

(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. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/18631 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10073
- (22) Internationales Anmeldedatum:
1. September 2001 (01.09.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 43 826.1 1. September 2000 (01.09.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **EPIGENOMICS AG** [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OLEK, Alexander** [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE).
PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwartzkopffs-
trasse 7 B, 10115 Berlin (DE). **BERLIN, Kurt** [DE/DE];
Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
- (74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Joachimstrasse 9, 10119
Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, PH, 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, GQ, 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.



WO 02/18631 A2

(54) Title: DIAGNOSIS OF ILLNESSES OR PREDISPOSITION TO CERTAIN ILLNESSES

(54) Bezeichnung: DIAGNOSE VON BESTEHENDEN ERKRANKUNGEN ODER DER PRÄDISPOSITION FÜR
BESTIMMTE ERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a set of oligomer probes (oligonucleotides and/or PNA oligomers) which are used for detecting the cytosine methylation state in nucleic acids. Said probes are especially suitable for diagnosing illnesses by analysing a group of genetic and/or epigenetic parameters.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Satz von Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosinmethylierungszustandes in Nukleinsäuren dienen. Diese Sonden sind für die Diagnose von bestehenden Erkrankungen durch Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter besonders geeignet.

Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen

Gebiet der Erfindung

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

Die vorliegende Erfindung beschreibt Nukleinsäuren, Oligonukleotide, PNA-Oligomere und ein Verfahren zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen.

Stand der Technik

Die Methylierung von CpG Inseln wird oft mit Transkriptionsinaktivität gleichgesetzt. Obwohl es eindeutige Beweise dafür gibt, dass die CpG Inseln in den Promotoren der Gene zu finden sind, sind nicht alle CpG Inseln und Methylierungsstellen in bekannten Promotoren lokalisiert. Bei verschiedenen gewebsspezifischen und „imprinting“ Genen sind die CpG Inseln in beträchtlichen Entfernungen stromabwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert, zusätzlich besitzen viele Gene multiple Promotoren. Für eine Vielzahl von Erkrankungen wurde Methylierung von CpG Dinukleotiden als ursächlich nachgewiesen. Im Gegensatz zu klassischen Mutationen, handelt es sich bei der DNA-Methylierung um einen Mechanismus, der eine Basensubstitution beschreibt, ohne die codierende Funktion eines Gens zu verändern. Dieses Wechselspiel zwischen epigenetischer Modifikation und

klassischen Mutationen spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Beispielsweise sind fokale Hypermethylierung und generalisierte genomische Demethylierung Merkmale vieler verschiedener Tumortypen. Es wird angenommen, dass die Tumorgenese und die Tumorprogression zum einen durch Hypermethylierung induzierter Mutationsereignisse und zum anderen durch das Abschalten von Genen, welche die zelluläre Proliferation und/oder die induzierte Reaktivierung von Genen über Demethylierung kontrollieren, die nur für die embryologische Entwicklung gebraucht werden, verursacht werden.

Bei dem vererbaren non-polyposis Colorektalkrebs beruht z. B. der Hauptteil der mutationsnegativen Dickdarmkrebs Fälle eher auf der Hypermethylierung des hMLH1 Promotors und der anschließenden Nicht-Expression von hMLH1, ein Reparaturgen für Fehlpaarungen (Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15;87(2):200-3.). Bei der Pathogenese von Lungenkrebs ist der Verlust der Expression mit der Methylierung von CpG Inseln in der Promotor Sequenz eines RAS Effektor-Homologs korreliert. (Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP, Nucleotide. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus3p21.3. *Nat Genet*. 2000 Jul;25(3):315-9). Eine epigenetische Inaktivierung des LKB1 Tumorsupressorgens, welche die Hypermethylierung des Promotors mit einschliesst, ist mit dem Peutz-Jeghers Syndrom assoziiert (Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, Herman JG, Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene*. 2000 Jan 6;19(1):164-8).

Eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit Methylierung assoziiert sind, weisen in ihrer Ätiologie eine enge Verbindung zu den Tumorsupressorgenen p16 oder p15 Gene auf. So wird eine Beziehung zwischen Mycoso fungoides und der Hypermethylierung des p16(INK4a) Gens angenommen (Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martinez P, Garcia C, Gomez E, Rodriguez JL, Garcia D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P, p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol*. 2000 May; 156(5):1565-72). Auch wird von einer starken Korrelation zwischen dem Abschalten der Transkription des p16 Gens bei dem gastrischen Karzinom und der de novo Methylierung einiger weniger spezifischer CpG Stellen ausgegangen (Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ, Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression

in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2000 Jul 15;87(2):236-40). Die Pathogenese des Cholangiokarzinoms, welches mit der primär sklerosierenden Cholangitis assoziiert ist, wird mit der Inaktivierung des p16 Tumorsuppressorgens, welches wiederum von der Methylierung des p16 Promotors abhängig ist, in Zusammenhang gebracht (Ahrendt SA, Eisenberger CF, Yip L, Rashid A, Chow JT, Pitt HA, Sidransky D, Chromosome 9p21 loss and p16 inactivation in primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma. *J Surg Res*. 1999 Jun 1;84(1):88-93). Bei der Leukämogenese und beim Fortschreiten der akuten lymphatischen Leukämie spielt die Inaktivierung des p16 Gens durch Hypermethylierung eine Rolle (Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, Kojika S, Shiraishi K, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, O-Koyama T, Mori T, Nakazawa S, p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. *Leukemia*. 1999 Jun;13(6):884-90). Weiterhin wird postuliert, dass die Hypermethylierung der p16 und p15 Gene eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese des multiplen Myeloms spielt (Ng MH, Wong IH, Lo KW, DNA methylation changes and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 1999 Aug;34(5-6):463-72). An der Prädisposition des Nierenkarzinoms scheint das durch Methylierung inaktivierte VHL-Gen beteiligt zu sein (Glavac D, Ravnik-Glavac M, Ovcak Z, Masera A, Genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma (RCC). *Pflugers Arch*. 1996;431(6 Suppl 2):R193-4). Eine abweichende Methylierung der 5' CpG Insel ist möglicherweise an der Transkriptionsinaktivierung des p16 Gens bei dem nasopharyngealen Karzinom beteiligt (Lo KW, Cheung ST, Leung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, Huang DP, Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Jun 15;56(12):2721-5). Bei dem Leberzellenkarzinom wurde eine Inaktivierung des p16 Proteins nachgewiesen. Promotor Hypermethylierung und homozygote Deletionen gehören hier zu den häufigen Mechanismen (Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H, p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2000 Jul 1;89(1):60-8). DNA-Methylierung als Kontrolle der Genexpression wurde für das BRCA1 Gen für Brustkrebs nachgewiesen (Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaib M, Lenoir GM, Guerin JF, Dante R Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells *FASEB J*. 2000 Aug;14(11):1585-94). Eine Korrelation zwischen Methylierung und Non-Hodgkin's Lymphom wird ebenfalls angenommen (Martinez-Delgado B, Richart A, Garcia MJ, Robledo M, Osorio A, Cebrian A, Rivas C, Benitez J, Hypermethylation of P16ink4a and P15ink4b genes as a marker of disease in the follow-up of non-Hodgkin's lymphomas.

Br J Haematol. 2000 Apr;109(1):97-103).

CpG-Methylierung ruft auch das Fortschreiten der T-Zell Leukämie hervor, die in Zusammenhang mit der verminderten Expression des CDKN2A Gens steht (Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, Sakai T, Mitsuya H, Matsuoka M, Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):1043-8). Bei Blasenkrebs wurde eine erhöhte Methylierung der CpG-Inseln festgestellt (Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, Nichols PW, Jones PA, Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2473-6). Die Transkriptionsinaktivierung von Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre wird in Verbindung mit der Methylierung des FHIT Gens gebracht, das mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist (Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M, Loss of fragile histidine triad gene expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history. *Cancer.* 2000 Jul 1;89(1):5-11). Die Neutral Endopeptidase 24.11 (NEP) inaktiviert das Wachstum von Neuropeptiden, die an dem Wachstum des Androgen unabhängigen Prostatakrebs beteiligt sind. Ein Verlust der NEP Expression durch Hypermethylierung des NEP-Promotors trägt möglicherweise zu der Entwicklung des Neuropeptid stimulierten Androgen unabhängigen Prostatakrebses bei (Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB, Nanus DM, Methylation of the neutral endopeptidase gene promoter in human prostate cancers. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):1664-70). Der adrenokortikale Tumor bei Erwachsenen weist strukturelle Abnormalitäten bei Tumor-DNA auf. Diese Abnormalitäten beinhalten unter anderem eine Überexpression des IGF2 Gens in Korrelation mit einer Demethylierung der DNA an diesem Locus (Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C, Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):2048-56. Review). Es wird angenommen, dass bei dem Retinoblastomgen DNA-Methylierungen in mehreren Exons an der Erkrankung beteiligt sind (Mancini D, Singh S, Ainsworth P, Rodenhiser D, Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1). *Am J Hum Genet.* 1997 Jul;61(1):80-7). Bei chronischer myeloischer Leukämie wird ein Zusammenhang zwischen der Deregulation des p53 Gens und einer Veränderung des Methylierungsmusters mit der Progression der Erkrankung vermutet (Guinn BA, Mills KI, p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid

leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 1997 Jul;26(3-4):211-26). Auch für die akute myeloische Leukämie wurde ein Zusammenhang mit Methylierung nachgewiesen (Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 1999 Aug 1;59(15):3730-40). Es wurde eine tumorspezifische Methylierungsstelle in dem Supressorgen für den Wilms Tumor identifiziert (Kleyменова EV, Yuan X, LaBate ME, Walker CL, Identification of a tumor-specific methylation site in the Wilms tumor suppressor gene. *Oncogene*. 1998 Feb 12;16(6):713-20). Bei dem Burkitt Lymphom weisen einige Promotoren eine vollständige CpG-Methylierung auf (Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF, Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1373-81). Es wird angenommen, dass bei dem Schilddrüsenkarzinom die DNA-Methylierung eine Rolle spielt (Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB, Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I-symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jul;84(7):2449-57).

Nicht nur viele Krebserkrankungen sind mit Methylierung assoziiert, auch viele nicht Krebserkrankungen werden mit Methylierung in Zusammenhang gebracht. So weisen Untersuchungen zur entzündlichen Arthritis darauf hin, dass diese Erkrankung mit einer Untermethylierung genomischer DNA assoziiert ist (Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R, DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: reversal with methotrexate. *J Lab Clin Med*. 1996 Aug;128(2):165-72). Für das ICF-Syndrom wurde eine Methylierungs regulierte Expression nachgewiesen (Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM, Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2). Die Beteiligung von Methylierung an systemischem Lupus erythematosus wird vermutet (Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L, Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1999 Dec1;163(11):6306-13); ebenso ein Zusammenhang zwischen der Muskeldystrophy Duchenne und einer CpG reichen Insel (Banerjee S, Singh PB, Rasberry C, Cattanaach BM, Embryonic inheritance of the chromatin organisation of the imprinted H19 domain in mouse spermatozoa. *Mech Dev*. 2000 Feb;90(2):217-26; Burmeister M, Lehrach H, Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*. 1986 Dec 11-17;324(6097):582-5). Ein epigenetischer Effekt, der an der Untermethylierung des Amyloid Precursor

Proteins, beteiligt ist, welches mit der Ausbildung der Erkrankung in Zusammenhang steht, wird bei der Alzheimer Erkrankung vermutet (West RL, Lee JM, Maroun LE, Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci.* 1995;6(2):141-6). Auch auf chromosomaler Ebene spielt der Methylierungsstatus eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird bei mentalen Retardierungssyndromen, die mit der Fragilität des X-Chromosoms gekoppelt sind, der Grad der Chromosomenbrüchigkeit durch die Methylierung bestimmt (de Muniain AL, Cobo AM, Poza JJ, Saenz A, [Diseases due to instability of DNA]. *Neurologia.* 1995 Dec;10 Suppl 1:12-9).

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

werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

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.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnick, M. et al., *Eur. J. Hum. Gen.* 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., *Nat. Genet.* 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., *Nucl. Acids Res.* 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., *Nucl. Acids. Res.* 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), *Bioassays* 16, 431; Zeschnik, M. et al. (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.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem.* 60: 2299-2301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer

verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nucleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995)), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1*: 147-157.) Für Nucleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nucleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnucleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

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

Aufgabenstellung

Die vorliegende Erfindung soll Oligonucleotide und/oder PNA-Oligomere zur Detektion von Cytosin-Methylierungen und ein Verfahren bereitstellen, welches sich zur Diagnose

bestehender Erkrankungen oder der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen durch Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter besonders eignet.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Satz von mindestens 10 Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) dienen. Mit diesen Sonden ist die Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder für die Diagnose der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen möglich.

Genetische Parameter im Sinne dieser Erfindung sind Mutationen und Polymorphismen der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) und zu ihrer Regulation weiterhin erforderliche Sequenzen. Insbesondere sind als Mutationen Insertionen, Deletionen, Punktmutationen, Inversionen und Polymorphismen und besonders bevorzugt SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) zu bezeichnen. Polymorphismen können aber ebenso Insertionen, Deletionen oder Inversionen sein.

Epigenetische Parameter im Sinne dieser Erfindung sind insbesondere Cytosin-Methylierungen und weitere chemische Modifikationen von DNA-Basen der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) und zu ihrer Regulation weiterhin erforderliche Sequenzen. Weitere epigenetische Parameter sind beispielsweise die Acetylierung von Histonen, die jedoch mit dem beschriebenen Verfahren nicht direkt analysiert werden kann, sondern wiederum mit der DNA-Methylierung korreliert.

Aus der besagten chemisch vorbehandelten DNA werden mindestens 18 Basenpaare lange Abschnitte aus Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 für die Diagnose benutzt. Als Detektoren für diese Abschnitte werden Oligomere mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden verwendet.

Die Oligomere enthalten mindestens ein CpG Dinukleotid. Das Cytosin des entsprechenden CpG Dinukleotids befindet sich in etwa im mittleren Drittel des Oligomers. Entscheidend ist, dass im jeweiligen Satz von Oligomeren für zumindest jedes der CpG Dinukleotide mindestens ein Oligonukleotid aus Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 vorhanden

ist.

Die Oligomere werden auf einem Trägermaterial in einer fixierten Anordnung hergestellt, wobei mindestens ein Oligomer an eine feste Phase gekoppelt wird.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang ferner, dass man zur Diagnose von genetischen und/oder epigenetischen Parametern der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) nicht einzelne CpG Dinukleotide, sondern die Mehrzahl der in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide analysieren muss. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind alle in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide zu untersuchen.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens ist mindestens ein Oligomer an eine Festphase gebunden.

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden mindesten zehn der Oligomere zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomischer DNA verwendet.

Die Oligomere werden vorzugsweise verwendet zur Diagnose von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, Krebserkrankungen, CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Erkrankungen, aggressiven Symptomen oder Verhaltensstörungen, klinischen, psychologischen und sozialen Folgen von Gehirnverletzungen, psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen, Demenz und/oder assoziierten Syndromen, kardiovaskulärer Krankheit, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des gastrointestinalen Traktes, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Atmungssystems, Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen, endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung, Kopfschmerzen und sexuellen Fehlfunktionen durch Analyse von Methylierungsmustern.

Auch von den im Anhang aufgelisteten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) wird vorzugsweise mindestens eine verwendet für die Analyse eines Satzes genetischer

und/oder epigenetischer Parameter zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder für die Diagnose der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen.

Ferner wird ein Verfahren zur Ermittlung von bedeutenden genetischen und/oder epigenetischen Parametern zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen durch Analyse von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben beschrieben. Dazu geht man in folgenden Schritten vor:

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

Dem durchschnittlichen Fachmann wird verständlich sein, dass die Oligomere bei einem Austausch von Thymin gegen Uracil in den verwendeten Sequenzen den gleichen Zweck erfüllen.

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

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

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

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

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

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

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

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens umfasst der Satz von Primeroligonukleotiden mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils revers komplementär oder identisch zu einem mindestens 18 Basenpaare langen Abschnitt der im Anhang (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) aufgelisteten Basensequenzen sind. Die Primeroligonukleotide sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass sie kein CpG Dinukleotid enthalten.

Erfindungsgemäss bevorzugt ist ferner, dass unterschiedliche Oligomere auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens findet die Amplifikation durch Verlängerung von Primeroligonukleotiden statt, die an eine Festphase gebunden sind.

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

Die im zweiten Verfahrensschritt erhaltenen Amplifikate werden anschließend an einen Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA- Sonden der oder an ein Array hybridisiert. Der bei der Hybridisierung verwendete Satz besteht bevorzugterweise aus mindestens 10 Oligomer Sonden. Die Amplifikate dienen dabei als Sonden, die an vorher an einer Festphase gebundene Oligonukleotide hybridisieren. Die nicht hybridisierten Fragmente werden anschließend entfernt.

Die besagten Oligomere umfassen mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von 9 Nukleotiden, die mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des entsprechenden CpG Dinukleotids befindet sich in etwa im mittleren Drittel des Oligomers. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oligonukleotid vorhanden.

Im vierten Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

Im letzten Verfahrensschritt detektiert man die hybridisierten Amplifikate.

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

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

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

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

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

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

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

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

Erfindungsgemäss bevorzugt ist die Verwendung eines Verfahrens zur Diagnose

bestehender Erkrankungen oder der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen durch Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenden Reagenz, einen Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einen 18 Basenpaaren langen Abschnitt der im Anhang aufgeführten Basensequenzen (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) entsprechen oder zu ihnen komplementär sind zur Herstellung der Amplifikate, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere sowie eine Anleitung zur Durchführung und Auswertung des beschriebenen Verfahrens.

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment des mit dem vererbaren non-polyposis Colorektalkrebs assoziierten Gens hMLH1, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrosulfit, 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 im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 M und 6 M 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 (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Beispiel werden Cytosine des Gens hMLH1, hier aus einer 1551 bp großen 5' flankierenden Region, untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden AGCAACACCTCCATGCACTG und TTGATTGGACAGCTTGAATGC ein definiertes Fragment der Länge 719 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer

Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise GAAGAGCGGACAG, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 588 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.
2. Oligomer (Oligonukleotid oder Peptide Nucleic Acid (PNA)-Oligomer) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an eine chemisch vorbehandelte DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) hybridisiert.
3. Oligomer gemäß Anspruch 2, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt.
4. Oligomer gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet.
5. Satz von Oligomeren gemäß Anspruch 3, umfassend mindestens ein Oligomer für zumindest eines der CpG Dinukleotide einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.
6. Satz von Oligomeren gemäß Anspruch 5, umfassend für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 mindestens ein Oligomer.
7. Satz von mindestens zwei Nukleinsäuren gemäß Anspruch 2, die als Primeroligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Sequenzen gemäß mindestens einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 oder Abschnitten davon eingesetzt werden.
8. Satz von Oligonukleotiden gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.
9. Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomischer

DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712, umfassend mindestens zehn der Oligomere gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4.

10. Verfahren zur Herstellung einer auf einem Trägermaterial fixierten Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustandes der CpG Dinukleotide einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 stehenden Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4 an eine feste Phase gekoppelt wird.

11. An eine Festphase gebundene Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) nach einem der Ansprüche 2 bis 4.

12. Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

13. Array gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

14. DNA- und/oder PNA-Array zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand von Genen stehenden Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure gemäß einem der voranstehenden Ansprüche umfaßt.

15. Verfahren zur Ermittlung von genetischen und/oder epigenetischen Parametern zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen durch Analyse von Cytosin-Methylierungen, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:

a) in einer genomischen DNA-Probe werden durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil oder eine andere vom Basenpaarungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base umgewandelt;

b) aus dieser chemisch vorbehandelten genomischen DNA werden Fragmente unter

Verwendung von Sätzen von Primeroligonukleotiden gemäss Anspruch 7 oder 8 und einer Polymerase amplifiziert, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung tragen;

c) Amplifikate werden an einen Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA- Sonden gemäß der Ansprüche 2 bis 4 oder aber an ein Array gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13; hybridisiert

d) die hybridisierten Amplifikate werden anschließend nachgewiesen.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt.

17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert werden, die 100 - 2000 Basenpaare lang sind.

18 . Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.

19. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerase eine hitzebeständige DNA-Polymerase ist.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.

21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.

22. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.

23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet dass die Markierungen der Amplifikate ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate oder Fragmente der Amplifikate im Massenspektrometer nachgewiesen werden.

25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 23 und/oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.

27. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die genomische DNA aus Zellen oder Zellbestandteilen erhalten wurde, welche DNA enthalten, wobei Quellen von DNA z. B. Zelllinien, Biopsien, 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 Kombinationen hiervon umfassen.

28. Kit, umfassend ein Bisulfit (= Bisulfit, Hydrogensulfit) Reagenz sowie Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4.

29. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, eines Oligonukleotids oder PNA-Oligomers gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, eines Kits gemäß Anspruch 28 oder eines Arrays gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13 zur Diagnose und/oder Therapie von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, Krebserkrankungen, CNS-Fehlfunktionen, aggressiven Symptomen oder Verhaltensstörungen, klinischen, psychologischen und sozialen Folgen von Gehirnverletzungen, psychotischen Störungen und Persönlichkeitsstörungen, Demenz und/oder assoziierten Syndromen, kardiovaskulärer Krankheit, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des gastrointestinalen Traktes, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Atmungssystems, Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der

Knochen, endokriner und metabolischer Fehlfunktion, Kopfschmerzen, sexuellen Fehlfunktionen durch Analyse von Methylierungsmustern.