

(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
7. August 2014 (07.08.2014)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2014/118086 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2014/051387

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Januar 2014 (24.01.2014)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
13153011.5 29. Januar 2013 (29.01.2013) EP

(71) Anmelder: **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; QIAGEN Str. 1,
40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder: **BIELKE, Wolfgang**; c/o QIAGEN GmbH,
QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden (DE).

(74) Anwalt: **WITTE, WELLER & PARTNER**; Postfach 10
54 62, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING 5-HYDROXYMETHYLCYTOSINE BASES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR IDENTIFIKATION VON 5-HYDROXYMETHYLCYTOSIN BASEN

(57) Abstract: The present invention relates to a method for identifying 5-hydroxymethylcytosine in a DNA molecule, to a kit for carrying out such a method, and to the use of a restriction endonuclease sensitive to 5-hydroxymethylcytosine in order to identify 5-hydroxymethylcytosine in a DNA molecule.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül, einem Kit, um solch ein Verfahren durchzuführen sowie die Verwendung einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül.



WO 2014/118086 A1

Verfahren zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin Basen

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül, einem Kit, um solch ein Verfahren durchzuführen sowie die Verwendung einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül.

Hintergrund der Erfindung

Die Identifizierung von chemisch modifizierten Nukleotiden genomischer DNA gehört zu den wichtigsten Arbeitsfeldern in der epigenetischen Forschung. Insbesondere die Methylierung von Cytosinresten stellt ein wichtiges epigenetisches Merkmal dar. Die Methylierung und die Demethylierung genomischer DNA von Säugern geschieht dynamisch während der frühen Embryogenese und spielt eine wesentliche Rolle unter anderen bei der Entwicklung, der X-Chromosominaktivierung, beim Imprinting, bei der Entwicklung der Keimzellen, bei Transkription, dem Silencing von Retrotransposonen sowie bei der Tumorentstehung (siehe z.B. Ooi et al. (2009), J. Cell. Sci., 122:2787-2791 sowie den darin zitierten Referenzen). Beispielsweise tendieren Promotoren von aktiven Genen dazu, hypomethyliert zu sein, was darauf schließen lässt, dass der Grad der DNA-Methylierung mit der Expression der zugehörigen Gene korreliert (Weber et al. (2007), Curr. Op. Cell. Biol., 19:273-280).

Die DNA-Methylierung geschieht beispielsweise durch Methyltransferasen, Enzyme, die Cytosin in 5-Methylcytosin (5-mC) umwandeln können. In Säugerzellen hat 5-mC in etwa 1% Anteil an der Häufigkeit aller Basen und wird fast ausschliesslich als symmetrische Methylierung an CpG Stellen gefunden, was bedeutet, dass die Methylierung auf beiden komplementären Strängen der CpG Stelle vorhanden ist (Ehrlich und Wang (1981), Science, 212:1350-1357).

Es wurden mehrere Methoden im Stand der Technik beschrieben, um die Position von 5-mC Basen in DNA-Sequenzen zu identifizieren und zu detektieren. Das am weitesten verbreitete Verfahren ist die Behandlung von DNA mit Bisulfit, welches zur Deaminierung von allen nicht methylierten Cytosinbasen führt, wodurch Uracil entsteht (Herman et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 9821-9826). 5-mC reagiert nicht mit Bisulfit, so dass 5-mC Basen im DNA-Molekül aufrecht erhalten werden. Nach der Umwandlung der Cytosine in Uracil kann die Position der 5-Methylcytosine innerhalb des DNA-Moleküls dadurch bestimmt werden, dass die Basenpaarung verändert worden ist. Während 5-mC wie Cytosin eine

Basenpaarung mit Guanin eingeht, geht Uracil hingegen eine Basenpaarung mit Adenin ein. Geeignete Verfahren, um die Position von 5-mC zu detektieren sind beispielsweise DNA-Sequenzierung, PCR, Oligonukleotid Ligation Assay, Einzelbasen-Extensionen und weitere dem Fachmann wohlbekannte Verfahren.

5

Weitere Verfahren, um den Methylierungszustand von DNA zu analysieren, basieren auf der enzymatischen Deaminierung von nicht methylierten Cytosinen. Beispielsweise beschreibt WO 2005005660 ein Verfahren, welches die schnelle Umwandlung von nicht methyliertem Cytosin in Uracil durch das Enzym Cytosin-Deaminase ausnutzt.

10

Vor wenigen Jahren wurde eine weitere methylierte Nukleobase entdeckt, 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC). Diese wird vermutlich gebildet, indem 5-mC oxidiert wird, ein Prozess, der durch die TET Familie von Cytosin-Oxygenasen katalysiert werden könnte (Kriaucionis und Heintz (2009), Science, 324(5929): 939-930). Diese Vermutung wird durch die Tatsache erhärtet, dass die 5-hmC Konzentration abnimmt, wenn TET1 depletiert wird (Tahiliani et al. (2009), Science, 324(5929):930-935). 5-hmC ist am häufigsten in der DNA des Gehirns, was eine Rolle in der epigenetischen Rolle der neuronalen Funktion nahe legt (Kriaucionis und Heintz, supra). Ungefähr 0,6% aller Nukleotide in Purkinje Zellen und 0,2% aller granulären Zellen sind 5-hmC, während es in Krebszelllinien nicht gefunden werden kann. Darüberhinaus kommt 5-hmC im Genom von embryonalen Maus Stammzellen vor, was auf eine Rolle als epigenetischer Marker während der Säugetierentwicklung hinweisen könnte.

20

Verfahren für die zuverlässige Identifikation von 5-hmC in DNA-Molekülen sind erforderlich, um weiter die Rolle dieser Modifikation als epigenetischen Marker und in regulatorischen Netzwerken zu untersuchen. Während die Behandlung der DNA mit Bisulfit ein geeigneter Weg ist, um nicht-methyliertes Cytosin und 5-mC zu unterscheiden, kann dieser Ansatz nicht verwendet werden, um die beiden methylierten Formen 5-mC und 5-hmC zu unterscheiden, da beide Formen der Nukleobase Cytosin nicht mit Bisulfit reagieren.

25

30

Ein Verfahren wurde beschrieben, um spezifisch 5-hmC Reste in DNA-Molekülen zu detektieren. Dieses basiert auf der Glycosylierung von 5-hmC durch eine enzymatische Reaktion mit Hilfe von T4 β -Glucosyltransferase (T4-BGT) und der anschließenden Restriktion der DNA durch Glykosylierungs-sensitive Endonukleasen. T4-BGT katalysiert

spezifisch die Glycosylierung von 5-hmC in DNA-Molekülen, reagiert aber nicht mit Cytosin- oder 5-mC-Resten.

Jedes 5-hmC, welches innerhalb eines CCGG Sequenzmotivs vorkommt, verändert diese Stelle so, dass sie nicht mehr durch die Restriktionsendonuklease MspI geschnitten werden

5 kann.

Diese Art der Detektion von 5-hmC wird im EpiMark™ 5-hmC und 5-mC Analyse Kit von New England Biolabs verwendet. Dieses Verfahren ist jedoch nur geeignet, um 5-hmC Basen zu detektieren, die in CCGG Sequenzmotiven vorkommen. 5-hmC Reste, die nicht in dieser Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz liegen, können durch dieses Verfahren nicht

10 identifiziert werden. Weiterhin weist dieses Verfahren eine Reihe enzymatischer Schritte auf, so dass die Gefahr besteht, mögliche Fehler während der Reaktion zu akkumulieren.

Daher besteht ein Bedarf für verbesserte Verfahren, die es erlauben, 5-hmC Basen in einem DNA-Molekül spezifisch zu detektieren. Dieses Verfahren sollte einfach durchzuführen sein

15 und möglichst wenige Schritte umfassen.

Die hier vorliegende Erfindung erfüllt diese Bedingungen und stellt ein neuartiges Verfahren zur Verfügung, um spezifisch 5-hmC modifizierte Nukleotide zu detektieren.

20 Beschreibung der Erfindung

In einem ersten Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül, aufweisend die folgenden Verfahrensschritte:

- a) In Kontakt Bringen des DNA-Moleküls mit einem Linker (1) und einem Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, unter Bedingungen, die den Linker (1) mit dem DNA-Molekül verknüpfen;
- b) In Kontakt Bringen des Linker (1)-DNA-Moleküls mit einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease unter Bedingungen, die ein Schneiden des Linker (1)-DNA-Moleküls an hydroxymethylierten Stellen ermöglichen;
- c) In Kontakt Bringen des geschnittenen Linker (1)-DNA-Moleküls mit einem Linker (2) und einem Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, unter Bedingungen, die den Linker (2) an die geschnittene Stelle aus Verfahrensschritt b) verknüpft, so dass ein Linker (1)-DNA-Molekül-Linker (2) Konstrukt entsteht;
- d) Analyse des in Verfahrensschritt c) entstandenen Konstruktes.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass es Restriktionsendonukleasen gibt, die spezifisch solche DNA-Stränge schneiden, die hydroxymethylierte Cytosine aufweisen, methylierte oder unmethylierte jedoch nicht. Zu diesen Restriktionsendonukleasen gehört beispielsweise PvuRTS11 (Szwagierczak et al. (2011), Nucleic Acids Res., 39:5149-5156; Wang et al. (2011), Nucleic Acids Res., 39:9294-9305).

In einem ersten Schritt wird ein erster Linker (1) mittels eines geeigneten Enzyms an das DNA-Molekül verknüpft, welches auf das Vorhandensein von 5-hmC untersucht werden soll. In einen zweiten Schritt wird das Linker (1)-DNA-Molekül mit einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease in Kontakt gebracht unter Bedingungen, die ein Schneiden dieses Moleküls an hydroxymethylierten Stellen ermöglicht. In einem dritten Schritt wird an diese geschnittene Stelle ein zweiter Linker (2) mittels eines geeigneten Enzyms an das Linker (1)-DNA-Molekül verknüpft, so dass ein DNA-Molekül entsteht, dass an beiden Seiten von jeweils einem Linker eingeschlossen wird.

Mit Hilfe der bekannten Linker-Sequenzen kann das DNA-Molekül in einem vierten Schritt analysiert werden, beispielsweise mittels einer Amplifikations- oder einer Sequenzierungsreaktion.

Das DNA-Molekül, welches auf das Vorhandensein von 5-hmC mit dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden soll, kann ein synthetisch hergestelltes oder natürlich vorkommendes DNA-Molekül sein.

Bevorzugt ist das DNA-Molekül ein natürlich vorkommendes DNA-Molekül eines lebenden Organismus und wurde aus einer Probe dieses Organismus gewonnen.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem DNA-Molekül um genomische DNA aus diesem Organismus.

In einer bevorzugten Ausführungsform stammt die biologische Probe, welche das zu untersuchende DNA-Molekül enthält, aus einem Säuger, in einer besonders bevorzugten Ausführungsform stammt diese von einem Menschen.

Die Probe kann Blut, Liquor, Plasma, Urin, Stuhl, eine Gewebeprobe oder jede andere DNA enthaltende Probe des Organismus sein.

Nach dem Trennen der Probe vom Organismus wird die Probe entsprechend behandelt, um die Isolation der DNA, die untersucht werden soll, zu gewährleisten. Geeignete Behandlungen solcher Proben sind dem Fachmann wohlbekannt.

Beispielsweise können die Zellen der biologischen Probe, welche die DNA beinhalten, zerstört werden, um die DNA freizusetzen, beispielsweise durch eine French Press, durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen oder durch Ultraschall. Dem Fachmann sind weitere geeignete Verfahren bekannt.

- 5 Die zellulären Reste können von den DNA-Bestandteilen abgetrennt werden, beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration.

Die von den Zellen abgetrennte DNA kann anschließend durch jedes beliebige Verfahren, welches im Stand der Technik bekannt ist, aufgereinigt werden. Beispielsweise kann die DNA durch Phenol-Chloroformextraktion, Aufreinigung über Minisäulen oder durch jedes beliebige Kit, welches für die Aufreinigung von DNA geeignet ist, insbesondere für die Aufreinigung von genomischer DNA aus biologischen Proben, aufgereinigt werden.

- 10 Geeignete Kits für die Aufreinigung von genomischer DNA aus unterschiedlichen Zell- oder Gewebetypen sind unter anderem der PAXgene blood DNA kit (QIAGEN, Deutschland) oder der QIASymphony DNA Kit (QIAGEN, Deutschland). Dem Fachmann sind weitere geeignete Kits geläufig.

Das durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung zu analysierende DNA-Molekül ist etwa 5, etwa 10, etwa 50, etwa 100, etwa 250, etwa 500, etwa 1000, etwa 10.000, etwa 100.000, oder mehr Nukleotide lang. Das DNA-Molekül umfasst bevorzugt ein Gen, einen Teil eines Gens oder eine regulatorische Sequenz, die die Transkription kontrolliert.

- 20 Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist geeignet, um Nukleotide in einem DNA-Molekül zu detektieren, das eine Cytosinbase aufweist, die durch einen 5-hmC Rest modifiziert ist.

Daher ist dieses Verfahren insbesondere geeignet, um den Methylierungsstatus eines DNA-Moleküls festzustellen, z.B. um Aufschluss über den Mechanismus zu erhalten, der die

- 25 Genexpression durch dynamische DNA-Methylierungsprozesse kontrolliert.

Das DNA-Molekül ist bevorzugt genomische DNA, z.B. chromosomale DNA, die von einem Säuger, bevorzugt von einem Menschen, erhalten worden ist.

Das DNA-Molekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein. Einzelsträngige DNA-Moleküle müssen zuvor durch dem Fachmann bekannte Verfahren in eine doppelsträngige

- 30 DNA überführt werden, bevor sie dem erfindungsgemäßen Verfahren unterzogen werden können.

Das von den Zellen abgetrennte und aufgereinigte DNA-Molekül wird in einem ersten Verfahrensschritt a) mit einem Linker (1) und einem Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, in Kontakt gebracht. Die Bedingungen werden so gewählt, dass das Enzym den Linker (1) mit dem DNA-Molekül verknüpfen kann.

5

Bei den Linkern (1) und (2), die im erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden, handelt es sich jeweils um eine Nukleinsäure, die eine bekannte Sequenz aufweist. Dabei kann die Nukleotidabfolge des Linkers (1) mit der des Linkers (2) partiell identisch oder aber völlig unterschiedlich sein. Auch eine vollständige Identität in der Nukleotidabfolge des Linkers (1) und des Linkers (2) ist möglich, wenn gewährleistet wird, dass nur ein bestimmtes Ende des Linkers an das DNA-Molekül ligiert wird. In diesem Fall kann das Konstrukt mit sense- und antisense-spezifischen Primern in Verfahrensschritt d) analysiert werden.

10

Die Linker können jeweils für sich eine Sequenz aufweisen, die mit der Sequenz eines Organismus identisch ist oder aber auch eine Sequenz aufweisen, die keine Sequenzhomologie zur Sequenz eines bestimmten Organismus aufweist. Für das erfindungsgemäße Verfahren spielt es keine Rolle, ob die für die Linker verwendete Nukleinsäure aus Ribonukleotiden oder Desoxyribonukleotiden aufgebaut ist, oder aus einer Mischung aus diesen Nukleotiden. Es muss jedoch gewährleistet sein, dass die in Verfahrensschritt d) zur Analyse verwendete Polymerase diese Nukleinsäure als Substrat verwenden kann.

15

20

Ebenso ist die Nukleotidabfolge für das erfindungsgemäße Verfahren nicht wesentlich, es muss jedoch gewährleistet sein, dass diese Nukleotidabfolge bekannt ist.

Ebenso kann die für die Linker verwendete Nukleinsäure vollständig oder teilweise aus modifizierten Nukleotiden aufgebaut sein, erfindungswesentlich ist lediglich, dass die Nukleotidabfolge bekannt sein muss. Zu den modifizierten Nukleotiden, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, gehören beispielsweise methylierte Nukletide, Phosphorotioat modifizierte Nukleotide, Locked Nucleic Acids, 3-Amino modifizierte Nukleotide, ddNTPs sowie Nukleotide mit abasischen Modifikationen. Dem Fachmann sind weitere geeignete Nukleotide geläufig.

25

30

Der Linker (1) und der Linker (2) weisen jeweils eine Länge von 15 bis 150, bevorzugt von 25 bis 100, besonders bevorzugt von 30 bis 80 auf.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Linker (1) an einer festen Phase immobilisiert. Bei der festen Phase kann es sich um eine beliebige feste Phase handeln, die dafür geeignet

ist, eine Nukleinsäure zu immobilisieren. Die Art der Immobilisierung der Nukleinsäure an diese feste Phase ist dabei beliebig, es muss nur gewährleistet sein, dass die an diese feste Phase immobilisierte Nukleinsäure noch für Nukleinsäuren modifizierende Enzyme sowie für Hybridisierungen zugänglich ist.

- 5 Die Immobilisierung der Nukleinsäure an die feste Phase kann reversibel oder irreversibel sein.

Beispielsweise kann die Nukleinsäure an Glasoberflächen erfolgen, bei der sowohl die Nukleinsäure als auch die feste Phase durch reaktive organische funktionelle Gruppen modifiziert sein können. Durch chemische Aktivierung mit Hilfe von geeigneten Reagenzien

10 kann so eine kovalente Bindung zwischen Nukleinsäure und fester Phase erreicht werden.

Hierfür eignen sich beispielsweise funktionelle Gruppen wie Carboxyl-, Phosphat-, Aldehyd- oder Aminogruppen.

- Dem Fachmann sind weitere geeignete Verfahren und chemische Modifikationen zur Immobilisierung einer Nukleinsäure an eine feste Phase, sowohl reversibel als auch
- 15 irreversibel, bekannt.

Bei der festen Phase kann es sich um eine planare oder gebogene Fläche, um einen Partikel, um Säulenmaterial oder auch um die Oberfläche von Reaktionsgefäßen handeln. Weitere geeignete Oberflächen sind dem Fachmann geläufig.

- Das Material der festen Phase ist nicht erfindungswesentlich. Seine Oberfläche muss lediglich
- 20 dazu geeignet sein, eine Nukleinsäure reversibel oder irreversibel binden zu können. Es kann sich bei der Oberfläche beispielsweise um eine Silikaoberfläche, eine Nitrozelluloseoberfläche oder um eine funktionalisierte Glasoberfläche handeln. Weitere geeignete Oberflächen sind dem Fachmann geläufig.

- 25 Bei dem Enzym, welches den Linker (1) und den Linker (2) an das DNA-Molekül verknüpft, kann es sich um ein beliebiges Enzym handeln, welches in der Lage ist, zwei Nukleinsäurestränge miteinander kovalent zu verknüpfen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesem Enzym um eine Ligase. Beispiele für geeignete Ligasen sind DNA Ligase aus E. coli und T4 DNA Ligase. Weitere

- 30 DNA Ligasen sind dem Fachmann geläufig.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Ligase um T4 DNA Ligase.

Dabei werden die Reaktionsbedingungen, beispielsweise Temperatur, Zeitdauer und Salzkonzentration, für die Verknüpfung des Linkers an das DNA-Molekül so gewählt, dass das Enzym in der Lage ist, dafür zu sorgen, dass eine ausreichende Menge Linker mit den DNA-Molekülen verknüpft wird. Dem Fachmann sind die Reaktionsbedingungen in

5 Abhängigkeit des ausgewählten Enzyms geläufig.

Beispielsweise können die Reaktionsbedingungen bei Verwendung von T4 DNA Ligase wie folgt gewählt sein:

10 µL	2X Ligation Buffer	1X
X µL	Fragment	1-10 ng/ µL
X µL	Linker	1-10 ng/ µL
1 µL	T4 DNA Ligase (600 U/ µL)	30 U/ µL
X µL	Water	N/A
20 µL	Total Volume	

10 Dem Fachmann ist wohlbekannt, dass jedes geeignete Enzym auch bei für es nicht optimalen Reaktionsbedingungen eine ausreichende Aktivität aufweisen kann.

Für die Verknüpfung des Linker (1) an das DNA-Molekül kann dasselbe oder ein unterschiedliches Enzym verwendet werden wie für die Verknüpfung des Linkers (2) an das geschnittene Linker (1)-DNA-Molekül.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform wird für beide Verknüpfungen dasselbe Enzym verwendet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Enzym dabei um T4 DNA Ligase.

20 Sofern das DNA-Molekül, welches auf das Vorhandensein von 5-hmC untersucht werden soll, für die Verknüpfung des Linkers (1) an das DNA-Molekül und für die weiteren Verfahrensschritte noch zu lang ist, kann das DNA-Molekül zuvor einer Fragmentierung in kürzere DNA-Moleküle unterworfen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die Länge des DNA-Moleküls für die 25 erfindungsgemäßen Verfahrensschritte zwischen 50 und 300 Nukleotiden, jedoch können auch längere oder kürzere DNA-Moleküle eingesetzt werden.

Diese Fragmentierung kann durch jedes dem Fachmann bekannte Verfahren durchgeführt werden, so zum Beispiel durch mechanische Fragmentierung, Beschallung, Nebulisierung, hydrodynamische Scherung oder enzymatische Fragmentierung. Dem Fachmann sind weitere

30 Verfahren zur Fragmentierung von DNA-Molekülen geläufig.

In einer weiteren Ausführungsform kann vor der Verknüpfung des Linkers (1) an das DNA-Molekül noch ein Verfahrensschritt durchgeführt werden, bei dem eine Anreicherung von 5-Hydroxymethylcytosin aufweisenden DNA-Molekülen stattfindet. Dieser Verfahrensschritt dient insbesondere der Vor-Anreicherung der zu untersuchenden DNA-Moleküle, wenn zu

5 erwarten ist, dass eine 5-hmC Modifikation nur in wenigen Bereichen der zu untersuchenden DNA vorkommt.

Diese Vor-Anreicherung von 5-hmC DNA-Molekülen kann durch verschiedene Verfahren durchgeführt werden.

Beispielsweise kann eine Präzipitation 5-hydroxymethylierter DNA-Moleküle mit Hilfe von

10 für diese Modifikation spezifischen Antikörpern durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht beispielsweise darin, die 5-hydroxymethylierten DNA-Moleküle durch geeignete chemische Substanzen zu präzipitieren.

Nach der Präzipitation der 5-hmC DNA-Moleküle besteht die Möglichkeit, durch einen optionalen Waschschrift die Antikörper oder die chemischen Substanzen, die zur Präzipitation

15 verwendet wurden, wieder zu entfernen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird vor der Verknüpfung des Linker (1) an das DNA-Molekül sowohl eine Fragmentierung des DNA-Moleküls in kürzere DNA-Moleküle durchgeführt, als auch eine spezifische Präzipitation 5-hydroxymethylierter DNA-Moleküle

20 durchgeführt.

25 In einem weiteren Verfahrensschritt b) wird das verknüpfte Linker (1)-DNA-Molekül mit einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease in Kontakt gebracht unter Bedingungen, die ein Schneiden des Linker (1)-DNA-Moleküls an hydroxymethylierten Stellen ermöglichen.

Geeignete Restriktionsendonukleasen für diesen Verfahrensschritt sind solche, welche in der

30 Lage sind, in ihrer Reaktionseffizienz zwischen unmethylierten, methylierten und hydroxymethylierten Cytosinen unterscheiden zu können.

Bevorzugt werden in diesen Verfahrensschritt solche Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die an hydroxymethylierten Cytosinen mit hoher Effizienz schneiden, bei methylierten und unmethylierten Cytosinen jedoch nur mit geringer oder gar keiner Effizienz. In einer

bevorzugen Ausführungsform handelt es sich bei der Restriktionsendonuklease um PvuRTsI. Dieses weist eine Restriktionseffizienz für 5-hmC von etwa 95% auf, während sowohl unmethylierte als auch 5-mC Nukleotide nur mit sehr geringer Effizienz geschnitten werden.

- 5 PvuRTsI schneidet an der Sequenz $^{hm}CN_{11-12}/N_{9-10}G$, so dass das geschnittene DNA-Molekül einen Überhang von 2 Nukleotiden aufweist, wobei das Ende dieses DNA-Moleküls, welches mit dem Linker (1) verknüpft ist, ein hydroxymethyliertes Cytosin an der geschnittenen Stelle aufweist.
- 10 Die Reaktionsbedingungen, bei denen das Linker (1)-DNA-Molekül mit einer Restriktionsendonuklease in Kontakt gebracht wird, beispielsweise Temperatur, Zeitdauer und Salzkonzentration, sind so gewählt, dass das Enzym in der Lage ist, an hydroxymethylierten Cytosinen zu schneiden. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist es ausreichend, wenn nur ein geringer Prozentsatz der hydroxymethylierten Cytosine geschnitten
- 15 wird, da diese geschnittenen DNA-Moleküle andere Enden aufweisen als nicht geschnittene DNA-Moleküle und so von diesen leicht unterschieden werden können. Da im Verfahrensschritt d) bei der Analyse eine Vervielfältigung des Signals, beispielsweise durch eine PCR, stattfinden kann, ist ein geringer Prozentsatz an geschnittenen hydroxymethylierten Cytosinen für das erfindungsgemäße Verfahren ausreichend.
- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Prozentsatz von mehr als 30%, von mehr als 50%, von mehr als 70%, von mehr als 90% aller hydroxymethylierten Cytosine in Verfahrensschritt b) geschnitten.
- Dem Fachmann sind die Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit des ausgewählten Enzyms geläufig. Dem Fachmann ist wohlbekannt, dass jedes geeignete Enzym auch bei für es nicht
- 25 optimalen Reaktionsbedingungen eine ausreichende Aktivität aufweisen kann.
- In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach diesem Verfahrensschritt b) ein Waschschrift eingefügt, in dem das Restriktionsenzym sowie die geschnittenen, nicht an eine feste Phase immobilisierten DNA-Moleküle, entfernt werden.
- In einem weiteren Verfahrensschritt c) wird das geschnittene Linker (1)-DNA-Molekül mit
- 30 einem Linker (2) und einem Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, unter Bedingungen, die den Linker (2) an die geschnittene Stelle aus Verfahrensschritt b) verknüpft, so dass ein Linker (1)-DNA-Molekül-Linker (2) Konstrukt entsteht.

Bei den Linkern (1) und (2), die im erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden, handelt es sich jeweils um eine Nukleinsäure, die eine bekannte Sequenz aufweist. Dabei kann die Nukleotidabfolge des Linkers (1) mit der des Linkers (2) partiell identisch oder aber
5 Linkers (1) und des Linkers (2) ist möglich, wenn gewährleistet wird, dass nur ein bestimmtes Ende des Linkers an das DNA-Molekül ligiert wird. In diesem Fall kann das Konstrukt mit sense- und antisense-spezifischen Primern in Verfahrensschritt d) analysiert werden.

Die Linker können jeweils für sich eine Sequenz aufweisen, die mit der Sequenz eines Organismus identisch ist oder aber auch eine Sequenz aufweisen, die keine
10 Sequenzhomologie zur Sequenz eines bestimmten Organismus aufweist. Für das erfindungsgemäße Verfahren spielt es keine Rolle, ob die für die Linker verwendete Nukleinsäure aus Ribonukleotiden oder Desoxyribonukleotiden aufgebaut ist, oder aus einer Mischung aus diesen Nukleotiden. Es muss jedoch gewährleistet sein, dass die in Verfahrensschritt d) zur Analyse verwendete Polymerase diese Nukleinsäure als Substrat
15 verwenden kann.

Ebenso ist die Nukleotidabfolge für das erfindungsgemäße Verfahren nicht wesentlich, es muss jedoch gewährleistet sein, dass diese Nukleotidabfolge bekannt ist.

Ebenso kann die für die Linker verwendete Nukleinsäure vollständig oder teilweise aus
20 modifizierten Nukleotiden aufgebaut sein, erfindungswesentlich ist lediglich, dass die Nukleotidabfolge bekannt sein muss. Zu den modifizierten Nukleotiden, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, gehören beispielsweise methylierte Nukletide, Phosphorotioat modifizierte Nukleotide, Locked Nucleic Acids, 3-Amino modifizierte Nukleotide, ddNTPs sowie Nukleotide mit abasischen Modifikationen. Dem
25 Fachmann sind weitere geeignete Nukleotide geläufig.

Der Linker (1) und der Linker (2) weisen jeweils eine Länge von 15 bis 150, bevorzugt von 25 bis 100, besonders bevorzugt von 30 bis 80 auf.

Bei dem Enzym, welches den Linker (1) und den Linker (2) an das DNA-Molekül verknüpft,
30 kann es sich um ein beliebiges Enzym handeln, welches in der Lage ist, zwei Nukleinsäurestränge miteinander kovalent zu verknüpfen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesem Enzym um eine Ligase. Beispiele für geeignete Ligasen sind DNA Ligase aus E. coli und T4 DNA Ligase. Weitere geeignete DNA Ligasen sind dem Fachmann bekannt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Ligase um T4 DNA Ligase.

5 Dabei werden die Reaktionsbedingungen, beispielsweise Temperatur, Zeitdauer und Salzkonzentration, für die Verknüpfung des Linkers an das DNA-Molekül so gewählt, dass das Enzym in der Lage ist, dafür zu sorgen, dass eine ausreichende Menge Linker mit den DNA-Molekülen verknüpft wird. Dem Fachmann sind die Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit des ausgewählten Enzyms geläufig.

10 Beispielsweise können die Reaktionsbedingungen bei Verwendung von T4 DNA Ligase wie folgt gewählt sein:

10 µL	2X Ligation Buffer	1X
X µL	Fragment	1-10 ng/ µL
X µL	Linker	1-10 ng/ µL
1 µL	T4 DNA Ligase (600 U/ µL)	30 U/ µL
X µL	Water	N/A
20 µL	Total Volume	

Dem Fachmann ist wohlbekannt, dass jedes geeignete Enzym auch bei für es nicht optimalen Reaktionsbedingungen eine ausreichende Aktivität aufweisen kann.

15 Für die Verknüpfung des Linker (1) an das DNA-Molekül kann dasselbe oder ein unterschiedliches Enzym verwendet werden wie für die Verknüpfung des Linkers (2) an das geschnittene Linker (1)-DNA-Molekül.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird für beide Verknüpfungen dasselbe Enzym verwendet.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Enzym dabei um T4 DNA Ligase.

25 Nach diesem Verfahrensschritt c) befindet sich das DNA-Molekül, welches ein hydroxymethyliertes Cytosin aufweist, als Amplikon zwischen zwei Linkern mit jeweils bekannter Nukleinsäuresequenz. Dabei ist die hydroxymethylierte Stelle dem Linker (2) benachbart.

30 In einem weiteren Verfahrensschritt d) wird das in Verfahrensschritt c) entstandene Konstrukt analysiert.

Da sich das zu untersuchende DNA-Molekül, welches ein hydroxymethyliertes Cytosin aufweist, nach den erfindungsgemäßen Verfahrensschritten a) bis c) zwischen zwei Linkern mit bekannter Nukleinsäuresequenz befindet, ist es nun möglich, das Konstrukt aus Verfahrensschritt c) zu analysieren.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Analyse des Konstruktes eine Amplifikation des Konstruktes.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Amplifikation um eine PCR. Dem Fachmann ist wohlbekannt, dass eine PCR in verschiedenen Ausführungsformen durchgeführt werden kann. Beispiele für die Analyse des Konstruktes
10 mittels PCR umfasst beispielsweise Endpunkt-PCR. Dem Fachmann sind weitere Ausführungsformen der PCR bekannt, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Amplifikation um eine Sequenzierung. Dem Fachmann ist wohlbekannt, dass eine
15 Sequenzierung in verschiedenen Ausführungsformen durchgeführt werden kann. Beispiele für die Analyse des Konstruktes mittels Sequenzierung umfasst Deep Sequencing, Next Generation Sequencing, oder auch Pyrosequencing, wenn es sich bei der amplifizierten DNA um eine einzelne Sequenz handelt. Dem Fachmann sind weitere Ausführungsformen der Sequenzierung bekannt, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind.

- 20 In einer darüber hinaus besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Sequenzierung um Deep Sequencing.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Sequenzierung um Pyrosequencing.

- 25 In einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül.

In einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Kit zur
30 Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül aufweisend einen Linker (1), ein Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, eine 5-Hydroxymethylcytosin sensitive Restriktionsendonuklease, einen Linker (2) sowie optional eine Anweisung für das erfindungsgemäße Verfahren.

Ansprüche

- 5 1) Verfahren zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül, aufweisend die folgenden Verfahrensschritte
- a) In Kontakt Bringen des DNA-Moleküls mit einem Linker (1) und einem Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, unter Bedingungen, die den Linker (1) mit dem DNA-Molekül verknüpfen;
- 10 b) In Kontakt Bringen des Linker (1)-DNA-Moleküls mit einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease unter Bedingungen, die ein Schneiden des Linker (1)-DNA-Moleküls an hydroxymethylierten Stellen ermöglichen;
- c) In Kontakt Bringen des geschnittenen Linker (1)-DNA-Moleküls mit einem Linker (2) und einem Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann, unter Bedingungen, die den Linker (2) an die geschnittene Stelle aus Verfahrensschritt b) verknüpft, so
- 15 dass ein Linker (1)-DNA-Molekül-Linker (2) Konstrukt entsteht;
- d) Analyse des in Verfahrensschritt c) entstandenen Konstruktes.
- 2) Verfahren gemäß Anspruch 1), dadurch gekennzeichnet, dass vor Verfahrensschritt a) aus Anspruch 1) eine Fragmentierung des DNA-Moleküls in kürzere DNA-
- 20 Moleküle erfolgt.
- 3) Verfahren gemäß Anspruch 1), dadurch gekennzeichnet, dass vor Verfahrensschritt a) aus Anspruch 1) eine Anreicherung von 5-Hydroxymethylcytosin aufweisenden DNA-Molekülen stattfindet.
- 4) Verfahren gemäß Anspruch 1), dadurch gekennzeichnet, dass vor Verfahrensschritt a) aus Anspruch 1) eine Fragmentierung der DNA in kürzere DNA-Moleküle erfolgt
- 25 und anschließend eine Anreicherung von 5-Hydroxymethylcytosin aufweisenden DNA-Molekülen stattfindet.
- 5) Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1) bis 4), dadurch gekennzeichnet, dass der Linker (1) in Verfahrensschritt b) aus Anspruch 1) an einer festen Phase
- 30 immobilisiert ist.
- 6) Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1) bis 5), dadurch gekennzeichnet, dass die Restriktionsendonuklease in Verfahrensschritt c) aus Anspruch 1) PvuRTs11 ist.

7) Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1) bis 6), dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym, das das DNA-Molekül mit einem Linker in den Verfahrensschritten a) und c) aus Anspruch 1) verknüpft, eine Ligase ist.

8) Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse des Konstruktes in Verfahrensschritt d) aus Anspruch 1 eine Amplifikation umfasst.

9) Verfahren gemäß Anspruch 8), dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Amplifikation um eine PCR handelt.

10) Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, dass die Analyse des Konstruktes in Verfahrensschritt d) aus Anspruch 1 eine Sequenzierung umfasst.

11) Verfahren gemäß Anspruch 10), dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Sequenzierung um Deep Sequencing handelt.

12) Verfahren gemäß Anspruch 10), dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Sequenzierung um Pyrosequencing handelt.

13) Verwendung einer 5-Hydroxymethylcytosin sensitiven Restriktionsendonuklease zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül.

14) Kit zur Identifikation von 5-Hydroxymethylcytosin in einem DNA-Molekül, aufweisend

- a) einen Linker (1);
- b) ein Enzym, welches DNA-Stränge verknüpfen kann;
- c) eine 5-Hydroxymethylcytosin sensitive Restriktionsendonuklease;
- d) einen Linker (2);
- e) optional eine Anweisung für ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1) bis 12).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/051387

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/025819 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS INC [US]; BITINAITE JURATE [US]; VAISVILA ROMALDAS) 3 March 2011 (2011-03-03) abstract page 25, line 14 - line 31 examples 9, 12-14 claims 1,3,9 page 6, line 15 - line 22 -----	1-14
X	WO 2012/119945 A1 (UNIV MUENCHEN L MAXIMILIANS [DE]; BRACHMANN ANDREAS [DE]; LEONHARDT HE) 13 September 2012 (2012-09-13)	14
Y	abstract paragraphs [0015], [0065] claims 1,11-12, 14-16 figure 12 ----- -/-	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2014

Date of mailing of the international search report

01/04/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Barz, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/051387

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. WANG ET AL: "Comparative characterization of the PvuRtsI family of restriction enzymes and their application in mapping genomic 5-hydroxymethylcytosine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 21, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 9294-9305, XP055057711, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr607 cited in the application abstract page 9301, right-hand column, paragraph 3 figure 6	1-14
Y	SEUNG-GI JIN ET AL: "Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 38, no. 11, 1 June 2010 (2010-06-01), pages e125-1, XP002631408, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKQ223 [retrieved on 2010-04-05] abstract pages e125-7, left-hand column, line 3 - line 5	1-13
Y	G. P. PFEIFER ET AL: "In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 88, no. 4, 15 February 1991 (1991-02-15), pages 1374-1378, XP055057877, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.88.4.1374 the whole document	1-13
A	A. SZWAGIERCZAK ET AL: "Characterization of PvuRtsI endonuclease as a tool to investigate genomic 5-hydroxymethylcytosine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 12, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 5149-5156, XP055012438, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr118 cited in the application abstract ----- -/--	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/051387

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALEKSANDRA SZWAGIERCZAK ET AL: "Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 38, no. 19, 1 October 2010 (2010-10-01), pages E181.1-E181.5, XP002631410, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKQ684 [retrieved on 2010-08-04] abstract	1-14
A	JANOSI L ET AL: "Molecular Cloning and Expression of a Novel Hydroxymethylcytosine-specific Restriction Enzyme (PvuRts1I) Modulated by Glucosylation of DNA", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 242, no. 1, 8 September 1994 (1994-09-08), pages 45-61, XP024009495, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1006/JMBI.1994.1556 [retrieved on 1994-09-08] abstract	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/051387

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011025819 A1	03-03-2011	EP 2470675 A1	04-07-2012
		US 2012156677 A1	21-06-2012
		WO 2011025819 A1	03-03-2011

WO 2012119945 A1	13-09-2012	EP 2681335 A1	08-01-2014
		WO 2012119945 A1	13-09-2012

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/051387

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/68

ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C12Q

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2011/025819 A1 (NEW ENGLAND BIOLABS INC [US]; BITINAITE JURATE [US]; VAISVILA ROMALDAS) 3. März 2011 (2011-03-03) Zusammenfassung Seite 25, Zeile 14 - Zeile 31 Beispiele 9, 12-14 Ansprüche 1,3,9 Seite 6, Zeile 15 - Zeile 22 -----	1-14
X	WO 2012/119945 A1 (UNIV MUENCHEN L MAXIMILIANS [DE]; BRACHMANN ANDREAS [DE]; LEONHARDT HE) 13. September 2012 (2012-09-13)	14
Y	Zusammenfassung Absätze [0015], [0065] Ansprüche 1,11-12, 14-16 Abbildung 12 ----- -/-	1-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Februar 2014

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/04/2014

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Barz, Wolfgang

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	H. WANG ET AL: "Comparative characterization of the PvuRtsI family of restriction enzymes and their application in mapping genomic 5-hydroxymethylcytosine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 39, Nr. 21, 1. November 2011 (2011-11-01), Seiten 9294-9305, XP055057711, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr607 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 9301, rechte Spalte, Absatz 3 Abbildung 6 -----	1-14
Y	SEUNG-GI JIN ET AL: "Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 38, Nr. 11, 1. Juni 2010 (2010-06-01), Seiten e125-1, XP002631408, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKQ223 [gefunden am 2010-04-05] Zusammenfassung Seiten e125-7, linke Spalte, Zeile 3 - Zeile 5 -----	1-13
Y	G. P. PFEIFER ET AL: "In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Bd. 88, Nr. 4, 15. Februar 1991 (1991-02-15), Seiten 1374-1378, XP055057877, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.88.4.1374 das ganze Dokument -----	1-13
A	A. SZWAGIERCZAK ET AL: "Characterization of PvuRtsI endonuclease as a tool to investigate genomic 5-hydroxymethylcytosine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 39, Nr. 12, 1. Juli 2011 (2011-07-01), Seiten 5149-5156, XP055012438, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkr118 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ----- -/--	1-14

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ALEKSANDRA SZWAGIERCZAK ET AL: "Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 38, Nr. 19, 1. Oktober 2010 (2010-10-01), Seiten E181.1-E181.5, XP002631410, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/GKQ684 [gefunden am 2010-08-04] Zusammenfassung -----	1-14
A	JANOSI L ET AL: "Molecular Cloning and Expression of a Novel Hydroxymethylcytosine-specific Restriction Enzyme (PvuRtsII) Modulated by Glucosylation of DNA", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, Bd. 242, Nr. 1, 8. September 1994 (1994-09-08), Seiten 45-61, XP024009495, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1006/JMBI.1994.1556 [gefunden am 1994-09-08] Zusammenfassung -----	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/051387

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO 2011025819	A1	03-03-2011	EP	2470675	A1	04-07-2012	
			US	2012156677	A1	21-06-2012	
			WO	2011025819	A1	03-03-2011	

WO 2012119945	A1	13-09-2012	EP	2681335	A1	08-01-2014	
			WO	2012119945	A1	13-09-2012	
