(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 201 21 977 U1** 2004.02.05

(12) # Gebrauchsmusterschrift

(22) Anmeldetag: **15.03.2001**
(67) aus Patentanmeldung: **P 01 92 3666.0**
(47) Eintragungstag: **24.12.2003**
(43) Bekanntmachung im Patentblatt: **05.02.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07H 21/04**
C12Q 1/68, C12N 15/11, A61K 31/7088

(66) Innere Priorität:

100 13 847.0	**15.03.2000**
100 19 058.8	**06.04.2000**
100 19 173.8	**07.04.2000**
100 32 529.7	**30.06.2000**
100 43 826.1	**01.09.2000**

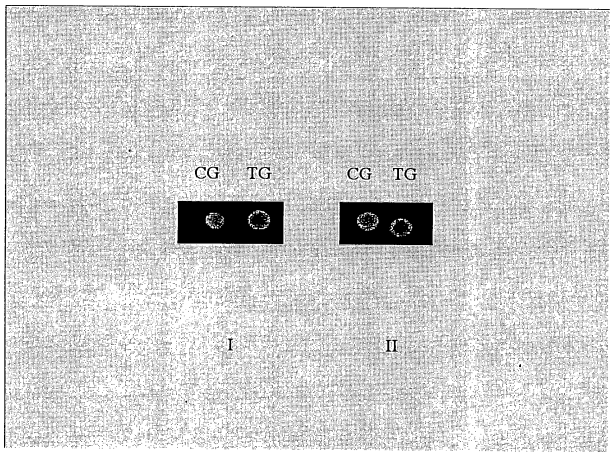
(71) Name und Wohnsitz des Inhabers:
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Nukleinsäuren für die Diagnose von mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Krankheiten**

(57) Hauptanspruch: Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, gemäß einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von Seq. IDNo. 1 bis Seq. IDNo. 536 und dazu komplementärer Sequenzen.



Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] 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.
[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, Oligonukleotide, PNA-Oligomere und ein Verfahren zur Diagnose von Erkrankungen, die mit dem genetischen und/oder epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind und insbesondere deren Methylierungsstatus in Zusammenhang stehen.

Stand der Technik

[0003] Es besteht ein Bedarf für die Entwicklung von alternativen Verfahren der Behandlung und Diagnose von Krebspatienten. Augenblickliche Verfahren der Behandlung, wie zum Beispiel Radiotherapie und Chemotherapie, sind oft von unangenehmen Nebenwirkungen begleitet und gegen viele Formen von Krebs ineffektiv.
[0004] Die Genetik von Krebs ist kompliziert und schließt viel dominante positive Regulatoren des transformierten Zustands (Onkogene) sowie viele rezessive negative Regulatoren (Tumorsuppressorgene) ein. Ungefähr 100 Onkogene wurden identifiziert. Die Onkogene fallen in mehrere Gruppen, die verschiedene Typen von Aktivitäten repräsentieren, die von Transmembranproteinen zu Transkriptionsfaktoren reichen. Im Augenblick sind ungefähr 10 Tumorsuppressorgene bekannt. Sie stellen den Verlust von Funktionen in Genen dar, die gewöhnlicher Weise einige Unterdrückung auf Tumorsuppressorgene und Onkogene oder das Zellwachstum ausüben, wobei ein Loslassen der Unterdrückung tumorigen ist. Zusätzlich zu den Verlust von Heterozygozität und spontaner Mutation in Genen existiert ein weiterer Mechanismus, der zu Tumorbildung führen kann. Von der epigenetischen Fehlregulation von Genen wurde gezeigt, dass sie an der Bildung von Tumoren beteiligt ist. Der am besten charakterisierte epigenetische Parameter ist der von genomischer Methylierung, der kovalenten Modifikation der CS-Position von Cytosin. Methylierungsanomalien bei Krebs schließen Punktmutationen, globale Hypomethylierung, Hypomethylierung von einzelnen Genen, Hypermethylierung von CpG Inseln und den Verlust von Imprinting ein.
[0005] Die hohe Rate von Mutationen innerhalb der CpG Inseln kann zu Krebs führen. Methylierte Cytosinbasen können spontan deaminieren, um Uracil zu bilden. Die Mismatchreparatur kann dann durch DNA-MTase beeinträchtigt werden, was zu einer Cytosin zu Thiamidin Transition führt. Ein gutes Beispiel davon ist das p53 Gen. eine Mutationen in diesem Genen ist in mehr als 50 % aller Tumore vorhanden, von denen abgeschätzte 24 % Cytosin zu Thymidin Transitionen an CpG Dinucleotiden sind.
[0006] Abnehmende Spiegel von globaler Methylierung ist in vielen Formen von Tumoren verbreitet. Eine Hypomethylierung von einzelnen Genen wurde auch beobachtet. Eine inverse Beziehung zwischen Spiegeln von Methylierung und der Zellteilung wurde in dem bcl-2 Gen (lymphocytische Leukämie) und dem k-ras Proto-Onkogen in Lungen- und Colonkarzinomen beobachtet.
[0007] Das p16 Gen ist ein Schlüssel-Tumorsuppressorgene und Onkogene regulatorisches Gen. Das p16 Protein stoppt das Fortschreiten des Zellzyklus an der G1/S Grenze, und der Verlust der p16 Funktionen kann zum Fortschreiten von Krebs führen, durch ein Ermöglichen von nicht regulierter Zellteilung. Die Hypermethylierungs vermittelte Inaktivierung des p16 Gens wurde in Hirn-, Brust-, Colon-, Kopf- und Nacken-, und nicht-kleine Zellen Lungenkrebs und in hochgradigem nicht-Hodgkin's Lymphom gezeigt.
[0008] Die Rolle der Methylierung bei der Tumorgenese wird durch Singal und Ginder 'DNA Methylation' Blood, Vol. 93 No. 12 (June 15), 1999: pp. 4059-4070 zusammenfassend beschrieben. Weitere Beispiele von Methylierungs-gekoppelter Onkogenese schließen ein:
[0009] Kopf- und Nackenkrebs (Sanchez-Cespedes M et al. „Gene promoter hypermethylation in tumours and serum of head and neck cancer patients" Cancer Res. 2000 Feb. 15;60 (4):892-5).
[0010] Hodgkin's Erkrankung (Garcia JF et al „Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16INK4A gene is a frequent finding in Hodgkin's disease" Lab invest 1999 Dec; 79 (12):1453-9):
[0011] Magenkrebs (Yanagisawa Y et al. „ Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability" Int J Cancer 2000 Jan 1; 85 (1):50-3).
[0012] Die Identifizierung der Methylierungs-abhängigen Regulation von Krebsgenen hat die Möglichkeit eröffnet, alternativen Verfahren der Krebsbehandlung und Diagnose zu entwickeln. Von der Behandlung mit DNA Methylierungsinhibitoren wurde gezeigt, daß sie die Genexpression des Schlüssel-Tumorsuppressorgene and Onkogens Gen p16 wiederherstellen, Bender et. al. "Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine

suppresses the growth of human tumor cell lines." Cancer research 58; 95-101 (1998). Dies führte zu erheblichen Spiegeln an Genexpression, was zur Suppression von Wachstum in Tumorzellinien führte.

[0013] Methylierungs-basierte Therapien könnten beträchtliche Vorteile über die augenblicklichen Verfahren der Behandlung, wie z. B. Chemotherapie, Chirurgie und Radiotherapien aufweisen. Sie könnten sogar ein Mittel zur Verfügung stellen, Tumore zu behandeln, die gegenüber herkömmlichen Verfahren der Behandlung resistent sind, wie durch Soengas et al "Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma" Nature 409; 207-211(2001) gezeigt. Zusätzlich zu der Entwicklung von Methylierungs-spezifischen Therapien, haben Experimente mit Min-Mäusen gezeigt, daß die Inhibierung der DNA Methylierung die Tumorinitiation unterdrücken kann, Laird et. al. 'Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation' Cell 81; 197-205 (1995). Weiterhin kann die DNA Methylierungsanalyse neue Mittel zur Krebsdiagnose zur Verfügung stellen.

[0014] 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer 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.

[0015] 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, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6). 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.

[0016] 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.

[0017] Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;S(2):94-8) 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, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. Nat Genet. 1997 Nov;17(3):275-6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion" (Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31, WO 95/00669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2532-4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99/28498).

[0018] Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. Bioessays. 1994 Jun;16(6):431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. Hum Mol Genet. 1997 Mar;6(3):387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Feb 25;22(4):695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4; WO 97/46705, WO 95/15373 und WO 98/45560.

[0019] Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im

Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

[0020] Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

[0021] Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988 Oct 15;60(20):2299-301). 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.

[0022] MALDI-TOF Spektrometrie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut I G, Beck S. DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Current Innovations and Future Trends. 1995, 1; 147-57). Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektrometrie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrizes gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrizes, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut IG, Beck S. A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 1995 Apr 25;23(8):1367-73). 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.

[0023] 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.

Definition der Aufgabe

[0024] Die vorliegende Erfindung ist dazu gedacht, Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere zur Detektion von Cytosin-Methylierungen sowie ein Verfahren bereitzustellen, welches sich zur Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, besonders eignet. Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß sich die Cytosin-Methylierungsmuster zur Diagnose und/oder der Therapie von mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Erkrankungen besonders eignen.

Beschreibung

[0025] Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die chemisch modifizierte DNA von Genen zur Verfügung zu stellen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, sowie Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere zur Detektion von Cytosin-Methylierungen sowie ein Verfahren bereitzustellen, welches sich zur Diagnose und/oder der Therapie von genetischen und epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, besonders eignet. Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß genetische und epigenetische Parameter und insbesondere die Cytosin-Methylierungsmuster von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, zur Diagnose und/oder der Therapie von mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Erkrankungen besonders eignen.

[0026] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das zur Verfügung stellen einer Nukleinsäure, die einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tu-

mor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene enthält, gelöst. In der Tabelle sind nach den aufgelisteten Gen-Bezeichnungen die jeweiligen Datenbanknummern (Zugangsnummern) angegeben, die die dazugehörigen Gensequenzen als einmalig definieren. GenBank am National Institute of Health wurde als die zu Grunde liegende Datenbank unter der Internet Adresse www.ncbi.nlm.nih.gov verwendet.

[0027] Die chemisch modifizierte Nukleinsäure konnte bisher nicht in Zusammenhang mit der Ermittlung von genetischen und epigenetische Parametern gebracht werden.

[0028] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung wird weiterhin durch ein Oligonukleotid oder Oligomer zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter DNA, umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 13 Nukleotiden gelöst, die an eine chemisch vorbehandelte DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene hybridisiert. Die erfindungsgemäßen Oligomersonden stellen wichtige und effektive Werkzeuge dar, welche die Ermittlung der genetischen und epigenetischen Parameter von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, erst ermöglichen. Bevorzugterweise umfaßt die Basensequenz der Oligomere mindestens ein CpG Dinukleotid. Die Sonden können auch in Form einer PNA (Peptide Nucleic Acid) vorliegen, die besonders bevorzugte Paarungseigenschaften aufweist. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße Oligonukleotide, bei denen das Cytosin des CpG Dinukleotids das 5. – 9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13-mers ist, im Falle von PNA-Oligomeren ist es bevorzugt, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids das 4. – 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9-mers ist.

[0029] Die erfindungsgemäßen Oligomere werden normalerweise in sogenannten Sets eingesetzt, die für jedes der CpG Dinukleotide eine der Sequenzen der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene mindestens ein Oligomer umfassen. Bevorzugt ist ein Set, das für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der Seq ID No. 1 bis Seq ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene mindestens ein Oligomer umfaßt.

[0030] Darüber hinaus stellt die Erfindung ein Set von mindestens zwei Oligonukleotiden zur Verfügung, die als sogenannte „Primer-Oligonukleotide" zur Amplifikation von DNA-Sequenzen einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene oder Abschnitten davon eingesetzt werden können.

[0031] Im Falle der erfindungsgemäßen Sets von Oligonukleotiden ist es bevorzugt, daß mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.

[0032] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin einen Satz von mindestens 10 n (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA (Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene) dienen. Mit diesen Sonden ist die Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind möglich. Das Set von Oligomeren kann auch zur Detektion von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene verwendet werden.

[0033] Erfindungsgemäß ist es bevorzugt, daß eine von der Erfindung zur Verfügung gestellte Anordnung aus unterschiedlichen Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren (ein sogenanntes "Array") ebenfalls an eine Festphase gebunden vorliegt. Dieses Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen kann dadurch gekennzeichnet sein, dass es auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet ist. Bevorzugterweise besteht die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold. Möglich sind jedoch auch Nitrocellulose sowie Kunststoffe wie zum Beispiel Nylon, die in Form von Kugeln oder auch als Harz-Matrizes vorliegen können.

[0034] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines auf einem Trägermaterial fixierten Arrays zur Analyse in Zusammenhang mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer gemäß der Erfindung an eine feste Phase gekoppelt wird. Verfahren zur Herstellung von solchen Arrays sind zum Beispiel aus der US 5,744,305 mittels Festphasenchemie und photolabilen Schutzgruppen bekannt.

[0035] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft einen DNA-Chip zur Analyse in Zusammenhang mit Tu-

mor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt. DNA-Chips sind zum Beispiel aus der US 5,837,832 bekannt.

[0036] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit, das zum Beispiel aus einer Bisulfit enthaltenden Reagenz, einem Satz von Primeroligonukleotiden umfassend mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils mindestens einen 18 Basenpaaren langen Abschnitt der im Anhang aufgeführten Basensequenzen (Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene), Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren sowie einer Anleitung zur Durchführung und Auswertung des beschriebenen Verfahrens bestehen kann. Ein Kit im Sinne der Erfindung kann jedoch auch nur Teile der vorgenannten Bestandteile enthalten.

[0037] Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Ermittlung von genetischen und/oder epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind durch Analyse von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen zur Verfügung, das folgende Schritte umfaßt:

[0038] In einem ersten Verfahrensschritt wird eine genomische DNA-Probe derart chemisch behandelt, daß an der 5'-Position nicht-methylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base umgewandelt werden. Dies wird im folgenden unter „chemischer Vorbehandlung" verstanden.

[0039] Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie Zellen oder Zellbestandteilen, zum Beispiel Zellinien, Biopsine, 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 oder Kombinationen davon.

[0040] Bevorzugt wird dazu die oben beschriebene Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse angewendet, die zu einer Umwandlung nicht methylierter Cytosin-Nukleobasen in Uracil oder eine andere vom Basenpaarungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base führt.

[0041] Aus dieser chemisch vorbehandelten genomischen DNA werden Fragmente unter Verwendung von Sätzen von erfindungsgemäßen Primer-Oligonukleotiden und einer bevorzugterweise hitzestabilen Polymerase amplifiziert. Aus statistischen und praktikablen Erwägungen werden bevorzugterweise mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert, die 100 – 2000 Basenpaare lang sind. Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten kann simultan in ein und demselben Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Üblicherweise wird die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt.

[0042] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfaßt der Satz von Primer-Oligonukleotiden mindestens zwei Oligonukleotide, deren Sequenzen jeweils revers komplementär oder identisch zu einem mindestens 18 Basenpaare langen Abschnitt der im Anhang (Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen und/oder der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene) aufgelisteten Basensequenzen sind. Die Primer-Oligonukleotide sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie kein CpG Dinukleotid enthalten.

[0043] Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß bei der Amplifikation mindestens ein Primer-Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist. Die unterschiedlichen Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen können auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sein, wobei die Festphasenoberfläche bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht, wobei auch andere Materialien, wie Nitrocellulose oder Kunststoffe verwendet werden können.

[0044] Die mittels der Amplifikation erhaltenen Fragmente können eine direkt oder indirekt nachweisbare Markierung tragen. Bevorzugt sind Markierungen in Form von Fluoreszenzmarkierungen, Radionukliden oder ablösbaren Molekülfragmenten mit typischer Masse, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden können, wobei bevorzugt ist, dass die erzeugten Fragmente zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen. Der Nachweis kann mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchgeführt und visualisiert werden.

[0045] Die im zweiten Verfahrensschritt erhaltenen Amplifikate werden anschließend an einen Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA- Sonden der oder an ein Array hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt dabei auf die unten angegebene Art und Weise. Der bei der Hybridisierung verwendete Satz besteht bevorzugterweise aus mindestens 10 Oligonukleotid oder PNA-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 Oligonukleotide umfassen mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von 13 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der im Anhang aufgeführten Basensequenzen ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des CpG Dinukleotids ist das 5. bis 9. Nukleotid vom 5'-Ende des 13 mers aus betrachtet. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oli-

gonukleotid vorhanden. Die besagten PNA-Oligomere umfassen mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von 9 Nukleotiden, die revers komplementär oder identisch zu einem Abschnitt der im Anhang aufgeführten Basensequenzen ist, der mindestens ein CpG Dinukleotid enthält. Das Cytosin des CpG Dinukleotids ist das 4. bis 6. Nukleotid vom 5'-Ende des 9-mers aus gesehen. Für jedes CpG Dinukleotid ist ein Oligonukleotid vorhanden.

[0046] Im vierten Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

[0047] Im letzten Verfahrensschritt detektiert man die hybridisierten Amplifikate. Dabei ist bevorzugt, daß an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.

[0048] Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Molekülfragmente mit typischer Masse sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden können. Der Nachweis der Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer ist bevorzugt, wobei man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführen und visualisieren kann.

[0049] Zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer können die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen. Bevorzugt wird das vorgenannte Verfahren zur Ermittlung von genetischen und/oder epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, verwendet.

[0050] Die erfindungsgemäßen Oligomere oder Arrays derselben sowie ein erfindungsgemäßes Kit sollen zur Diagnose und/oder Therapie einer mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Krankheit durch Analyse von Methylierungsmustern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, verwendet werden. Erfindungsgemäss bevorzugt ist die Verwendung des Verfahrens zur Diagnose und/oder Therapie bedeutender genetischer und/oder epigenetischer Parameter innerhalb von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind.

[0051] Das erfindungsgemäße Verfahren dient zum Beispiel der Diagnose und/oder der Therapie von soliden Tumoren und Krebsarten.

[0052] Auch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementäre Sequenzen und/oder die chemisch vorbehandelte DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Sequenzen der in Tabelle 1 aufgelisteten Gene können für die Diagnose und/oder der Therapie von genetischen und/oder epigenetischen Parametern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, verwendet werden.

[0053] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums und/oder Therapeutikums zur Diagnose und/oder der Therapie von Krankheiten, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind durch Analyse von Methylierungsmustern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, wobei das Diagnostikum und/oder das Therapeutikum dadurch gekennzeichnet ist, dass mindestens eine Nukleinsäure, gemäß der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen zu dessen Herstellung verwendet wird.

[0054] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum für Krankheiten, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, durch Analyse von Methylierungsmustern von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, wobei das Diagnostikum und/oder Therapeutikum dadurch gekennzeichnet ist, das es mindestens eine Nukleinsäure gemäß der Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen enthält.

[0055] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, bei dem die mittels der Erfindung erhaltenen bedeutenden genetischen und/oder epigenetischen Parameter innerhalb von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind mit einem anderen Satz genetischen und/oder epigenetischen Parameter verglichen werden können und die so erhaltenen Unterschiede als Basis für eine Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen dienen.

[0056] Unter dem Begriff "Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine Bindung unter Ausbildung einer Duplex-Struktur eines Oligonukleotids an eine vollständig komplementäre Sequenz im Sinne der Watson-Crick Basenpaarungen in der Proben DNA zu verstehen. Unter "stringenten Hybridisierungsbedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung bei 60°C in 2,5 x SSC-Puffer, gefolgt von mehreren Waschschritten bei 37°C in einer geringeren Pufferkonzentration erfolgt und stabil bleibt.

[0057] Mit dem Begriff "funktionelle Varianten" sind alle DNA-Sequenzen bezeichnet, die komplementär zu einer DNA-Sequenz sind, die unter stringenten Bedingungen mit der Referenzsequenz hybridisieren und eine zu dem entsprechenden erfindungsgemäßen Polypeptid ähnliche Aktivität aufweisen.

[0058] "Genetische Parameter" im Sinne dieser Erfindung sind Mutationen und Polymorphismen von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind und zu deren Regulation weiterhin erforderlicher Sequenzen. Insbesondere sind als Mutationen Insertionen, Deletionen, Punktmutationen, Inversionen

und Polymorphismen und besonders bevorzugt SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) zu bezeichnen.
[0059] "Epigenetische Parameter" im Sinne dieser Erfindung sind insbesondere Cytosin-Methylierungen und weitere chemische Modifikationen von DNA-Basen von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind und zu deren 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.
[0060] Die Erfindung soll nun im folgenden anhand der Sequenzen und Beispiele unter Bezugnahme auf die beigefügte Figur weiter verdeutlicht werden, ohne daß die Erfindung hierauf eingeschränkt wird.

Figur 1

[0061] **Fig.** 1 zeigte die Hybridisierung von Fluoreszenz-markierten Amplifikaten an ein Oberflächen-gebundenes Oligonukleotid. Probe I stammt von pilocytischem Astrocytom (Hirntumor)-Gewebe und Probe II stammt von Astrocytom Grad II (Hirntumor)-Gewebe. Die Fluoreszenz an einem Punkt zeigt die Hybridisierung des Amplifikats an. Die Hybridisierung an ein CG Oligonukleotid zeigt an, daß die Methylierung an der Cytosin-Position analysiert wird, die Hybridisierung an ein TG Oligonukleotid zeigt an, daß keine Methylierung an der Cytosin-Position analysiert wird.

Seq ID No. 1 bis Seq ID No. 536

[0062] Die Seq ID No. 1 bis Seq ID No. 536 zeigen Sequenzen der chemisch vorbehandelten genomischen DNAs von verschiedenen Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, gemäß der Erfindung. Sequenzen, die ungerade Sequenznummern haben (z.B., Seq. ID No. 1, 3, 5,...) zeigen in jedem Fall Sequenzen der chemisch vorbehandelten genomischen DNAs von verschiedenen Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind. Sequenzen, die gerade Sequenznummern aufweisen (z.B., Seq. ID No. 2, 4, 6, ...) zeigen in jedem Fall Sequenzen der chemisch vorbehandelten genomischen DNAs von verschiedenen Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, die komplementär zu den voranstehenden Sequenzen sind (z.B., die komplementäre Sequenz zu Seq. ID No. 1 ist Seq. ID No. 2, die komplementäre Sequenz zu Seq. ID No. 3 ist Seq. ID No. 4, usw.)

Seg. ID No. 537 bis Seq. ID No. 540

[0063] Seq. ID No. 537 bis Seq. ID No. 540 zeigen spezifische Oligonukleotid-Sequenzen, wie in Beispiel 1 verwendet.
[0064] Das folgende Beispiel betrifft ein Fragment eines Gens, das mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert ist, in diesem Fall MYC, wobei eine spezifische CG-Position auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert wird.

Beispiel 1: Methylierungsanalyse in dem mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Gen MYC

[0065] Das folgende Beispiel betrifft ein Fragment des Gens MYC, worin eine spezifische CG-Position auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert wird.
[0066] Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, daß alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, daß eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.
[0067] Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Chemisch umgewandelte DNA dient dann 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 Fall werden Cytosine des Gens MYC analysiert. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden TTTTGTGTGGAGGGTAGTTG (Seq. ID No. 537) und CCCCAAATAAACAAAATAACC (Seq. ID No. 538) ein definiertes Fragment der Länge 831 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise TAAGGATGCGGTTTGTTA (Seq. ID No. 539), wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 60 des Amplifikats befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primer-Oligonukleotiden, 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 kann der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt abgeleitet werden.

[0068] Um den Methylierungsstatus der Position zu überprüfen, wird eine Probe des Amplifikats weiterhin an ein anderes Oligonukleotid hybridisiert, das vorher an eine feste Phase gebunden wurde. Dieses Oligonukleotid ist identisch zu dem Oligonukleotid, das vorher benutzt wurde, um den Methylierungsstatus der Probe zu analysieren, mit der Ausnahme der fraglichen Position. An der zu analysierenden Position umfaßt das Oligonukleotid eine Thymin-Base, im Gegensatz zu einer Cytosin-Base d.h. die Sequenz TAAGGATGTGGTTTGTTA (Seq. ID No. 540). Daher findet die Hybridisierungsreaktion nur statt, falls ein nicht-methyliertes Cytosin an der zu analysierenden Positionen vorhanden ist.

[0069] Die Analyse wurde an zwei Gewebeproben durchgeführt, Probe 1 aus pilocytischem Astrocytom (Hirntumor) und Probe 2 aus Astrocytom Grad II (Hirntumor). Aus den Ergebnissen (**Fig.** 1) kann gesehen werden, daß Probe 1 an Position 60 des Amplifikat nicht methyliert war, wohingegen im Vergleich Probe 2 ein Gemisch von sowohl methylierten als auch nicht-methylierten Zellen an derselben Position aufwies.

Beispiel 2: Diagnose von mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Erkrankungen

[0070] Um einen Bezug der Methylierungsmuster zu einer der mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziierten Erkrankungen herzustellen, bedarf es zunächst der Untersuchung der DNA-Methylierungsmuster einer Gruppe von erkrankten und einer Gruppe von gesunden Personen. Diese Untersuchungen werden zum Beispiel analog dem Beispiel 1 durchgeführt. Die so erhaltenen Ergebnisse werden in einer Datenbank abgespeichert und die CpG Dinukleotide identifiziert, die zwischen den beiden Gruppen unterschiedlich methyliert sind. Dies kann durch Bestimmung einzelner CpG Methylierungsraten erfolgen, wie dies z. B. durch Sequenzieren relativ ungenau oder aber durch eine Methylierungs-sensitive „Primer-Extension-Reaktion" sehr genau möglich ist. Auch gleichzeitige Analyse des gesamten Methylierungsstatus ist möglich, und die Muster können z.B. mittels Clustering-Analysen, die z.B. durch einen Rechner durchgeführt werden können, verglichen werden.

[0071] Nachfolgend ist es möglich, untersuchte Patienten einer bestimmten Therapiegruppe zuzuordnen und diese Patienten gezielt mit einer individualisierten Therapie zu behandeln.

[0072] Beispiel 2 kann zum Beispiel für die folgenden Erkrankungen durchgeführt werden: Soliden Tumoren und Krebsarten.

[0073] Tabelle 1

[0074] Auflistung von bevorzugten Genen der vorliegenden Erfindung, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind.

Gen	Datenbank-Eintragungsnummer. (GenBank Internetadresse www.ncbi.nlm.nih.gov)
BRCA2	(U43746),
E2F1	(M96577),
ELE1	(X71413),
MN/CA9	(Z54349),
PVT1	(M26714),
SAC2	(AK001725),
TEM8	(AK025429),
TM4SF1	(X01394),
TNFSF11	(AF053712),
AXL	(NM_021913&NM_001699),
CCND3	(NM_001760),
CSF1R	(NM_005211),
MGMT	(NM_002412),
NOV	(NM_002514),
SFRS8	(NM_004592),
TNFRSF6	(NM_000043),
TPD52	(NM_005079),
AKT1	(NM_005163),

BCL2	(NM_000633&NM_000657),
CBL	(NM_005188),
CBLC	(NM_012116),
CRK	(NM_005206&NM_016823),
DCC	(NM_005215),
EPHA1	(NM_005232),
EPHA3	(NM_005233),
ETS1	(NM_005238),
ETV5	(NM_004454),
ETV6	(NM_001987),
FGF3	(NM_005247),
FGF4	(NM_002007),
FHIT	(NM_002012),
GLTSCR1	(NM_015711),
GPS1	(NM_004127),
GROS1	(NM_022356),
HIC1	(NM_006497),
IGFBP7	(NM_001553),
KISS1	(NM_002256),
KRAS2	(NM_004985),
LATS1	(NM_004690),
LOC51213	(NM_016383),
MUC1	(NM_002456),
MUC2	(NM_002457),
N33	(NM_006765),
PTTG1IP	(NM_004339),
SE20-4	(NM_022117),
SE70-2	(NM_022118),
SFN	(NM_006142),
ST7	(NM_013437),
SUPT3H	(NM_003599),
SUPT6H	(NM_003170),
TEM1	(NM_020404),

TERT	(NM_003219),
THRB	NM_000461),
TIMP2	(NM_003255),
TMEFF1	(NM_003692),
TNFAIP6	(NM_007115),
TNFRSF10A	(NM_003844),
TNFRSF10B	(NM_003842),
TNFRSF10C	(NM_003841),
TNFRSF11A	(NM_003840),
TNFRSF1A	(NM_001065),
TNFSF12	(NM_003809),
TNFSF13	(NM_003808),
TNFSF15	(NM_005118),
TNFSF18	(NM_005092),
TP63	(NM_003722),
TSSC1	(NM_003310),
VDR	(NM_000376),
YES1	(NM_005433),
FOXG1A	(NM_004471),
GRF2	(NM_005312),
HSPC070	(NM_014160),
RAB3A	(NM_002866),
RAB5A	(NM_004162),
APC	(NM_000038),
BMI1	(NM_005180),
CHES1	(NM_005197),
SMT3H1	(NM_006936),
TIAM1	(NM_003253),
VAV1	(NM_005428),
MCF2	(NM_005369),
MSH2	(NM_000251),
ERBB4	(NM_005235),
FOXG1B	(NM_005249),

TACSTD1	(NM_002354),
TRA1	(NM_003299),
FOXG1B	(NM_005249),
TACSTD1	(NM_002354),
FLI1	(NM_002017)

Schutzansprüche

1. Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, gemäß einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementärer Sequenzen.

2. Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt der chemisch vorbehandelten DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind, gemäß einer der Sequenzen gemäß einem der Gene BRCA2 (U43746), E2F1 (M96577), ELE1 (X71413), MN/CA9 (Z54349), PVT1 (M26714), SAC2 (AK001725), TEM8 (AK025429), TM4SF1 (X01394), TNFSF11 (AF053712), AXL (NM_021913&NM_001699), CCND3 (NM_001760), CSF1R (NM_005211), MGMT (NM_002412), NOV (NM_002514), SFRS8 (NM_004592), TNFRSF6 (NM_000043), TPD52 (NM_005079), AKT1 (NM_005163), BCL2 (NM_000633&NM_000657), CBL (NM_005188), CBLC (NM_012116), CRK (NM_005206&NM_016823), DCC (NM_005215), EPHA1 (NM_005232), EPHA3 (NM_005233), ETS1 (NM_005238), ETV5 (NM_004454), ETV6 (NM_001987), FGF3 (NM_005247), FGF4 (NM_002007), FHIT (NM_002012), GLTSCR1 (NM_015711), GPS1 (NM_004127), GROS1(NM_022356), HIC1 (NM_006497), IGFBP7 (NM_001553), KISS1 (NM_002256), KRAS2 (NM_004985), LATS1 (NM_004690), LOC51213 (NM_016383), MUC1 (NM_002456), MUC2 (NM_002457), N33 (NM_006765), PTTG1IP (NM_004339), SE20-4 (NM_022117), SE70-2 (NM_022118), SFN (NM _06142), ST7 (NM_013437), SUPT3H (NM_003599), SUPT6H (NM_003170), TEM1 (NM_020404), TERT (NM_003219), THRB NM_000461), TIMP2 (NM_003255), TMEFF1 (NM_003692), TNFAIP6 (NM_007115), TNFRSF10A (NM_003844), TNFRSF10B (NM_003842), TNFRSF10C (NM_003841), TNFRSF11A (NM_003840), TNFRSF1A (NM_001065), TNFSF12 (NM_003809), TNFSF13 (NM_003808), TNFSF15 (NM_005118), TNFSF18 (NM_005092), TP63 (NM_003722), TSSC1 (NM_003310), VDR (NM_000376), YES1 (NM_005433), FOXG1A (NM _04471), GRF2 (NM_005312), HSPC070 (NM_014160), RAB3A (NM_002866), RAB5A (NM_004162), APC (NM_000038), BMI1 (NM_005180), CHES1 (NM_005197), SMT3H1 (NM_006936), TIAM1 (NM_003253), VAV1 (NM_005428), MCF2 (NM_005369), MSH2 (NM_000251), ERBB4 (NM_005235), FOXG1B (NM_005249), TACSTD1 (NM_002354), TRA1 (NM_003299), FOXG1B (NM_005249), TACSTD1 (NM_002354), FLI1 (NM_002017) und dazu komplementärer Sequenzen.

3. Oligomer, insbesondere Oligonukleotid oder Peptide Nucleic Acid (PNA)-Oligomer, wobei das Oligomer in jedem Fall mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden umfaßt, die an eine chemisch vorbehandelte DNA von Genen, die mit Tumor-Suppressorgenen und Onkogenen assoziiert sind gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 nach Anspruch 1 oder eine chemisch vorbehandelte DNA von Genen nach Anspruch 2 und dazu komplementären Sequenzen hybridisiert oder dazu identisch ist.

4. Oligomer nach Anspruch 3, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt.

5. Oligomer nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet.

6. Satz von Oligomeren, umfassend mindestens zwei Oligomere nach einem der Ansprüche 3 bis 5.

7. Satz von Oligomeren nach Anspruch 6, umfassend Oligomere zur Detektion des Methylierungszustandes aller CpG Dinukleotide von einer der Sequenzen gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 nach Anspruch 1 oder einer chemisch vorbehandelten DNA eines Gens nach Anspruch 2 und dazu komplementärer Sequenzen.

8. Satz von mindestens zwei Oligonukleotiden nach Anspruch 3, die als Primer-Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Sequenzen einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementären Sequenzen oder einer chemisch vorbehandelten DNA eines Gens nach Anspruch 2 und dazu komplementären Sequenzen oder Abschnitten davon eingesetzt werden können.

9. Satz von Oligonukleotiden nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.

10. Auf einem Trägermaterial fixierten Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand der CpG Dinukleotide einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 536 und dazu komplementärer Sequenzen und/oder einer chemisch vorbehandelten DNA eines Gens nach Anspruch 2 stehenden Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer nach einem der Ansprüche 3 bis 5 an eine feste Phase gekoppelt vorliegt.

11. Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

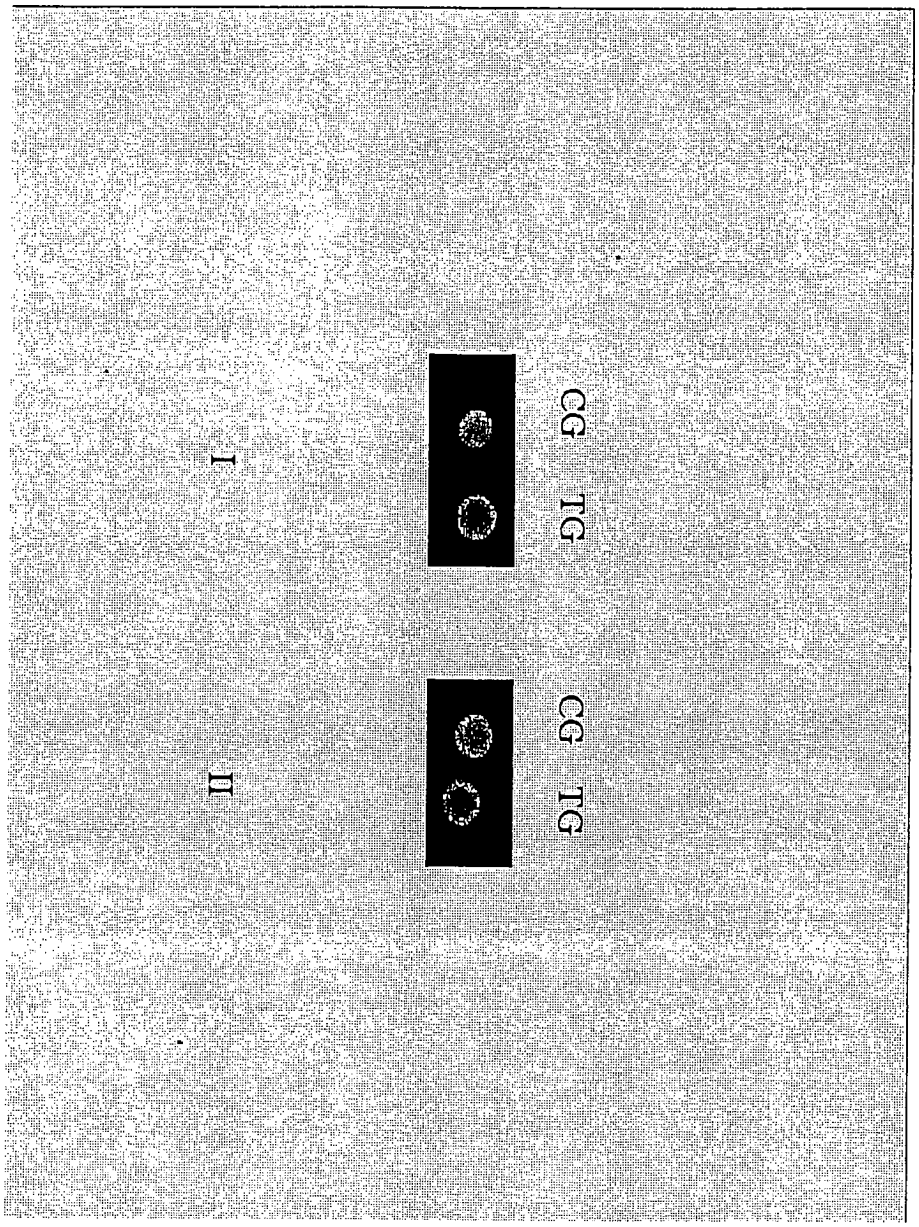
12. Array nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

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

14. Kit, umfassend ein Bisulfit (= Disulfit, Hydrogensulfit) Reagenz sowie Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere nach einem der Ansprüche 3 bis 5.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Figur 1