

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: AT 408 989 B

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2041/99  
 (22) Anmeldetag: 03.12.1999  
 (42) Beginn der Patentdauer: 15.09.2001  
 (45) Ausgabetag: 25.04.2002

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C12Q 1/68

(73) Patentinhaber:  
**FORSCHUNGSGESELLSCHAFT FÜR KREBSKRANKHEITEN  
KINDER**  
**A-1090 WIEN (AT).**

(72) Erfinder:  
**HAAS OSKAR A. DR.**  
**WIEN (AT).**  
**WEINHÄUSEL ANDREAS DR.**  
**WIEN (AT).**

(54) VERFAHREN ZUR DETEKTION UND EXALUIERUNG EINER POTENTIELL ABERRANT METHYLIERTEN DNS-REGION AM X-CHROMOSOM ODER DER KLONALITÄT

AT 408 989 B

(57) Verfahren zur Detektion und Evaluierung einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom oder der Klonalität, wobei in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und gegebenenfalls das Ausmaß der Methylierung in einem sicher physiologisch methylierten DNS-Bereich des X-Chromosoms und/oder das Ausmaß der Methylierung sowie gegebenenfalls die Sequenzvariante einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen und gegebenenfalls der Sequenzvariante das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration oder der Klonalität diagnostiziert wird.

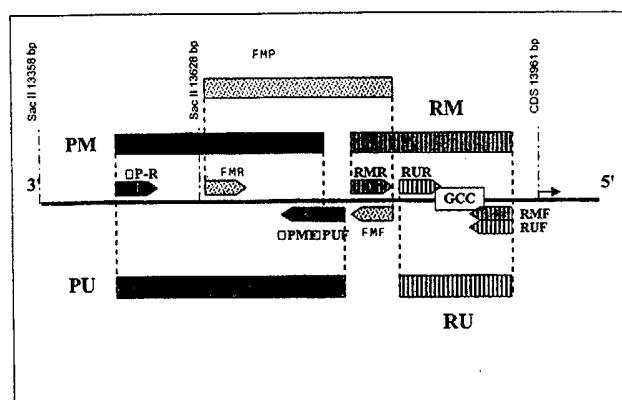


Fig. 1

Es wird ein Verfahren zur Detektion und Evaluierung einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom oder der Klonalität zur Verfügung gestellt, die Verwendung eines solchen Verfahrens sowie ein Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Die DNS, Träger der genetischen Information, liegt im Zellkern der Eukaryonten in strukturellen

- 5 Einheiten, den Chromosomen, dicht verpackt vor. Änderungen der Zahl oder aber der Struktur der Chromosomen sowie Veränderungen der DNS selbst, ohne dass diese mikroskopische Veränderungen an den Chromosomen herbeiführen, haben bei Menschen meist schwerwiegende Krankheitsbilder zur Folge. Krankheiten können auch infolge epigenetischer Veränderungen, wie etwa durch aberrante DNA-Methylierung hervorgerufen werden. Die Methylierung der DNA erfolgt durch
- 10 kovalente Bindung von Methylgruppen an die Nukleotide und stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar: Im Fall des Säugergenoms sind aktive Gene oder deren regulatorische Einheiten häufig untermethyliert, während inaktive DNA-Abschnitte sich häufig durch eine starke Methylierung auszeichnen. Dabei werden primär die Cytosin-Reste in CpG-Dinukleotiden in 5'-Position methyliert. Dementsprechend ist in methylierter DNA Methyl-Cytosin (mC) präferentiell als mCpG
- 15 in den CpG-Inseln der DNA vorzufinden. Diese sind zumeist in regulatorischen DNA-Einheiten zu finden und ursächlich nicht methyliert. Physiologisch findet man im diploiden Säugergenom mCpG in geprägten Genen, "imprinted genes", - in Abhängigkeit vom elterlichen Ursprung des jeweiligen Gens bzw. Chromosoms, in der Regel unmethylierte aktive DNA -, und methylierte inaktive DNA-Abschnitte. Somit werden "geprägte Gene" von nur einem der beiden homologen Chromosomen
- 20 exprimiert. Ein ähnliches Verhältnis findet sich in Zellen weiblicher Individuen zur Dosiskompensation von Genen, welche am X-Chromosom lokalisiert sind: da weibliche Zellen (XX) im Gegensatz zu den männlichen Zellen (XY) 2 X-Chromosomen tragen, wird eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert. Dabei ist dieses inaktive X-Chromosom, bzw. dessen DNA (in der Form mCpG) bis auf wenige Bereiche (XIC... X-Inaktivierungs-Zentrum, pseudoautosomale Bereiche) methyliert. Diese
- 25 X-Inaktivierung erfolgt im Laufe der Entwicklung eines Individuums zufällig (Random-X-Inaktivierung), wonach die Gesamtheit der Zellen aus einer Population von Zellen mit inaktivem väterlichen und aktivem mütterlichen X-Chromosom, sowie einer gleich großen Population von Zellen mit aktivem väterlichen und inaktivem mütterlichen X-Chromosom besteht. So kommt es zu einem Verhältnis von aktiven zu inaktiven (Xa/Xi) Allelen bezüglich ihres elterlichen Ursprungs von
- 30 Xa/Xi = 50/50. In vielen Fällen kann es bei weiblichen Individuen aber auch zu einer Abweichung von diesem 50/50-Verhältnis kommen, so dass zwar das Verhältnis von methylierten zu unmethylierten bzw. aktiven zu inaktiven X-Chromosomen (pro Zelle und auch pro Gesamtpopulation) von 1:1 aufrecht erhalten wird, aber die Größe der Zellpopulation mit dem aktiven/inaktiven X-Chromosom in Bezug auf dessen elterlichen Ursprung nicht gleich 50/50 ist. D.h. es ist die Zellpopulation (Klon) mit dem aktiven X-Chromosom des einen Elter (E1) größer und die mit dem aktiven X-Chromosom des anderen Elter (E2) kleiner, bzw. der Klon mit dem inaktiven X-Chromosom von E1 kleiner und jener mit dem inaktiven X-Chromosom von E2 größer. Dieses Phänomen der "verschobenen" Klongröße bzw. Klonalität wird durch den Begriff "skewed-X-inactivation" beschrieben, welches auch bei normalen Frauen mit zunehmendem Alter beobachtet werden kann.
- 35

- 40 Experimentell kann man die Methylierung von DNA, z.B. durch das Schneiden mit methylierungssensitiven Enzymen, durch mC spezifische Antikörper, durch genomisches Sequenzieren Bisulfit deaminierter DNA, selektive Hydrazin-Spaltung nicht-methylierter DNA, etc. nachweisen.

- 45 Weist ein DNA-Abschnitt eine fehlerhafte (aberrante) Methylierung auf (d.h. Hypermethylierung von physiologisch unmethylierter DNA oder aber Hypomethylierung physiologisch methylierter DNA), führt dies zumeist zu einer Deregelation der physiologischen Funktion dieses DNA-Abschnittes und kann in einer Krankheit resultieren. Häufig genügt die Feststellung des Phänotyps nicht, um die spezielle Krankheit zu diagnostizieren. Um die Krankheit mit Sicherheit feststellen zu können und auch die Variante bzw. die Krankheit zu diagnostizieren, ist in der Regel eine Untersuchung der Erbsubstanz des Patienten notwendig, insbesondere die Methylierung eines bestimmten DNA-Abschnitts.

- 50 Eine Reihe an Krankheiten wird durch eine Veränderung der DNA an einem X-Chromosom hervorgerufen. Beispielsweise kann ein DNA-Bereich am X-Chromosom methyliert werden, so dass dieses Gen inaktiviert wird. Zusätzlich kann z.B. durch eine Veränderung (Mutation) der DNA, etwa durch Expansion einer Repeatregion, die Genfunktion gestört und zudem methyliert werden (FraX-A, FraX-E, FraX-F (s. Carrel et al., American Journal of Medical Genetics 64: 27-30 (1996);
- 55

Hirst et al., Hum. Molec. Genet. 2: 197-200, 1993; Parrish et al., Nature Genet. 8: 229-235, 1994; Ritchie et al., Hum. Molec. Genet. 3: 2115-2121, 1994; Sutherland et al., Hum. Molec. Gent. 1: 111-113, 1992). In anderen Fällen können Krankheiten durch Veränderungen von DNA-Abschnitten bzw. ganzer Chromosomen (-bereiche) durch Duplikation, Insertion, Translokation bedingt sein.

5      Betrifft eine solche Veränderung das X-Chromosom bereits in den frühen Entwicklungsstadien eines Individuums, muss man in vielen Fällen von X-chromosomalen Erkrankungen sprechen. Auch bei sporadischen Erkrankungen, wie dies für viele Tumor-Erkrankungen gilt, konnten X-chromosomal Veränderungen nachgewiesen werden (Gale et al., Blood, Vol. 83, No. 10 (1994), 2899-2905). Demzufolge liegen unterschiedliche Varianten des X-Chromosoms nebeneinander oder aber auch unterschiedliche Zellpopulationen (Klone) neben dem normalen gesunden Klon vor. Diese Populationen (Klone) können sich einerseits im Allelmuster als auch im Methylierungsmuster der Allele bzw. des veränderten genetischen Materials unterscheiden (siehe Cammarata et al., Am. J. Med. Genet., 1999; 85(1): 86-7; ISSN: 0148-7299; Dierlamm et al., Br. J. Haematol., 1995; 91(4): 885-91; ISSN: 0007-1048; James et al., Ann. Hum. Genet., 1997; 61(6): 485-90; ISSN: 0003-4800; Leal et al., Hum. Genet., 1994; 94(4): 423-6; ISSN: 0340-6717; MacDonald et al., Hum. Mol. Genet., 1994; 3(8): 1365-71; ISSN: 0964-6906; und Martinez-Pasarell et al., Horm. Res., Oktober 1999; 51(5): 248-252; ISSN: 0301-0163).

10     Bei genetischen Untersuchungen wird das betroffene Gen bzw. der betroffene Genlokus mittels zytogenetischen, Southern blot-, PCR-, reverse Transkription PCR (RT-PCR)- bzw. immunologischen Analysen untersucht. In diesen Untersuchungen wird die Sequenz, die Expression, das Ausmaß der Methylierung, und ähnliches untersucht.

15     Das fragile X-Syndrom (FX- oder FRAXA-Syndrom) ist ein Beispiel für eine Erbkrankheit, wobei sie insbesondere Männer betrifft.

20     Der klinische Phänotyp des FX-Syndroms zeigt eine geringe bis sehr starke mentale Retardation, große Ohren, ein langes Gesicht, Hyperaktivität, autistische Charakterzüge, etc. Das FX-Syndrom resultiert aus einer funktionellen Störung oder einer unterdrückten Expression des FMR-1-Gens, welches in der telomerischen Region des langen Armes des X-Chromosoms, X (q27) lokalisiert ist. Meistens ist die Gentranskription durch eine unphysiologische Expansion eines polymorphen CGG-Triplet-Repeat-Bereichs am 5'-Ende des FMR-1-Gens gestört. In normalen Personen umfasst der FMR-1-Gen-Repeat-Bereich zwischen 6 und (48-) 54 Repeat-Einheiten, mit einem Häufigkeitsmaximum der Allelfrequenz mit einer Repeatlänge von etwa 30 Einheiten. Personen mit Allelen mit einer sogenannten Prämutation weisen zwischen (48-) 54 und 200 Repeat-Einheiten auf und zeigen ebenfalls keine klinischen Störungen. Im Bereich von 48-54 Repeat-Einheiten herrscht eine Grauzone, d.h., dass Patienten mit einer Repeat-Bereich-Länge von 48-54 Einheiten bei weiteren FX-Patienten in der Familie als Prämutationen eingestuft werden müssen. Personen mit Prämutationen haben ein erhöhtes Risiko, Vollmutationen an die nachfolgenden Generationen weiterzugeben, wobei diese Vollmutationen aus über 200-Triplet-Repeat-Einheiten bestehen. Das Risiko, Vollmutationen an nachfolgende Generationen weiterzugeben, hängt von der Größe der Prämutation, vom Geschlecht des Elternteils und der Stellung im Stammbaum dieses Elternteils ab. Personen mit größeren Prämutations-Allelen weisen ein höheres Risiko auf, Vollmutationen weiterzugeben als solche mit kürzeren Prämutationen. Dieses Phänomen betrifft jedoch nur Frauen, so dass Kinder von Müttern, die Prämutationen aufweisen, durch Vollmutationen betroffen sein können. Hingegen erben Kinder von Vätern mit einem Prämutations-Allel lediglich seine Prämutation.

25     Darüber hinaus können andere seltene Mutationen, wie z.B. kleine Deletionen der FMR-1-Genregion oder Punktmutationen innerhalb der kodierenden Sequenz, zum Fehlen oder zur Produktion eines nicht funktionsfähigen FMR-1-Proteins führen.

30     Es konnte gezeigt werden, dass der FMR-1-Genbereich mit einer normalen oder Prämutations-Repeat-Anzahl nicht-methyliert ist, während bei Vollmutationen Cytosin in CpG-Dinukleotiden im expandierten Repeat-Bereich als auch in der umgebenden 5'-Promotor-Region des FMR-1-Gens methyliert werden.

35     Nichtsdestotrotz können FMR-1-Allele mit sehr vielen Repeat-Einheiten (300-800) in vitro durch Behandlung mit demethylierenden Agentien, wie 5-Azadeoxycytidin, reaktiviert werden. Weiters wurden Männer gefunden, die obwohl sie eine Repeatzahl über 200 (Vollmutation) aufweisen, diese jedoch unmethyliert ist, eine normale Intelligenz und fast normale FMR-1-Proteinkonzentra-

tionen aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass eher die Denovo-Methylierung des FMR-1-Promotors als die Länge des expandierten Repeat-Bereiches die Genfunktion stört. Unterschiedliche Grade der Methylierung können unterschiedliche Grade der Krankheit zur Folge haben.

Gängige Verfahren zur Evaluierung des FX-Syndroms umfassen zytogenetische, Southern blot-, PCR-, reverse Transkription PCR (RT-PCR)- und immunohistochimische Analysen. Bei diesen Untersuchungen wird in der Regel die Größe des expandierten Repeat-Bereichs, die Denovo-Methylierung dieser Genregionen oder die Genexpression analysiert.

In der WO 92/14840 wird die Detektion von fragilem X-Syndrom mittels Restriktionsenzymen beschrieben, wobei diese Restriktionsenzyme beispielsweise nur die Stellen schneiden, die nicht methylierte Cytosine aufweisen. Die methylierte DNA wird somit im Gegensatz zur nicht-methylierten DNA verdaut, wobei die Verdauungsprodukte nachweisbar sind.

Die WO 91/09140 betrifft ein Oligonukleotid mit einer bestimmten Sequenz, welches an eine bestimmte Stelle, M54, der Region des fragilen Gens, bindet. Durch eine *in situ*-Hybridisierung mit dem markierten Oligonukleotid können Patienten mit fragilem X-Syndrom detektiert werden.

Die WO 92/20825 betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Diagnose des fragilen X-Syndroms, wobei einerseits die Menge an mRNA etwa durch RT-PCR oder die Menge des Proteins etwa mittels immunologischer Verfahren des FMR-1-Gens bestimmt wird. Eine weitere Methode zur Detektion des fragilen X-Syndroms besteht darin, die Repeat-Bereich-Länge zu bestimmen. Dies geschieht z.B. durch Verdauung des FMR-1-Gens mit Restriktionsenzymen bzw. PCR-Verfahren mit Primern, die für den Repeat-Bereich des FMR-1-Gens spezifisch sind, und anschließender Gelelektrophorese.

Auch das Verfahren gemäß der US 5 658 764 zur Detektion des fragilen X-Syndroms umfasst eine Größenmessung der GC-reichen Sequenz mit Hilfe von PCR-Verfahren.

Die Nachteile dieser beschriebenen Verfahren bestehen darin, dass die Bestimmung lediglich einer Genregion keine eindeutige Aussage bezüglich der Variante der Krankheit zulässt. Eine herkömmliche PCR eines einzigen Gen-Bereiches ergibt z.B. keine ausreichenden Ergebnisse, da im Falle des fragilen X-Syndroms beispielsweise Vollmutationen aufgrund ihres hohen CG-Gehalts und ihrer repetitiven Natur mittels PCR nicht amplifiziert werden können. Da negative Ergebnisse somit auch auf eine Vollmutation schließen lassen können, müsste anschließend immer eine Southern blot-Analyse durchgeführt werden. Diese Southern blot-Analysen bringen Informationen bezüglich der Repeat-Bereich-Länge sowie der Methylierung. Die Nachteile des Southern blots liegen darin, dass er zeitaufwendig ist, dass relativ große Mengen an DNA notwendig sind, was insbesondere bei pränatalen Analysen Schwierigkeiten darstellt, und auch die dabei übliche Verwendung von Radioisotopen ist für das Laborpersonal nachteilig. Ein Nachteil der PCR besteht darin, dass nicht zwischen einer Vollmutation und einer Prämutation unterschieden werden kann, insbesondere wenn ein Grenzfall Vollmutation/Prämutation vorliegt, d.h. dass die Länge des Repeat-Bereichs um 200 Einheiten liegt und die Sequenz teilweise methyliert bzw. nicht methyliert ist. Weiters ist die Unterscheidung zwischen einer Vollmutation und einem Mosaik (d.h. z.B. eine Vollmutation auf einem Allel und eine Prämutation oder eine Expansion im Normalbereich auf dem anderen Allel) problematisch bzw. unmöglich. Weiters sind diese bekannten Verfahren sehr zeitaufwendig, da mehrere Verfahrensschritte notwendig sind. Auch zeigen diese Methoden eine hohe "Falsch-Negativ"-Rate bei Frauen.

Die Schrift von Das et al. "Methylation analysis of the fragile X Syndrome by PCR" (Genetic testing, Volume 1, Number 3, 1997/98) betrifft ein Verfahren zur Detektion des fragilen X-Syndroms mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MS-PCR). Hierbei werden die nicht-methylierten Cytosinreste durch Zusetzen eines Agens in Urazil umgewandelt, während die methylierten Cytosinreste nicht umgewandelt werden. Bei der DNA-Replikation wird in der modifizierten DNA das Urazil durch Thymidin ersetzt. Durch die Konstruktion von spezifischen Primern, die entweder mit der modifizierten DNA-Sequenz hybridisieren, wird entweder die methylierte Sequenz oder die nicht-methylierte Sequenz amplifiziert. Werden Primer ausgewählt, die unterschiedliche Produktlängen ergeben, kann je nach PCR-Produkt bestimmt werden, ob die bestimmte Stelle des FMR-1-Gens methyliert ist oder nicht. Durch diese MS-PCR werden infolge der PCR-Amplifikation der nicht-methylierten Sequenz die normalen und prämutierten Allele von den Vollmutation und Mosaiksequenzen, - Amplifikation der methylierten Sequenz -, unterschieden. Normale und prämutierte Sequenzen müssen anschließend durch eine konventionelle PCR unterschieden werden (Seite 152, Spalte 2, 2. Absatz). In der konventionellen PCR werden nur normale Sequenzen (5-50

- Repeat-Einheiten) nicht aber prämutierte Sequenzen (50-200 Repeat-Einheiten) amplifiziert (s. Fig. 2B). Weiters kann gemäß dieser MS-PCR nicht zwischen Personen mit Vollmutationen und solchen mit einem Mosaik aus Vollmutation/Prämutation unterschieden werden. Für diese Bestimmung muss anschließend eine Southern blot-Analyse durchgeführt werden (s. Seite 153, 2. Spalte unten, bis Seite 154, 1. Spalte oben). Weiters ist es auch nicht möglich, mit Hilfe dieser MS-PCR das Krankheitsbild von Frauen zu testen, da das inaktive X-Chromosom immer methyliert ist und somit immer ein Produkt erhalten wird. Betroffene weibliche Patienten können demnach nur mit Hilfe der konventionellen Southern blot-Analyse richtig diagnostiziert werden (s. Seite 155, vorletzter Absatz).
- Selbst bei Durchführung der obgenannten Methoden in Kombination, ist im Falle eines Mosaiks eine Bestimmung der Klongröße, d.h. der Klonalität, nicht möglich, da hier lediglich die Methylierung bzw. Nicht-Methylierung qualitativ bestimmt wird. Diese kann nur durch Analyse eines zusätzlichen informativen (d.h. 2 voneinander unterscheidbare Allele) Genabschnittes erfolgen, wobei das Ausmaß einer "skewed X-Inaktivierung" durch Methylierungsanalyse eines solchen informativen Bereiches am X-Chromosom durchgeführt werden muß. Zudem ist dieser Bereich so zu wählen, dass das physiologische Methylierungsmuster von vornherein bekannt ist. Ein dazu oftmals herangezogener Genlokus ist das HUMARA (human androgen receptor) Gen (s. Pardini et al., The New England Journal of Medicine, Vol. 338, Nr. 5 (1998), 291-295; Kubota et al., Hum. Gent. (1999) 104: 49-55).
- Diese Problematik ergibt sich bei der Diagnostik aller X-chromosomaler Erkrankungen, deren zugehörige Genbereiche durch X-Inaktivierung unterschiedlich methyliert werden, insbesondere bei der Ermittlung der Variante der Erkrankung (Normal-/Prä-/Vollmutation) und Klonalität bzw. Klongröße. Als Beispiele seien hier nur FRAX-A, FRAX-E, FRAX-F, und diverse X-chromosomale Erkrankungen angeführt:
- Wie schon für das fragile X-Syndrom (FRAX-A) dargestellt, sind die Verhältnisse im Fall von PRAX-E und FRAX-F ähnlich, wobei ebenfalls Repeat-Expansion und einhergehende Methylierung zur Ausprägung der Erkrankung führen.
- Bei FRAXE-positiven Personen umfasst eine GCC-Repeat-Expansion, die neben einer CpG-Insel im Xq28 vorhanden ist, über 200 GCC-Einheiten, im Vergleich zu 6-25 GCC-Einheiten bei normalen Personen. Überdies ist bei FRAXE-positiven Personen die CpG-Insel methyliert. Diese Patienten weisen mentale Retardationen auf (s. Knight et al., Am. J. Hum. Gent. 53:A79, 1993; Knight et al., Cell 74: 127-134, 1993). Es wurde ein Gen, FMR2, identifiziert, das distal der CpG-Insel beim FRAXE transkribiert wird und durch Repeat-Expansion & Methylierung down-reguliert wird (Gu et al., Nature Gent. 13: 109-113).
- Bei FRAXF-positiven Patienten ist eine Expansion einer Sequenz (GCCGTC)<sub>n</sub>(GCC)<sub>m</sub> zu finden, wobei m mehr als 900 betragen kann und die daneben liegende CpG-Insel methyliert ist. In normalen Personen beträgt m 12 bis 26 und n 3 (Ritchie et al., Hum. Molec. Gent. 3: 2115-2121, 1994).
- Die Nachteile der bekannten Bestimmungstechniken liegen darin, dass zur Diagnose der Krankheiten und der Krankheitsvariante oft mehrere unterschiedliche Verfahrensschritte notwendig sind. In vielen Fällen ist eine eindeutige Aussage über das Krankheitsbild nicht möglich, da die angewandten Bestimmung nur Aussagen über einen spezifischen Gen-Bereich zulassen.
- Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es demnach, ein Verfahren zur Diagnose einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom oder der Klonalität zur Verfügung zu stellen, das rasch und einfach mit möglichst wenigen Verfahrensschritten durchgeführt werden kann, wobei zwischen den verschiedenen Varianten unterschieden wird, und das Verfahren sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Patienten zur Unterscheidung der verschiedenen Genotypen herangezogen werden kann.
- Das erfindungsgemäße Verfahren der eingangs angeführten Art ist dadurch gekennzeichnet,
- dass
- entweder in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und/oder das Ausmaß der Methylierung in einem sicher physiologisch methylierten DNS-Bereich des X-Chromosoms bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration diagnostiziert wird, oder

b) in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und/oder das Ausmaß der Methylierung sowie gegebenenfalls die Sequenzvariante einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen und gegebenenfalls der Sequenzvariante das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration oder der Klonalität diagnostiziert wird, oder

c) in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region, das Ausmaß der Methylierung in einem sicher physiologisch methylierten DNS-Bereich des X-Chromosoms, und das Ausmaß der Methylierung sowie die Sequenzvariante einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen und der Sequenzvariante das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration diagnostiziert wird.

Unter dem Ausmaß der Methylierung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung das Verhältnis von methyliertem und nicht-methyliertem Allel in einem Chromosom verstanden, d.h., dass in einer Reaktion gleichzeitig die methylierte und nicht-methylierte DNS bestimmt wird. Durch die gleichzeitige Bestimmung kann eine genaue und quantitative Aussage bezüglich des Verhältnisses von Methylierung und Nicht-Methylierung einer spezifischen Sequenz getroffen werden. Dadurch ist es möglich, das Ausmaß und die Variante der bestimmten Krankheit zu diagnostizieren.

Unter einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine DNS-Region verstanden, die methyliert oder nicht-methyliert ist. Wird diese DNS-Region durch Methylierung beeinflusst, kann durch aberrante Methylierung eine Krankheit hervorgerufen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine quantitative Methylierungsbestimmung der beiden Allele eines methylierten DNS-Bereichs und/oder die Bestimmung der Klongröße über die Methylierungsbestimmung einer polymorphen DNS-Region eine eindeutige und klare Auflösung des Methylierungsmusters und damit des Krankheitsbildes ergeben. Somit können die unterschiedlichen Genotypen sowohl von männlichen als auch von weiblichen Patienten voneinander unterschieden werden, da je nach Genotyp das Ergebnis ein spezifisches Muster aufweist.

Eine quantitative Methylierungsanalyse, welche bei Bestimmung der Klonalität (Klongröße) aussagekräftig ist, eignet sich zur Abklärung aller X-chromosomalen Erkrankungen, und auch jener Erkrankungen, welchen eine Abweichung von der normalen Anzahl an X-Chromosomen zugrunde liegt (Klinefelter-, Turner-, Multiples X-Syndrom), oder auch jener Krankheiten, deren betroffene Zellpopulation (Klon) X-Aneuploidie aufweist. Dies findet man sehr häufig bei verschiedenen Tumorerkrankungen und hämatologischen Neoplasien. Der Nachweis und eine Bestimmung der Klongröße/Klonalität dieser neoplastischen Erkrankungen ist für Diagnose und ein Monitoring ein wichtiger Parameter. Im Falle autosomaler Erkrankungen, welche geprägte Gene betreffen, liegen die Verhältnisse ähnlich.

Dabei kann auch das Ausmaß der Methylierung in einem sicher physiologisch methylierten DNS-Bereich des X-Chromosoms bestimmt werden. Der sicher physiologisch methylierte DNS-Bereich betrifft dabei lediglich ein Allel des X-Chromosoms, während das andere Allel nicht methyliert ist.

Ist dieses Ausmaß des sicher physiologisch methylierten DNS-Bereiches bekannt, so dient diese zusätzliche Kontrolle als interner Standard.

Einen diagnostischen Wert hat diese zusätzliche Analyse dann, wenn die potentiell aberrant methylierte DNS-Region Deletionen aufweist, so dass diese auch nicht nachgewiesen werden kann, unabhängig davon, ob sie Methylierungen aufweist oder nicht. Im Ergebnis würde dann der Nachweis der potentiell aberrant methylierten DNS-Region fehlen, jedoch würde der sicher physiologisch methylierte DNS-Bereich nachgewiesen werden. Somit kann auf eine Deletion geschlossen werden. Ohne diese zusätzliche Kontrolle wäre es nicht möglich zu sagen, ob die DNS-Region Deletionen aufweist, und somit nicht detektiert worden ist, oder ob der Nachweis nicht funktioniert hat.

Gemäß Punkt b) ist es aber auch möglich, als eventuelle zusätzliche Bestimmung das Ausmaß der Methylierung sowie gegebenenfalls die Sequenzvariante einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms zu bestimmen.

Unter einer polymorphen DNS-Region wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Varia-

bilität einer DNS-Sequenz verstanden, beispielsweise ein DNS-Abschnitt, der in einer Population verschiedene Allele aufweist, wie etwa die Länge eines bestimmten DNS-Abschnittes im Fall von Mikrosatelliten-Repeats oder Nukleotid- und Aminosäure-Polymorphismen. Die gleichzeitige Bestimmung des Ausmaßes der Methylierung der Sequenzvariante zusammen mit der Bestimmung des Ausmaßes der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region erlaubt eine sehr gute Aussage bezüglich der Variante oder auch der Klongröße der entsprechenden Krankheit.

Gemäß Punkt c) können diese drei verschiedenen Bestimmungen auch gleichzeitig durchgeführt werden, was eine maximale Aufklärung des Krankheitsbildes ergibt, da eine genaue Zuordnung der Variante der aberrant methylierten DNS-Region gewährleistet ist. Das Verfahren kann schnell durchgeführt werden und das Ergebnis ist fehlerfrei und leicht zu interpretieren. Mit diesem Verfahren können im Gegensatz zu den herkömmlichen Analyseverfahren sowohl männliche als auch weibliche Patienten untersucht werden. Diese Analyse gibt selbst in Grenzfällen eindeutige Ergebnisse.

Das Ausmaß der Methylierung kann dabei durch verschiedene Verfahren bestimmt werden, z.B. Methylierungs-spezifische Restriktionsenzyme, Oligonukleotide, die Methylierungs-spezifisch veränderte DNS-Abschnitte spezifisch erkennen und hybridisieren, etc. Auch die Sequenzvariante der polymorphen DNS-Region kann auf unterschiedliche Arten bestimmt werden, etwa mittels PCR oder mit Hilfe von Restriktionsenzymen.

Für eine rasche Analyse ist es besonders vorteilhaft, wenn die Bestimmung des Ausmaßes der Methylierung sowie gegebenenfalls die Bestimmung der Sequenzvariante mittels einer Methylierungs-spezifischen PCR (MS-PCR) durchgeführt wird, wobei Primer verwendet werden, mit welchen eine methylierte bzw. nicht-methylierte DNS-Region jeweils Methylierungs-spezifisch amplifiziert werden. Die Technik der MS-PCR ist eine einfache Methode, um zwischen methylierten Sequenzen und nicht-methylierten Sequenzen zu unterscheiden und wird, da die Methylierung bzw. Nicht-Methylierung häufig ein Indiz für eine genetisch bedingte Krankheit ist bzw. diese hervorruft, für die Diagnostik von Patienten herangezogen.

Die MS-PCR basiert auf dem Prinzip, dass Primer verwendet werden, die spezifisch für eine methylierte bzw. nicht-methylierte Sequenz sind, so dass jeweils die einen oder anderen Primer mit der Sequenz hybridisieren, je nachdem, ob diese methyliert oder nicht methyliert ist. Die PCR-Produkte lassen anschließend auf die Methylierung bzw. Nicht-Methylierung schließen. Beispielsweise können die Primer so gewählt werden, dass das PCR-Produkt für die methylierte Sequenz eine bestimmte Länge aufweist und das PCR-Produkt für die nicht-methylierte Sequenz eine andere Länge aufweist. Die PCR-Produkte geben somit aufgrund ihrer Größe Aufschluss über die Methylierung der amplifizierten DNA-Abschnitte.

Eine gängige Methode, MS-Primer zu erhalten besteht darin, die methylierte und/oder die nicht-methylierte Sequenz spezifisch zu verändern und entsprechende Primer, die spezifisch für die geänderten Sequenzen sind, zu konstruieren. Eine Möglichkeit, die DNA Methylierungs-spezifisch zu verändern, besteht darin, die DNA mit einem deaminierenden Agens zu behandeln, z.B. Natriumbisulfit. Natriumbisulfit wandelt das nicht-methylierte Cytosin in Urazil um, das bei der anschließenden DNA-Amplifikation durch Thymidin ersetzt wird. Dieses Verfahren stellt somit unterschiedliche DNA-Sequenzen ausgehend von ursprünglich homologen aber unterschiedlich methylierten Allelen her. Die Primer, die mit der nicht-methylierten Sequenz hybridisieren, weisen Thymidin anstelle von Cytosin auf. Die Primer, die für die methylierte Sequenz spezifisch sind, weisen hingegen an den Stellen der methylierten Cs weiterhin Cytosin auf.

In dem vorliegenden Fall ist es für ein eindeutiges Ergebnis vorteilhaft, wenn die Primer so gewählt werden, dass das PCR-Produkt der methylierten Sequenz immer - unabhängig von der Länge des Repeat-Bereichs - eine andere Länge aufweist als das PCR-Produkt der nicht-methylierten Sequenz.

Die Bestimmung mittels MS-PCR gewährleistet demnach ein besonders zeitsparendes und effizientes Verfahren, da wenig DNA gebraucht wird und weniger Arbeitsaufwand notwendig ist. Das Ergebnis der PCRs wird gleichzeitig erhalten. Es sind auch keine weiteren Verfahrensschritte notwendig, wie Southern blot, Hybridisierungsverfahren, etc.

Besonders günstig ist es, z.B. im Falle des CGG-Repeats des FMR-1-Gens, wenn die MS-PCR-Primer an einem antisense-Strang bzw. an antisense-Strängen durchgeführt wird bzw. werden. Dadurch wird die Schmelztemperatur von 95°C auf eine Schmelztemperatur von 75°C

reduziert, was die Durchführung der PCR bei moderater Annealingtemperatur ermöglicht und den Ablauf des Verfahrens verbessert. Diese Temperaturbedingungen sind für die Reaktionskomponenten und die DNA-Polymerase schonend.

Vorzugsweise werden die MS-PCRs in Duplex-Reaktionen durchgeführt. D.h., dass die PCRs zur Amplifikation einer bestimmten methylierten Sequenz als auch derselben bestimmten nicht-methylierten Sequenz in einer Reaktion durchgeführt werden, z.B. die PCRs zur Amplifikation der polymorphen methylierten und nicht-methylierten DNS-Region. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Reaktionsprodukte, welche erhalten werden, bei der anschließenden Analyse aufgrund ihrer Größe eindeutig zugeordnet werden können, und so das Ergebnis klar zu interpretieren ist.

Vorteilhafterweise werden die MS-PCR für die Bestimmung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und die MS-PCR für die Bestimmung des sicher physiologisch methylierten DNS-Bereichs in einer gemeinsamen Multiplex-Reaktion durchgeführt. Da die MS-PCRs in der Regel zwei verschiedene Gene betreffen und somit zwei verschiedene Sequenzen, werden die MS-PCRs nicht von einander beeinflusst. Die Bestimmung der polymorphen DNS-Region würde in einer separaten Duplex-Reaktion durchgeführt werden, um den Polymorphismus eindeutig bestimmen zu können, z.B. damit diese in der Größe variabler PCR-Produkte mit anderen PCR-Produkten bei der anschließenden Auswertung nicht überlagern.

Besonders bevorzugt wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, wobei die polymorphe DNS-Region eine DNS-Region mit einem Repeat-Polymorphismus ist, die vorzugsweise mit der potentiell aberrant methylierten DNS-Region in Zusammenhang steht, wobei als Sequenzvariante die Länge des Repeat-Bereiches bestimmt wird, und anschließend sowohl das Vorhandensein als auch das Ausmaß der potentiellen Aberration bestimmt wird.

Unter Repeat-Polymorphismus wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Bereich verstanden, der eine mehrmalige Wiederholung einer Repeat-Einheit, d.h. einer bestimmten Abfolge von mehreren Nukleotiden, aufweist. Die Anzahl der Wiederholungen, der sogenannten "Repeat-Einheiten", ist dabei je nach Gen bzw. Krankheit unterschiedlich, wobei das Ausmaß der Krankheit in der Regel mit der Länge des Repeat-Bereichs zusammenhängt. Meist ist ein Repeat-Bereich, der eine besonders unnatürliche Länge aufweist, auch gleichzeitig methyliert, wenn dieser DNS-Bereich normalerweise nicht methyliert ist. Meist ist in diesem Fall auch der z.B. angrenzende bzw. potentiell aberrant methylierte Bereich entsprechend stark methyliert, so dass die Bestimmung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und die Bestimmung der polymorphen DNS-Region ergänzende Ergebnisse erbringen und damit als zusätzliche Kontrollen gesehen werden können.

Besonders bevorzugt ist die polymorphe DNS-Region der CGG-Trinukleotid-Repeat-Bereich des FMR-1-Gens. Die Bestimmung in diesem Bereich ergibt ein wiederholbares und eindeutiges Ergebnis. Wird die Bestimmung etwa mit Hilfe einer MS-PCR durchgeführt, kann in einem einzigen Verfahrensschritt sowohl die Länge des Repeat-Bereiches als auch das Ausmaß der Methylierung bestimmt werden, wenn die Primer so gewählt werden, dass sie den gesamten Repeat-Bereich einschließen. Der CGG-Trinukleotid-Repeat-Bereich des FMR-1-Gens ist, wie bereits in der Beschreibungseinleitung angeführt ist, ein Sequenzbereich, der Auskunft über Krankheiten, insbesondere über das fragile X-Syndrom, gibt, da die Länge des Repeat-Bereichs charakteristisch für die Variante der Krankheit ist.

Dabei ist es besonders günstig, wenn die polymorphe DNS-Region im ersten untranslatierten Exon des FMR-1-Gens ist. Dies ist eine für die Bestimmung vorteilhafte Region, die zu einem fehlerfreien Ergebnis führt.

Vorzugsweise ist die potentiell aberrant methylierte DNS-Region das FMR-1-Gen oder ein Teil davon. Dies gewährleistet ein vereinfachtes Verfahren, da für zumindest einen Teil der Analyse lediglich der FMR-1-Genbereich notwendig ist. Dieser könnte aus der übrigen DNA isoliert für die Analyse verwendet werden, auch könnte die Analyse an isolierten X-Chromosomen durchgeführt werden.

Vorzugsweise ist die potentiell aberrant methylierte DNS-Region der 5'-untranslatierte Bereich des FMR-1-Gens, d.h. der FMR-1-Promotor, oder ein Teil davon. Dies liefert einerseits zuverlässige Ergebnisse und andererseits liegt die potentiell aberrant methylierte DNS-Region damit in der Nähe des CGG-Repeat-Bereichs, da dieser im ersten untranslatierten Exon liegt. Auf diese Weise muss nicht das gesamte Gen für die Analyse herangezogen werden, das im Laufe der Deaminierung möglicherweise zerfallen könnte. Liegt die potentiell aberrant methylierte DNS-Region im

FMR-1-Promotor, kann für die Bestimmung ein kürzerer DNS-Abschnitt für die Untersuchung herangezogen werden.

Dabei ist es vorteilhaft, wenn die sicher physiologisch methylierte DNS-Region eine DNS-Region ist, die am aktiven X-Chromosom sicher methyliert ist. Damit ist dessen Methylierungsmuster gegenteilig zu dem des FMR-1-Gens, welches am inaktiven X-Chromosom methyliert ist. Diese zusätzliche Bestimmung stellt damit ein neues und erfinderisches Verfahren zur Verfügung, das erlaubt, auf besonders einfache und eindeutige Art und Weise auch den Grad der entsprechenden Krankheit von Frauen zu bestimmen. Dazu wird das Verhältnis der methylierten zur nicht-methylierten DNS-Region des einen Gens (vorzugsweise des FMR-1-Gens) mit dem Verhältnis der reziprok-methylierten DNS-Region (methyliert: nicht-methyliert) sowie auch mit dem Verhältnis des methylierten Repeat-Polymorphismus zum nicht-methylierten Repeat-Polymorphismus (vorzugsweise des FMR-1-Gens) verglichen.

Vorzugsweise ist die sicher physiologisch methylierte DNS-Region eine Region, die das XIST-Gen oder Teile davon umfaßt. Das XIST-Gen ist am aktiven Chromosom X methyliert, so dass es ein reziprokes Methylierungs-Muster zum FMR-1-Gen aufweist. Die Bestimmung mit Hilfe des XIST-Gens als interner Standard stellt ein zuverlässiges, eindeutiges und einfaches Verfahren zur Detektion und Evaluierung einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom, insbesondere bei Frauen, zur Verfügung.

Besonders günstig ist es, wenn die sicher physiologisch methylierte DNS-Region eine Region im XIST-Gen-Promotor ist. Es hat sich herausgestellt, dass die Methylierung des Promoters des XIST-Gens einfach zu bestimmen ist, und zu zuverlässigen Ergebnissen führt.

Für ein besonders vorteilhaftes Verfahren ist es vorgesehen, dass die potentiell aberrant methylierte DNS-Region und die polymorphe DNS-Region zwei einander nicht überlappende Sequenzen sind. Somit ist sichergestellt, dass, selbst wenn beide DNS-Regionen auf dem FMR-1-Gen sind, zwei separate, voneinander unabhängige DNS-Regionen untersucht werden, so dass die Ergebnisse der Untersuchung beider Bereiche sich gegenseitig ergänzen, und dadurch mögliche Verwechslungsfehler vorzeitig erkannt werden können.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfundungsgemäßen, oben beschriebenen Verfahrens zur Detektion und Evaluierung von X-chromosomalen Erkrankungen. Diese Erkrankungen wurden bereits oben beschrieben, wobei es sich um Erkrankungen handelt, die durch aberrante Methylierung an zumindest einer Stelle im X-Chromosom hervorgerufen werden. Je nach der zu detektierenden und zu evaluierenden Erkrankung wird eine spezifische, potentiell aberrant methylierte DNS-Region und gegebenenfalls ein sicher physiologisch methylierter DNS-Bereich des X-Chromosoms und/oder eine spezifische polymorphe DNS-Region des X-Chromosoms analysiert.

Dabei ist es besonders günstig, wenn das Verfahren insbesondere zur Detektion und Evaluierung des fragilen X-Syndroms, FraX-E, FraX-F, der Klonalität und X-Aneuploidien verwendet wird.

Im Fall des fragilen X-Syndroms ist es besonders günstig, wenn der FMR-1-Promotor als potentiell aberrant methylierte DNS-Region bestimmt wird und/oder das XIST-Gen oder ein Teil davon als sicher physiologisch methylierter DNS-Bereich bestimmt wird und/oder der CGG-Trinukleotid-Bereich des FMR-1-Gens als polymorphe DNS-Region bestimmt wird.

Im Fall des FRAXE wird vorteilhafterweise die CpG-Insel im Sq28 als potentiell aberrant methylierte DNS-Region und/oder der GCC-Trinukleotid-Bereich als polymorphe DNS-Region und/oder das XIST-Gen oder ein Teil davon als sicher physiologisch methylierter DNS-Bereich bestimmt.

Im Fall des FRAXF wird vorteilhafterweise die  $(GCCGTC)_n(GCC)_m$ -Region als polymorphe DNS-Region und/oder die daneben liegende CpG-Insel als potentiell aberrant methylierte DNS-Region und/oder das XIST-Gen oder ein Teil davon als sicher physiologisch methylierter DNS-Bereich bestimmt.

Im Fall der Klongröße wird vorzugsweise der CGG-Nukleotid-Repeat-Bereich des FMR-1-Gens als polymorphe DNS-Region bestimmt.

Wie bereits in der Beschreibungseinleitung angeführt ist, weisen im Fall der FRAXA normale Sequenzen einen Repeat-Bereich von 5-(48-) 54 CGG-Einheiten, prämutierte Sequenzen (48-) 54-200 CGG-Einheiten und Vollmutationen über 200 CGG-Einheiten auf.

Zur vollständigen Erfassung des Krankheitsbildes im Falle des fragilen X-Syndroms (aber auch z.B. bei FRAXE und FRAXF) kann durch die erfundungsgemäße Analyse eindeutig und schnell

zwischen den verschiedenen Genotypen des fragilen X-Syndroms unterschieden werden, selbst bei weiblichen Patienten, bei denen die Methylierungsanalyse kein eindeutiges Ergebnis liefert, da - im Fall des Repeat-Bereichs - dieser in der PCR insbesonders bei einer Länge von mehr als 200 Einheiten durch einen Repeat mit normaler Länge kompetitiert wird. Durch die Bestimmung 5 des Ausmaßes der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region kann die Probe einem bestimmten Genotyp eindeutig zugeordnet werden, da im Normal- und Prämutationsfall diese DNS-Region nicht methyliert, bei der Vollmutation hingegen methyliert ist. In männlichen Prä-Vollmutations-Mosaiken liegen die Verhältnisse ähnlich wie soeben für weibliche Patienten 10 dargestellt. Mittels einer herkömmlichen Analyse, bei der lediglich der Repeat-Bereich bestimmt wird, kann insbesonders bei Grenzfällen ohne zusätzliche Verfahrensschritte, z.B. Southern-blots, keine eindeutige Diagnose erfolgen. Selbst bei Durchführung eines Southern-blots können Mosaik 15 aufgrund der limitierten Sensitivität nur begrenzt nachgewiesen werden. Demgegenüber kann mittels der genannten PCR-Verfahren höhere Sensitivität bei geringerem Bedarf an Patienten-DNA mittels der genannten PCR-Verfahren eine verbesserte Beurteilung des Krankheitsbildes erfolgen.

Wenn weiters neben der Bestimmung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region auch 15 ein sicher physiologisch methylierter DNS-Bereich analysiert wird, so kann dieser als interner Standard herangezogen werden. Falls die potentiell aberrant methylierte DNS-Region aufgrund von Deletionen nicht nachgewiesen werden kann, wird in jedem Fall der sicher methylierte DNS- Bereich (z.B. das XIST-Gen) nachgewiesen. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass das Verfahren 20 funktioniert hat, und gegebenenfalls die potentiell aberrant methylierte DNS-Region zumindest teilweise fehlt, d.h. deletiert ist (z.B. FMR-1-Gen).

Im Fall, dass der FMR-1-Repeat-Bereich bestimmt wird, und zwar mittels MS-PCR, kann die Anzahl der normalen bzw. Prämutations-Repeat-Einheiten einfach aus der Länge der MS-PCR-Produkte errechnet werden. Auf diese Weise wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, bei dem 25 gleichzeitig der Grad der Methylierung und die Länge der Repeat-Bereiche bestimmt werden. In einem einzigen Verfahrensschritt (entweder eine einzige MS-PCR-Reaktion oder mehrere MS-PCR-Reaktionen nebeneinander) wird somit der Grad des fragilen-X-Syndroms bestimmt. Die MS-PCR ist ein schnelles und zuverlässiges Verfahren, das kostengünstig ist und in jedem Labor 30 durchgeführt werden kann. Weiters ist lediglich eine kleine Menge an DNA für diese Analyse durchgeführt werden kann. Weiters müssen keine zusätzlichen, oft zeitaufwendigen und kostspieligen Verfahren notwendig. Weiters müssen keine zusätzlichen, oft zeitaufwendigen und kostspieligen Verfahren 35 durchgeführt werden, wie etwa immunologische oder Southern blot-Verfahren. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren zur Bestimmung des fragilen X-Syndroms, die meist PCR und zusätzlich einen Southern blot beinhalten, werden keine radioaktiven Substanzen eingesetzt, was insbesondere für das Laborpersonal vorteilhaft ist. Weiters wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, das aufwendige Arbeitsschritte einspart und sich besonders für Routinediagnosen und Screening-Studien eignet. Weiters eignet sich diese Analyse für DNA, die aus Guthrie-Karten 40 Screening-Studien eignet. Weiters eignet sich diese Analyse für DNA, die aus Guthrie-Karten extrahiert wurde, und für Studien von kleinen Gewebsproben, die mit feinen Nadeln aus dem Körper entnommen wurden.

Wird eine 3-fach MS-PCR-Analyse für die Detektion und Evaluierung des fragilen X-Syndroms 45 durchgeführt, kommt es zu folgendem Ergebnis:

- Normale männliche Individuen zeigen einen nicht-methylierten Repeat-Bereich (als polymorphe DNS-Region) von bis zu (48-) 54 Einheiten sowie eine nicht-methylierte FMR-1-DNS-Region, z.B. der Promotor (als potentiell aberrant methylierte DNS-Region).

- Männliche Patienten mit einer Prämutation zeigen dasselbe Muster, aber mit etwa (48-) 54 bis 50 200 Repeat-Einheiten.

- Männliche Patienten mit einer Vollmutation weisen einen methylierten Repeat-Bereich mit über 200 Einheiten (wird in der Regel nicht amplifiziert) sowie eine methylierte FMR-1-Promotor-Region (als potentiell aberrant methylierte DNS-Region) auf. Bei Grenzfällen Vollmutation/Prämutation ist es ausschlaggebend, ob die methylierte oder nicht-methylierte FMR-1-Promotor-Region amplifiziert 55 ist. Selbst wenn nun der methylierte Repeat-Bereich einer Vollmutation so lange ist, dass dieser nicht amplifiziert werden würde, kann die Vollmutation aufgrund der Amplifizierung der methylierten FMR-1-Promotor-Region detektiert werden.

- Mosaik Vollmutation/Prämutation: der Repeat-Bereich des Allels mit der Vollmutation wird nicht amplifiziert, der nicht-methylierte Repeat-Bereich des Prämutationsallels wird amplifiziert, wobei es (48-) 54 bis 200 Einheiten aufweist. Die methylierte FMR-1-Promotor-Region wird amplifiziert.

- Aufgrund der zufälligen (random) X-Inaktivierung in normalen homozygoten Frauen beträgt das Verhältnis der nicht-methylierten zur methylierten FMR-1-DNS-Region sowie vom nicht-methylierten zum methylierten XIST-Gen 1:1. Da beide Homologe identische Repeat-Bereich-Längen aufweisen, ist lediglich jeweils ein nicht-methylierter und ein methylierter FMR-1-Repeat-Bereich sichtbar.
  - 5 - Bei heterozygoten Frauen, die unterschiedliche Repeat-Bereich-Längen aufweisen, ist dasselbe Muster wie oben beschrieben zu sehen, lediglich sind zwei nicht-methylierte und zwei methylierte FMR-1-Repeat-Bereiche mit unterschiedlichen Längen zu sehen.
  - Frauen mit einer Prämutation weisen ein ähnliches Muster auf wie heterozygote Frauen, mit dem Unterschied, dass ein methylierter und ein nicht-methylierter FMR-1-Repeat-Bereich eines
  - 10 Allels eine Länge von (48-) 54 bis 200 Einheiten aufweist.
  - Frauen mit einer Vollmutation weisen immer eine methylierte FMR-1-Promotor-Region am expandierten Allel auf, unabhängig davon, ob diese am aktiven oder inaktiven Chromosom liegt. Im Fall einer random X-Inaktivierung beträgt das Methylierungsverhältnis der FMR-1-DNS-Region Promotor-Region 3:1 (Methylierung:Nicht-Methylierung), während das Methylierungsverhältnis des XIST-Gens weiterhin 1:1 beträgt.
  - 15 - Frauen mit einer Vollmutation und entweder einer skewed X-Inaktivierung oder Mosaik weisen dasselbe Muster auf wie betroffene Frauen mit random X-Inaktivierung. Eine skewed X-Inaktivierung und Mosaiken können durch quantitative Bewertung des Methylierungsverhältnisses der FMR-1-Promotor-Region mit dem des XIST-Gens und des FMR-1-Repeat-Bereichs identifiziert werden.
  - 20 Das Methylierungsverhältnis des XIST-Gens bleibt in allen Fällen 1:1, da jede Zelle weiterhin ein aktives und ein inaktives Chromosom enthält. Somit stellt das Methylierungsverhältnis des Abschnitts des weiteren Gens (XIST) einen Standard dar. Im Gegensatz dazu verschiebt sich das Methylierungsverhältnis der FMR-1-Promotor-Region und des Repeat-Bereichs in Richtung Nicht-Methylierung bzw. Methylierung, je nachdem, ob das normale Chromosom oder das mit dem
  - 25 expandierten Allel eine skewed X-Inaktivierung aufweist. Ein ähnliches Muster kann bei Mosaik-Frauen mit einer normalen Zellpopulation und einer mit einer Vollmutation gesehen werden.
- Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Kit, der eingangs angeführten Art, wobei er Primer-Sets zur spezifischen Amplifizierung jeweils der methylierten und nichtmethylierten DNA-Variante einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region und/oder eines sicher physiologisch methylierten DNS-Bereichs des X-Chromosoms und/oder einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, umfasst. Mit diesem Kit kann das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden.
- Vorzugsweise umfasst dieser Kit zusätzlich zu den Primer-Sets weitere notwendige Stoffe zur Durchführung einer MS-PCR: einen Stoff zur Umwandlung der methylierten bzw. nicht-methylierten Sequenz (z.B. Natriumbisulfat zur Umwandlung der nicht-methylierten Cytosin-Reste), die notwendigen Enzyme, Puffer, etc. Auf diese Weise wird ein Kit zur Verfügung gestellt, so dass für die Durchführung des Verfahrens lediglich die zu testende DNA noch zugefügt werden muss. Mit Hilfe dieses Kits können in jedem Labor routinemäßige Diagnosen durchgeführt werden.
- Besonders vorteilhaft lässt sich dieser Kit zur Detektion und Evaluierung X-chromosomaler Erkrankungen einsetzen, wobei er Primer-Sets zur methylierungsspezifischen Amplifizierung einer DNS-Region mit einem Repeat-Polymorphismus für die Bestimmung der polymorphen DNS-Region umfasst. Mit diesen Primer-Sets wird das Ausmaß der Methylierung und die Länge des Repeat-Polymorphismus bestimmt, um den Grad der Erkrankung und die Klonalität dieser zu testen. Diese chromosomalen Erkrankungen sind z.B.: FRAX-A, FRAX-E, FRAX-F, X-chromosomale Retardierungen, Klonalität, etc.
- Vorzugsweise umfasst der Kit Primer-Sets zur Amplifizierung einer polymorphen DNS-Region des CGG-Nukleotid-Repeat-Bereiches im ersten Exon des FMR-1-Gens. Da der Repeat-Bereich des FMR-1-Gens wie oben bereits beschrieben eine sichere und klare Aussage über den Krankheitsgrad des fragilen X-Syndroms bzw. die Klongröße gewährleistet, kann mit Hilfe dieses Kits ein rasches und sicheres Analyseverfahren zur Verfügung gestellt werden.
- Weiters ist es günstig, wenn der Kit Primer-Sets zur Amplifizierung des XIST-Gens oder Teilen davon für die Bestimmung der sicher physiologisch methylierten DNS-Region umfasst. Wie oben bereits beschrieben, weist das XIST-Gen ein Methylierungsmuster auf, das reziprok zu dem des FMR-1-Gens ist. Das Methylierungsmuster im Ergebnis lässt eine genaue Interpretation bezüglich

der Variante des fragilen X-Syndroms zu.

Weiters ist es von Vorteil, wenn der Kit Primer-Sets zur Amplifizierung des FMR-1-Gens oder eines Teils davon für die Bestimmung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region umfasst. Günstigerweise umfasst der Kit Primer-Sets zur Amplifizierung des FMR-1-Gen-Promoters oder eines Teiles davon. Damit kann das oben beschriebene bevorzugte Analyseverfahren durchgeführt werden.

Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Primer-Sets jeweils als Duplex-Sets, räumlich voneinander getrennt, vorgesehen sind. Auf diese Weise wird, wie oben beschrieben, sichergestellt, dass klare und leicht interpretierbare Ergebnisse erhalten werden.

Dabei ist es besonders günstig, wenn die Primer-Sets für die Amplifizierung des sicher physiologisch methylierten DNS-Bereichs und der potentiell aberrant methylierten DNS-Region zusammen in einem Multiplex-Set oder 4-plex-Set vorgesehen sind. Auf diese Weise werden die Methylierungs-spezifischen PCR-Reaktionen zweier DNS-Regionen in einem Reaktionsgemisch gleichzeitig durchgeführt, wodurch das Verfahren zeitsparender wird. Dies ist möglich, da die beiden Gene (FMR-1 und XIST) unterschiedliche Sequenzen aufweisen, so dass sich die beiden PCR-Reaktionen nicht beeinflussen.

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von Beispielen sowie von Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, weiter erläutert, wobei in Fig. 1 die Stellung der Primer für das FMR-1-Gen; in Fig. 2 die jeweiligen Methylierungsmuster des FMR-1- und XIST-Gens sowie die Größe und Methylierung des Repeat-Bereichs schematisch, sowie in Fig. 3a und 3b Gelelektrophoresen zur Auftrennung der MS-PCR-Produkte dargestellt sind.

### **Beispiel 1: DNA-Präparation**

EDTA antikoagulierte, periphere Blutproben aus gesunden sowie an fragilem X-Syndrom erkrankten Patienten wurden bis zur DNA-Extraktion in 500 µl Aliquoten bei -20°C gelagert. Für die DNA-Deaminierung und anschließender MS-PCR-Analyse wurde DNA aus 80 µl Blut mit DNAzol™ (Vienna Lab, Vienna, Austria) extrahiert und in 30 µl steriles Wasser resuspendiert.

0,5 µg DNA wurde gemäß den Protokollen von Zeschnigk et al. "A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrom based on allelic methylation differences at the SNRPN locus." Eur. J. Hum. Genet. 5, 94-8 (1997); "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. 6, 387-95 (1997) deaminiert, wobei die Deaminierung bei 55°C zwei Stunden lang mit Zusatz von 8 µl Polyacrylträger, der die DNA-Präzipitation auf 10 min bei -20°C verkürzt, durchgeführt wird. Die deaminierte DNA wurde in 20 µl steriles Wasser gelöst.

### **Beispiel 2: Methylierungs-spezifische PCR**

13 Primer wurden (s. Seq.Id.Nr. 1-13) entsprechend der deaminierten DNA-Sequenz der jeweiligen nicht-methylierten bzw. methylierten Genregionen synthetisiert (s. Tabelle 1 und Fig. 1).

45

50

55

**Multiplex PCR****Tabelle 1**

Zielsequenz	Primer	Primer-Bezeichnung	Sequenz	Konzentration pro Reaktion (pmol)	Produkt-Bezeichnung	Produkt-länge (bp)
				Seq. Id.Nr.		
<i>FMR1</i> nicht-methyliert Promotor	vorwärts rückwärts	PUF P-R	5'-GTGTTGATTGAGGGTGAAATTTTG-3' 5'-ATTTAATTTCCCA C(A/G) CCACCTAAATAACAC-3'	1 2	5 10	PU 318
<i>FMR1</i> methyliert Promotor	vorwärts rückwärts	PMF P-R	5'-GTTGGGGTGTAAATATTGAAATTTACG-3' 5'-ATTTAATTTCCCA C(A/G) CCACCTAAATAACAC-3'	3 2	5 -	PM 288
<i>XIST</i> methyliert Promotor	vorwärts rückwärts	XMF XMR	5'-AATTAAAGTAGGTATTCGCGGTTTCG-3' 5'-TTTTCCCTAACCCCATCGAAATATCG-3'	4 5	8 8	XM 241
<i>XIST</i> nicht-methyliert Promotor	vorwärts rückwärts	XUF XUR	5'-AAAAGTGGTTGTTATTAGATTGTT-3' 5'-TTTTCCCTAACCCATCGAAATATCG-3'	6 7	8 8	XU 198

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Zielsequenz	Primer Bezeichnung	Primer- Bezeichnung	Sequenz	Konzentration pro Reaktion (pmol)	Produkt- Bezeichnung	Produkt- länge (bp)
<i>FMR1</i> nicht-methyliert Repeat	RUF RUR		5'-TTTGAGAGGTGGGTTGGTTGAGG-3' 5'-AACACCACTACCAAAAAACATAACAAACAAC-3'	8 9	RU	64+3x (CGG)n
<i>FMR1</i> methyliert Repeat	RMF RMR		5'-CCGCCTCTAAACGAAACGACGAACCGACGAC-3' 5'-TTTCGAGAGGTGGGTTGGGGCTCGAG-3'	10 11	RM	120+3x (CGG)n
<i>FMR1</i> methyliert Promotor	FMF FMR		5'-CGTCGTCGGTTCGTCTGGTTAGAGGC-3' 5'-CCGACCGATTCCCAACAAACGCCATACG-3'	12 13	FP	231bp

In einer Multiplex-PCR-Reaktionsmischung wurden zwei Vorwärts-Primer (PUF, PMF), die spezifisch für unmethylierte und methylierte DNS sind, und ein gemeinsamer Rückwärts-Primer (P-R), der spezifisch für den deaminierten, nicht-methylierten und methylierten FMR-1-Promotor ist, sowie zwei Vorwärts-Primer (XUF, XMF) und zwei Rückwärts-Primer (XUR, XMR), die spezifisch für den deaminierten, nicht-methylierten und methylierten XIST-Promotor sind, zugesetzt. Der Duplex-PCR-Mix umfasst zwei Vorwärts-Primer (RUF, RMF) und zwei Rückwärts-Primer (RUR, RMR), die spezifisch für den deaminierten, nicht-methylierten und methylierten Triplet-Repeat-Bereich sind.

Ein zusätzliches Primer-Paar detektiert einen weiteren methylierten Sequenzabschnitt im FMR-1-Promotor (FMF, FMR), kann jedoch nicht mit den anderen Primern kombiniert werden.

Für das Design dieser Primer wurde als zu amplifizierende Ziel-Sequenz die des antisense-Stranges des FMR-1-Genbereiches (Acc. Nr. L29074, L38501, U80460) verwendet, um die Schmelztemperatur von  $T_m=95^{\circ}\text{C}$  auf  $T_m=75^{\circ}\text{C}$  zu reduzieren.

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu\text{l}$  unter Öl durchgeführt, wobei jeweils 1  $\mu\text{l}$  der 20  $\mu\text{l}$  deaminierten DNA aus Patienten und Normalkontrollen verwendet wurde. Für die Multiplex-PCR wurde der Amplifikationspuffer F-511 (10 mM Tris, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton-X-100; Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) verwendet; optimierter Puffer EXT (50 mM Tris, 15 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton-X-100, pH 9,0) wurde für die Duplex-Reaktion mit 4% DMSO und 60 mM TMAC und für die FMP-Amplifikation ohne Verstärker (DMSO, TMAC) verwendet. Die dNTPs-Konzentrationen betrugen 200  $\mu\text{M}$  jedes Nukleotids. In Tabelle 1 sind die optimalen Primer-Konzentrationen aufgelistet. Die Amplifikationen wurden auf einem Biometra TrioBlock (Biometra, Goettingen, Deutschland) durchgeführt und mit einer Einheit Dynazyme 501L (Finnzymes Oy, Espoo, Finnland) gestartet, mit einem ersten Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min. Die Multiplex-PCR-Profile waren 35 Zyklen 95°C/30 s, 60°C/20 s, 72°C/40 s. Duplex und FMP-Profile betrugen 37 Zyklen bei 95°C/45 s, 63°C/1 min und 72°C/1 min. Abschließend wurde in allen Fällen bei 72°C 7 min lang inkubiert.

PCR-Produkte (5  $\mu\text{l}$ ) wurden auf in 0,5x TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 8,0) auf NOVEX-TBE-Gelen getrennt (Novex, San Diego, California, USA). Die Banden wurden durch Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr) detektiert. Densitometrische Analysen wurden mit KODAK-1D™2.0.2 software package (Kodak, New Haven, CT, USA) durchgeführt.

Repeat-Einheiten im normalen und Prämutations-Bereich, aber keine Vollmutationen, konnten amplifiziert werden. Die Anzahl der Repeat-Einheiten konnte bei normalen Individuen und Prämutationsträgern aus der Länge der PCR-Produkte errechnet werden.

In Tabelle 2 sind die zu erwartenden Ergebnisse aufgelistet, wobei "-" kein PCR Produkt, "+" ein PCR Produkt und "2+" zwei Produkte mit unterschiedlichen Längen bedeuten. In Fig. 2 sind die zu erwartenden Ergebnisse schematisch dargestellt, wobei dieselbe Nummerierung wie in Tabelle 2 verwendet wird.

Tabelle 2

Ziel-Gen-Sequenz	#	Multiplex PCR				Duplex PCR	
		<i>FMR1</i>		<i>XIST</i>		<i>FMR1</i>	
		Promotor	Promotor	Promotor	Promotor	Repeat	
PCR-Produkt	#	PU	PM	XU	XM	RU	RM
normale Männer	1	+	-	-	+	+	-
Männer mit Prämutation	2	+	-	-	+	+	-
Männer mit Vollmutation	3	-	+	-	+	-	-
Mosaik-Männer mit Vollmutation	4	-	+	-	+	+	-
Männer mit Deletion	5	-	-	-	+	-	-

5	Ziel-Gen-Sequenz	Multiplex PCR				Duplex PCR	
		<i>FMR1</i>		<i>XIST</i>		<i>FMR1</i>	
		Promotor	Promotor	Promotor	Promotor	Repeat	
#	PCR-Produkt	PU	PM	XU	XM	RU	RM
6	normale Frauen mit gleichen Repeat-Längen an beiden Allelen	1:1		1:1		+	+
10	7 normale Frauen mit ungleichen Repeat-Längen an beiden Allelen	1:1		1:1		2+	2+
15	8 Frauen mit Prämutation	1:1		1:1		2+	2+
19	9 Frauen mit Vollmutation	1:3		1:1		+	+
20	10 Frauen mit Vollmutation und einer erhöhten Menge an Zellen mit aktiven normalen Allelen	(>) 1:3		1:1		Δ	▽
25	11 Frauen mit Vollmutation und einer erhöhten Menge an Zellen mit aktiven betroffenen Allelen	(<) 1:3		1:1		▽	△
30	12 Mosaik-Frauen mit Prämutation	(>) 1:3 oder < 1:3		1:1		△ ▽	▽ △
35	13 Mosaik-Frauen mit Vollmutation	(>) 1:3 oder < 1:3		1:1		△ ▽	▽ △
40	(1) Normale männliche Individuen zeigen einen nicht-methylierten Repeat-Bereich von bis zu (48-) 54 Triplets sowie einen nicht-methylierten FMR-1-Promotor. (2) Männliche Patienten mit einer Prämutation zeigen dasselbe Muster, aber mit etwa (48-) 54 bis 200 Repeat-Einheiten. (3) Männliche Patienten mit einer Vollmutation weisen im Ergebnis einen methylierten Repeat-Bereich mit über 200 Triplets (wird in der MS-PCR meist nicht amplifiziert) sowie einen methylierten FMR-1-Promotor auf. (4) Männliche Patienten mit Mosaik Vollmutation/Prämutation zeigen einen methylierten Repeat-Bereich mit über 200 Einheiten (wird nicht amplifiziert) sowie einen nicht-methylierten Repeat-Bereich von (48-) 54 bis 200 Einheiten, zudem einen nicht-methylierten und einen methylierten FMR-1-Promotor. Anhand des Nachweises des spezifischen Produktes des XIST-Gens, kann in allen Fällen zwischen weiblichen und männlichen Patienten eindeutig unterschieden werden.						
45	(5) Bei Deletionen im zu amplifizierenden Bereich des FMR-1-Gens ist lediglich das methylierte PCR-Produkt des XIST-Gen-Promotors sichtbar. (6) Bei normalen homozygoten Frauen ist das Verhältnis von nicht-methyliertem zu methyliertem FMR-1-Promotor und jenes des XIST-Gen-Promotors etwa 1:1. Da beide Homologe identische Repeat-Bereich-Längen aufweisen, ist lediglich jeweils ein nicht-methylierter und ein methylierter FMR-1-Repeat-Bereich sichtbar.						
50	(7) Bei heterozygoten Frauen, die unterschiedliche Repeat-Bereich-Längen aufweisen, ist dasselbe Muster wie oben beschrieben zu sehen, lediglich sind zwei nicht-methylierte und zwei methylierte FMR-1-Repeat-Bereiche mit unterschiedlichen Längen zu sehen. (8) Frauen mit einer Prämutation weisen ein ähnliches Muster auf wie heterozygote Frauen, mit dem Unterschied, dass ein methylierter und ein nicht-methylierter FMR-1-Repeat-Bereich eine Länge zwischen (48-) 54 bis 200 Einheiten aufweist.						

- (9) Frauen mit einer Vollmutation weisen immer einen methylierten FMR-1-Promotor am expandierten Allel auf, unabhängig davon, ob dieser am aktiven oder inaktiven Chromosom liegt. Im Fall einer random-X-Inaktivierung beträgt das Methylierungsverhältnis des FMR-1-Promotors 1:3 (Nicht-Methylierung:Methylierung), während das Methylierungsverhältnis des XIST-Gen-Promotors weiterhin 1:1 beträgt.
- (10) - (13) Frauen mit einer Vollmutation und entweder einer skewed X-Inaktivierung oder Mosaik weisen dasselbe Muster auf wie betroffene Frauen mit random-X-Inaktivierung, wobei jedoch das Methylierungsverhältnis im FMR-1-Gen in die eine oder andere Richtung verschoben ist. Eine skewed X-Inaktivierung und Mosaik können durch semi-quantitativen Vergleich des Methylierungsverhältnisses des FMR-1-Promotors und des FMR-1-Repeat-Bereichs mit dem des Gen-Abschnitts des XIST-Gens identifiziert werden. Das Methylierungsverhältnis des XIST-Gens bleibt 1:1 in allen Fällen, da jede Zelle weiterhin 1 aktives und 1 inaktives Chromosom trägt. Im Gegensatz dazu verschiebt sich das Methylierungsverhältnis des FMR-1-Promotors und des Repeat-Bereichs in Richtung Nicht-Methylierung bzw. Methylierung, je nachdem ob das normale Chromosom oder das mit dem expandierten Allel eine skewed X-Inaktivierung aufweist. Ein ähnliches Muster kann bei Mosaik-Frauen mit einer normalen Zellpopulation und einer mit einer Vollmutation gesehen werden.

Somit können alle möglichen Varianten zur Diagnostik des fragilen-X-Syndroms und ähnlicher Erkrankungen wie FraX-E, FraX-F, und andere X-chromosomal Erkrankungen aber auch Klonalität und X-Aneuploidien festgestellt werden.

In Fig. 3a und 3b sind Gelelektrophoresen der MS-PCR-Produkte dargestellt, wobei Fig. 3a die Produkte der Multiplex-Reaktion (FMR-1-Promotor, XIST-Promotor) und Fig. 3b die Produkte der Duplex-Reaktion (FMR1-Repeat-Expansion) zeigt, wobei dieselbe Nummerierung wie in Tabelle 2 verwendet wird, und n die Anzahl der Repeat-Einheiten bedeutet.

- (1) Normaler männlicher Patient (n = 34);
- (2) Männlicher Patient mit Prämutation (n = 130);
- (3) Männlicher Patient mit Vollmutation (n > 200);
- (4) Männlicher Patient mit Mosaik-Vollmutation (n > 200 und n = 100);
- (5) Männlicher Patient mit einer Deletion im FMR1-Gen-Promotor sowie im Repeat Bereich;
- (6) Normale homozygote Frau (n = 33);
- (7) Normale heterozygote Frau (n = 23+30);
- (8) Frau mit Prämutation (n = 33+66);
- (9) Frau mit Vollmutation (n > 200 + n = 23);
- (10) Frau mit einer Vollmutation und einer erhöhten Anzahl von Zellen mit einem normalen Allel auf Grund einer skewed X-Inaktivierung (n > 200 und n = 30); erhöhte Menge des RU-Produktes);
- (11) Frau mit erhöhter Menge von Zellen mit einer Vollmutation auf Grund einer skewed X-Inaktivierung (n > 200 und n = 46; erhöhte Menge des RM-Produktes);
- (12) Negativkontrolle (native Plazenta-DNA, die vor der Amplifikation nicht deaminiert wurde);
- (s) Größenstandard.

Tabelle 3 stellt die Ergebnisse einer densitometrischen Analyse der Multiplex-PCR-Produkte von weiblichen Patienten dar. Es werden die Netto-Intensitäten, die berechneten Verhältnisse von nicht-methylierten und methylierten Produkten sowie das standardisierte Verhältnis, basierend auf dem intergenen XIST-Standardverhältnis (XM pro XU) gezeigt, wobei die Spalten gemäß Fig. 1 und 3 nummeriert sind. Das Verhältnis von nicht-methylierten und methylierten XIST-Produkten, spezifisch für das inaktive bzw. aktive X-Chromosom, blieb innerhalb aller weiblichen Proben stabil (Mittelwert (XM/XU) =  $1,033 \pm 0,21$ ). In betroffenen Frauen (9 und 11) waren die Verhältnisse der FMR1-Methylierung basierend auf dem XIST-Standardverhältnis außerhalb des 95 %-Vertrauensbereiches (Verhältnis (PU/PM) / (XM/XU) =  $0,32 \pm 0,06$ ). Im Fall einer skewed X-Inaktivierung, die das Vollmutations-Allel bevorzugt (Spalte 10) verbleibt das Verhältnis im normalen Bereich und es wurde auf Grund der verschiedenen Banden-Intensitäten der RU- und RM-Produkte, spezifisch für betroffene Frauen, diagnostiziert, daß der Patient am fragilen X-Syndrom erkrankt war (Spalte 10, s. auch Fig. 3, unten).

Tabelle 3

5	Produkt [bp]	Probe (Netto-Intensität)					
		6	7	8	9	10	11
	PU [318]	1206	2585	1122	1244	916	318
	PM [288]	3812	5317	3863	6512	3278	2977
10	XM [241]	1177	2476	1972	3529	1854	1698
	XU [198]	1157	1862	1700	3143	2363	2155
	Verhältnis	intragene Verhältnisse					
	(PM/PU)	0,32	0,49	0,29	0,19	0,28	0,11
	(XM/XU)	1,02	1,33	1,16	1,12	0,78	0,79
15		standardisierte intergene Verhältnisse					
	(PM/PU)	0,31	0,37	0,25	0,17	0,36	0,14
	(XM/XU)						

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; St. Anna-Kinderspital

&lt;120&gt; Verfahren zur Detektion und Evaluierung einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom

&lt;130&gt; R35658

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 1

gtgttgatt gaggttgaat ttttg

25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

&lt;400&gt; 2

atthaatttc ccacrcact aaatacac

28

<210> 3  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
5  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
<400> 3  
10 gttgcgggtg taaatattga aattacg 27  
  
<210> 4  
<211> 26  
<212> DNA  
15 <213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
20 <400> 4  
aattaaagta ggtattcgcg gtttcg 26  
  
<210> 5  
<211> 26  
25 <212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
30  
<400> 5  
ttttcccta acccatcgaa atatcg 26  
  
<210> 6  
35 <211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
40 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
<400> 6  
aaaagtgggtt gttatatttag atttgtt 27  
  
45 <210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
  
50 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
  
<400> 7  
ttttcccta acccatcgaa atatcg 26  
55

<210> 8		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
5		
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer		
10	<400> 8	
	tttgagaggt gggtttgtgg tgtttgagg	29
	<210> 9	
	<211> 34	
	<212> DNA	
15	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer	
20	<400> 9	
	aacaccacta ccaaaaaaca tacaacaaca caac	34
	<210> 10	
	<211> 30	
25	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer	
30	<400> 10	
	ccgcctctaa acgaacgacg aaccgacgac	30
	<210> 11	
35	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
	<220>	
40	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer	
	<400> 11	
	tttcgagagg tgggtgcgg gcgttcgag	29
45	<210> 12	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Künstliche Sequenz	
50	<220>	
	<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer	
	<400> 12	
	cgtcgctggc tcgtcgatcg ttagagggc	29
55		

<210> 13  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 5  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
 <400> 13  
 10 ccgaccgatt cccaaacaacg cgcatacg 28

### PATENTANSPRÜCHE:

- 15 1. Verfahren zur Detektion und Evaluierung einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom oder der Klonalität, dadurch gekennzeichnet, dass
  - a) entweder in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und/oder das Ausmaß der Methylierung in einem sicher physiologisch methylierten DNS-Bereich des X-Chromosoms bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration diagnostiziert wird, oder
  - b) in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und/oder das Ausmaß der Methylierung sowie gegebenenfalls die Sequenzvariante einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen und gegebenenfalls der Sequenzvariante das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration oder der Klonalität diagnostiziert wird, oder
  - c) in einer Probe das Ausmaß der Methylierung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region, das Ausmaß der Methylierung in einem sicher physiologisch methylierten DNS-Bereich des X-Chromosoms, und das Ausmaß der Methylierung sowie die Sequenzvariante einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, bestimmt wird und anschließend aus dem Vergleich der Methylierungsbestimmungen und der Sequenzvariante das Vorhandensein und gegebenenfalls die Variante und das Ausmaß der potentiellen Aberration diagnostiziert wird.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Ausmaßes der Methylierung sowie gegebenenfalls die Bestimmung der Sequenzvariante mittels einer Methylierungs-spezifischen PCR (MS-PCR) durchgeführt wird, wobei Primer verwendet werden, mit welchen eine methylierte bzw. nicht-methylierte DNS-Region jeweils Methylierungs-spezifisch amplifiziert werden.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die MS-PCRs an einem anti-sense-Strang bzw. an antisense-Strängen durchgeführt wird bzw. werden.
- 30 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die MS-PCRs in Duplex-Reaktionen durchgeführt werden.
- 35 5. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die MS-PCR für die Bestimmung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region und die MS-PCR für die Bestimmung des sicher physiologisch methylierten DNS-Bereichs in einer gemeinsamen Multiplex-Reaktion durchgeführt werden.
- 40 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die polymorphe DNS-Region eine DNS-Region mit einem Repeat-Polymorphismus ist, die vorzugsweise mit der potentiell aberrant methylierten DNS-Region in Zusammenhang steht, wobei als Sequenzvariante die Länge des Repeat-Bereiches bestimmt wird, und anschließend sowohl das Vorhandensein als auch das Ausmaß der potentiellen Aberration bestimmt wird.
- 45 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die polymor-

- phe DNS-Region der CGG-Trinukleotid-Repeat-Bereich des FMR-1-Gens ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die polymorphe DNS-Region im ersten untranslatierten Exon des FMR-1-Gens ist.
  9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die potentiell aberrant methylierte DNS-Region das FMR-1-Gen oder ein Teil davon ist.
  - 5 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die potentiell aberrant methylierte DNS-Region der 5'-untranslatierte Bereich des FMR1-Gens, d.h. der FMR-1-Promotor, oder ein Teil davon ist.
  11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die sicher physiologisch methylierte DNS-Region eine DNS-Region ist, die am aktiven X-Chromosom sicher methyliert ist.
  12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die sicher physiologisch methylierte DNS-Region eine Region ist, die das XIST-Gen oder Teile davon umfasst.
  - 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die sicher physiologisch methylierte DNS-Region eine Region im XIST-Gen-Promotor ist.
  14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die potentiell aberrant methylierte DNS-Region und die polymorphe DNS-Region zwei einander nicht überlappende Sequenzen sind.
  - 20 15. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Detektion und Evaluierung von X-chromosomalen Erkrankungen.
  16. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es insbesondere zur Detektion und Evaluierung des fragilen X-Syndroms, FraX-E, FraX-F, der Klonalität und X-Aneuploidien verwendet wird.
  - 25 17. Kit zur Detektion und Evaluierung einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region am X-Chromosom gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass er Primer-Sets zur spezifischen Amplifizierung jeweils der methylierten und nicht-methylierten DNA-Variante einer potentiell aberrant methylierten DNS-Region und/oder einer sicher physiologisch methylierten DNS-Bereichs des X-Chromosoms und/oder einer polymorphen DNS-Region des X-Chromosoms, die entweder physiologisch oder aberrant methyliert sein kann, umfasst.
  - 30 18. Kit nach Anspruch 17 zur Detektion und Evaluierung X-chromosomaler Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass er Primer-Sets zur Methylierungs-spezifischen Amplifizierung einer DNS-Region mit einem Repeat-Polymorphismus für die Bestimmung der polymorphen DNS-Region umfasst.
  - 35 19. Kit nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass er Primer-Sets zur Amplifizierung einer polymorphen DNS-Region des CGG-Nukleotid-Repeat-Bereichs im ersten Exon des FMR-1-Gens umfasst.
  20. Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass er Primer-Sets zur Amplifizierung des XIST-Gens oder von Teilen davon für die Bestimmung der sicher physiologisch methylierten DNS-Region umfasst.
  - 40 21. Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass er Primer-Sets zur Amplifizierung des FMR-1-Gens oder eines Teils davon für die Bestimmung der potentiell aberrant methylierten DNS-Region umfasst.
  - 45 22. Kit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass er Primer-Sets zur Amplifizierung des FMR-1-Gen-Promoters oder eines Teils davon umfasst.
  23. Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Primer-Sets jeweils als Duplex-Sets räumlich voneinander getrennt vorgesehen sind.
  - 50 24. Kit nach einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Primer-Sets für die Amplifizierung des sicher physiologisch methylierten DNS-Bereichs und der potentiell aberrant methylierten DNS-Region zusammen in einem Multiplex-Set oder 4-plex-Set vorgesehen sind.

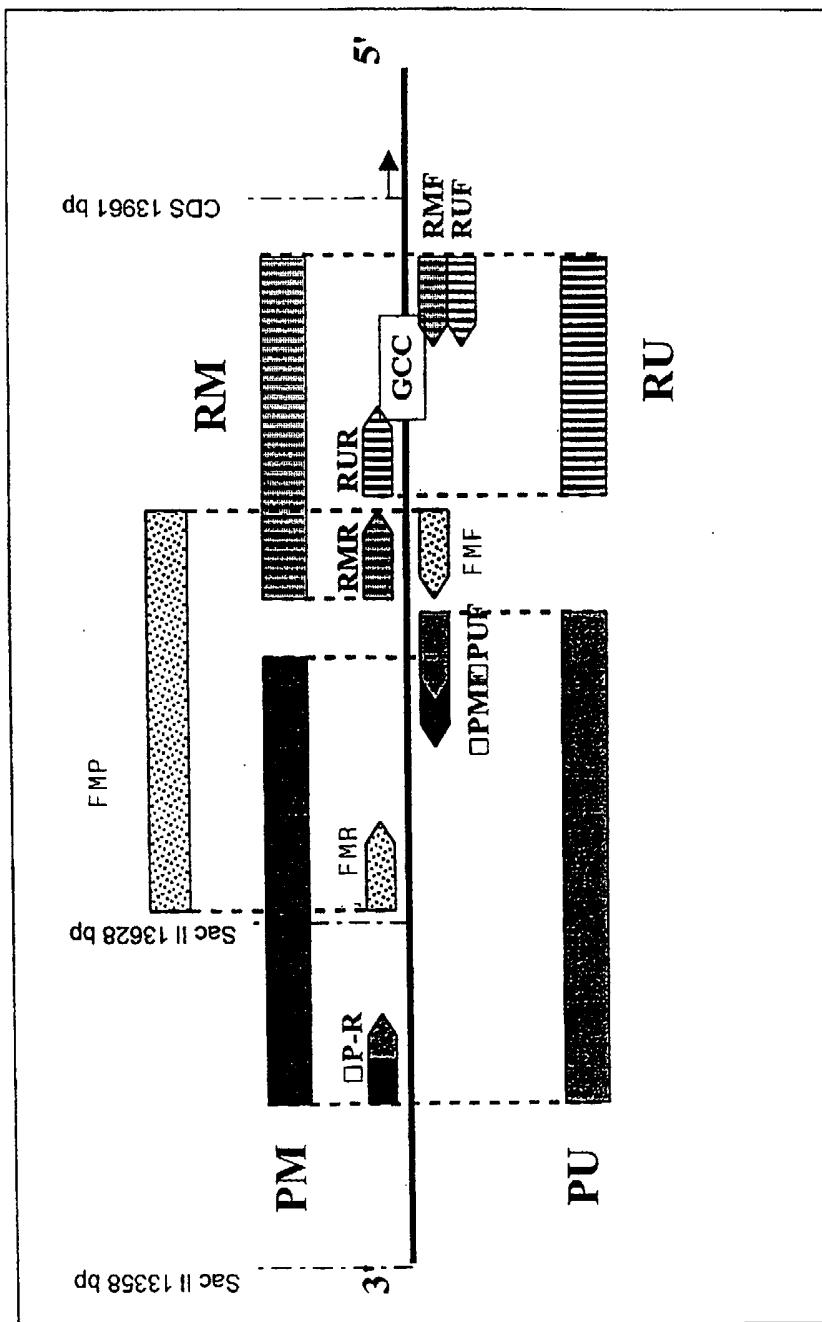


Fig. 1

Fig. 2

