



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 201 21 978 U1** 2004.02.19

(12)

Gebrauchsmusterschrift

(22) Anmeldetag: **02.07.2001**
(67) aus Patentanmeldung: **P 01 96 2814.8**
(47) Eintragungstag: **15.01.2004**
(43) Bekanntmachung im Patentblatt: **19.02.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C07H 21/00**
C12Q 1/68, G01N 33/58

(66) Innere Priorität:
100 32 529.7 30.06.2000
100 43 826.1 01.09.2000

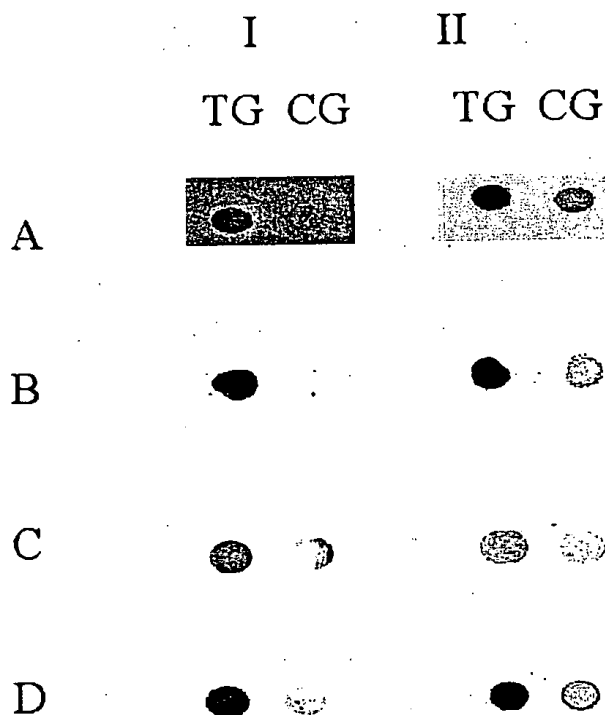
(71) Name und Wohnsitz des Inhabers:
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

(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 Analyse von Astrocytomen**

(57) Hauptanspruch: Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt der chemisch vorbehandelten genomischen DNA gemäß einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von Seq. IDNo. 1 bis Seq. IDNo. 120 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 für die Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einstufung, Einstufung, Therapie und/oder Diagnose oder die Prädisposition von Astrocytomen durch die Analyse der genetischen und/oder epigenetischen Parametern von genomischer DNA und insbesondere dessen Cytosin-Methylierungsstatus.

Stand der Technik

[0003] Es wird vorhergesehen, daß in den Vereinigten Staaten 2001 17,200 Erwachsene Hirntumore entwickeln werden. Von den verschiedenen Klassen an Tumoren sind Gliome die häufigsten, von denen Astrocytome einer der am meisten verbreiteten sind. Diese können gemäß der WHO Klassifikation in vier Kategorien eingestuft werden, pilocytische Astrocytome, niedrig-Grad nichtpilocytische Astrocytome, anaplastische Gliome und Glioblastome multiforme. Pilocytische Astrocytome (WHO Grad I) sind die am meisten benignen und werden gewöhnlich in Kindheitsfällen gefunden. Sie bilden gelegentlich Zysten oder sind in Zysten eingeschlossen und wachsen langsam und im allgemeinen nicht-invasiv. Die Behandlung im ersten Fall erfolgt durch Chirurgie, die in einigen Fällen von Bestrahlungstherapie gefolgt werden kann. Die Effektivität von Chemotherapie und anderen Formen der Behandlung werden augenblicklich untersucht.

[0004] Grad II Astrocytome schließen fibrilläre, gemistocytische und protoplasmatische Astrocytome ein. Im Gegensatz zu Grad I Tumoren sind sie infiltrativ. Die Behandlung erfolgt idealerweise durch vollständige chirurgische Entfernung, wo möglich. In einigen Fällen kann die Chirurgie durch Bestrahlungstherapie ergänzt werden.

[0005] Eine grundlegende Eigenschaft von astrocytotischen Gliomen ist eine Fähigkeit, einer anaplastischen Veränderung unterzogen zu werden. Dies wird mit der Entwicklung von seriellen genetischen Defekten in Zusammenhang gebracht, die für das geordnete Fortschreiten von Eigenschaften der Malignität verantwortlich sind, d.h. Hyperzellularität, Anaplasie. Es ist wichtig, eine Unterscheidung zwischen Grad I pilocytischen Astrocytomen und diffusiv infiltrierenden Grad II Tumoren zu treffen, da nur die zuletzt genannte Gruppe weist eine Neigung auf, sich in die malignen Grad III (z. B. anaplastische Astrocytome) und letztlich Grad IV (z. B. Glioblastom multiforme) Tumore zu entwickeln.

[0006] Anders als für Brustkrebs und die meisten anderen Formen von Krebs gibt es keine etablierten Richtlinien zur Einstufung von Astrocytomen. Die Diagnose erfolgt oftmals durch Scanbildgebende Verfahren (z. B. MRI, CT), die von einer Biopsie für die histologische und cytologische Analyse gefolgt werden kann. Unter der Verwendung solcher Verfahren kann die Unterscheidung zwischen Grad I und Grad II Astrocytomen nicht immer klar sein.

[0007] Die Diagnose durch solche Verfahren verwendet nicht die molekulare Basis des Fortschreitens der Malignität. Weiterhin bieten molekulare Marker den Vorteil, daß sogar Proben sehr kleiner Größe und Proben, deren Gewebearchitektur nicht erhalten wurde, relativ effizient analysiert werden können. Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde von zahlreichen Genen gezeigt, daß diese zwischen benignen und malignen Tumoren unterschiedlich exprimiert werden. Jedoch wurde von keinem einzelnen Marker gezeigt, daß er für die Unterscheidung zwischen den zwei Tumoren ausreichend ist. Von hoch-dimensionalen mRNA-basierten Ansätzen wurde kürzlich gezeigt, daß sie in der Lage sind, ein besseres Mittel zur Verfügung zu stellen, um zwischen verschiedenen Tumortypen und benignen und malignen Läsionen zu unterscheiden. Die Anwendung als ein Routine diagnostisches Werkzeug in einer klinischen Umgebung wird jedoch durch die extreme Instabilität der mRNA, die im Anschluß an bestimmte auslösende Faktoren (z. B. die Probensammlung) schnell auftretende Expressionsveränderungen und, was am Wichtigsten ist, die große Menge an mRNA, die für die Analyse benötigt wird (Lipshutz, R. J. et al., Nature Genetics 21:20-24, 1999; Bowtell, D. D. L. Nature genetics suppl. 21:25-32, 1999), und die oft nicht von einer Routinebiopsie erhalten werden kann, behindert.

[0008] Die aberrante DNA Methylierung innerhalb von CpG Inseln ist in menschlichen malignen Erkrankungen verbreitet, was zu einer Einstellung oder Überexpression eines breiten Spektrums von Genen führt (Jones, P.A. Cancer Res 65:2463-2467, 1996). Von der abnormalen Methylierung wurde auch gezeigt, daß sie in CpG reichen regulatorischen Elementen in intronischen und kodierenden Teilen von Genen von bestimmten Tumoren (Chan, M.F., et al., Curr Top Microbiol Immunol 249:75-86, 2000) auftritt. Hoch charakteristische DNA Me-

- thylierungsmuster konnten auch für Brustkrebs Zelllinien gezeigt werden (Huang, T. H.-M., et al., *Hum Mol Genet* 8:459-470, 1999).
- [0009] Die abnormale Methylierung von Genen wurde mit dem Auftreten von Gliomen in Zusammenhang gebracht (z.B. Epigenetic silencing of PEG3 gene expression in human glioma cell lines. Maegawa et. al. *Mol Carcinog.* 2001 May;31(1):1-9.). Es wurde auch gezeigt, daß die Analyse von Methylierungsmustern mit der Entwicklung von Astrocytomen geringen Grades korreliert werden kann (Aberrant methylation of genes in low-grade Astrocytomen. Costello JF, Plass C, Cavenee WK. *Brain Tumor Pathol.* 2000;17(2):49-56). Jedoch sind die in solchen Studien verwendeten Techniken (Restriktions-Landmark genomisches Scanning, Imprinting-Analyse) auf die Forschung begrenzt, sie sind für die Verwendung in einem klinischen oder diagnostischen Aufbau ungeeignet und stellen keine Basis für die Entwicklung eines mittleren oder Hochdurchsatz-Verfahren für die Analyse von Gliomen zur Verfügung.
- [0010] 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.
- [0011] 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.
- [0012] 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.
- [0013] Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dorerfler 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;5(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“ (Gonzalzo 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).
- [0014] 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, Dorerfler 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 97/45560.

[0015] 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.

[0016] 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.

[0017] 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.

[0018] 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 Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, daß sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie 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.

[0019] 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.

Beschreibung

[0020] Die offenbarte Erfindung stellt ein Verfahren und Nukleinsäuren zur Einstufung von Astrocytomen zur Verfügung. Sie beschreibt ein Mittel zur Unterscheidung zwischen gesundem Gewebe, pilocytischem Astrocytom (Grad I) und Grad II Astrocytomzellen. Dies stellt ein Mittel für die verbesserte Einstufung und Grad-Einteilung von Hirntumoren auf einem molekularen Niveau im Gegensatz zu den augenblicklich verwendeten Verfahren relativ subjektiver Natur, wie zum Beispiel histologische Analyse und Scan-Imaging. Dies ist von besonderer Wichtigkeit aufgrund von den verschiedenen Prognose und der Behandlung von Grad I und II Astrocytom-Patienten. Die offenbarte Erfindung stellt die Mittel für die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens der Einstufung von Astrocytomen zur Verfügung, das im Augenblick nicht existiert. Weiterhin zeigt die offenbarte Erfindung Verbesserungen über den Stand der Technik, da die augenblicklichen Verfahren der histologischen und cytologischen Analyse erfordern, daß die Biopsie eine ausreichende Menge an Gewebe enthält. Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann zur Klassifizierung von kleinsten Proben verwendet werden.

[0021] Die Erfindung stellt die chemisch modifizierte genomische DNA zur Verfügung, sowie Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen, sowie ein Verfahren, das besonders für die Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einteilung, Einstufung und Behandlung und/oder der Diagnose von Astrocytomen geeignet ist. Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, daß genetische und epigenetische Parametern und, insbesondere die Cytosin-Methylierungsmuster von genomischer DNA besonders für die Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einteilung, Einstufung und Behandlung und/oder der Diagnose von Astrocytomen geeignet sind.

[0022] Diese Aufgabe wird gemäß der vorliegenden Erfindung gelöst, indem eine Nukleinsäure verwendet wird, die eine Sequenz von mindestens 18 Basen Länge der chemisch vorbehandelten genomischen DNA gemäß einer der Seq. ID No.1 bis Seq. ID No.120 enthält.

- [0023] Die chemisch modifizierte Nukleinsäure konnte bisher nicht in Zusammenhang mit der Ermittlung von genetischen und epigenetischen Parametern gebracht werden.
- [0024] 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 gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 hybridisiert. Die erfindungsgemäßen Oligomersonden stellen wichtige und effektive Werkzeuge dar, die es zum ersten Mal ermöglichen, spezifische genetische und epigenetische Parameter von Hirntumoren zu ermitteln, insbesondere bei der Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einteilung, Einstufung und Behandlung und/oder der Diagnose von Astrocytomen. 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.
- [0025] 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. 120 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. 120 mindestens ein Oligomer umfaßt.
- [0026] 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. 120 oder Abschnitten davon eingesetzt werden können.
- [0027] Im Falle der erfindungsgemäßen Sets von Oligonukleotiden ist es bevorzugt, daß mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist. Es ist weiter bevorzugt, daß alle der Oligonukleotide eines Sets an eine Festphase gebunden sind.
- [0028] 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. 120) dienen. Diese Sonden ermöglichen die Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einteilung, Einstufung und/oder Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern von Hirntumoren, genauer gesagt Astrocytomen. Weiterhin ermöglichen die Sonden die Diagnose der Prädisposition gegenüber Astrocytomen. Das Set von Oligomeren kann auch zur Detektion von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in der chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 verwendet werden.
- [0029] Gemäß der vorliegenden Erfindung 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.
- [0030] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines auf einem Trägermaterial fixierten Arrays zur Analyse in Zusammenhang mit der Genregulation 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.
- [0031] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen DNA-Chip zur Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einteilung, Einstufung, Behandlung und/oder Diagnose von genetischen und epigenetischen Parametern von Astrocytomen. Weiterhin ermöglicht der Chip die Diagnose der Prädisposition gegenüber Astrocytomen. Der Chip enthält mindestens eine Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung. DNA-Chips sind zum Beispiel aus der US 5,837,832 bekannt.
- [0032] 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. 120), 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.
- [0033] Die Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Ermittlung von genetischen und/oder epigenetischen Parametern von genomischer DNA zur Verfügung. Das Verfahren dient der Grad-Einstufung, Einstufung, Behandlung und/oder der Diagnose von Astrocytomen, insbesondere der Unterscheidung von Grad I und Grad II Tumoren. Das Verfahren ermöglicht die Analyse von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymor-

phismen, wobei die folgenden Schritte enthalten sind:

[0034] In einem ersten Verfahrensschritt muß die genomische DNA-Probe aus Gewebe oder zellulären Quellen isoliert werden. Solche Quellen können Zelllinien, histologische Objektträger, Körperflüssigkeiten, zum Beispiel cerebrospinale Flüssigkeit oder lymphatischer Flüssigkeit, oder in Paraffin eingebettetes Gewebe; zum Beispiel, Hirn, zentrales Nervensystem oder lymphatisches Gewebe einschließen. Die Extraktion kann durch Mittel erfolgen, die Standard für den Fachmann sind, diese schließen die Verwendung von Detergenzlysaten, die Beschallung und Vortexen mit Glasperlen ein. Sobald die Nukleinsäuren extrahiert wurden, wird die genomische doppelsträngige DNA in der Analyse verwendet.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform kann die DNA vor der chemischen Behandlung gespalten werden, dies kann durch jedes Standardmittel im Stand der Technik erfolgen, insbesondere mit Restriktionsendonukleasen.

[0036] Im zweiten Verfahrensschritt wird eine genomische DNA-Probe derart chemisch behandelt, daß an der 5'-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base umgewandelt werden. Dies wird im folgenden unter „chemischer Vorbehandlung“ verstanden.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] 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. 120) aufgelisteten Basensequenzen sind. Die Primer-Oligonukleotide sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie kein CpG Dinukleotid enthalten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens ist die Sequenz der Primer Oligonukleotide so aufgebaut, daß sie nur an die Astrocytom und/oder Hirngewebe spezifische DNA von Interesse selektiv an hybridisiert und diese amplifiziert, wodurch die Amplifikation von Hintergrund- oder nicht relevanter DNA minimiert wird. Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung wird Hintergrund DNA als genomische DNA bedeutend angenommen, die kein relevantes Gewebe-spezifisches Methylierungsmuster aufweist, wobei in diesem Fall das relevante Gewebe Hirngewebe ist, genauer gesagt Astrocyten- oder Astrocytomgewebe. Beispiele von solchen in den Beispielen verwendeten Primern sind in Tabelle 1 enthalten.

[0040] 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.

[0041] 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.

[0042] 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-Oligomersonden. 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 Oligonukleotid 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 auf-

fürten 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.

[0043] Im fünften Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

[0044] 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.

[0045] 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. Zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer können die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

[0046] Bevorzugt wird das vorgenannte Verfahren zur Ermittlung von genetischen und/oder epigenetischen Parametern von genomischer DNA verwendet.

[0047] Die erfindungsgemäßen Oligomere oder Arrays derselben sowie ein erfindungsgemäßes Kit sollen zur Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einstufung, Einstufung und/oder der Diagnose von Astrocytomen verwendet werden. Weiter bevorzugt für die Differenzierung von Grad I und II Astrocytomen oder der Diagnose der Prädisposition gegenüber Astrocytomen. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird das Verfahren bevorzugterweise für die Analyse von wichtigen genetischen und/oder epigenetischen Parametern innerhalb genomischer DNA verwendet, insbesondere für die Verwendung bei der Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einstufung, Einstufung und/oder der Diagnose von Astrocytomen und der Prädisposition gegenüber Astrocytomen.

[0048] Das erfindungsgemäße Verfahren wird zum Beispiel für die Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einstufung, Einstufung und/oder die Diagnose von Astrocytomen verwendet.

[0049] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 können für die Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einstufung, Einstufung und/oder der Diagnose von genetischen und/oder epigenetischen Parametern von genomischer DNA verwendet werden, insbesondere zur Verwendung zur Differenzierung von Grad I und II Astrocytomen.

[0050] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums und/oder Therapeutikums zur Charakterisierung, Klassifizierung, Differenzierung, Grad-Einstufung, Einstufung und/oder der Diagnose von Astrocytomen durch Analyse von Methylierungsmustern von genomischer DNA. Das Diagnostikum und/oder das Therapeutikum ist dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Nukleinsäure, gemäß der vorliegenden Erfindung (Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120), gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen, zu dessen Herstellung verwendet wird.

[0051] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum für Astrocytome durch Analyse von Methylierungsmustern von genomischer DNA, insbesondere zur Verwendung zur Differenzierung von Grad I und II Astrocytomen oder der Diagnose der Prädisposition gegenüber Hirntumoren, wobei das Diagnostikum und/oder Therapeutikum dadurch gekennzeichnet ist, das es mindestens eine Nukleinsäure gemäß der Erfindung (Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120), gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Zusatz- und Hilfsstoffen enthält.

[0052] 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 genomischer DNA, wobei die Parameter mittels der vorliegenden Erfindung erhalten wurden 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.

[0053] 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.

[0054] 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.

[0055] "Genetische Parameter" im Sinne dieser Erfindung sind Mutationen und Polymorphismen von Genen, die mit der Genregulation 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.

[0056] "Epigenetische Parameter" im Sinne dieser Erfindung sind insbesondere Cytosin-Methylierungen und weitere chemische Modifikationen von DNA-Basen von Genen, die mit der Genregulation 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.

[0057] Im Kontext der vorliegenden Erfindung wird der Begriff „Behandlung“, wie auf Astrocytome angewendet, als die Planung von geeigneten Verfahren der Behandlung der Patienten (z.B. Chirurgie, Bestrahlungstherapie, Chemotherapie) einschließend angenommen.

[0058] Die Erfindung soll nun im folgenden anhand der Sequenzen und Beispiele unter Bezug auf die beige-fügte Figuren weiter verdeutlicht werden, ohne hierauf eingeschränkt zu werden.

[0059] **Fig. 1**

[0060] **Fig. 1** zeigte die Hybridisierung von Fluoreszenz-markierten Amplifikaten an ein Oberflächengebundenes Oligonukleotid. Probe I stammt von Grad I Astrocytom (Hirntumor)-Gewebe und Probe II stammt von Grad II Astrocytom (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. Es kann gesehen werden, daß Probe I für die CG Positionen (wie in Beispiel (1-4) gezeigt) der Amplifikate der Gene TGF-alpha (vergl. **Fig. 1A**), MLH1 (vergl. **Fig. 1B**), NF1 (vergl. **Fig. 1C**) und CSKN2B (**Fig. 1D**) nicht methyliert war, wohingegen im Vergleich Probe II ein höheres Ausmaß an Methylierung an denselben Positionen aufwies.

[0061] **Fig. 2**

[0062] Differenzierung von gesunden Kontrollproben (markiert I) und Astrocytom Grad I (markiert II) (**Fig. 2A**), und gesunden Kontrollproben und Astrocytom Grad II (markiert III) (**Fig. 2B**). Hohe Wahrscheinlichkeit von Methylierung entspricht rot, Unsicherheit schwarz und geringe Wahrscheinlichkeit grün. Die Marker auf der linken Seite des Plots sind Gen Identifizierer, wobei die ersten 3 Ziffern sich auf die Tabelle 1 beziehen. Die Hybridisierung wurde mit Cy5 markierten Amplifikaten durchgeführt, die durch Multiplex PCR Reaktionen erzeugt wurden, wie in Tabelle 1 gezeigt. Die Marker auf der rechten Seite geben die Signifikanz (p-Wert, T-Test) des Unterschieds zwischen dem Mittel der beiden Gruppen an. Jede Reihe entspricht einem einzelnen CpG und jede Spalte den Methylierungsniveaus einer Probe. Die CpGs sind nach ihrem Beitrag zu der Unterscheidung für die differenzielle Diagnose der zwei Läsionen geordnet, mit zunehmendem Beitrag von oben nach unten.

[0063] **Fig. 3** Differenzierung von Astrocytom Grad I (1) und Astrocytom Grad II (2). Hohe Wahrscheinlichkeit von Methylierung entspricht rot, Unsicherheit schwarz und geringe Wahrscheinlichkeit grün. Die Marker auf der linken Seite des Plots sind Gen und CpG Identifizierer. Die Hybridisierung wurde mit Cy5 markierten Amplifikaten durchgeführt, die durch Multiplex PCR Reaktionen erzeugt wurden, wie in Tabelle 1 gezeigt. Die Marker auf der rechten Seite geben die Signifikanz (p-Wert, T-Test) des Unterschieds zwischen dem Mittel der beiden Gruppen an. Jede Reihe entspricht einem einzelnen CpG und jede Spalte den Methylierungsniveaus einer Probe. Die CpGs sind nach ihrem Beitrag zu der Unterscheidung für die differenzielle Diagnose der zwei Läsionen geordnet, mit zunehmendem Beitrag von oben nach unten.

[0064] **Fig. 4**

[0065] Trennung von Astrocytom Grad I (I) und Astrocytom Grad II (II). Hohe Wahrscheinlichkeit von Methylierung entspricht rot, Unsicherheit schwarz und geringe Wahrscheinlichkeit grün. Die Marker auf der linken Seite des Plots sind Gen und CpG Identifizierer. Die Hybridisierung wurde mit Cy5 markierten Amplifikaten der Gene MLH1, TGF-alpha und NF1 durchgeführt, die alle durch Einzelgen-PCR Reaktionen erzeugt wurden. Jede Reihe entspricht einem einzelnen CpG und jede Spalte den Methylierungsniveaus einer Probe. Die CpGs sind nach ihrem Beitrag zu der Unterscheidung für die differenzielle Diagnose der zwei Läsionen geordnet, mit zunehmendem Beitrag von oben nach unten.

Sequenz ID Nos. 1 bis 120

[0066] Die Sequenz ID Nos. 1 bis 120 zeigen Sequenzen von Genen, die mit der Genregulation 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 der Genregulation 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 der Genregulation 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.)

Seq. ID No. 121 bis Seq. ID No. 136

[0067] Seq. ID No. 121 bis Seq. ID No. 136 zeigen spezifische Oligonukleotid-Sequenzen, wie in den folgenden Beispielen verwendet.

Beispiel 1: Methylierungsanalyse des Gens TGF-alpha

[0068] Das folgende Beispiel betrifft ein Fragment des Gens TGF-alpha, worin eine spezifische CG-Position auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert wird.

[0069] 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.

[0070] 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. Die 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 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 TGF-alpha analysiert. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden GGTTTGGTTGGGAGGTAAG (Seq. ID No. 121) und CCCCTAAAAACACAAAA (Seq. ID No. 122) ein definiertes Fragment der Länge 533 bp amplifiziert. Die Einzelgen-PCR Reaktion wurde auf einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) unter der Verwendung von Bisulfit DNA 10 ng, Primer jeweils 6 pmol, dNTP jeweils 200 µM, 1,5 mM MgCl₂ und 1 U HotstartTaq (Qiagen AG) durchgeführt. Die anderen Bedingungen waren wie durch den Hersteller der Taq Polymerase empfohlen. In der Multiplex PCR wurden bis zu 16 Primerpaare in der PCR Reaktion verwendet. Die Multiplex PCR wurde gemäß der Einzelgen-PCR mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Primer jeweils 0,35 pmol, dNTP jeweils 800 µM und 4,5 mM MgCl₂. Das Zyklusprogramm für die Einzelgen-PCR und die Multiplex-PCR war wie folgt: Schritt 1, 14 min 96 °C; Schritt 2, 60 sec 96 °C; Schritt 3, 45 sec 55 °C; Schritt 4, 75 sec 72 °C; Schritt 5, 10 min 72 °C; die Schritte 2 bis 4 wurden 39fach wiederholt.

[0071] Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise AAGTTAGGCGTTTTTTGT (Seq. ID No. 123), wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 382 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.

[0072] 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 AAGTTAGGTGTT-TTTTGT (Seq. ID No. 124). Daher findet die Hybridisierungsreaktion nur statt, falls ein nicht-methyliertes Cytosin an der zu analysierenden Positionen vorhanden ist.

Beispiel 2: Methylierungsanalyse des Gens NF1

[0073] Das folgende Beispiel betrifft ein Fragment des Gens NF1, worin eine spezifische CG-Position auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert wird.

[0074] 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.

[0075] 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. Die 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 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 NF-1 analysiert. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden TTGGGAGAAAGGTTAGTTTT (Seq. ID No. 129) und ATACAAACTCCCAATATTCC (Seq. ID No. 130) ein definiertes Fragment der Länge 600 bp amplifiziert. Die

Einzelgen-PCR Reaktion wurde auf einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) unter der Verwendung von Bisulfit DNA 10 ng, Primer jeweils 6 pmol, dNTP jeweils 200 µM, 1,5 mM MgCl₂ und 1 U HotstartTaq (Qiagen AG) durchgeführt. Die anderen Bedingungen waren wie durch den Hersteller der Taq Polymerase empfohlen. In der Multiplex PCR wurden bis zu 16 Primerpaare in der PCR Reaktion verwendet. Die Multiplex PCR wurde gemäß der Einzelgen-PCR mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Primer jeweils 0,35 pmol, dNTP jeweils 800 µM und 4,5 mM MgCl₂. Das Zyklusprogramm für die Einzelgen-PCR und die Multiplex-PCR war wie folgt: Schritt 1, 14 min 96 °C; Schritt 2, 60 sec 96°C; Schritt 3, 45 sec 55 °C; Schritt 4 ,75 sec 72 °C; Schritt 5, 10 min 72 °C; die Schritte 2 bis 4 wurden 39fach wiederholt.

[0076] Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise AATTAAAACGCCCTAAAA (Seq. ID No. 131), wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 24 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.

[0077] 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 AATTAAAACAC-CCTAAAA (Seq. ID No. 132). Daher findet die Hybridisierungsreaktion nur statt, falls ein nicht-methyliertes Cytosin an der zu analysierenden Positionen vorhanden ist.

Beispiel 3: Methylierungsanalyse des Gens MLH1.

[0078] Das folgende Beispiel betrifft ein Fragment des Gens MLH1, worin eine spezifische CG-Position auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert wird.

[0079] 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.

[0080] 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. Die 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 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 MLH1 analysiert. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden TTAAAGGTAAGAGAATAGGT (Seq. ID No. 133) und TTAACCCTACTCTTATAACC (Seq. ID No. 134) ein definiertes Fragment der Länge 568 bp amplifiziert. Die Einzelgen-PCR Reaktion wurde auf einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) unter der Verwendung von Bisulfit DNA 10 ng, Primer jeweils 6 pmol, dNTP jeweils 200 µM, 1,5 mM MgCl₂ und 1 U HotstartTaq (Qiagen AG) durchgeführt. Die anderen Bedingungen waren wie durch den Hersteller der Taq Polymerase empfohlen. In der Multiplex PCR wurden bis zu 16 Primerpaare in der PCR Reaktion verwendet. Die Multiplex PCR wurde gemäß der Einzelgen-PCR mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Primer jeweils 0,35 pmol, dNTP jeweils 800 µM und 4,5 mM MgCl₂. Das Zyklusprogramm für die Einzelgen-PCR und die Multiplex-PCR war wie folgt: Schritt 1, 14 min 96 °C; Schritt 2, 60 sec 96°C; Schritt 3, 45 sec 55 °C; Schritt 4 ,75 sec 72 °C; Schritt 5, 10 min 72 °C; die Schritte 2 bis 4 wurden 39fach wiederholt.

[0081] Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise TTGTAGGACGTTTATATG (Seq. ID No. 135), wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 125 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.

[0082] 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 Oligonukle-

otid 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 TTGTAGGATGTTTATATG (Seq. ID No. 136). Daher findet die Hybridisierungsreaktion nur statt, falls ein nicht-methyliertes Cytosin an der zu analysierenden Positionen vorhanden ist.

Beispiel 4: Methylierungsanalyse des Gens CSNK2B.

[0083] Das folgende Beispiel betrifft ein Fragment des Gens CSNK2B, worin eine spezifische CG-Position auf ihren Methylierungsstatus hin analysiert wird.

[0084] Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrosulfid, 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.

[0085] 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. Die 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 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 CSNK2B analysiert. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden GGGGAAATGGAGAAGTGTA (Seq. ID No. 125) und CTACCAATCCCAAATAACC (Seq. ID No. 126) ein definiertes Fragment der Länge 524 bp amplifiziert. Die Einzelgen-PCR Reaktion wurde auf einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) unter der Verwendung von Bisulfit DNA 10 ng, Primer jeweils 6 pmol, dNTP jeweils 200 µM, 1,5 mM MgCl₂ und 1 U HotstartTaq (Qiagen AG) durchgeführt. Die anderen Bedingungen waren wie durch den Hersteller der Taq Polymerase empfohlen. In der Multiplex PCR wurden bis zu 16 Primerpaare in der PCR Reaktion verwendet. Die Multiplex PCR wurde gemäß der Einzelgen-PCR mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Primer jeweils 0,35 pmol, dNTP jeweils 800 µM und 4,5 mM MgCl₂. Das Zyklusprogramm für die Einzelgen-PCR und die Multiplex-PCR war wie folgt: Schritt 1, 14 min 96 °C; Schritt 2, 60 sec 96 °C; Schritt 3, 45 sec 55 °C; Schritt 4, 75 sec 72 °C; Schritt 5, 10 min 72 °C; die Schritte 2 bis 4 wurden 39fach wiederholt.

[0086] Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise TAGGTTAGCGTATTGGGA (Seq. ID No. 127), wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 50 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.

[0087] 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 TAGGTTAGTGATTGGGA (Seq. ID No. 128). Daher findet die Hybridisierungsreaktion nur statt, falls ein nicht-methyliertes Cytosin an der zu analysierenden Positionen vorhanden ist.

Beispiel 5: Differenzierung von gesunden Proben und Astrocytom Grad I und Grad II, isoliert von Cerebrum

[0088] Um einen Bezug der Methylierungsmuster zu einem bestimmten Tumortyp herzustellen, bedarf es zunächst der vergleichenden Untersuchung der DNA-Methylierungsmuster von zwei Gruppen von Patienten mit alternativen Formen eines Tumors, in diesem Fall eine Gruppe von Astrocytom Grad I und einer anderen Gruppe von Astrocytom Grad II, mit denjenigen von gesundem Gewebe (**Fig. 2A und B**). Diese Untersuchungen wurden analog den Beispielen 1-4 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 Methylierungssensitive „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, vergli-

chen werden.

[0089] Alle klinischen Proben wurden zur Zeit der Chirurgie entnommen, d.h. in einer Routine klinischen Situation (Santourlidis, S., Prostate 39:166-174, 1999, Florl, A.R., Br. J. Cancer 80:1312-1321, 1999). Ein Panel von genomischen Fragmenten von 64 verschiedenen Genen (aufgelistet in Tabelle 1) wurden Bisulphit-behandelt und durch 6 Sets von Multiplex PCRs (mPCR) gemäß Beispiel 1 amplifiziert. Die mPCR Reaktionen (I, J, K, L, M, N) der genomischen, Bisulphit-behandelten DNA wurde unter Verwendung der Kombination von Primerpaaren wie in Tabelle 1 gezeigt, durchgeführt. Jedoch, wie dem Fachmann ersichtlich sein wird, ist es auch möglich, andere Primer zu verwenden, die die genomische, Bisulphit-behandelte DNA auf eine geeignete Weise amplifizieren. Jedoch sind die Primerpaare, wie in Tabelle 1 aufgelistet, besonders bevorzugt. Um Astrocytome Grad I von gesunden Kontrollproben zu differenzieren, wurden optimale Ergebnisse durch Aufnahme von mindestens 6 CpG Dinukleotiden erhalten, wobei die am meisten informativen CpG Positionen für diese Unterscheidung innerhalb der Gene OAT, GP1B, cMyc, UNG, TIMP3 und cABL (vergl. **Fig. 2A**, Tab. 1) lokalisiert sind. Um Astrocytome Grad I von gesunden Kontrollproben zu differenzieren, wurden optimale Ergebnisse durch Aufnahme von mindestens 6 CpG Dinukleotiden erhalten, wobei die am meisten informativen CpG Positionen für diese Unterscheidung innerhalb der Gene cMyc, EGR4, ApoA1, AR und den Hitzeschockgenen (vergl. **Fig. 2B**, Tab. 1) lokalisiert sind. Zusätzlich zeigte die Hauptzahl der analysierten CpG Dinukleotide des Panels verschiedenen Methylierungsmuster zwischen den zwei Phänotypen. Die Ergebnisse belegen, daß Methylierungs-Fingerprints in der Lage sind, eine differenzielle Diagnose von soliden malignen Tumoren zur Verfügung zu stellen und daher bei einer großen Zahl von klinischen Situationen angewendet werden könnten.

Beispiel 6: Differenzierung von Astrocytom Grad I und Grad II Tumoren

[0090] Um einen Bezug der Methylierungsmuster zu einem bestimmten Tumortyp herzustellen, bedarf es zunächst der Analyse der DNA-Methylierungsmuster von zwei Gruppen von Patienten mit alternativen Formen eines Tumors, in diesem Fall eine Gruppe von Astrocytom Grad I und einer anderen Gruppe von Astrocytom Grad II. Diese Untersuchungen wurden analog zu 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 Methylierungssensitive „Primer-Extension-Reaktion“ sehr genau möglich ist. In einer besonders bevorzugten Variante, wie in Beispielen 1 bis 4 verdeutlicht, kann der Methylierungsstatus von Hunderten oder Tausenden von CpGs auf einem Oligomerarray analysiert werden. Es ist auch möglich, daß die Muster durch zum Beispiel Clustering-Analysen, die z.B. durch einen Rechner durchgeführt werden können, verglichen werden.

[0091] Alle klinischen Proben wurden zur Zeit der Chirurgie entnommen, d.h. in einer Routine klinischen Situation (Santourlidis, S., Prostate 39:166-174, 1999, Florl, A.R., Br. J. Cancer 80:1312-1321, 1999). Ein Panel von genomischen Fragmenten von 56 verschiedenen Genen (aufgelistet in Tabelle 1) wurden Bisulphit-behandelt und durch 6 Sets von Multiplex PCRs (mPCR), genannt I, J, K, L, M und N in Tabelle 1, gemäß Beispiel 1 amplifiziert. Die mPCR Reaktionen der genomischen, Bisulphit-behandelten DNA wurde unter Verwendung der Kombination von Primerpaaren wie in Tabelle 1 gezeigt, durchgeführt. Wie dem Fachmann ersichtlich sein wird, ist es auch möglich, andere Primer zu verwenden, die die genomische, Bisulphit-behandelte DNA auf eine geeignete Weise amplifizieren. Jedoch sind die Primerpaare, wie in Tabelle 1 aufgelistet, besonders bevorzugt. Optimale Ergebnisse wurden durch Aufnahme von mindestens 8 CpG Dinukleotiden erhalten, wobei die am meisten informativen CpG Positionen für diese Unterscheidung innerhalb der Gene CSKNB2, NF1, M1H1, EGR4, AR; TGF-alpha und APOC2 (vergl. **Fig. 3**) lokalisiert sind. Zusätzlich zeigte die Hauptzahl der analysierten CpG Dinukleotide des Panels verschiedenen Methylierungsmuster zwischen den zwei Phänotypen. Die Ergebnisse belegen, daß Methylierungs-Fingerprints in der Lage sind, eine differenzielle Diagnose von soliden malignen Tumoren zur Verfügung zu stellen und daher bei einer großen Zahl von klinischen Situationen angewendet werden könnten.

Beispiel 7: Differenzierung von Astrocytom Grad I und Grad II Tumoren unter der Verwendung von DNA Fragmenten, die vom Gen TGF-alpha, NF1 und M1H1 abgeleitet sind.

[0092] Die Methylierungsmuster von CpG Inseln, abgeleitet von den Genen TGF-alpha, NF1 und M1H1 wurden analysiert. Um die Gene zu evaluieren, wurden bereits identifizierte differenzierende Astrocytom Grad I und Grad II Tumore im Klassen-Vorhersage-Ansatz (vergl. Beispiel 6) verwendet. Die Gene TGF-alpha, NF1 und M1H1 wurden aus genomischer Bisulfit behandelter DNA wie in Beispielen 1, 2 und 3 beschrieben, amplifiziert. Die DNA wurde aus Gewebeproben von zwei Gruppen von Patienten mit alternativen Formen eines Tumors, in diesem Fall eine Gruppe von Astrocytom Grad I und eine andere Gruppe von Astrocytom Grad II. Optimale Ergebnisse wurden durch die Aufnahme von mindestens 6 CpG Dinukleotiden erhalten, wobei die am meisten informativen CpG Positionen für diese Unterscheidung innerhalb der Gene TGF-alpha und NF1

und M1H1 (vergl. **Fig. 4**) lokalisiert sind. Die Ergebnisse validieren die Ergebnisse der in Beispiel 6 gezeigten Methylierungs-Fingerprints weiter.

Tabelle 1

[0093] Liste der Gene, Referenznummern und Primer Oligonukleotide gemäß Beispielen 1-7 und **Fig. 1-4**.

Gen ID	mPCR set	Gen	PCR Primer	PCR Primer
81	N	ADCYAP1	GGTGGATTTATGGTTATTTTG	TCCCTCCCTTACCCTTCAAC
292	K	AFP	AGGTTTATTGAATATTTAGG	AACATATTTCCACAACATCC
85	L	ANT1	GTTTAAGGTTGTTTGTGTTAT AAAT	CCTCCTCCCAACTACAAAA
48	L	APOA1	GTTGGTGGTGGGGGAGGTAG	ACAACCAAAATCTAAACTAA
50	N	APOC2	ATGAGTAGAAGAGGTGATAT	CCCTAAATCCCTTTCTTACC
87	K	AR	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA	ACCCCTAAATAATTATCCT
1143	L	ATP5A1	AGTTTGTTTTAATTTATTGAT AGGA	AACAACATCTTTACAATTACT CC
1011	L	CABL	GGTTGGGAGATTTAATTTTAT T	ACCAATCCAACTTTTCCTT
77	L	CD1A	ATTATGGTTGGAATTGTAAT	ACAAAAACAACAAACACCCC

Gen ID	mPCR set	Gen	PCR Primer	PCR Primer
1079	L	CD63	TGGGAGATATTTAGGATGTG A	CTCACCTAAACTTCCCAAA
99	M	CDC25A	AGAAGTTGTTTATTGATTGG	AAAATTAAATCCAAACAAAC
187	L	CDH3	GTTTAGAAGTTTAAGATTAG	CAAAAACCTCAACCTCTATCT
88	K	CDK4	TTTTGGTAGTTGGTTATATG	AAAAATAACACAATAACTCA
310	I	CFOS	TTTTGAGTTTTAGAAATTGTTT TAG	AAAAACCCCTACTCATCTAC TA
1034	L	CMYC	TTTTGTGTGGAGGGTAGTTG	CCCCAAATAAAACAAAATAACC
312	K	CMYC	TTGTTTTTGTGGAAAAGAGG	TTTCAATCTCAAAACTCAACC
313	I	CMYC	AAAGGTTTGGAGGTAGGAGT	TCCTTTCCAAATCCTCTTT
37	M	CRIP1	TTTAGGTTTAGGGTTTAGTT	CCACTCCAAAATAATATCA
70	N	CSF1	TAGGGTTTGGAGGGAAAG	AAAAATCACCCCTAACCAAC
78	M	CSNK2B	GGGGAAATGGAGAAGTGTA	CTACCAATCCCAAAATAACC
272	N	CTLA4	TTTTTATGGAGAGTAGTTGG	TAACCTTACTACCAATTAC
287	K	DAD1	TTTTGTGTAGAGTAATTG	ACCTCAATTTCCCCATTAC
147	I	DAPK1	ATTAATATTATGTAAAGTGA	CTTACAACCATTCACCCACA
319	J	E-CADHERIN	GGGTGAAAGAGTGAGTTTTA TTT	ACTCCAAAACCCATAACTAA
63	M	EGFR	GGTGTGATAAGATTGAA G	CCCTTACCTTTCTTTTCCT
311	I	EGFR	GGGTAGTGGGATATTTAGTTT TT	CCAACACTACCCCTCTAA
82	M	EGR4	AGGGGGATTGAGTGTTAAGT	CCCAAACATAAACACAAAAT
1012	L	ELK1	AAGTGTTTTAGTTTTTAATGG GTA	CAAACCCAAAACCTCACCTAT
307	J	ERBB2	GAGTGATATTTTATTTTATG TTTGG	AAAACCCTAACTCAACTACTC AC
308	K	ERBB2	GAGTTTGGGAGTTTAAGATT AGT	TCAACTTCACAACCTTCATTCTT AT
130	N	GP1B	GGTGATAGGAGAATAATGTT GG	TCTCCCAACTACAACCAAAC
290.2	M	HEAT SHOCK	AGAGGAGATATTTTTTATGG	AAAAATCCTACAACAACCTTC
290.3	J	HEAT SHOCK	AAGGATAATAATTTGTTGGG	CTTAAATACAACTTAATCC
89	I	HUMOS	TTTATTGATTGGGAGTAGGT	CTAATTTTACAAACATCCTA
1083	N	IL13	TTTTTAGGGTAGGGGTTGT	CCTTATCCCCCATAACCA
1010	L	LMYC	AGGTTTGGGTATTGAGTTT	CATTATTTCTAACTACCTTAT ATCTC
291	L	MC2R	ATATTTGATATGTTGGGTAG	ACCTACTACAAAAAATCATC
314.2	I	MGMT	AAGGTTTTAGGGAAGAGTGT TT	ACTCCCAATACCTCACAATAT AAC
427	K	MHC	GGGTATTAGGAATTTATGTG	CAAAACACCTTCCTAACTCA
401	I	MHC	TTGTTGTTTTTAGGGGTTTTG G	TCCTTCCCATTCCTCAAATATC
458	M	MHC	AAGAGTGAGAAGTAGAGGGT T	CTACTCTCTAAAACTCCAAAC
487	M	MHC	GAGGTAAAGGAAGTTTTGG A	AAACTAAATTCTCCCAATACC
465	L	MHC	ATTGATAGGTAGTTAGATTG G	AAAAAACTCTCATAAATCTCA

Gen ID	mPCR set	Gen	PCR Primer	PCR Primer
451	M	MHC	AGGAGGAAGGGTTAATAAAG A	ATCTTCCTACTACTATCTCTAA C
441	M	MHC	AGGTTGGATTTTGGGTAGGT	TCTCCTACTCTCCTAATCTC
160	M	MLH1	TTTAAGGTAAGAGAATAGGT	TTAACCCTACTCTTATAACC
94	N	N33	TGGAGGAGATATTGTTTTGT	TTTTTCAAATCAAAACCCTACT
302	J	NF1	TTGGGAGAAAGGTTAGTTTT	ATACAAACTCCCAATATTCC
1009	L	NMYC	GGAGGAGTATATTTTGGGTTT	ACAAACCCTACTCCTTACCTC
1018	N	NUC	AAGTTGTGTTTTTAAAAGGGT TA	AAAAACTAAACCTACCCAATA A
1007	N	OAT	TGGAGGTGGATTTAGAGGTA	ACCAAAACCCCAAAACAA
304	J	P16	AGGGGTGGTTGGTTATTAG	TAATTCCAATTCCCCTACAA
305	J	P53	GTGATAAGGGTTGTGAAGGA	CAAAACTTACCCAATCCAA
1069	N	POMC	AGTTTTTAAATAATGGGGAA AT	ACTCTTCTTCCCCTCCTTC
177	N	PRG	AGTTGAAGTTATAAGGGGTG	AATAAAAACCTCTCAAAAACC
26	K	SOD1	AGGGGAAGAAAAGGTAAGTT	CCCACTCTAACCCCAAACCA
303	I	TGF-A	GGTTTGTGGGGAGGTAAG	CCCCCTAAAACACAAAA
301	J	TGF-B1	GGGGAGTAATATGGATTG	CCTTTACTAAACACCTCCCAT A
317	I	TIMP3	GTAAGGGTTTTGTGTTGTTT	CCCCCTCAAACCAATAAC
128	N	TNFB	TTTTTGTTTTTGATTGAAATA GTAG	AAAAACCCCAAAATAAACAA
35	L	UBB	TTAAGTTATTTAGGTGGAGT TTA	ACCAAAATCCTACCAATCAC
1140	N	UNG	GTTGGGGTGTTTGAGGAA	CCTCTCCCCTCTAATTAAACA
300	J	VEGF	TGGGTAATTTTAGGTTGTGA	CCCCAAAAACAAATCACTC
188	K	WT1	AAAGGGAAATTAAGTGTGT	TAACTACCCTCAACTCCC

Schutzansprüche

1. Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt der chemisch vorbehandelten genomischen DNA gemäß einer der Sequenzen ausgewählt aus der Gruppe von Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 und dazu komplementärer Sequenzen.

2. 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 genomische DNA gemäß einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 nach Anspruch 1 hybridisiert oder dazu identisch ist.

3. Oligomer nach Anspruch 2, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt.

4. Oligomer nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet.

5. Satz von Oligomeren, umfassend mindestens zwei Oligomere nach einem der Ansprüche 3 bis 4.

6. Satz von Oligomeren nach Anspruch 5, umfassend Oligomere zur Detektion des Methylierungszustandes aller CpG Dinukleotide innerhalb einer der Sequenzen gemäß Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 nach Anspruch 1 und dazu komplementärer Sequenzen.

7. Satz von mindestens zwei Oligonukleotiden nach Anspruch 2, die als Primer-Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Sequenzen einer der Seq. ID No. 1 bis Seq. ID No. 120 und dazu komplementären Sequenzen.

zen und Abschnitten davon eingesetzt werden können.

8. Satz von Oligonukleotiden nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.

9. An eine Festphase gebundene 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. 120 und dazu komplementärer Sequenzen stehenden Erkrankungen, wobei mindestens ein Oligomer nach einem der Ansprüche 2 bis 4 an eine feste Phase gekoppelt vorliegt.

10. Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

11. Array nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

12. 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.

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

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Figur : 1

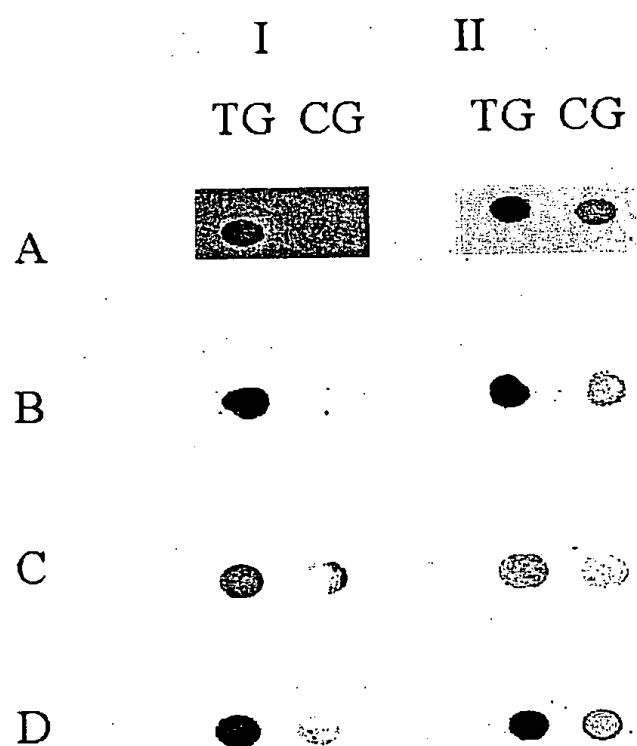
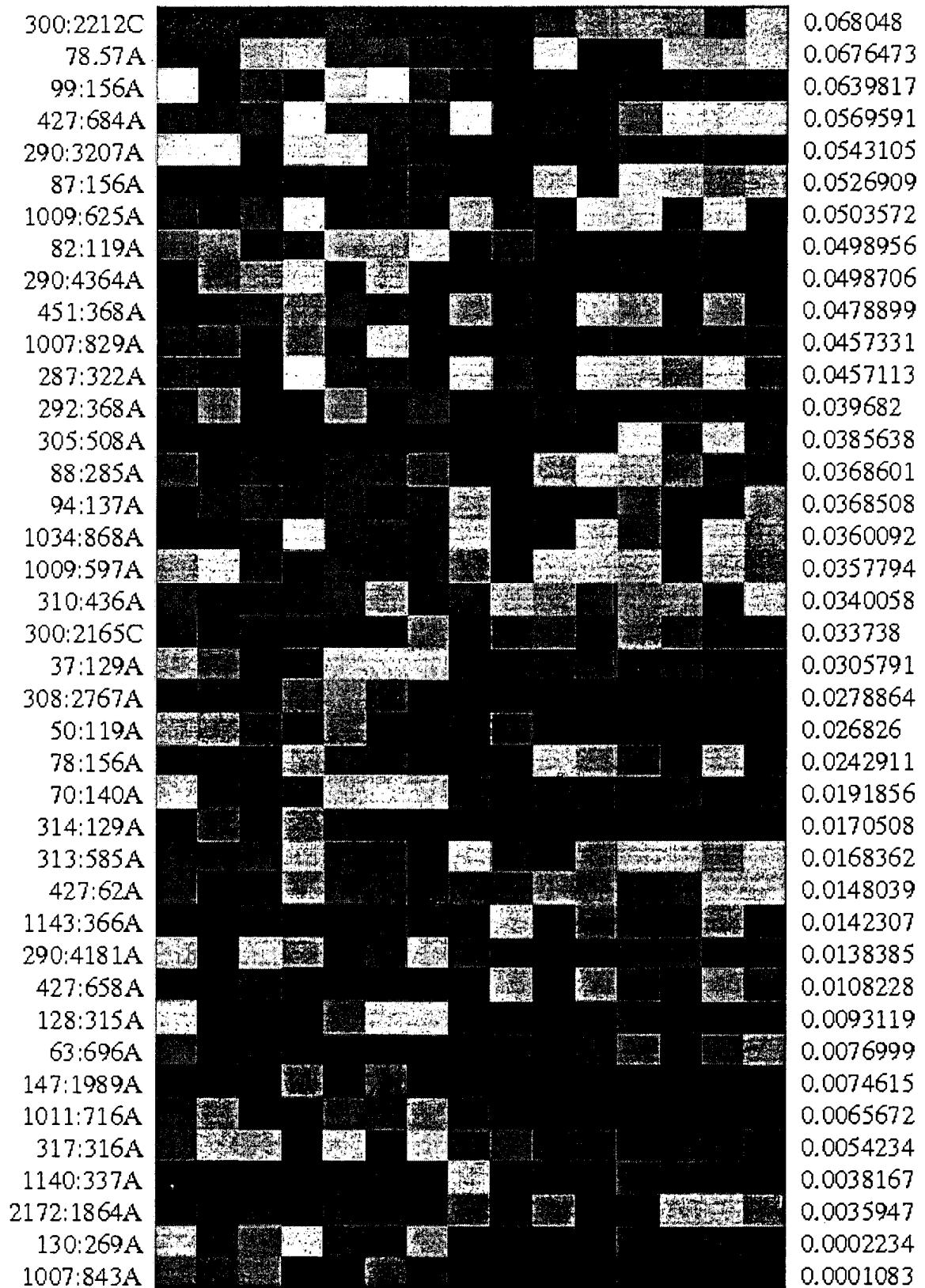
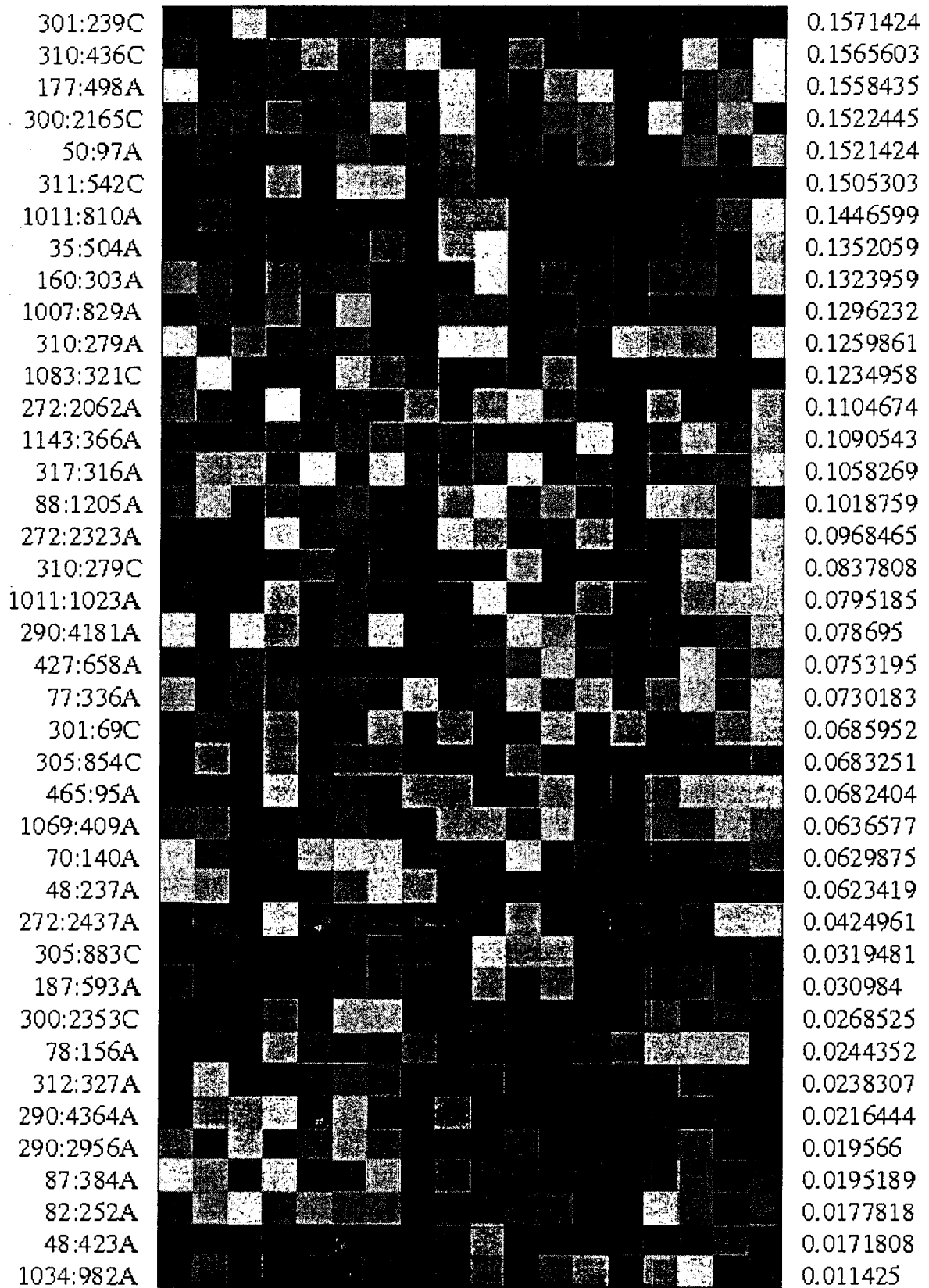


Figure 2A



I

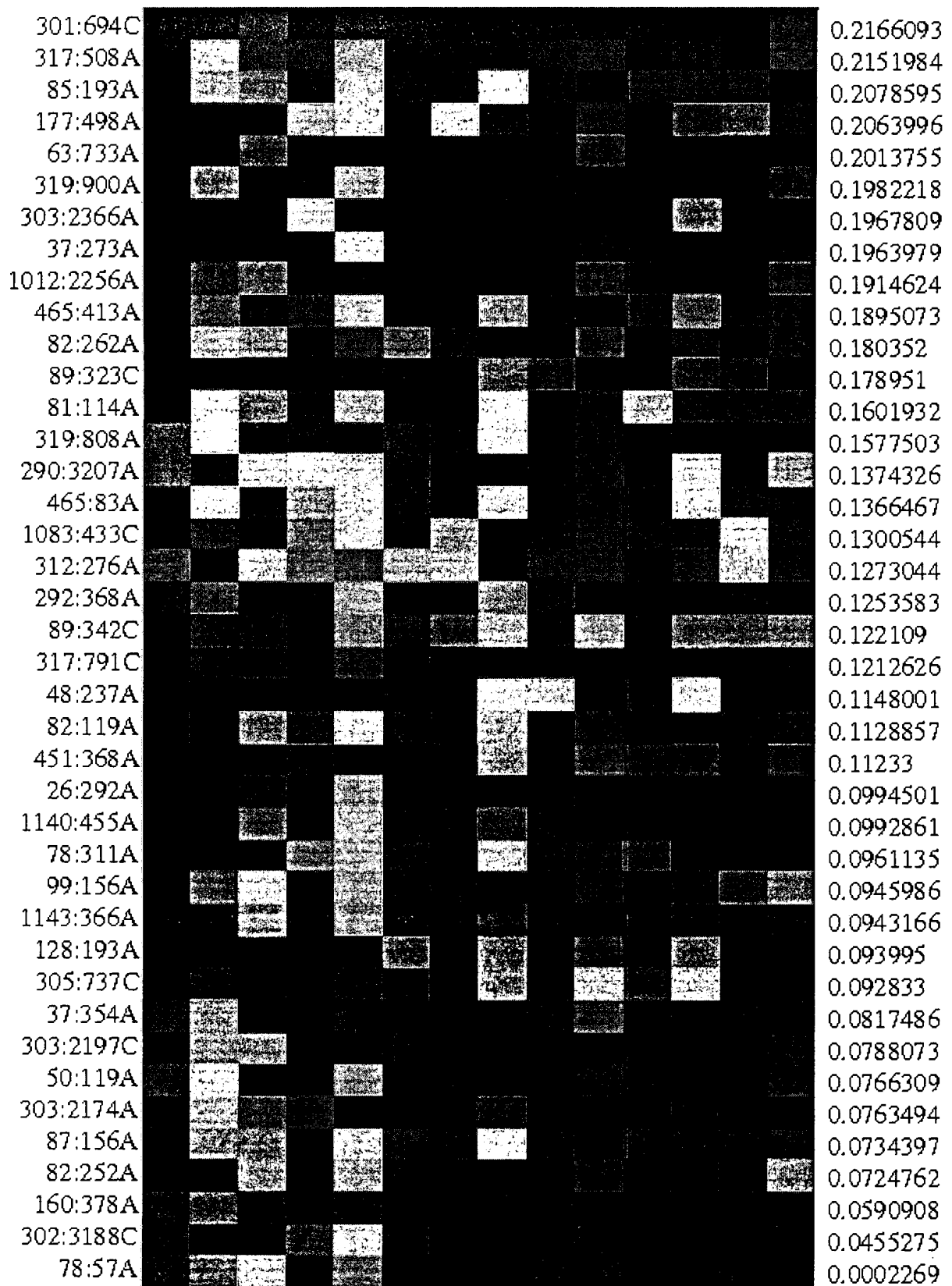
II

Figur 2B

I

II

Figur 3



I

II

Figur : 4

