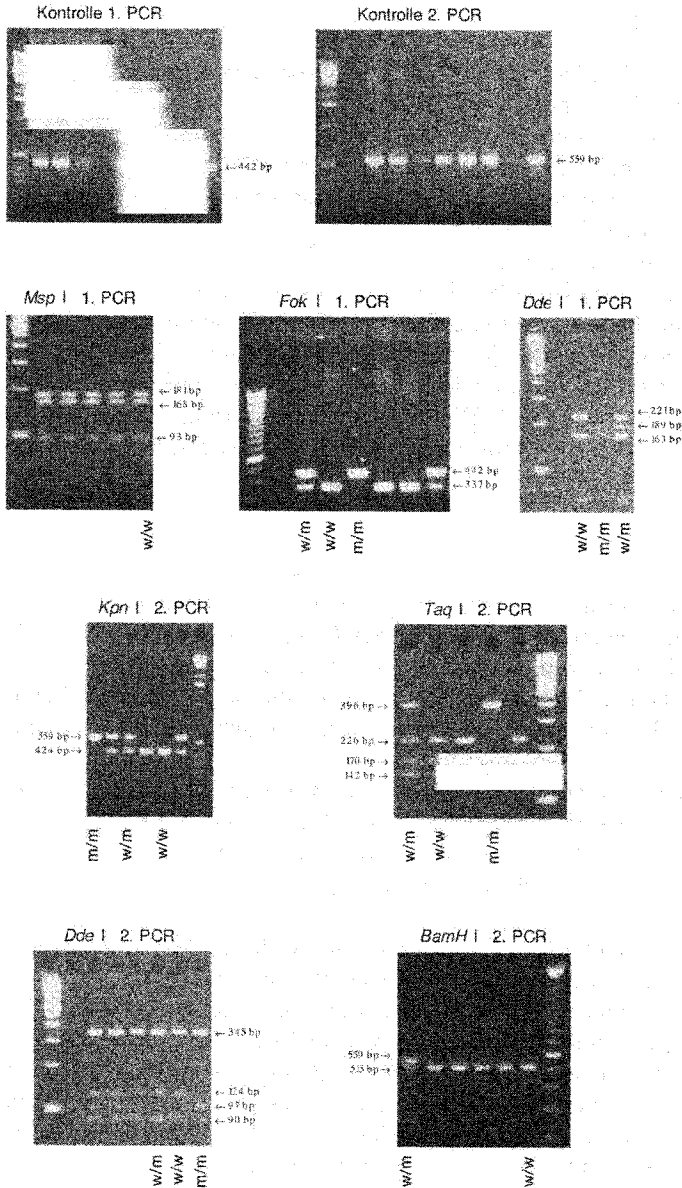


Abb. 3. Gel-Dokumentation der DNA-Fragmente nach Amplifikation und Restriktionsschnitten (bp = Basenpaare, w = Wildtyp = Referenzsequenz (rf), m = Mutant = Sequenzvariation (sv)).

7 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätssicherung wird ausdrücklich auf das entsprechende allgemeine Kapitel in diesem Werk (Teil I, Kapitel 12) verwiesen.

Laborseitig sollte folgenderweise verfahren werden:

Die erste und letzte Probe einer 96er-Lochplatte werden zur Prüfung auf DNA-Kontaminationen als Leerwerte mitgeführt. Dazu wird das Volumen der eigentlichen DNA-Probe durch steriles Wasser ersetzt.

Es ist zu empfehlen, bei jeder neuen PCR zur Kontrolle einige Proben mit bekanntem unterschiedlichen Genotyp als Positivkontrolle mitzuanalysieren.

Zur Verifizierung der PCR-Ergebnisse sollten in derselben Analyse einige willkürlich gewählte Proben (z. B. eine aus jeder Reihe der Well-Platte) in einer Doppelbestimmung analysiert werden. Dazu werden diese Wiederholungsproben auf die beiden letzten Reihen der Platte verteilt. Dies sichert das Typisierungsergebnis ab und kann helfen, ein Vertauschen von Proben durch Pipettierfehler aufzudecken.

8 Störeinflüsse

Grundsätzlich besteht bei allen Arbeiten zur PCR-Technik die Gefahr der Kontamination der Probe durch Fremd-DNA und DNAsen. Dadurch sind in dieser Methode die beiden Amplifikationsschritte besonders kritisch. Bei allen Operationen ist deshalb auf größte Sauberkeit, Verwendung steriler Materialien und Tragen von Handschuhen zu achten, denn die größte Kontaminationsgefahr geht von den Operateuren selbst aus.

Die in der Methode verwendete DNA wird aus Blut isoliert. Blutproben können ohne Kühlung auf dem Postweg verschickt werden. Wird die DNA nicht sofort isoliert, kann die Probe bei -20°C eingefroren werden und ist so mehrere Monate stabil. Die isolierte DNA wird im Kühlschrank bei $4-6^{\circ}\text{C}$ gelagert. Diese Proben sind so mehrere Jahre stabil.

Bei Proben mit geringerer DNA-Konzentration als in der Methode vorgesehen kann das Volumen der DNA-Probe in der PCR erhöht werden. Dann muss jedoch unbedingt das H_2O -Volumen im Mastermix entsprechend reduziert werden. Die Konzentration der anderen Reagenzien muss zwingend konstant gehalten werden. Das hat zur Folge, dass derartige Proben in der PCR zusammengefasst analysiert werden müssen, da für sie ein eigener Mastermix hergestellt werden muss. Wenn die Amplifikation für solche Proben erfolgreich war, können sie zusammen mit anderen den Restriktionsschnitten zugeführt werden. Bei Blutproben, die teilweise koaguliert sind, kann die DNA aus ca. $200\ \mu\text{L}$ des noch flüssigen Teils mit einem Mini-Aufarbeitungs-Kit (z. B. Qiagen) isoliert werden. Die Ausbeuten sind zwar geringer, reichen jedoch aus um einige PCR durchzuführen. Üblicherweise werden

EDTA-Blutproben verwendet. Erfahrungen mit anderen Gerinnungshemmern wie Heparin oder Citrat liegen bei den Autoren nicht vor. Soll eine Genotypisierung aus histologischen Probenmaterialien, z. B. aus Gewebeschnitten, durchgeführt werden, eignet sich eine Aufarbeitung mit speziellen DNA-Isolierungs-Kits (z. B. Qiagen, Hilden, oder TaKaRa DEXPAT™, Takara Shuzo über MoBiTec GmbH, Göttingen, oder Puregene® Genra Systems über BIOzym DIAGNOSTIK GmbH Hessisch-Oldendorf).

Zur Frage von Störungen durch Medikamente, z. B. Cytostatika, wurden von den Autoren keine systematischen Untersuchungen gemacht. Einzelne Hinweise, dass trotz erfolgreicher DNA-Isolierung aus Blutproben von Patienten mit Medikamenteneinnahme mitunter keine Amplifikation in der PCR erfolgte, könnten auf solche Störungen hinweisen. Diese sind jedoch nicht belegt.

Störungen können auch auftreten durch unvollständige Restriktionsschnitte. Dies ist daran erkennbar, dass im Gel neben den Zielbanden weitere sichtbar sind, z. B. die Bande des Amplifikats oder Banden in der Größe zwischen Amplifikat und Zielbanden. Abhilfe kann in diesen Fällen oft durch eine Verlängerung der Inkubationszeit geschaffen werden. Hierzu wird auf das Informationsmaterial der Enzym-Hersteller, das mitgeliefert wird, verwiesen.

9 Diskussion der Methode

Diese Methode basiert auf der Arbeit von Cascorbi et al. [5], in der 3 Amplifikate hergestellt werden. Ein zunächst amplifiziertes 1211 bp großes *NAT2*-DNA-Fragment dient hierbei als Start-DNA für zwei weitere Amplifikate mit der Größe von 442 bp und 420 bp. Alle drei Amplifikate müssen den Restriktionsschnitten unterzogen werden, wobei die verwendeten Enzyme mit denen der hier vorgestellten Methode identisch sind. Vorteile in der Weiterentwicklung der Methode liegen darin, dass die störungsanfällige Amplifikation des sehr großen DNA-Fragments entfällt und nur zwei Amplifikate mit kleineren Fragmenten hergestellt werden. Da diese aus der Ursprungs-DNA amplifiziert werden, können größere Mengen DNA für die PCR eingesetzt werden. Dies ist als Vorteil gegenüber der Cascorbi-Methode zu werten, da dort für die zweite und dritte PCR DNA-Volumina von 0,3 µL eingesetzt werden, was mit einem hohen Fehler bei den Pipettierungen verbunden ist. Wegen des Wegfalls einer PCR bedeutet dies auch einen Zeitgewinn bei der Durchführung.

Trotzdem ist die Methode mit zwei PCR und sieben Restriktionsschnitten immer noch sehr aufwändig. Die Amplifikation kleinerer Fragmente verbessert die Chancen auch aus DNA schlechterer Qualität, wie sie z. B. aus insbesondere älteren histologischen Proben gewonnen werden könnte, eine eindeutige Genotypisierung zu

erhalten. Als Vorteil kann die Kontrolle des Ergebnisses durch mehrere Restriktionsschnitte gewertet werden.

Die *NAT2*-Genotypisierung kann auch mit einem kommerziellen Kit für die Real-Time-PCR-Cycler-Technik durchgeführt werden (z. B. Lightcycler mit 32 Proben-einsatz, Roche). Diese Methode ist gegenüber der hier vorgestellten Methode letztlich zeitaufwändiger und liefert Informationen für die Referenzsequenz und nur drei Mutationsstellen (*NAT2*5*, *NAT2*6*, *NAT2*7*). Zusätzlich ist die Real-Time-PCR für diese Anwendung teurer.

Auf die Möglichkeit, dass die enzymatischen Reaktionen zum Restriktionsschnitt unvollständig sein können, wird hier (Kapitel 8) und bei Cascorbi und Roots [37] hingewiesen. Inwieweit die eingesetzte Enzymmenge reduzierbar ist, wurde nicht systematisch untersucht. Die vom Hersteller mitgelieferten Informationen lassen hier Optimierungsmöglichkeiten denkbar erscheinen. Durch Verwendung von bekannten Proben kann die Effizienz der Restriktionsenzyme kontrolliert werden. In der Gelelektrophorese werden unter den dargestellten Bedingungen DNA-Fragmente kleiner 90 bp nicht nachgewiesen. Dies ist unkritisch, da die Zuordnung der restlichen Fragmente eindeutig ist.

Die Methode ist sowohl Material als auch Zeit aufwändig. So benötigt eine Person bei täglich 8 Stunden Arbeitszeit für die DNA-Isolierung und Bearbeitung und Auswertung von Proben einer 96er-Well-Platte ca. 7 Arbeitstage. Einen ungefähren Ablaufplan zeigt die Tabelle 10.

Tab. 10. Zeitlicher Ablaufplan für die *NAT2*-Genotypisierung.

Tag	Arbeiten
1.–3.	DNA-Isolierung aus ca. 100 Blutproben
4.	1. PCR mit Erfolgskontrolle
5.	3 Restriktionsschnitte mit Gelelektrophorese und 2. PCR mit Erfolgskontrolle
6.	3 Restriktionsschnitte mit Gelelektrophorese und <i>Taq</i> I-Restriktionsschnitt über Nacht
7.	Gelelektrophorese des <i>Taq</i> I-Restriktionsschnitts und Auswertung

In den von uns untersuchten Kollektiven werden neben dem *NAT2*4*-Allel häufig die Allele *NAT2*5B* und *NAT2*6A* bestimmt. Agundez et al. haben 1008 Proben aus der spanischen Bevölkerung (Kaukasier) untersucht und die in Tabelle 11 aufgelistete Allel-Häufigkeit gefunden [38]. Unter 4000 untersuchten Proben von Mitteleuropäern wurde keine einzige Mutation an der Position 191 gefunden. Diese Mutationsstelle wurde in Genen von Afrikanern, bzw. Amerikanern afrikanischer Abstammung nachgewiesen [39, 40] und ist außerordentlich selten in europäischen oder orientalischen Bevölkerungsgruppen zu finden.



Tab. 11. Häufigkeitsverteilung (%) von NAT2-Allelen für eine kaukasische Bevölkerungsgruppe [38].

Allel	NAT2*5B	NAT2*6A	NAT2*4	NAT2*12A	NAT2*6B	NAT2*13
Prozent	41,6	23,6	21,6	2,5	2,0	1,9
Allel	NAT2*5A	NAT2*7B	NAT2*12C	NAT2*5C	NAT2*14C	NAT2*14A
Prozent	1,5	1,2	1,0	0,8	0,8	0,6
Allel	NAT2*5D	NAT2*6C	NAT2*12B	NAT2*14D	NAT2*14F	
Prozent	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	

10 Literatur

- [1] *D. W. Hein, D. M. Grant und E. Sim:* Arylamine N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.5) Nomenclature. <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>. (Stand 5. 2. 2003).
- [2] *M. Blum, D.M. Grant, W. McBride, M. Heim und U.A. Meyer:* Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization, and functional expression. *DNA Cell Biol.* 9(3), 193–203 (1990).
- [3] *M. Abe, T. Suzuki und T. Deguchi:* An improved method for genotyping of N-acetyltransferase polymorphism by polymerase chain reaction. *Jpn. J. Hum. Genet.* 38(2), 163–168 (1993).
- [4] *I. Cascorbi, N. Drakoulis, J. Brockmöller, A. Maurer, K. Sperling und I. Roots:* Arylamine N-Acetyltransferase (*NAT2*) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 581–592 (1995).
- [5] *I. Cascorbi, J. Brockmöller, P.M. Mrozikiewicz, S. Bauer, R. Loddenkemper und I. Roots:* Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (*NAT2*) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res.* 56, 3961–3966 (1996).
- [6] *D. A. Evans:* N-Acetyltransferase. *Pharmacol. Ther.* 42, 157–234 (1989).
- [7] *A. Hirvonen:* Polymorphic *NATs* and cancer predisposition. In: *P. Vineis, N. Malats, M. Lang, A. d'Errico, N. Caporaso, J. Cuzick, P. Bofetta* (Hrsg.): *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer.* IARC Scientific Publications No. 148, 251–270 (1999).
- [8] *L.W. Wormhoudt, J.N.M. Commandeur und N.P.E. Vermeulen:* Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 29, 59–124 (1999).
- [9] *R. Thier, K. Golka, T. Brüning und H.M. Bolt:* Genetische Suszeptibilität im Hinblick auf toxische Arbeitsplatz- und Umweltbelastungen. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 42, 834–840 (1999).
- [10] *H. Aurtup:* Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.* 464, 65–76 (2000).
- [11] *K. F. Windmill, A. Gaedigk, P. M. Hall, H. Samaritunga, D. M. Grant und M. E. McManus:* Localization of N-Acetyltransferases *NAT1* and *NAT2* in human tissues. *Toxicol. Sci.* 54, 19–29 (2000).

- [12] *D.W. Nebert*: Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics* 10, 279–290 (2000).
- [13] *J. Lewalter* und *H.-G. Neumann*: Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (Biomonitoring), Teil XII: Die Bedeutung der individuellen Empfindlichkeit beim Biomonitoring, Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 33, 352–364 (1998).
- [14] *D.M. Grant, B.K. Tang* und *W. Kalow*: A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 17, 459–464 (1984).
- [15] *J. Lewalter, R. Bussmann, W. Popp* und *K. Norpoth*: Bewertung der Zuverlässigkeit verschiedener Methoden zur Bestimmung des individuellen Acetylierer-Status. In: *R. Kreutz* und *C. Piekarski* (Hrsg.): *Verh. Dtsch. Ges. Arbeitsmedizin.* 32, 420–425 (1992).
- [16] *A.J. Kilbane, L.K. Silbart, M. Manis, I.Z. Beitins* und *W.W. Weber*: Human N-acetylation genotype determination with urinary caffeine metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47, 470–477 (1990).
- [17] *B.K. Tang, D. Kadar, L. Qian, J. Iriah, J. Yip* und *W. Kalow*: Caffeine as a metabolic probe: validation of its use for acetylator phenotyping. *Clin. Pharmacol. Ther.* 49, 648–657 (1991).
- [18] *A. Schnuch, G.A. Westphal, M.M. Müller, T.G. Schulz, J. Geier, J. Brasch, H.F. Merk, Y. Kawakubo, G. Richter, P. Koch, T. Fuchs, T. Gutgesell, K. Reich, M. Gebhardt, D. Becker, J. Grabbe, C. Szliska, W. Aberer* und *E. Hallier*: Genotype and phenotype of N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism in patients with contact allergy. *Contact Dermatitis* 38, 209–211 (1998).
- [19] *O. Adam* und *W. Forth*: Coffein – Umgang mit einem Genussmittel, das auch pharmakologische Wirkungen entfalten kann. *Deutsches Ärzteblatt* 98 (43), B2412–B2414 (2001).
- [20] *J. Brockmüller* und *I. Roots*: Assessment of liver metabolic function, clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 27, 216–248 (1994).
- [21] *D.M. Grant, B.K. Tang* und *W. Kalow*: Polymorphic N-acetylation of a caffeine metabolite. *Clin. Pharmacol. Ther.* 33, 355–359 (1983).
- [22] *K. Golka, V. Prior, M. Blaszekwicz, I. Cascorbi, W. Schöps, G. Kierfeld, I. Roots* und *H.M. Bolt*: Occupational history and genetic N-acetyltransferase polymorphism in urothelial cancer patients of Leverkusen, Germany. *Scand. J. Work Environ. Health* 22, 332–338 (1996).
- [23] *K. Golka, T. Reckwitz, M. Kempkes, I. Cascorbi, M. Blaszekwicz, S.E. Reich, I. Roots, J. Sökeland, H. Schulze* und *H.M. Bolt*: N-Acetyltransferase 2 (NAT2) and glutathione S-transferase μ (GSTM1) in bladder-cancer patients in a highly industrialized area. *Int. J. Occup. Environ. Health* 3 105–110 (1997).
- [24] *J. Lewalter* und *L. Miksche*: Individual variation and immunological effects in human biomonitoring. In: *R.C. Garner* (Hrsg.): *Human carcinogen exposure*, Oxford University Press 315–327 (1991).
- [25] *Z. Ye* und *J.P. Parry*: Meta-analysis of 20 case-control studies on the N-acetyl-transferase 2 acetylation status and colorectal cancer risk. *Med. Sci. Monit.* 8, CR558–CR565 (2002).
- [26] *P.M. Marcus, P. Vineis* und *N. Rothman*: NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk. a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population. *Pharmacogenetics*, 10, 115–122 (2000).
- [27] *L.E. Johns* und *R.S. Houlston*: N-acetyl transferase-2 and bladder cancer risk. a meta-analysis. *Environ. Mol. Mutagen.* 36, 221–227 (2000).
- [28] *P. Vineis, D. Marinelli, H. Atrup, J. Brockmüller, I. Cascorbi, A.K. Daly, K. Golka, H. Okkels, A. Risch, N. Rothman, E. Sim* und *E. Taioli*: Current smoking, occupation, N-acetyltransferase-2 and bladder cancer. A pooled analysis of genotype-based studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 1249–1252 (2001).

- [29] *D.A. Bell, A.F. Badawi, N.P. Lang, K.F. Ilett, F.F. Kadlubar und A. Hirvonen*: Polymorphism in N-acetyltransferase 1 (*NAT1*) polyadenylation signal: association of *NAT1*10* allele with higher N-acetylation in bladder and colon tissue. *Cancer Research*, 55, 5226–5229 (1995).
- [30] *D.M. Grant, G.H. Goodfellow, K.S. Sugamori und K. Durette*: Pharmacogenetics of the human arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacology* 61, 204–211 (2000).
- [31] Grundsatz G 33, Aromatische Nitro- und Aminoverbindungen in: *Arbeitsmedizinische Vorsorge, HVBG*, Gentner Verlag, Stuttgart, 2. Auflg. 407–419 (1998).
- [32] *P. Wolkenstein, V. Carriere, D. Charue, S. Bastuji-Garin, J. Revuz, J.C. Roujeau, P. Beaune und M. Bagot*: A slow acetylator genotype is a risk factor for sulphonamide-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Pharmacogenetics* 5, 255–258 (1995).
- [33] *B. Zhao, A. Seow, E.J.D. Lee und H.-P. Lee*: Correlation between acetylation phenotype and genotype in Chinese women. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 56, 689–692 (2000).
- [34] *K. Golka und M. Blaszkewicz*: Genotypisierung und Phänotypisierung am Beispiel der *NAT2*. In: *Angerer J.* (Hrsg.): *Biological Monitoring. Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin.*, Wiley-VCH, Weinheim: 98–104 (2001).
- [35] *H. J. Müller*: PCR – Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (2001).
- [36] *C. Mülhardt*: *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 3. Auflage (2002).
- [37] *I. Cascorbi und I. Roots*: Pitfalls in N-acetyltransferase 2 genotyping. *Pharmacogenetics* 9, 123–127 (1999).
- [38] *J. A. Agundez, M. Olivera, C. Martinez, J.M. Ladero und J. Benitez*: Identification and prevalence study of 17 allelic variants of the human *NAT2* gene in a white population. *Pharmacogenetics* 6(5), 423–428 (1996).
- [39] *D.A. Bell, J.A. Taylor, M.A. Butler, E.A. Stephens, J. Wiest, L.H. Brubaker, F.F. Kadlubar und G.W. Lucier*: Genotype / phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (*NAT2*) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis* 14, 1689–1692 (1993).
- [40] *C. Delomenie, L. Sica, D.M. Grant, R. Krishnamoorthy und J.M. Dupret*: Genotyping of the polymorphic N-acetyltransferase (*NAT2*) gene locus in two native African populations. *Pharmacogenetics*. 6, 177–185 (1996).

Autoren: *M. Blaszkewicz, D. Dannappel, R. Thier, J. Lewalter*
Prüfer: *T. Schulz*

Anlage 1: Auswertebogen (✓ = gefundene Fragmentlängen-Kombinationen).

	Restriktionsenzyme mit Mutationsstellen und Fragmentlängen für NAT2														
	1. PCR = 442 bp						2. PCR = 559 bp								
	Msp I 191		Fok I 282		Dde I 341		Kpn I 481		Taq I 590		Dde I 803		BamH I 857		
	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	
Fragmentlängen (bp)		274		442	221			559		396	345	345		559	
nach	181		337		189		424		226		124		515		
Restriktion	168	168	105		163	163	135		170		97		44		
	93				58	58			142	142	90	90			
						32			21	21		27			
Probenkennung	Beispiele für gefundene Fragmentlängen-Kombinationen für 7 Proben														zugeordnete NAT2-Allelkombinationen
1	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		4,4
2	✓		✓			✓		✓	✓		✓	✓	✓		5B,5B
3	✓			✓	✓		✓			✓	✓		✓		6A,6A
4	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	5B,7B
5	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		5A,6C / 5B,6A
6	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓		4,6A / 13,6B
7	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		4,5B / 12A,5A / 12C,5D

Anlage 2: Auswerteschablone.

	Restriktionsenzyme mit Mutationsstellen und Fragmentlängen für NAT2													
	1. PCR = 442 bp						2. PCR = 559 bp							
	Msp I 191		Fok I 282		Dde I 341		Kpn I 481		Taq I 590		Dde I 803		BamH I 857	
	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu
Fragmentlängen (bp) nach Restriktion	181	274	337	442	221	189	424	559	226	396	345	345	515	559
	168	168	105		163	163	135		170		124	97	44	
	93				58	58			142	142	90	90		27
Allele	Fragmentlängen-Kombinationen													
NAT2*4	●		●		●		●		●		●		●	
NAT2*5A	●		●		■		■		●		●		●	
NAT2*5B	●		●		■		■		●			■		●
NAT2*5C	●		●		■		●		●			■		●
NAT2*5D	●		●		■		●		●		●		●	
NAT2*5E	●		●		■		●			■	●		●	
NAT2*6A	●			■	●		●			■	●		●	
NAT2*6B	●		●		●		●			■	●		●	
NAT2*6C	●			■	●		●			■		■		●
NAT2*7A	●		●		●		●		●		●			■
NAT2*7B	●			■	●		●		●		●			■
NAT2*12A	●		●		●		●		●			■		●
NAT2*12B	●			■	●		●		●			■		●
NAT2*12C	●		●		●			■	●			■		●
NAT2*13	●			■	●		●		●		●		●	
NAT2*14A		■	●		●		●		●		●		●	
NAT2*14B		■		■	●		●		●		●		●	

