

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/00932 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, G01N 33/50, C12N 15/11, A61K 31/70
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB01/01501
- (22) Internationales Anmeldedatum:
29. Juni 2001 (29.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 32 529.7 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EPIGENOMICS AG** [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OLEK, Alexander** [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE). **PIEPENBROCK, Christian** [DE/DE]; Schwartzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE). **BERLIN, Kurt** [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
- (74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DIAGNOSIS OF KNOWN GENETIC PARAMETERS WITHIN THE MHC

(54) Bezeichnung: DIAGNOSE VON BEDEUTENDEN GENETISCHEN PARAMETERN INNERHALB DES MHC

(57) Abstract: The invention relates to nuclear acids to diagnose a set of genetic parameters in the Major Histocompatibility Complex (MHC), comprising a reversibly complimentary or identical piece of at least 20 base pairs of a chemically pre-treated genomic DNA, in addition to a set of oligomer probes (oligonucleotides and/or PNO oligomers) which are used to detect cytosine methylation substances in nucleic acids. Said probes are especially suitable for the diagnosis of genetic parameters within the MHC.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt Nukleinsäuren zur Diagnose von einem Satz genetischer Parameter innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC), umfassend einen mindestens 20 Basenpaare langen revers komplementären oder identischen Abschnitt einer chemisch vorbehandelten genomischen DNA sowie einen Satz Oligomersonden (Oligonucleotide und/oder PNA-Oligomere), die zur Detektion des Cytosin-Metylierungszustandes in Nukleinsäuren dienen. Diese Sonden sind für die Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC besonders geeignet.



WO 02/00932 A2

Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, Oligo-
nukleotide, PNA-Oligomere und ein Verfahren zur Diagnose
von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des Ma-
jor Histocompatibility Complex (MHC).
- 10 Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre
in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebe-
nen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in
RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe
der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschal-
15 tet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Ge-
ne in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist
mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw.
des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene
Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzel-
20 ner Gene oder des Genoms.

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) beschreibt ei-
ne Gruppe von Genen mit immunologischen und nicht-
immunologischen Funktionen und wird bei allen Vertebraten
25 gefunden ("Both man & bird & beast": comparative organi-
zation of MHC genes. 1995, Trowsdale J, Immunogenetics;
41: 1-17; Evolving views of the major histocompatibility
complex. 1997, Gruen JR and Weissman SM, Blood; 90: 4252-
4265). Beim Menschen erstreckt er sich über einen Bereich
30 von 3,6 Millionen Basenpaaren auf dem kurzen Arm von
Chromosom 6 (6p21.3) und ist wesentlich an der Immunant-
wort beteiligt. Er ist komplett sequenziert, hoch poly-
morph und weist die höchste Gendichte im ganzen menschli-
chen Genom auf. So werden von den insgesamt auf Chromosom
35 6 geschätzten 3500 Genen 224 identifizierte Genloci dem
MHC zugerechnet, was bedeutet, dass 3 mal so viele Gene

in der Region des MHC lokalisiert sind wie aufgrund seiner Größe zu erwarten wäre. Der MHC wird unterteilt in die drei Regionen: Klasse 1, 2 und 3. Alle Gene der Klasse 1 sind zwischen 3 und 6 kb groß. Sie sind auf jeder Zelle vorhanden und werden als Transplantationsantigene bezeichnet, d.h. sie sind verantwortlich für die Abstoßung von fremdem Gewebe. Die Gene der Klasse 2 sind zwischen 4 und 11 kb groß. Die Genprodukte sind an der Wechselwirkung zwischen Zellen, die für die Immunantwort benötigt werden, beteiligt. Die Klasse 3 weist die höchste Gendichte auf. Hier sind sowohl Gene lokalisiert, die nicht im Immunsystem involviert sind als auch die Komplementfaktoren, die als Komponenten des Serums mit Antikörper-Antigen Komplexen interagieren.

15

Die primäre immunologische Funktion der MHC Moleküle besteht darin, antigene Peptide auf den Oberflächen von Zellen zu binden; dies dient zur Erkennung von Antigen spezifischen T-Zell Rezeptoren von Lymphocyten. Die Bedeutung der T-Zellen steht in engem Zusammenhang mit intrazellulären Infekten und Tumoren. Da MHC Moleküle eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen, haben sie wahrscheinlich auch einen entscheidenden Anteil an der Kontrolle und Suszeptibilität von Erkrankungen. Es wird angenommen, dass der MHC mit genetischen Erkrankungen wie rheumatischer Arthritis (The association of HLA-DM genes with rheumatoid arthritis in Eastern France. 2000, Toussirot E et al., Hum Immunol; 61(3):303-308), Diabetes (In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. 2000, Wen L et al., J Exp Med; 191(1):97-104), speziell Typ I Diabetes (The aetiology of Type I diabetes. 1999, Chowdhury TA, Mijovic CH, Barnett AH, Baillieres Clin Endocrinol Metab.; 13(2): 181-195), und Insulin abhängige Diabetes mellitus (IDDM) (Identification of a new susceptibility locus for insu-

35

lin-dependent diabetes mellitus by ancestral haplotype
congenic mapping. 1995, Ikegami H, Makino S, Yamoto E,
Kawaguchi Y, Ueda H, Sakamoto T, Takekawa K, Ogihara T, J
Clin Invest.; 96(4):1936-1942), hereditärer Hämochroma-
5 tose (Haemochromatosis in the new millennium. 2000, Pow-
ell LW et al., J Hepatol;32(1 Suppl):48-62), speziell die
genetische Hämochromatose (GH) (HFE codon 63/282
(H63D/C282Y) dimorphism in German patients with genetic
hemochromatosis. 1998, Gottschalk R, Seidl C, Loffler T,
10 Seifried E, Hoelzer D, Kaltwasser JP, Tissue Anti-
gens;51(3):270-275) und die milde Form der Hämochromatose
(HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands:
evidence for S65C implication in mild form of hemochroma-
tosis. 1999, Mura C, Ragueneas O, Ferec C, Blood;
15 93(8):2502-2505), Schizophrenie (Schizophrenia, rheuma-
toid arthritis and natural resistance genes. 1997, Rubin-
stein G, Schizophr Res; 25(3):177-181), HIV (The human
immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein inter-
feres with an early step in the biosynthesis of major
20 histocompatibility complex (MHC) class I molecules. 1997,
Kerkau T et al., Exp Med; 185(7):1295-1305), Myositis
(Mapping of a candidate region for susceptibility to in-
clusion body myositis in the human major histocompatibil-
ity complex. 1999, Kok CC et al. Immunogenetics;
25 49(6):508-516), Psoriasis (Localization of Psoriasis-
Susceptibility Locus PSORS1 to a 60-kb Interval Telomeric
to HLA-C. 2000; Nair RP et al., Am J Hum Genet Jun;
66(6):1833-1844), Systemischem Lupus Erythematodes (The
genetics of systemic lupus erythematodes. 1999, Lindqvist
30 AK, Alarcon-Riquelme ME; Scand J Immunol; 50(6):562-571),
IgA Nephropathie (Evidence for genetic factors in the de-
velopment and progression of IgA nephropathy. 2000, Hsu
SI et al., Kidney Int; 57(5):1818-1835.Review), Blu-
thochdruck (Possible influence of genes located on chro-
35 mosome 6 within or near to the major histocompatibility
complex on development of essential hypertension. 2000,

Vidan-Jeras B et al., *Pflugers Arch*; 439(3 Suppl):R60-62), Behcets Krankheit (The critical region for Behcet disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46-kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsatellite mapping. 1999, Ota M et al., *Am J Hum Genet*; 64(5):1406-1410), Gee-Heubner-Herter-Thaysen-Krankheit (CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. 1998, Djilali-Saiah I et al., *Gut*; 43(2):187-189), Myasthenia gravis, Spondylarthropathia (Genes in the spondyloarthropathies. 1998, Wordsworth P., *Rheum Dis Clin North Am*; 24(4):845-863. Review), Tuberkulose (Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. 1998, Ulrichs T et al., *Eur J Immunol*; 28(12):3949-3958), hypertrophe Kardiomyopathie (Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy. 1997, Kimura A., *Nat. Genet.* 16(4):379-382), Basedow-Krankheit (Iodide, cytokines and TSH-receptor expression in Graves' disease. 1996, Schuppert et al., *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 104(Suppl 4):68-74), juvenile rheumatische Arthritis (HLA and T cell receptor polymorphisms in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. 1991, Nepom BS, *Arthritis Rheum.* 34(10):1260-1267), Epilepsie, idiopathische generalisierte Epilepsie (The phenotypic spectrum related to the human epilepsy susceptibility gene EJM1. 1995, Sander T, *Ann Neurol*;38(2):210-217), juvenile myoklonische Epilepsie (Refined mapping of the epilepsy susceptibility locus EJM1 on chromosome 6. 1997, Sander T, *Neurology.* 49(3):842-847), Takayasu-Krankheit, multiple immunopathologische Krankheiten (The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1,B8,DR3) with multiple immunopathological diseases. 1999, Price P, *Immunol Rev.* 167: 257-274), Kopf- und Halskrebs (Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head

and neck cancer. 1998; susceptibility to leprosy in humans. 1996; Lagrange PH et al., *Acta Leprol*;10(1):11-27), Malaria (Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases: from the MHC to the whole genome. 1996; Hill AV, *Parasitology*;112 Suppl: 75-84, Genetic epidemiology in the study of susceptibility/resistance to malaria in the human population. 1999; Abel L, *Bull Soc Pathol Exot*;92(4):256-60), Leishmania (Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. 1998; Blackwell JM, *Int J Parasitol*;28(1):21-28), Sarkoidose (Analysis of MHC encoded antigen-processing genes TAP1 and TAP2 polymorphisms in sarcoidosis. 1999; Foley PJ et al., *Am J Respir Crit Care Med*;160(3):1009-1014), Multiple Sklerose (DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. 1998; Marrosu MG et. al., *Hum Mol Genet*; 7(8):1235-1237), primäre Gallenzirrhose (Genetic susceptibility to primary biliary cirrhosis. 1999; Agarwal K et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol. Jun*;11(6):603-606), Nephritis (Genetic susceptibility to lupus nephritis. 1998; Tsao BP, *Lupus*; 7(9):585-590) und vielen anderen Erkrankungen in Zusammenhang steht.

25

Es gibt Untersuchungen, die belegen, dass die Expression von MHC Genen an die Methylierung von CpG Dinukleotiden gekoppelt ist, was die Transkription negativ beeinflussen kann. Entweder direkt, indem sich die Transkriptionsfaktoren nicht an die DNA anlagern können oder indirekt, durch Repressormoleküle, die an methylierte CpGs binden (How does DNA methylation repress transcription?, 1997; Kass SU et al., *Trends Genet*; 11:444-449).

35

Verschiedene Ergebnisse belegen den Zusammenhang zwischen immunologischen Erkrankungen und Methylierung. Die Bezie-

5 hung zwischen der Expression von HLA-DR Antigenen und der Methylierung des Gens HLA-DR alpha wurde bei systemischem Lupus erythematoses, einer generalisierten Autoimmunerkrankung, untersucht (Low expression of human histocompatibility leukocyte antigen-DR is associated with hypermethylation of human histocompatibility leukocyte antigen-DR alpha gene regions in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. 1985; Sano H et al., J Clin Invest, 76(4):1314-1322). Die Beteiligung der DNA Methylierung an der aberranten MHC class II Genexpression wurde bei Patienten mit MHC class II Defizienz Syndrome untersucht (The MHC class II deficiency syndrome: heterogeneity at the level of the response to 5-azadeoxycytidine. 1990; Lambert M et al., Res Immunol. 141(2):129-140). Ein Beweis für die Regulierung von MHC Genen wurde anhand eines epigenetischen Mechanismus erbracht (Methylation of class II trans-activator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. 2000, Morris AC et. al., J Immunol; 164(8):4143-4149). Die Expression von MHC-Genen wird inhibiert, wenn Transkriptionsfaktoren nicht an den class 2 trans activator (CIITA) Promotor binden. Die Inhibierung basiert hier auf der Methylierung der CpG Dinukleotide in dem pIV Promotor, dagegen führt die Inhibierung der Methylierung zu einer Re-Expression der CIITA Gene. Außerdem konnte die Expression in einem transienten Transfektionsversuch nicht durch methylierte pIV DNA stimuliert werden. Diese Ergebnisse belegen eine epigenetische Regulierung von CIITA und lassen weiterhin den Schluß zu, dass diese epigenetische Kontrolle prinzipiell für Gene der MHC Klasse II gilt.

35 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil

genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlererweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann

auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

- 5 Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 2255.
- 10 Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnik, M. et al., *Eur. J. Hum. Gen.* 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., *Nat. Genet.* 1997, 17, 15 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. 20 W., *Nucl. Acids. Res.* 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen 25 Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), *Bioassays* 16, 431; Zeschnik, M. et al. 30 (1997), *Human Molecular Genetics* 6, 387; Teil, R. et al. (1994), *Nucl. Acids Res.* 22, 695; Martin, V. et al. (1995), *Gene* 157, 261; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

35 Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungs-

fähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analyt wird in
5 eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt
10 die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

15 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995)), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für
20 Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch
25 die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es
30 zwar mittlererweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich
35

durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die
5 Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den
10 Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie
15 Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere zur Detektion von Cytosin-
20 Methylierungen und ein Verfahren bereitzustellen, welches sich zur Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des MHC besonders eignet.

Die Aufgabe wird gelöst durch Nukleinsäuren zur Diagnose
25 von einem Satz genetischer Parameter innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC), umfassend einen mindestens 20 Basenpaare langen revers komplementären oder identischen Abschnitt der chemisch vorbehandelten genomischen DNA gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2.

30 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Oligonukleotide zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in vorbehandelter genomischer DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von
35 mindestens 13 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ

ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält.

5 Dabei ist bevorzugt, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 5. - 9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13 mers ist.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonukleotid vorhanden ist.
10

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomere zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens eine PNA Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält.
15

20 Erfindungsgemäß bevorzugt ist hierbei, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 4. - 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9 mers ist.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass für jedes der CpG Dinukleotide aus einer Basensequenz gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonukleotid vorhanden ist.
25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 10 der erfindungsgemäßen Oligonukleotid oder PNA Sequenzen.
30

35 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Anordnung von unterschiedlichen erfindungsgemäßen Oligo-

nukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen, wobei diese an definierte Stellen einer Festphase gebunden sind. Bevorzugt ist dabei, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einem 18 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 entsprechen oder revers komplementär zu ihnen sind. Bevorzugt ist erfindungsgemäß dabei, dass diese kein CpG Dinukleotid enthalten. Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.

Ein weiterer besonders bevorzugten Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere zur Diagnose von Autoimmunerkrankungen, zur Diagnose von rheumatischer Arthritis, zur Diagnose von Diabetes, besonders bevorzugt zur Diagnose der Diabetes vom Typ I Diabetes oder von Insulin abhängiger Diabetes mellitus (IDDM), zur Diagnose von hereditärer Hämochromatose, besonders bevorzugt zur Diagnose von genetischer Hämochromatose (GH) oder der milden Form der Hämochromatose, zur Diagnose von Schizophrenie, zur Diagnose von Multipler Sklerose, zur Diagnose von Systemischem Lupus Erythematoses, zur Diagnose von Sarkoidose, zur Diagnose von primärer Gallenzyrrose, zur Diagnose von Myositis, zur Diagnose von Psoriasis, zur Diagnose von Nephritis, zur Diagnose von Krebs, insbesondere von Hals- oder Kopfkrebs, zur Diagnose von IgA Nephropathie, zur Diagnose von Bluthochdruck, zur Diagnose von Behcets Krankheit, zur Diagnose von der Gee-Heubner-Herter-Thaysen-Krankheit (Zöliakie), zur Diagnose von Myasthenia gravis, zur Diagnose von Spondylarthro-

pathia, zur Diagnose von Tuberkulose, zur Diagnose von hypertropher Kardiomyopathie, zur Diagnose von der Basedow-Krankheit, zur Diagnose von juveniler rheumatischer Arthritis, zur Diagnose von Epilepsie, bevorzugt der idiopathischen generalisierten Epilepsie oder der juvenilen myoklonischen Epilepsie, zur Diagnose von der Takayasu-Krankheit, zur Diagnose von multiplen immunopathologischen Krankheiten, zur Diagnose für die Suszeptibilität für Lepra, zur Diagnose für die Suszeptibilität für Malaria und/oder zur Diagnose für die Suszeptibilität für Leishmania durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.

Ein weiterer Gegenstand ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 für die Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen in Sätzen von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:

- a) in einer genomischen DNA Probe wandelt man durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymidin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um;
- b) aus dieser chemisch vorbehandelten genomischen DNA amplifiziert man Fragmente unter Verwendung von Sätzen von erfindungsgemäßen Primeroligonukleotiden und einer Polymerase;
- c) man hybridisiert die Amplifikate an einen Satz von erfindungsgemäßen Oligonukleotid oder PNA Sonden;

d) man detektiert und visualisiert die hybridisierten Amplifikate.

5 Bevorzugt ist erfindungsgemäß dabei, dass mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert werden, die 100 - 2000 Basenpaare lang sind. Weiterhin ist bevorzugt, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt. Besonders bevorzugt ist auch, dass die Polymerase eine hitzebeständige DNA-Polymerase ist.
10

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird. Bevorzugt ist auch, dass die an den
15 Amplifikaten angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind. Weiterhin ist besonders erfindungsgemäß bevorzugt, dass man eine erfindungsgemäße Anordnung verwendet und dass die Festphasenoberfläche aus
20 Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

Weiterhin ist bevorzugt, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird. Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch, dass die
25 Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind. Weiterhin ist bevorzugt, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind. Bevorzugt ist auch, dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massen-
30 spektrometer nachgewiesen werden. Besonders bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass die Amplifikate oder Fragmente der Amplifikate im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Hierzu ist es erfindungsgemäß vorteilhaft, dass
35 zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die

erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

5 Erfindungsgemäß ganz besonders bevorzugt ist es, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.

10 Bevorzugt ist das Verfahren, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Biopsien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere,
15 Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.

Bevorzugt ist auch ein Verfahren, zur Diagnose und/oder
20 Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mit Methylierungsmustern innerhalb des MHC in Zusammenhang stehen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Ver-
25 wendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei man bedeutende genetische Parameter innerhalb des MHC diagnostiziert.

Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden
30 Erfindung ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, Sätze von erfindungsgemäßen Primern zur Herstellung der erfindungsgemäßen Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung eines erfindungsgemäßen
35 Verfahrens.

Die vorliegende Erfindung beschreibt also einen Satz von mindestens 10 Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA (SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2) dienen. Mit diesen Sonden ist die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC) möglich. Ferner wird ein Verfahren beschrieben, das für die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des MHC bestimmt ist.

Aus der vorgenannten chemisch vorbehandelten DNA werden mindestens 20 Basenpaare lange Abschnitte aus SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 für die Diagnose benutzt. Als Detektoren für diese Abschnitte werden entweder revers komplementäre bzw. identische Oligonukleotide mit einer Länge von 13 Nukleotiden verwendet oder aber revers komplementäre bzw. identische PNA Oligomere mit einer Länge von 9 Nukleotiden.

Sowohl die Oligonukleotide als auch die PNA-Oligomere enthalten mindestens ein CpG Dinukleotid. Das Cytosin des entsprechenden CpG Dinukleotids ist vom 5'-Ende des Oligonukleotids aus gesehen das 5. - 9. Nukleotid. Das Cytosin des CpG Dinukleotids hingegen ist vom 5'-Ende des PNA Oligomers aus betrachtet das 4. - 6. Nukleotid. Entscheidend ist, dass im jeweiligen Satz von Oligonukleotiden oder PNA Oligomeren für jedes der CpG Dinukleotide ein Oligonukleotid aus SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 vorhanden ist.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang ferner, dass man zur Diagnose von genetischen Parametern innerhalb des MHC nicht einzelne CpG Dinukleotide, sondern die Mehrzahl der in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide analysieren muss. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfah-

rens sind alle in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide zu untersuchen.

5 In einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden.

10 Bevorzugt sind unterschiedliche Amplifikate auf der ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet.

15 Die Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere werden vorzugsweise zur Diagnose von rheumatischer Arthritis, Diabetes, hereditärer Hämochromatose, Schizophrenie, Multipler Sklerose, Systemischem Lupus Erythematoses, Sarkoidose, Zirrhose, Myositis, Psoriasis, Nephritis, Krebs, insbesondere Hals- oder Kopfkrebs, IgA Nephropathie, Bluthochdruck, Behcets Krankheit, Gee-Heubner-Herter-Thaysen-Krankheit, Myasthenia gravis, Spondylarthropathia, Tuberkulose, hypertropher Kardiomyopathie, Basedow-Krankheit, juveniler chronischer Arthritis, Epilepsie, idiopathischer generalisierter Epilepsie oder von juveniler myoklonischer Epilepsie, der Takayasu-Krankheit, multiplen immunopathologischen Krankheiten, 25 für die Suszeptibilität von Lepra, für die Suszeptibilität von Malaria und/oder für die Suszeptibilität von Leishmania durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC verwendet.

30 Auch die im Anhang aufgelisteten Nukleinsäuren gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 werden vorzugsweise verwendet für die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern innerhalb des Major Histocompatibility Complexes (MHC) verwendet.

35

Ferner wird ein Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben beschrieben. Dazu geht man in folgenden Schritten vor:

Im ersten Verfahrensschritt wird eine genomische DNA Probe derart chemisch behandelt, dass an der 5'-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base verwandelt werden.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Bevorzugt wird dazu die oben beschriebene Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse verwendet, die zu einer Umwandlung nicht methylierter Cytosin-Nukleobasen in Uracil führt.

Im zweiten Verfahrensschritt werden aus der chemisch vorbehandelten genomischen DNA Fragmente unter Verwendung von Primeroligonukleotiden amplifiziert.

Bevorzugt werden mehr als 10 unterschiedliche Fragmente amplifiziert, die 100 - 2000 Basenpaare lang sind.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion

(PCR) durch, wobei vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet wird.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

10 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens umfasst der Satz von Primeroligonukleotiden mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils revers komplementär oder identisch zu einem mindestens 18 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 sind. Die Primeroligonukleotide sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass sie kein CpG Dinukleotid
15 enthalten.

20 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

30 Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man die Amplifikate an einen Satz von mind. 10 Oligonukleotid oder PNA-Oligomer Sonden.

35 Die genannten Oligonukleotide umfassen mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von 13 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der

im Anhang aufgeführten Basensequenzen ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des CpG Dinukleotids ist das 5. bis 9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13 mers aus betrachtet. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oligonukleotid vorhanden.

Die genannten PNA-Oligomere umfassen mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von 9 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des CpG Dinukleotids ist das 4. bis 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9 mers aus gesehen. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oligonukleotid vorhanden.

Im vierten Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

Im letzten Verfahrensschritt detektiert man die hybridisierten Amplifikate.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen werden.
5

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
10

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
15

Wiederum bevorzugt ist ein Verfahren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mit bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC in Zusammenhang stehen.
20

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Verwendung eines Verfahrens zur Diagnose bedeutender genetischer Parameter innerhalb des MHC.
25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, einen Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einen 18 Basenpaaren langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 entsprechen oder zu ihnen komplementär sind zur Herstellung der Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung des beschriebenen Verfahrens.
30
35

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment des Gens HLA-A, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

5

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse umgewandelt. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im vorliegenden Fall werden die Cytosine des Gens HLA-A der Länge 3201 untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primern TTTGGTTTTGATTTAGATTTGG und AAATAAACTCTCTAACTACTC ein definiertes Fragment der Länge 874 amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenem Oligonukleotid hybridisiert, beispielsweise TAGGTCGTTTATA, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 487 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primern, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt.

10

15

20

25

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

30

Beispiel 1: Durchführung der Methylierungsanalyse des in dem MHC lokalisierten Gens DAXX

Das folgende Beispiel (Fig 1) bezieht sich auf ein Fragment des Gens DAXX, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

35

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Fall werden Cytosine des Gens DAXX untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden TTAGGTTTTGGTTTGTGATGAG und CCCTAACTCCTCTAAACCTCA ein definiertes Fragment der Länge 880 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise TAAAGAGGCGGATTAGTT, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 142 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden

Cytosins über das Hybridisierungsprodukt. Im vorliegenden Fall wird für das Oligomer ein nicht methylierter Status nachgewiesen.

5

Beispiel 2: Durchführung der Methylierungsanalyse des in dem MHC lokalisierten Gens RXRB

Das folgende Beispiel (Fig 2) bezieht sich auf ein Fragment des Gens RXRB, in dem eine bestimmte CG-Position auf
10 Methylierung untersucht wird.

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit
15 verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-
20 Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten
25 Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Fall werden Cytosine des Gens RXRB untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden ATATTGGTAAAGGTATTAGGG und ACTTAACTCAACTCTATACCTAC ein definiertes Fragment der
30 Länge 385 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes
35

Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise AGGTGGAACGGAATTTT, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 33 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt. Im vorliegenden Fall wird für das Oligomer in Abbildung A ein nicht methylierter Status und in Abbildung B ein teilweise methylierter Status nachgewiesen.

Beispiel 3: Durchführung der Methylierungsanalyse des in dem MHC lokalisierten Gens BAT5

Das folgende Beispiel (Fig 2) bezieht sich auf ein Fragment des Gens BAT5, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu,

methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA durchgeführt. Im dritten

5 Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Fall werden Cytosine des Gens BAT5 untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden AGAAGAGAATGTGGGTAGGA und

10 AAAACCTACTTATCAAACCAAT ein definiertes Fragment der Länge 539 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an vorher an einer Festphase gebundene Oligonukleotide unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise i) TGAGAAAGCGGTAAAGAG oder ii)

15 ATTTAAGGCGAGGGTAAA, wobei sich das nachzuweisende Cytosin für das Oligomer TGAGAAAGCGGTAAAGAG an Position 211 oder für das Oligomer ATTTAAGGCGAGGGTAAA an Position 431 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation

20 verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet

25 der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt. Im vorliegenden Fall werden für beide Oligomere in Abbildung A jeweils ein teilweise methylierter Status und in Abbildung B jeweils ein nicht methylierter Status nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuren zur Diagnose von einem Satz genetischer
5 Parameter innerhalb des Major Histocompatibility
Complexes (MHC), umfassend einen mindestens 20 Basen-
paare langen revers komplementären oder identischen
Abschnitt der chemisch vorbehandelten genomischen DNA
gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2.
10
2. Oligonukleotide zur Detektion des Cytosin-
Methylierungszustandes in vorbehandelter genomischer
DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz
mit einer Länge von mindestens 13 Nukleotiden, die
15 revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt
der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2
ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält.
3. Oligonukleotid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeich-
20 net, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 5. -
9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13 mers ist.
4. Satz von Oligonukleotiden nach Anspruch 2, dadurch
gekennzeichnet, dass für jedes der CpG Dinukleotide
25 aus einer der SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligo-
nukleotid vorhanden ist.
5. PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomere zur Detektion
des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbe-
30 handelter genomischer DNA, umfassend mindestens eine
PNA Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9
Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch
zu einem Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-
NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ist, der mindestens ein CpG Di-
35 nukleotid enthält.

6. PNA Oligomer nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 4. - 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9 mers ist.
- 5 7. Satz von PNA Oligomeren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass für jedes der CpG Dinukleotide aus einer Basensequenz gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 ein Oligonukleotid vorhanden ist.
- 10 8. Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 10 der Oligonukleotid oder PNA Sequenzen der Ansprüche 2 bis 7.
- 15 9. Anordnung von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass diese an definierte Stellen einer Festphase gebunden sind.
- 20 10. Anordnung von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 25 11. Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einem 18 Basenpaare langen Abschnitt der Basensequenzen gemäß SEQ ID-NO:1 oder SEQ ID-NO:2 entsprechen oder revers komplementär zu ihnen sind.
- 30 12. Satz von Primeroligonukleotiden nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass diese kein CpG Dinukleotid enthalten.
- 35

13. Satz von Primeroligonukleotiden nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 5 14. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Autoimmunerkrankungen durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10 15. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von rheumatischer Arthritis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15 16. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Diabetes durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20 17. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Diabetes um Typ I Diabetes oder um Insulin abhängige Diabetes mellitus (IDDM) handelt.
- 25 18. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von hereditärer Hämochromatose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30 19. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der hereditären Hämochromatose um genetische Hämochromatose (GH) oder die milde Form
- 35 der Hämochromatose handelt.

20. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Schizophrenie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 5
21. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Multipler Sklerose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10
22. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Systemischem Lupus Erythematodes durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15
23. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Sarkoidose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20
24. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von primärer Gallenzirrhose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25
25. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Myositis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30
26. Verwendung der Nucleinsäuren, Oligonucleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Psoriasis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35

27. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Nephritis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 5
28. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Krebs durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10
29. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Krebsarten um Hals- oder Kopfkrebs handelt.
- 15
30. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von IgA Nephropathie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20
31. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Bluthochdruck durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25
32. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Behcets Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30
33. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von der Gee-Heubner-Herter-Thaysen-Krankheit (Zöliakie) durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35

- 5
34. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Myasthenia gravis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 10
35. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Spondylarthropathia durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15
36. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Tuberkulose durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20
37. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von hypertropher Kardiomyopathie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25
38. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von der Basedow-Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30
39. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von juveniler rheumatischer Arthritis durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35
40. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von Epilepsie durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.

- 5 41. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Epilepsie um idiopathische generalisierte Epilepsie oder um juvenile myoklonische Epilepsie handelt.
- 10 42. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von der Takayasu-Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 15 43. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose von multiplen immunopathologischen Krankheiten durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 20 44. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose für die Suszeptibilität für Lepra durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 25 45. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose für die Suszeptibilität für Malaria durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 30 46. Verwendung der Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose für die Suszeptibilität für Leishmania durch Analyse von Methylierungsmustern innerhalb des MHC.
- 35 47. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 für die Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC.

48. Verfahren zur Diagnose von bedeutenden genetischen Parametern innerhalb des MHC durch Analyse von Cytosin-Methylierungen in Sätzen von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:
- 5
- a) in einer genomischen DNA Probe wandelt man durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um;
- 10
- b) aus dieser chemisch vorbehandelten genomischen DNA amplifiziert man Fragmente unter Verwendung von Sätzen von Primeroligonukleotiden gemäss Anspruch 11 oder 12 und einer Polymerase;
- 15
- c) man hybridisiert die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotid oder PNA Sonden der Ansprüche 2 bis 8;
- 20
- d) man detektiert und visualisiert die hybridisierten Amplifikate.
- 25
49. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert werden, die 100 - 2000 Basenpaare lang sind.
- 30
50. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt.
- 35
51. Verfahren nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase eine hitzebeständige DNA-Polymerase ist.

52. Verfahren nach einem der Ansprüche 48 bis 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.
- 5
53. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 52, dadurch gekennzeichnet, dass die an den Amplifikaten angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.
- 10
54. Verfahren nach Anspruche 53, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Anornung gemäß Anspruch 9 oder 10 verwendet und dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
- 15
55. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 48 bis 54, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.
- 20
56. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 25
57. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.
- 30
58. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 35

59. Verfahren nach einem der Ansprüche 48, 49 oder 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate oder Fragmente der Amplifikate im Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 5
60. Verfahren nach Anspruch 58 oder 59, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 10
61. Verfahren nach einem der Ansprüche 58 bis 60, dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
- 15
62. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche 48 bis 61, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Biopsien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.
- 20
63. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche 48 bis 62 zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mit Methylierungsmustern innerhalb des MHC in Zusammenhang stehen.
- 25
- 30
64. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 48 bis 63, dadurch gekennzeichnet, dass man bedeuten-
- 35

de genetische Parameter innerhalb des MHC diagnostiziert.

- 5 65. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, Sätze von Primern gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Herstellung der Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere gemäß einem der Ansprüche 2 bis 8 sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung eines
10 Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 48 bis 63.

Fig 1

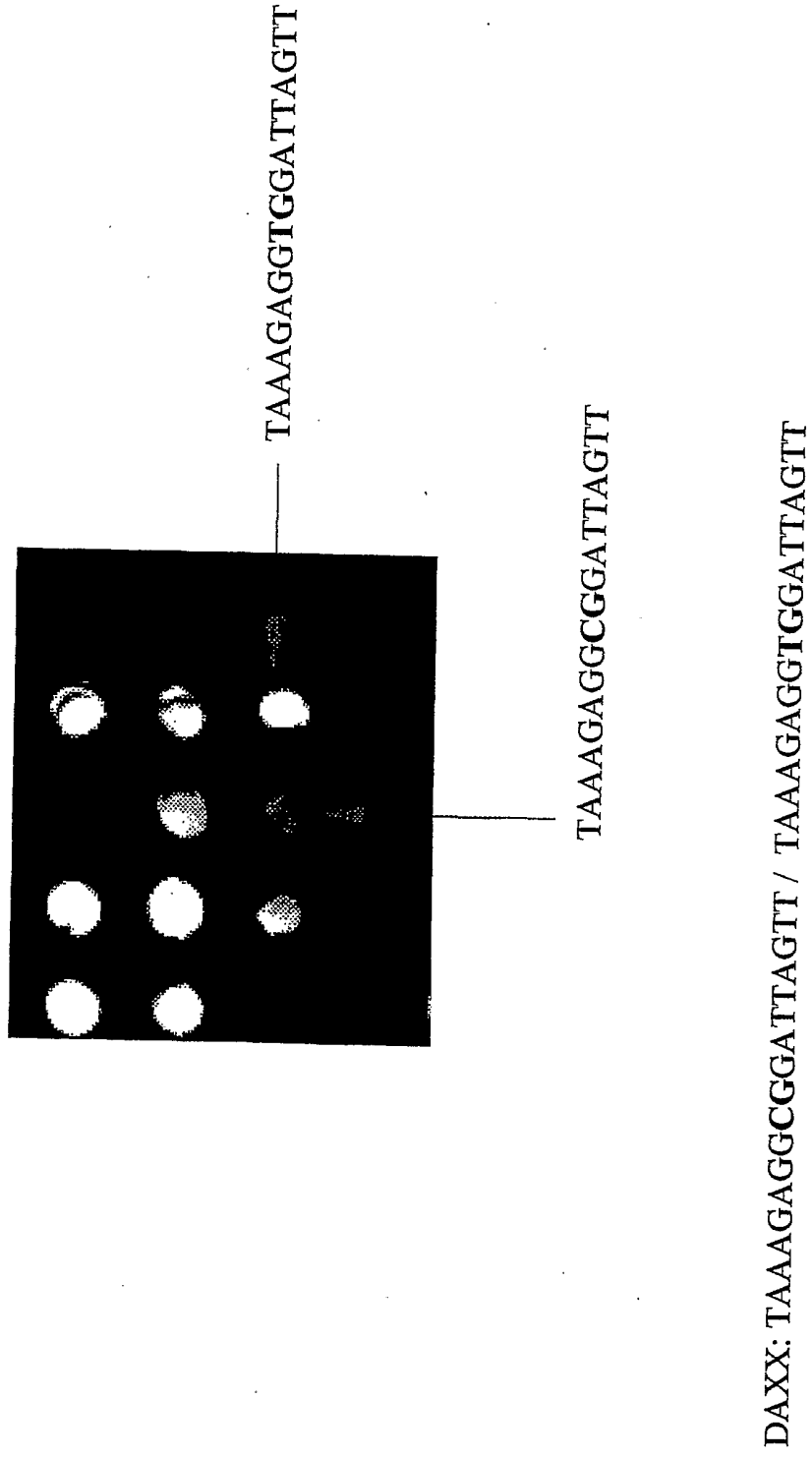
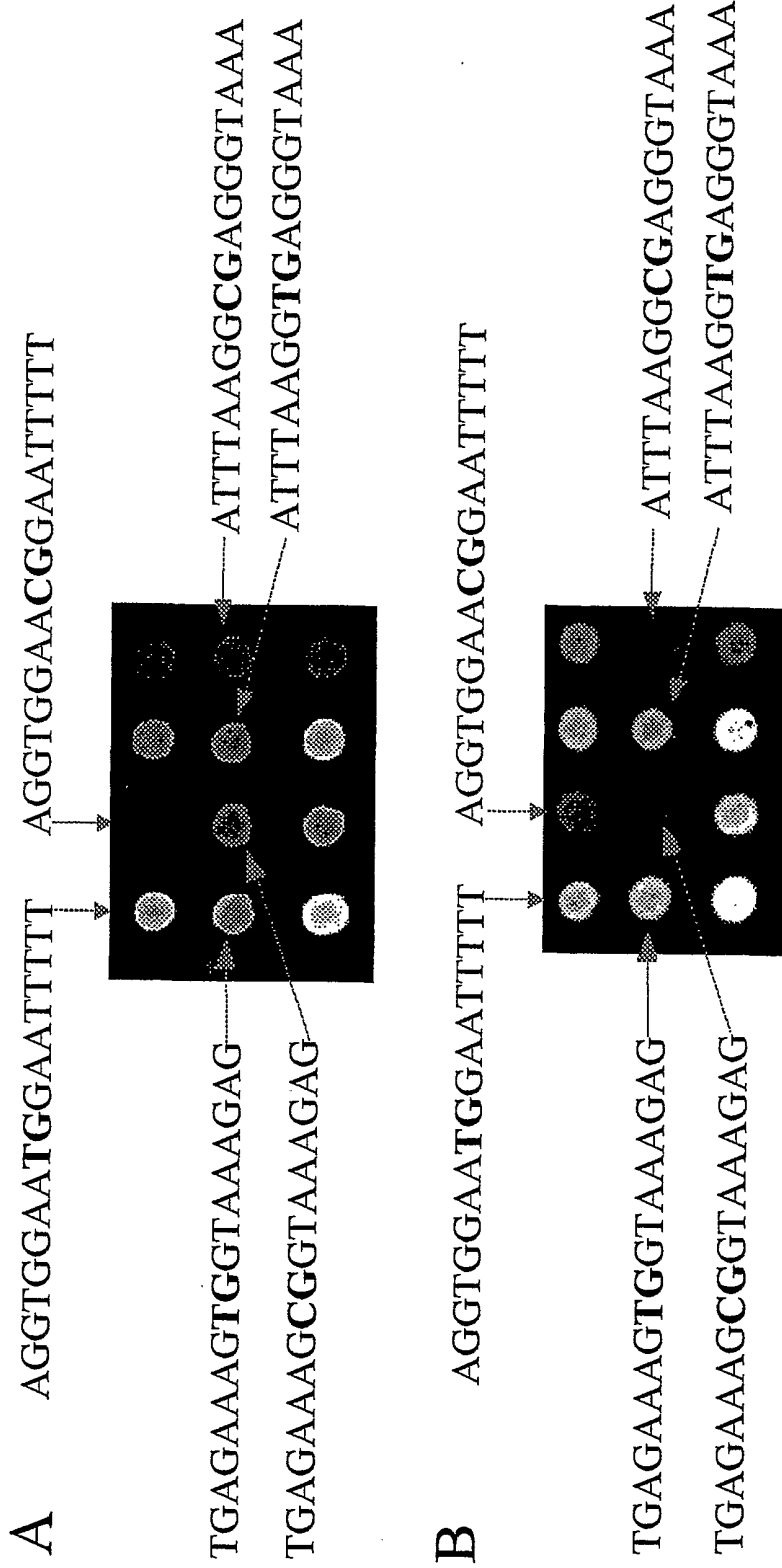


Fig 2



RXRB : AGGTGGAAACGGGAATTTT / AGGTGGAAATGGGAATTTT
 BAT5 (i) : TGAGAAAGCGGTAAAGAG / TGAGAAAGTGGTAAAGAG
 BAT5 (ii) : ATTTAAGGCCGAGGGTAAA / ATTTAAGGTGAGGGTAAA