

(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
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/98527 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02273
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. Juni 2001 (19.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 29 914.8 19. Juni 2000 (19.06.2000) 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): **BERLIN, Kurt**
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
GUT, Ivo, Glynne [DE/FR]; 18 Rue du Moulin Vert,
F-75014 Paris (FR).
- (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, CR, CU,
CZ, 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
 - mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Inter-
nationalen Büro erhältlich
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE HIGH-PARALLEL ANALYSIS OF POLYMORPHISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HOCHPARALLELEN ANALYSE VON POLYMORPHISMEN

(57) **Abstract:** Disclosed is a method for the high-parallel characterisation of polymorphisms, especially SNPs. Said method can also be used for the simultaneous or separate detection of DNA methylation. First, a set of probes provided with at least one characteristic detectable identifying mark for a respective probe is connected to an addressed surface. A nucleic acid to be examined is then hybridised to these probes and the probes are extended in an allele-specific enzymatic reaction. The type and the occurrence of said allele-specific reaction determine whether the respective probe is enzymatically decomposed. Finally, the remaining allele-specific products are analysed and the existing alleles in the extracted nucleic acid samples are determined.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen, insbesondere SNPs, das auch für die gleichzeitige oder separate Detektion von DNA-Methylierung eingesetzt werden kann. Zuerst bindet man einen Satz von Sonden, der mit mindestens einer für die jeweilige Sonde charakteristischen nachweisbaren Markierung versehen ist, an eine adressierte Oberfläche. Anschliessend hybridisiert man eine zu untersuchende Nukleinsäure an diese Sonden und verlängert die Sonden in einer allelspezifischen enzymatischen Reaktion. Die Art und das Stattfinden der allelspezifischen Reaktion entscheiden darüber, ob im folgenden Schritt die jeweilige Sonde enzymatisch abgebaut wird. Zuletzt analysiert man die verbleibenden allelspezifischen Produkte und führt eine Bestimmung der vorhandenen Allele in der abgefragten Nukleinsäureprobe durch.

WO 01/98527 A2

Verfahren zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen

5 Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen, insbesondere SNPs. Gleichzeitig oder in einem separaten Experiment kann das Verfahren zur Analyse von DNA-Methylierung eingesetzt werden.

10 Das Humangenomprojekt, die Erstsequenzierung des menschlichen Genoms, wird in den nächsten Jahren abgeschlossen sein. Durch dieses Projekt wird es möglich werden, alle etwa 100.000 Gene zu identifizieren. Die Sequenzinformation öffnet ungeahnte Möglichkeiten für die Aufklärung

15 der Genfunktionen. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zu betreiben. Die Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zielt auf den Einsatz von Medikamenten in Abhängigkeit eines Genotypen.

20 Dadurch soll die Effektivität von Medikamenten gesteigert werden. Der notwendige Zwischenschritt ist die Bestimmung der Polymorphismen und Genotypen, die mit einem bestimmten Ansprechen assoziiert sind. Verlangt werden deshalb immer effizientere Genotypisierungsmethoden.

25 Derzeit gibt es zwei Kategorien von polymorphen Markern, die zur Genotypisierung eingesetzt werden, Mikrosatelliten und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Mikrosatelliten sind hoch polymorph, d.h. sie haben eine Viel-

30 zahl von Allelen. Sie sind dadurch charakterisiert, dass ein repetitives Sequenzelement, mit einer unterschiedlichen Anzahl Wiederholungen für unterschiedliche Allele, von konservierten Sequenzen flankiert ist. Durchschnittlich gibt es einen Mikrosatellitenmarker pro 1 Million

35 Basen. Eine Karte von 5.000 positionierten Mikrosatellitenmarkern wurde von CEPH publiziert (Dil, C. et al. Na-

ture, March 14, 1994). Mikrosatelliten werden durch die Grössenbestimmung von Produkten einer PCR mit Primern der konservierten, flankierenden Sequenz genotypisiert. Die fluoreszent markierten PCR Produkte werden auf Gelen auf-
5 getrennt.

Es gibt vergleichsweise wenige beschriebene SNP Marker. Eine Karte mit 300.000 SNP Markern wird derzeit vom SNP Konsortium entwickelt und wird öffentlich zugänglich sein.
10 Es gibt eine Handvoll Genotypisierungsmethoden für SNPs. Einige basieren auf der Auftrennung von Produkten auf Gelen, wie der oligonucleotide ligase assay (OLA). Er eignet sich daher eher für den mittleren Durchsatz. Andere vertrauen auf reine Hybridisierung, die jedoch nicht die
15 gleiche Stringenz hat. DNA Arrays (DNA chips) eignen sich für die Analyse einer grossen Anzahl SNPs in einer beschränkten Anzahl von Individuen. Bis jetzt sind Beispiele gezeigt worden, in denen 1.500 SNPs auf einem DNA Chip genotypisiert wurden. Die wirkliche Stärke von DNA Chips
20 liegt in Ansätzen, wie der Resequenzierung und der Expressionsanalyse. Ansätze, welche Primerverlängerung anwenden sind gezeigt worden. Diese haben den Vorteil, dass wenn mit fluoreszenzmarkierten Terminatorbasen gearbeitet wird, die Resultate mit einem einfachen ELISA Lesegerät
25 gesammelt werden können.

Es gibt einige SNP Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometrie zur Analyse verwenden. Diese haben den wesentlichen Vorteil, dass die allelspezifischen Produkte
30 eine physische Darstellung der Produkte sind und kein fluoreszierendes Signal, dass indirekt dem Produkt zugeordnet werden muss.

Eine Methode, die kürzlich vorgestellt wurde, ist der Invader Assay und als Variante davon der Invader Squared
35 (T. Griffin and L.M. Smith Proceedings of the ASMS 1998).

Für diese Methode werden mindestens zwei Oligonukleotide verwendet, die einen bekannten SNP abdecken. Ein Oligonukleotid deckt die Sequenz von der 5'-Seite bis unmittelbar zum SNP hin ab, so dass sich der SNP an das 3'-
5 Ende dieses Oligonukleotids anschliesst. Meistens werden zwei weitere Oligonukleotide, von denen jeder ein Allel des Polymorphismus abdeckt und einen unterschiedliche 5'-Überhang hat, an das System hybridisiert. Eine strukturaktive Endonuklease entfernt vom vollständig komplementären Oligonukleotid den 5'-Überhang. Der abgekappte Überhang wird mittels Massenspektrometrie analysiert und zur Identifikation des Allels verwendet. Ein Nachteil der gezeigten Methode ist, dass die Produkte vor der massenspektrometrischen Analyse gründlich gereinigt werden
10 müssen. Für diese Aufreinigung werden magnetic beads verwendet, die nicht einfach in der Handhabung sind. Dies ist ein wesentlicher Nachteil von vielen Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometrie zur Analyse verwenden.

20

Eine weitere Genotypisierungsmethode ist der Taq Man Assay. In diesem wird allelspezifisch enzymatisch ein Fluoreszenzlöcher von einem fluoreszenzfarbstofftragenden Oligonukleotid getrennt.

25

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI) hat die Analytik von Biomolekülen revolutioniert (Karas, M. & Hillenkamp, F. Anal. Chem. 60, 2299-2301 (1988)). MALDI ist in verschiedenen Varianten zur Analyse von DNA eingesetzt worden.
30 Die Varianten reichen von primer extension bis Sequenzierung (Liu, Y.-H., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 735-743 (1995); Ch'ang, L.-Y., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 772-774 (1995); Little, D.P., et al. J. Mol. Med. 75, 745-750 (1997); Haff, L. & Smirnov, I.P. Genome Res. 7, 378-388 (1997), Fei, Z., Ono, T. & Smith, L.M.

35

Nucleic Acids Res. 26, 2827-2828 (1998); Ross, P., Hall, L., Smirnov, I. & Haff, L. Nature Biotech. 16, 1347-1351 (1998); Ross, P.L., Lee, K. & Belgrader, P. Anal. Chem. 69, 4197-4202 (1997); Griffin, T.J., Tang, W. & Smith, L.M. Nature Biotech. 15, 1368-1372 (1997)). Der grösste Nachteil dieser Methoden ist, dass alle eine gründliche Aufreinigung der Produkte vor der MALDI Analyse bedingen. Spin column Aufreinigung oder der Einsatz von magnetic bead technology oder reversed-phase Aufreinigung sind notwendig.

Die Analyse von DNA im MALDI ist stark abhängig vom Ladungszustand des Produktes. Eine 100-fache Verbesserung der Empfindlichkeit in der MALDI Analyse kann dadurch erzielt werden, dass der Ladungszustand auf dem zu analysierenden Produkt so kontrolliert wird, dass nur eine einzige positive oder negative Überschussladung vorhanden ist. So modifizierte Produkte sind auch wesentlich weniger anfällig für die Ausbildung von Addukten (z.B. mit Na und K, Gut, I.G. and Beck, S. (1995) Nucleic Acids Res., 23, 1367-1373; Gut, I.G., Jeffery, W.A., Pappin, D.J.C. and Beck, S. Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 43-50 (1997)). Ein SNP Genotypisierungsverfahren, welches von diesen Bedingungen Gebrauch macht, mit dem Namen "GOOD Assay" wurde kürzlich vorgestellt (Sauer, S. et al., Nucleic Acids Research, Methods online, 2000, 28, e13). Nachteil ist, dass das gesamte Verfahren einen beschränkten Multiplexierungsgrad zulässt, und die Probenvorbereitung immer den Einsatz modernster und teurer Pipettier-technologie bedingt.

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 inzwischen 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 Thymin 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
- 15 sequenziert (Olek, A. und Walter, J., *Nat. Genet.* 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., *Nucl. Acids. Res.* 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen.
- 20 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; Gonzalgo, 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. (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 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 er-

schienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Ge-
netics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zi-
tierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden
zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie
5 Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hin-
tergrundsignal entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind
vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden.
10 Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das
einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH
der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der
hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein
Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben
15 vielen anderen, kommerziell erhältlich.

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

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren
zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen zur Verfü-
25 gung zu stellen, welches die Nachteile des Standes der
Technik überwindet.

Gegenstand der Erfindung ist Verfahren zur hochparallelen
Charakterisierung von Polymorphismen, bei dem man die
30 folgenden Schritte ausführt:

- a. man bindet einen Satz von Sonden an eine adressierte
Oberfläche,
- b. man hybridisiert eine zu untersuchende Nukleinsäure
an diese Sonden;
- 35 c. man verlängert die Sonden in einer allelspezifischen
Reaktion, die von der Sequenz der als Templat fungieren-

den zu untersuchenden Nukleinsäure abhängt;

d. man behandelt die Sonden mit einer Nuklease, welche die nicht verlängerten Sonden abbaut, nicht aber die verlängerten Sonden;

5 e. man analysiert die verbleibenden allelspezifischen Verlängerungsprodukte.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist dabei, dass die Adresse der Oberfläche in Schritt a) die Position (in einem Oligo-
10 nukleotidarray), eine Farbe, eine Fluoreszenzmarkierung, eine isotopische Markierung, eine chemische Markierung oder eine radioaktive Markierung ist.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die zu untersuchende Nukleinsäure in Schritt b) genomische DNA,
15 mit einer Bisulfitlösung vorbehandelte DNA, klonierte DNA, cDNA, RNA, ein PCR Produkt oder ein Ligationsprodukt ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templats mittels einer Polymerase und modifizierten Nukleotidbausteinen zu spezifischen Produkten
20 entsprechend Schritt c) umsetzt.

Bevorzugt ist ferner, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templats mittels einer Ligase und einem phosphorylierten Oligonukleotid zu spezifischen Verlängerungsprodukten,
25
30 entsprechend Schritt c) umsetzt.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Verlängerungsreaktion oder die Art der Verlängerungsreaktion von einem SNP (Single Nucleotide Polymorphism) in der
35 Proben DNA abhängt.

Besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die zu untersuchende Nukleinsäure eine mit einer Bisulfitlösung (=Hydrogensulfit, Disulfit) vorbehandelte genomische DNA Probe ist und dass die Verlängerungsreaktion oder die Art der Verlängerungsreaktion vom Methylierungsstatus von Cytosin-Basen in der genomischen DNA-Probe abhängt.

Ganz besonders ist ein erfindungsgemäßes Verfahren bevorzugt, bei dem man SNPs und DNA-Methylierung gleichzeitig untersucht.

Bevorzugt ist erfindungsgemäß, dass man in der Verlängerungsreaktion wenigstens ein Nukleotid anfügt, welches von einer 3'-Exonuklease nicht oder nur mit erheblich verminderter Effizienz abspaltbar ist. In einigen Fällen ist besonders bevorzugt, dass dieses Nukleotid ein Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Methylphosphorothioat, ein alkyliertes Phosphorothioat oder -Dithioat oder ein Derivat dieser Verbindungen ist.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man am betreffenden Nukleotidbaustein entweder an der Nukleobase oder an der Desoxyribose einen Substituenten anfügt, welcher den Abbau durch eine 3'-Exonuklease verhindert.

Bevorzugt ist ferner, dass man in Schritt d) eine 3'-Exonuklease verwendet. Dabei ist insbesondere erfindungsgemäß bevorzugt, dass man als 3'-Exonuklease Phosphodiesterase aus *Crotalus durissus* (snake venom phosphodiesterase), *Escherichia coli* polymerase I, II, oder III, T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase (unmodifiziert), Phosphodiesterase II Typ I-SA oder Calf Thymus 54 kDa Polypeptid mit 3'- Exonuclease Aktivität verwendet.

Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch, dass man die Verlängerungsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren

Markierung versteht. Bevorzugt ist ebenso, dass man komplementäre Oligomere an die Verlängerungsprodukte hybridisiert, die für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind. Hierbei ist besonders bevorzugt, dass die komplementären Oligomere Oligonukleotide, RNA-Oligomere oder PNA-Oligomere (Peptide Nucleic Acids) sind. Dabei ist weiterhin ganz besonders bevorzugt, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind und/oder dass die Markierungen Radionuklide sind und/oder dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden und/oder dass man die Verlängerungsprodukte oder die komplementären Oligomere selbst über ihre Masse in einem Massenspektrometer nachweist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist aber auch, dass man die allelspezifischen Verlängerungsprodukte mittels Massenspektrometrie analysiert und/oder dass man Fragmente der allelspezifischen Verlängerungsprodukte mittels Massenspektrometrie analysiert. Besonders bevorzugt ist dabei auch noch, dass man Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) zur Analyse verwendet.

Hierzu ist es erfindungsgemäß vorteilhaft, dass die Sonden oder die komplementären Oligomere in einer Art vorliegen, die sich besonders gut zur massenspektrometrischen Analyse eignen. Bevorzugt ist dabei, dass die besonders gute Eignung zur massenspektrometrischen Analyse dadurch zustande kommt, dass die allelspezifischen Produkte netto einfach positiv oder einfach negativ geladen sind.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass auf einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden sind.

5 Bevorzugt ist erfindungsgemäß auch, dass man bekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA genotypisiert und/oder dass man unbekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA identifiziert und/oder dass man Cytosin-Methylierungen detektiert und visualisiert. Dabei ist be-
10 sonders bevorzugt, dass man bekannte Methylierungsmuster in der zu analysierenden Probe untersucht.

Besonders bevorzugt ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, dass man die genomische DNA aus einer DNA-Probe er-
15 hält, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen
20 Kombinationen hiervon umfassen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Pati-
25 enten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz
30 und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung,
35 Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonva-

leszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische
5 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Weiterhin ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
10

Schließlich ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Kit, enthaltend mindestens ein Primerpaar zur Amplifikation, einen Satz von Sonden und Enzyme und Puffer und eine Anleitung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.
15

Zur Verfügung gestellt wird ein Verfahren zur hochparallelen Genotypisierung von Polymorphismen. Dieses Verfahren übertrifft die Effizienz bestehender Verfahren, in Bezug auf die Einfachkeit der Handhabung, die Kosten, die Qualität und den Durchsatz, bei weitem. Es ist zudem für die gleichzeitige Detektion von Cytosin-Methylierung in
20 Nukleinsäureproben geeignet.
25

Die Erfindung beschreibt somit ein Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen.

30 Im ersten Schritt des Verfahrens wird ein Satz von Sonden an eine adressierte Oberfläche gebunden.

Man setzt als Sonden vorzugsweise Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, peptide nucleic acids (PNAs),
35 Chimäre dieser Verbindungsklassen oder andere Substanzen ein, die sequenzspezifisch mit DNA wechselwirken.

Die jeweilige Sonde ist mit einer charakteristischen nachweisbaren Markierung versehen. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens ist die Adressierung der Oberfläche die Position in einem Oligonukleotidarray, eine Farbe, eine Fluoreszenzmarkierung, eine isotopische Markierung, eine chemische Markierung oder eine radioaktive Markierung.

Im zweiten Verfahrensschritt hybridisiert man die zu untersuchende Nukleinsäure, die vorzugsweise aus genomischer DNA, klonierter DNA, chemisch vorbehandelter DNA, cDNA, RNA, PCR Produkten oder Ligationsprodukten besteht, an die besagten Sonden.

Bevorzugt stammen die zu untersuchenden Nukleinsäuren aus einer DNA-Probe, wobei Quellen für DNA 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 umfassen.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die DNA zuvor mit einer Bisulfitlösung (Disulfit, Hydrogensulfit) behandelt.

Im dritten Verfahrensschritt verlängert man die Sonden in einer allelspezifischen enzymatischen Reaktion, welche von der Sequenz der als Templat fungierenden zu untersuchenden Nukleinsäure abhängt.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templats mittels einer Po-

lymerase und Nukleotidbausteinen zu spezifischen Produkten umgesetzt.

5 In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templats mittels einer Ligase und einem 5'-phosphorylierten Oligonukleotid zu spezifischen Produkten umgesetzt.

10 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden Methylierungsmuster in der zu analysierenden vorbehandelten DNA untersucht, und die Art oder das Stattfinden der Verlängerungsreaktion oder Ligasereaktion hängen von der Ausprägung einer potentiell methylierten Position in der zu untersuchenden Nukleinsäureprobe ab.

15 In diesem Fall ist es erforderlich, die Nukleinsäureprobe mit einer Bisulfitlösung vorzubehandeln, wobei nach alkalischer Hydrolyse die nicht methylierten Cytosinbasen als Uracil, die 5-Methylcytosinbasen jedoch unverändert vorliegen.

20 In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden SNPs in der zu analysierenden vorbehandelten DNA untersucht, und die Art oder das Stattfinden der Verlängerungsreaktion oder Ligasereaktion hängen von der Ausprägung eines SNP (Single Nucleotide Polymorphism) in der zu untersuchenden Nukleinsäureprobe ab.

30 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden Cytosin-Methylierung und SNPs einer Nukleinsäureprobe in einem Experiment untersucht.

35 Auf einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche befinden sich vorzugsweise eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden.

In einer besonders bevorzugten Ausführung des Verfahrens wird in der Verlängerungsreaktion zumindest ein Nukleotid oder eine andere Einheit angefügt, welche von einer 3'-Exonuklease entweder nicht oder nur mit erheblich verminderter Effizienz abgespalten werden kann. Damit wird der
5 Abbau solcher Verlängerungsprodukte verhindert, welche charakteristisch für jeweils eine bestimmte Ausprägung eines SNPs oder einer Methylierungsposition sind.

10 Bevorzugt sind solche Einheiten Methylphosphonate, Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Methylphosphorothioate, alkylierte Phosphorodithioate oder -Thioate, oder aber Derivate dieser Verbindungen sind.

15 Bevorzugt sind solche Einheiten auch Nukleotidbausteine, die entweder an der Nukleobase oder aber an der Desoxyribose Substituenten tragen, welche den Abbau durch eine 3'-Exonuklease verhindern.

20 Bevorzugt ist auch im Falle der Ligasereaktion das Anfügen eines Oligonukleotids, das zumindest eine der oben genannten chemischen Einheiten enthält.

25 Im vierten Verfahrensschritt werden die nicht verlängerten Sonden abgebaut. Bevorzugt werden zuvor die hybridisierten, zu untersuchenden Nukleinsäuren entfernt.

30 Es ist auch möglich, das Verfahren so auszuführen, dass zudem auch bestimmte Verlängerungsprodukte abgebaut werden, die nicht einer bestimmten Ausprägung eines SNPs oder einer Methylierungsposition entsprechen oder diesen nicht zuzuordnen sind.

35 Besonders bevorzugt erfolgt der Abbau durch eine 3'-Exonuklease, wiederum besonders bevorzugt durch Phospho-

diesterase aus *Crotalus durissus* (snake venom phosphodiesterase).

5 Bevorzugt ist auch die Verwendung von *Escherichia coli* polymerase I, II, und III, T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase (unmodifiziert), Phosphodiesterase II Typ I-SA oder Calf Thymus 54 kDa Polypeptid mit 3'- Exonuklease Aktivität.

10 Im fünften Verfahrensschritt analysiert man die verbleibenden allelspezifischen Produkte.

Bevorzugt sind die Verlängerungsprodukte mit einer nachweisbaren Markierung versehen.

15 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden komplementäre Oligomere an die Verlängerungsprodukte hybridisiert. Die komplementären Oligomere sind besonders bevorzugt mit einer nachweisbaren Markierung versehen.

20 Besonders bevorzugt sind die komplementären Oligomere Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, peptide nucleic acids (PNAs), Chimäre dieser Verbindungsklassen oder andere Substanzen, die sequenzspezifisch mit DNA wechselwirken.

30 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die nachweisbaren Markierungen Fluoreszenzmarkierungen.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die nachweisbaren Markierungen Radionuklide.

35 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die nachweisbaren Markierungen ablösbare Massenmar-

kierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

5 In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Verlängerungsprodukte oder die komplementären Oligomere selbst über ihre Masse in einem Massenspektrometer nachgewiesen.

10 In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die allelspezifischen Verlängerungsprodukte mittels Massenspektrometrie analysiert. In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante werden Fragmente der allelspezifischen Verlängerungsprodukte mittels Massenspektrometrie analysiert.

15 Besonders bevorzugt werden Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) zur Analyse verwendet.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführung des Verfahrens liegen die Sonden oder die komplementären Oligomere derart vor, dass sie sich besonders gut zur massenspektrometrischen Analyse eignen. Die besonders gute Eignung zur
25 massenspektrometrischen Analyse kommt bevorzugt dadurch zustande, dass die allelspezifischen Produkte netto einfach positiv oder einfach negativ geladen sind.

30 Bevorzugt befinden sich an einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden.

35 Besonders bevorzugt werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren bekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA genotypisiert.

Bevorzugt werden entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren unbekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA genotypisiert.

- 5 Besonders bevorzugt werden entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren Cytosin-Methylierungen detektiert und visualisiert.

- 10 Besonders bevorzugt werden entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren bekannte Methylierungsmuster in der zu analysierenden Probe untersucht.

Gegenstand der Erfindung ist zudem die Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des 15 gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der 20 Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

- 35 Gegenstand der Erfindung ist zudem die Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens zur Unterscheidung von Zell-

typen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, welcher ein Primerpaar zur Amplifikation, einen Satz von Sonden und Enzyme und Puffer und eine Anleitung zur Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens enthält.

10 Das Verfahren wird abschließend durch eine Abbildung erläutert.

Fig. 1a und 1b veranschaulichen die Verfahrensschritte an einem Beispiel:

- 15 1. Zuerst werden Sonden an die adressierte Oberfläche gebunden.
2. Dann hybridisiert man die zu untersuchende Nukleinsäure an die Sonde.
3. Daraufhin verlängert man die Sonden in einer allelspezifischen Reaktion. Nur an den Positionen, an denen ein T vorliegt, wird mit dem Adeninbaustein eine Einheit, beispielsweise ein Phosphorothioat (in der Figur ein schwarzer Kreis), eingebaut, die den Abbau im folgenden Schritt verhindert.
- 20 4. Die zu untersuchende Nukleinsäure wird entfernt.
5. Nachfolgend werden die Sonden enzymatisch abgebaut, die im dritten Schritt nicht mit einer blockierenden Funktion versehen wurden.
6. Die verbleibenden Verlängerungsprodukte werden analysiert, indem beispielsweise ein komplementäres Oligonukleotid, welches eine Fluoreszenzmarkierung (in der Figur mit * gekennzeichnet) trägt, an die verbleibenden Verlängerungsprodukte hybridisiert wird.

35 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1:

Durchführung der Extension von immobilisierten Primeroligonukleotiden mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden

5 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 25 Cytosine des Gens DAPK1 untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden ATTAATATTATGTAAAGTGA (SEQ-ID:1) und CTTACAACCATTACCCACA (SEQ-ID:2) ein definiertes Fragment der Länge 465 bp amplifiziert. Diese Amplifikat dient als Templat, welches zum Verlängern der immobilisierten Primeroligonukleotide dient. Nach Hybridisierung des Templats gegen die immobilisierten Primeroligonukleotide werden diese in einer Extensionsreaktion unter Verwendung eines Nukleotidgemisches aus Deoxynukleotiden (hier: dCTP, dTTP, dATP) und Cyanine-5 (Cy5) bzw. Cyanine-3 (Cy3) markierten Deoxynukleotiden (hier: 35 Cy5-dCTP, Cy3-dUTP) verlängert. In Figur 3a) werden die

Primeroligonukleotide nach einer Hybridisierung mit einem
Cy5-fluoreszenzmarkierten Amplifikat des Gens DAPK1 und
anschließender Extensionsreaktion mit Cy3- und Cy5-
fluoreszenzmarkierten Nukleotiden bei einer für den Flu-
oreszenzfarbstoff Cy3 spezifischen Wellenlänge von 532nm
5 detektiert. Figur 3b) zeigt die durch die bei der Exten-
sionsreaktion eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleoti-
de nach anschließender Dehybridisierung des Cy5-
fluoreszenzmarkierten Amplifikats bei einer Wellenlänge
10 von 532nm detektierten Signale. Figur 3c) dient als Kon-
trolle; hier können nach Hybridisierung mit dem Cy5-
fluoreszenzmarkierten Amplifikat bei einer Wellenlänge
von 532nm keine Signale detektiert werden.

15 Beispiel 2:

Durchführung der Extension von immobilisierten Primeroli-
gonukleotiden mit 5'-Phosphothioat modifizierten Nukleo-
tiden

20 Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Ver-
wendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart
behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base me-
thylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hin-
sichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Ba-
25 se entsteht, während die in 5-Position methylierten Cyto-
sine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit
verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinba-
sen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes
Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zuge-
30 gen 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 Verfahrens-
schritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser
35 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 DAPK1 untersucht. Dazu wird mit den

5 spezifischen Primeroligonukleotiden ATTAATATTATGTAAAGTGA (SEQ-ID:1) und CTTACAACCATTACCCACA (SEQ-ID:2) ein definiertes Fragment der Länge 465 bp amplifiziert. Diese Amplifikat dient als Templat, welches zum Verlängern der immobilisierten Primeroligonukleotide dient. Nach Hybridisierung des Templats gegen die immobilisierten Primeroligonukleotide werden diese in einer Extensionsreaktion unter Verwendung eines Nukleotidgemisches aus Deoxynukleotiden (hier: dCTP, dTTP, dATP) und 5'-

10 Phosphothioat modifizierten Deoxynukleotiden (hier: α -S-dCTP, α -S-dUTP) verlängert. In Figur 4a) werden die Primeroligonukleotide nach Hybridisierung mit einem Cy5-fluoreszenzmarkierten Amplifikat des Gens DAPK1 und anschließender Extensionsreaktion mit 5'-Phosphothioat modifizierten Nukleotiden bei einer für für den Fluoreszenzfarbstoff Cy5 spezifischen Wellenlänge von 635nm detektiert. Figur 4b) zeigt die durch die bei der Extensionsreaktion eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotide nach anschließender Dehybridisierung des Cy5-

20 fluoreszenzmarkierten Amplifikats bei einer Wellenlänge von 653nm detektierten Signale. In einem anschließenden Schritt werden durch Zugabe des Enzyms Phosphodiesterase 1 (PDE 1), welches DNA vom 3' Terminus ausgehend hydrolysiert, alle Primeroligonukleotide hydrolysiert, die nicht durch den Einbau eines 5'-Phosphothioat modifizierten

25 Nukleotids geschützt sind. In Figur 4c) können bei den Primeroligonukleotiden, die durch den Einbau eines 5'-Phosphothioat modifizierten Nukleotids vor der Hydrolyse des Enzyms PDE 1 geschützt waren, nach Hybridisierung mit dem Cy5-fluoreszenzmarkierten Amplifikat des Gens DAPK1

30 Signale bei einer Wellenlänge von 653nm detektiert werden.

35

Patentansprüche

1. Verfahren zur hochparallelen Charakterisierung von Polymorphismen, dadurch gekennzeichnet, dass man die folgenden Schritte ausführt:
- a. man bindet einen Satz von Sonden an eine adressierte Oberfläche,
- b. man hybridisiert eine zu untersuchende Nukleinsäure an diese Sonden;
- c. man verlängert die Sonden in einer allelspezifischen Reaktion, die von der Sequenz der als Template fungierenden zu untersuchenden Nukleinsäure abhängt;
- d. man behandelt die Sonden mit einer Nuklease, welche die nicht verlängerten Sonden abbaut, nicht aber die verlängerten Sonden;
- e. man analysiert die verbleibenden allelspezifischen Verlängerungsprodukte.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Adresse der Oberfläche in Schritt a) die Position (in einem Oligonukleotidarray), eine Farbe, eine Fluoreszenzmarkierung, eine isotopische Markierung, eine chemische Markierung oder eine radioaktive Markierung ist.
3. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende Nukleinsäure in Schritt b) genomische DNA, mit einer Bisulfitlösung vorbehandelte DNA, klonierte DNA,

cDNA, RNA, ein PCR Produkt oder ein Ligationsprodukt ist.

4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templats mittels einer Polymerase und modifizierten Nukleotidbausteinen zu spezifischen Produkten entsprechend Schritt c) umsetzt.
10
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man die Sonden in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz des daran hybridisierten Templats mittels einer Ligase und einem phosphorylierten Oligonukleotid zu spezifischen Verlängerungsprodukten, entsprechend Schritt c) umsetzt.
15
6. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Verlängerungsreaktion oder die Art der Verlängerungsreaktion von einem
20 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) in der Proben DNA abhängt.
7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchende Nukleinsäure eine mit einer Bisulfitlösung (=Hydrogensulfit, Disulfit) vorbehandelte genomische DNA Probe ist und dass die Verlängerungsreaktion oder die Art der Verlängerungsreaktion vom Methylierungsstatus von Cytosin-Basen in der genomischen DNA-Probe abhängt.
30
8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
35 dadurch gekennzeichnet, dass man SNPs und DNA-Methylierung gleichzeitig untersucht.

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man in der Verlängerungsreaktion wenigstens ein Nukleotid anfügt, welches von einer 3'-Exonuklease nicht oder nur mit
5 erheblich verminderter Effizienz abspaltbar ist.
10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass dieses Nukleotid ein Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Methylphosphorothioat, ein alkyliertes Phosphorothioat oder -
10 Dithioat oder ein Derivat dieser Verbindungen ist.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass man am betreffenden Nukleotidbaustein entweder an der Nukleobase oder an der
15 Desoxyribose einen Substituenten anfügt, welcher den Abbau durch eine 3'-Exonuklease verhindert.
12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man in Schritt d) eine
20 3'-Exonuklease verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man als 3'-Exonuklease Phosphodiesterase aus
25 *Crotalus durissus* (snake venom phosphodiesterase), *Escherichia coli* polymerase I, II, oder III, T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase (unmodifiziert), Phosphodiesterase II Typ I-SA oder Calf Thymus 54 kDa Polypeptid mit 3'- Exonuclease Aktivität verwendet.
30
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verlängerungsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren
35 Markierung versieht.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man komplementäre Oligomere an die Verlängerungsprodukte hybridisiert, die für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versehen sind.
- 5
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die komplementären Oligomere Oligonukleotide, RNA-Oligomere oder PNA-Oligomere (Peptide Nucleic Acids) sind.
- 10
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 15
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 20
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 25
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verlängerungsprodukte oder die komplementären Oligomere selbst über ihre Masse in einem Massenspektrometer nachweist.
- 30
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass man die allelspezifischen Verlängerungsprodukte mittels Massenspektrometrie analysiert.
- 35
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Fragmente der allelspezifischen

schen Verlängerungsprodukte mittels Massenspektrometrie analysiert.

- 5 23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass man Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) zur Analyse verwendet.
- 10 24. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden oder die komplementären Oligomere in einer Art vorliegen, die sich besonders gut zur massenspektrometrischen Analyse eignen.
- 15 25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die besonders gute Eignung zur massenspektrometrischen Analyse dadurch zustande kommt, dass die allelspezifischen Produkte netto einfach positiv oder einfach negativ geladen sind.
- 20 26. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem adressierten Analysepunkt der Oberfläche eine Vielzahl von unterschiedlichen Sonden sind.
- 25 27. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass man bekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA genotypisiert.
- 30 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass man unbekannte Polymorphismen in der zu untersuchenden DNA identifiziert.
- 35 27. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass man Cytosin-Methylierungen detektiert und visualisiert.

28. Verfahren nach Anspruch 27 dadurch gekennzeichnet,
dass man bekannte Methylierungsmuster in der zu ana-
lysierenden Probe untersucht.
- 5
29. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
wobei man die genomische DNA aus einer DNA-Probe er-
hält, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut,
Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit,
10 in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Ge-
webe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata,
Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger
und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
- 15
30. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranste-
henden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose
nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individu-
en, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens
einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte
20 Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-
Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-
symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psycho-
logische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädi-
gungen; psychotische Störungen und Persönlichkeits-
störungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kar-
diovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung;
25 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastroin-
testinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder
Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung,
30 Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehl-
funktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als
Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,
Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des
Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabo-
35 lische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopf-
schmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

- 5 31. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 10 32. Kit, enthaltend mindestens ein Primerpaar zur Amplifikation, einen Satz von Sonden und Enzyme und Puffer und eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 29.

fig. 1a

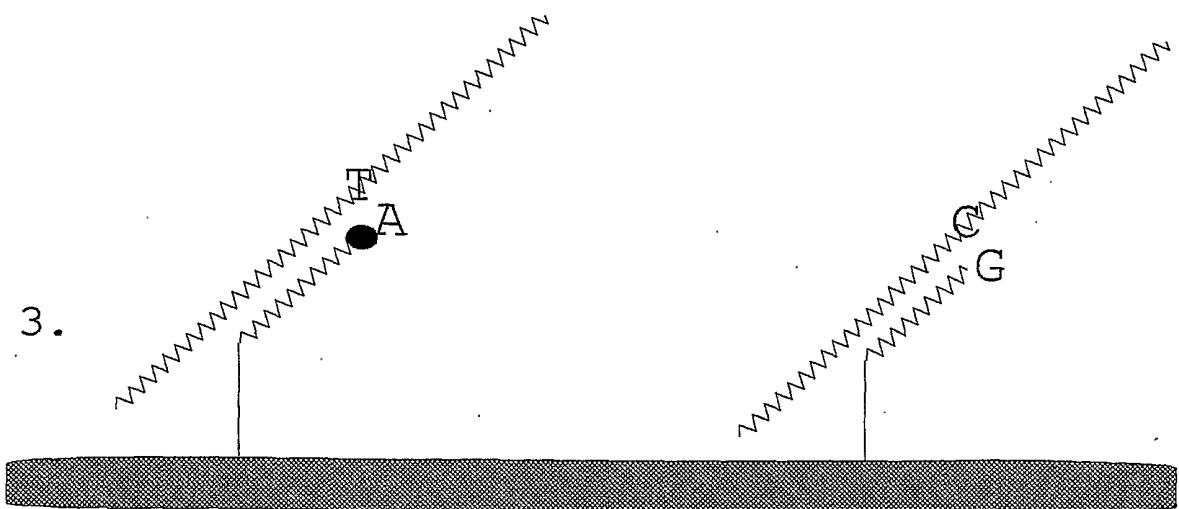
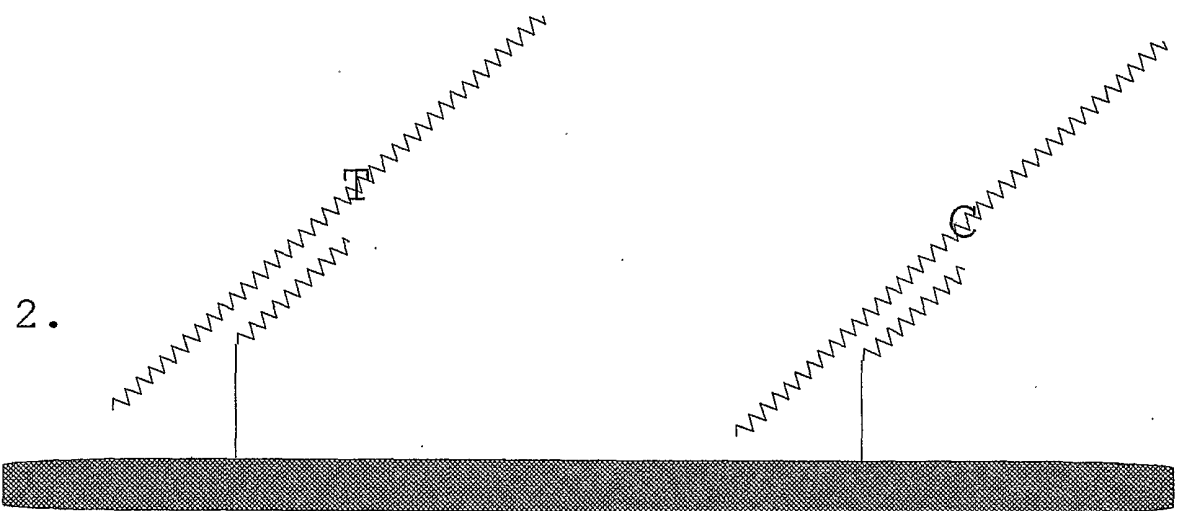
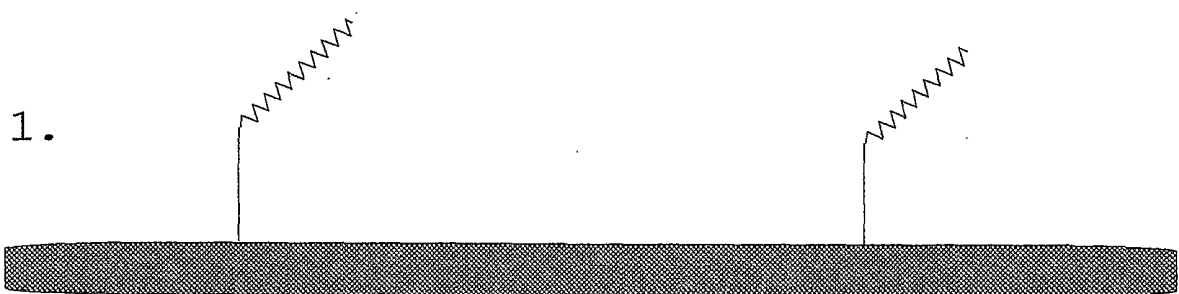


fig. 1b

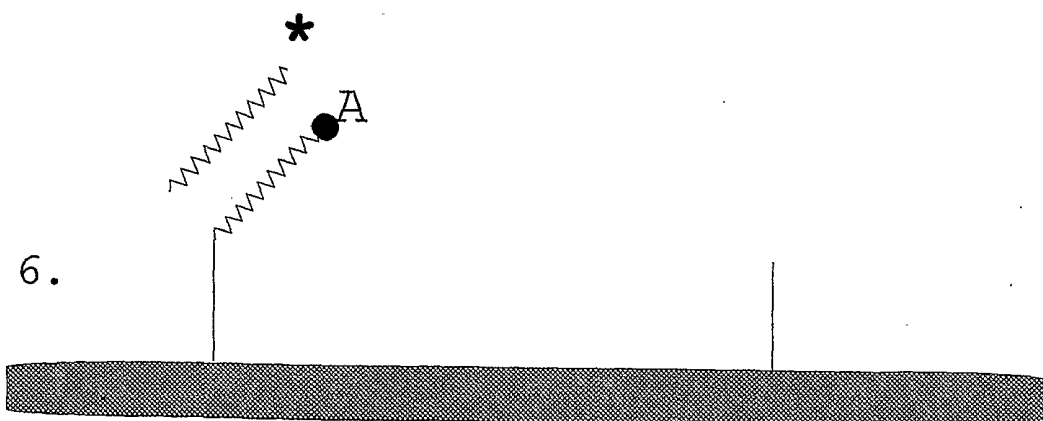
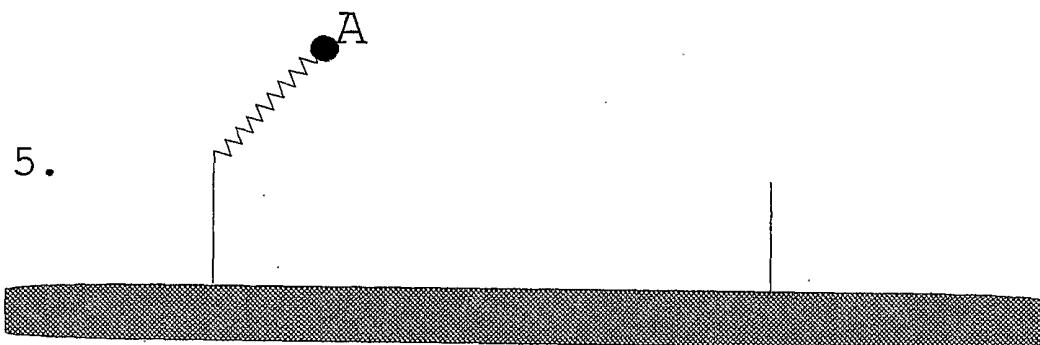
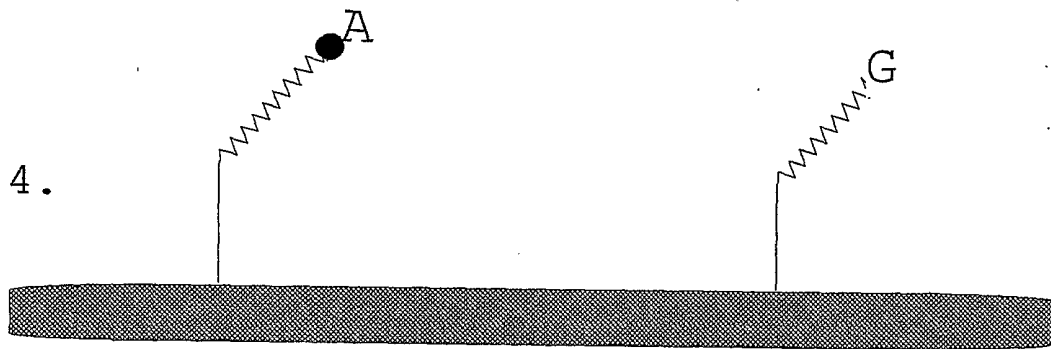
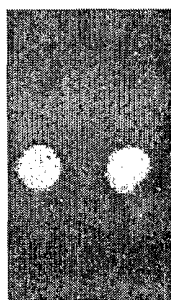
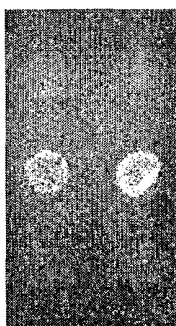


Fig. 3

a)



b)



c)

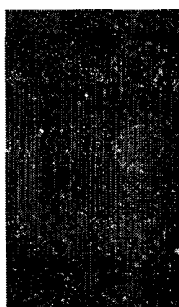
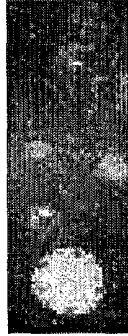
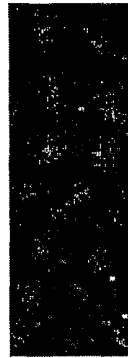


Fig. 4

a)



b)



c)



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Epigenomics AG

5 <120> Verfahren zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen

<130> E01/1206/WO

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 1

25 attaatatta tgtaaagtga 20

<210> 2

<211> 20

30 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

35 <400> 2

cttacaacca ttcaccaca 20