



(11) **EP 1 438 437 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:  
**22.04.2009 Patentblatt 2009/17**

(21) Anmeldenummer: **02802274.7**

(22) Anmeldetag: **25.10.2002**

(51) Int Cl.:  
**C12Q 1/68 (2006.01)**

(86) Internationale Anmeldenummer:  
**PCT/DE2002/004054**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:  
**WO 2003/038121 (08.05.2003 Gazette 2003/19)**

(54) **VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN IN IMMOBILISIERTEN DNA PROBEN**

METHOD FOR THE DETECTION OF CYTOSINE METHYLATION IN IMMOBILISED DNA SAMPLES  
PROCEDE DE DETECTION DE METHYLATION DE LA CYTOSINE DANS DES ECHANTILLONS D'ADN IMMOBILISE

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR  
IE IT LI LU MC NL PT SE SK TR**

(30) Priorität: **26.10.2001 DE 10154317**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**21.07.2004 Patentblatt 2004/30**

(73) Patentinhaber: **Epigenomics AG  
10178 Berlin (DE)**

(72) Erfinder:  
• **BERLIN, Kurt  
14532 Stahnsdorf (DE)**  
• **BALLHAUSE, Matthias  
13187 Berlin (DE)**  
• **GÜTIG, David  
13357 Berlin (DE)**

(74) Vertreter: **Schubert, Klemens  
Neue Promenade 5  
10178 Berlin-Mitte (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:  
**WO-A-00/44934 US-B1- 6 291 166**

- **OLEK A ET AL: "A modified an improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 24, Nr. 24, 1996, Seiten 5064-5066, XP002106408 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt**
- **MYOHANEN S ET AL: "AUTOMATED FLUORESCENT GENOMIC SEQUENCING AS APPLIED TO THE METHYLATION ANALYSIS OF THE HUMAN ORNITHINE DECARBOXYLASE GENE" DNA SEQUENCE, NEWYORK, NY, US, Bd. 5, Nr. 1, 1994, Seiten 1-8, XP001097559 ISSN: 1042-5179**
- **REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 in der Anmeldung erwähnt**
- **SHEPHERD M ET AL: "MONITORING OF FLUORESCENCE DURING DNA MELTING AS A METHOD FOR DISCRIMINATION AND DETECTION OF PCR PRODUCTS IN VARIETY IDENTIFICATION" MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, Bd. 4, Nr. 6, 1998, Seiten 509-517, XP001016033 ISSN: 1380-3743**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

**EP 1 438 437 B1**

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierung in DNA-Proben.

**[0002]** 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.

**[0003]** 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

**[0004]** 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 Thymin 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 Fällung- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphate 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.

**[0005]** Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 1998 May 15;26(10):2255-64.

**[0006]** Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Dörfler 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-Patent 9500669) 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).

**[0007]** Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1998 Nov. 1;26(21):5009-10).

**[0008]** Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

**[0009]** Grigg G, Clark S. sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioassays.* 1994 Jun.;16(6): 431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Dörfler 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 bisulphate genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994 Feb. 25;22(4): 695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Danter R. Genomic sequencing indicates a correlation be-

tween 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 95/45560.

**[0010]** Ein weiteres bekanntes Verfahren ist die sogenannte methylierungssensitive PCR (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996), Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 3;93(18):9821-6). Für dieses Verfahren werden Primer verwendet, die entweder nur an eine Sequenz hybridisieren, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht, oder aber umgekehrt Primer, welche nur an eine Nukleinsäure bindet, die durch die Bisulfit-Behandlung einer an der betreffenden Position unmethylierten DNA entsteht. Mit diesen Primer können demnach Amplifikate erzeugt werden, deren Detektion wiederum Hinweise auf das Vorliegen einer methylierten oder unmethylierten Position in der Probe liefern, an welche die Primer binden.

**[0011]** Ein neueres Verfahren ist auch der Nachweis von Cytosin-Methylierung mittels einer Taqman PCR, das als Methyl-Light bekannt geworden ist (WO 00/70090). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den Methylierungsstatus einzelner oder weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, so dass sich eine nachfolgende Analyse der Produkte erübrigt.

**[0012]** 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), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonucleotide bei vermindertem nichtspezifischen Hintergrundsignal entnehmen.

**[0013]** Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoresziert markierte 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.

**[0014]** 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 feld-

freies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

**[0015]** MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.*) Für 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 Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines "charge tags" an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von "charge tagging" ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

**[0016]** Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989.

**[0017]** Nach der Erfindung der PCR sind in den folgenden Jahren zahlreiche Varianten bekannt geworden, die diese Technik zur Amplifikation der DNA verfeinern. Insbesondere ist hier die Multiplexierung der PCR (Multiplex-PCR) zu erwähnen, wobei man mehr als 2 spezifische Primer einsetzt und dabei in einem Reaktionsgefäß eine Vielzahl von verschiedenen, spezifischen Amplifikationen erzeugen kann. Besonders interessant ist auch die sogenannte Nested PCR, welche unter anderem zum Nachweis besonders geringer DNA Mengen verwendet wird. Diese Art der PCR besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationen, wobei die Primer der zweiten Amplifikation innerhalb des ersten Amplifikates liegen und nicht mit den Primern der ersten Amplifikation identisch sind. Dadurch wird eine besondere Spezifität erreicht, da die Primer der zweiten Amplifikation nur dann

funktionieren, wenn in der ersten Amplifikation das beabsichtigte Fragment erzeugt wurde. Dagegen ist die Vermehrung etwaiger Nebenprodukte der ersten Amplifikation in der zweiten so gut wie ausgeschlossen.

**[0018]** Die vorliegenden Verfahren zur Methylierungsanalyse, welche eine Bisulfitreaktion beinhalten, haben durchweg den Nachteil, dass die Reaktionslösung nicht unmittelbar für eine nachfolgenden Polymerasereaktion eingesetzt werden kann, da der hohe Salzgehalt der Bisulfitreaktion sich störend auswirkt. Es müssen also in der Praxis mehrere Aufreinigungs- und/oder Waschschriffe durchgeführt werden, was insbesondere bei kleinen DNA-Probenmengen zu schlechter Reproduzierbarkeit der Protokolle, umständlicher Handhabung und geringer Empfindlichkeit der Methode beiträgt. Zudem muss die DNA erst, wie auch für andere molekularbiologische Assays, isoliert werden, bevor sie in der Bisulfitreaktion eingesetzt werden kann.

**[0019]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

**[0020]** Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben gelöst, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

- a) die genomische DNA wird aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden,
- b) die an die Oberfläche gebundene DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
- c) die in Schritt b) verwendeten Reagenzien werden in einem Waschschriff entfernt,
- d) ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,
- e) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

**[0021]** Vorteilhaft ist es, dass man folgende zusätzliche Schritte ausführt:

- f) die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschriff entfernt,
- g) weitere ausgewählte Abschnitte, welche von denen in Schritt d) verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,
- h) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

**[0022]** Es ist erfindungsgemäß weiterhin besonders vorteilhaft, dass man die Schritte f)-g) mehrmals wiederholt, wobei in jeder Amplifikation nach Schritt g) andere Abschnitte amplifiziert werden als in einer der vorange-

gangenen Amplifikationen.

**[0023]** Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Bindung der DNA an die Oberfläche kovalent ist.

**[0024]** Besonders vorteilhaft ist es dabei, dass man die DNA unmittelbar in dem Immobilisierungsschritt auch isoliert.

**[0025]** Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Isolierung der DNA aus Vollblut oder Serum erfolgt. Vorteilhaft ist es erfindungsgemäß auch, dass die Isolierung der DNA aus lysiertem Gewebe erfolgt.

**[0026]** Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, dass man die Lysis mittels Proteinase K durchführt.

**[0027]** Erfindungsgemäß bevorzugt ist es insbesondere, dass die Immobilisierung in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen oder 384 Gefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

**[0028]** Besonders vorteilhaft ist es erfindungsgemäß auch, dass die Immobilisierung in PCR-Reaktionsgefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden. Bevorzugt ist es erfindungsgemäß, dass die Immobilisierung der DNA an einem Metalloxid, bevorzugt Aluminiumoxid, erfolgt.

**[0029]** Vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren auch, wenn die Immobilisierung an einem hydrophoben Material erfolgt und die Bindung nur unter den gewählten Pufferbedingungen im wesentlichen irreversibel ist.

**[0030]** Es ist erfindungsgemäß auch bevorzugt, dass ein Amplifikationsschritt mit mehreren Primerpaaren als Multiplex-PCR ausgeführt wird.

**[0031]** Bevorzugt ist es erfindungsgemäß dabei, dass alle oder ein großer Teil der Amplifikate einer immobilisierten DNA Probe gepoolt werden und so gemeinsam einer weiteren Analyse zugeführt werden. Ein großer Teil sind etwa 50% und mehr der Amplifikate. Es können aber auch bis zu 75 % und mehr sein.

**[0032]** Bevorzugt ist beim erfindungsgemäßen Verfahren auch, dass es sich bei dieser weiteren Analyse um die Hybridisierung an einen Oligonukleotidarray oder PNA (Peptide Nucleic Acids)-Array handelt.

**[0033]** Bevorzugt ist es erfindungsgemäß auch, dass die Analyse während der Amplifikation durch eine Real-time PCR Methode erfolgt.

**[0034]** Erfindungsgemäß vorteilhaft ist es auch, dass die Analyse nach der Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß durch die Aufnahme einer Schmelzkurve erfolgt.

**[0035]** Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass die Analyse durch allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden oder PNAs (Peptide Nucleic Acids) an die zu untersuchenden Positionen in den Amplifikaten erfolgt.

**[0036]** Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass die Analyse durch Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und einer nachfolgenden Primerextensionsreaktion oder einer Sequenzierreaktion erfolgt.

**[0037]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist

auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

**[0038]** Bevorzugt ist erfindungsgemäß dabei, die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

**[0039]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Kit, bestehend aus einem Reagenz zur Behandlung der DNA gemäss Schritt b, mindestens zwei Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate, einer Festphase zur Immobilisierung der Proben-DNA, sowie optional weiteren Lösungen und einer Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem erfindungsgemäßen Verfahren.

**[0040]** Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Lösung des Problems besteht darin, dass DNA, die im Rahmen ihrer ohnehin angestrebten Isolierung aus beispielsweise Vollblut, Serum oder Gewebe ohnehin an eine Festphase gebunden wird, direkt auf dieser Festphase nachfolgend auch einer Bisulfitreaktion unterworfen wird. Nach der in diesem Falle sehr einfachen, durch Nachwaschen mit Wasser oder einem geeigneten Puffer zu erzielenden Abtrennung der Bisulfit-Reaktionsmischung kann die immobilisierte DNA unmittelbar auch direkt für die Amplifikation eingesetzt werden. Alternativ kann sie in dieser immobilisierten Form gelagert werden und erst bei Bedarf für eine Amplifikation verwendet werden. Da die immobilisierte DNA bei der Amplifikation nicht wesentlich verändert wird, ist es auch möglich, mit der immobilisierten DNA als Templat mehrere nachfolgende Amplifikationen durchzuführen, nachdem die Reaktionskomponenten der jeweils vorangegangenen Amplifikation durch Waschschriffe entfernt wurden.

**[0041]** Insgesamt stellt die vorliegende Erfindung also ein Verfahren zur Verfügung welches hinsichtlich der Durchführung beliebiger, auf Bisulfitbehandlung zurückgreifender Methylierungsassays eine erhebliche Vereinfachung darstellt. Die Proben-DNA muss nur noch direkt

an eine Festphase gebunden werden, die Bisulfitbehandlung an dieser Festphase durchgeführt und nachfolgend unter Verwendung immer noch derselben Festphase eine Polymerasereaktion durchgeführt werden. Dies erlaubt es auch, stabile Assays ausgehend von sehr geringen DNA Mengen, etwa aus Serum, durchzuführen. **[0042]** Sinnvollerweise ist die Festphase eine modifizierte Oberfläche eines Gefäßes, in welchem dann auch die PCR-Reaktion durchgeführt wird und vorteilhafterweise ein handelsübliches PCR Gefäß, welches auch als 8er Streifen oder als Teil einer Mikrotiterplatte vorliegen kann. Wesentliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es also unter anderem, Oberflächen bereitzustellen, welche zum einen die DNA möglichst irreversibel binden können, zum anderen aber auch unter den in der Bisulfitbehandlung vorliegenden Bedingungen hinreichend stabil bleiben und die DNA weiterhin gebunden halten.

**[0043]** Es wurden zwei Oberflächen identifiziert, die diesen Zweck erfüllen. Zum einen handelt es sich um Aluminiumoxid, zum anderen um C18-Alkylketten, welche in Verbindung mit geeigneten Kationen wie Triethylammoniumionen eine feste Anbindung der DNA erlauben. C18-Alkylketten können durch dem Fachmann bekannte Silanisierungsverfahren mittels einem Octadecyltrialkoxysilan aufgebracht werden. Methoden zur Modifizierung von Oberflächen mit Aluminiumoxid werden unter anderem in US6,291,166 beschrieben.

**[0044]** Das erfindungsgemäße Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern besteht aus den folgenden Teilschritten:

1. Die genomische DNA wird aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden.
2. Die an die Oberfläche gebundene DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt.
3. die im zweiten Schritt verwendeten Reagenzien werden in einem Waschschriffe entfernt.
4. Ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert und
5. Die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

**[0045]** In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden zusätzlich die folgenden Schritte ausgeführt:

6. Die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschriffe entfernt.

7. Weitere ausgewählte Abschnitte, welche von denen in Schritt d) verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

8. Die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

**[0046]** In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Schritte 6-8 mehrmals wiederholt.

**[0047]** Im ersten Verfahrensschritt wird die bevorzugt genomische DNA aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden.

**[0048]** Eine irreversible Bindung in Sinne der vorliegenden Erfindung meint eine Bindung, die mit den üblicherweise zur Verfügung stehenden Mitteln unter den in der Reaktion vorhandenen Bedingungen nicht wieder vollständig gelöst werden kann. Diese Bindung kann bevorzugt eine kovalente Bindung, eine Ionenpaarbindung oder aber eine Bindung sein, die auf elektrostatischen oder hydrophoben Effekten beruht.

**[0049]** Die Isolierung der DNA erfolgt bevorzugt derart, dass eine Körperflüssigkeit oder aber ein Lysat eines Gewebes mit der Oberfläche kontaktiert wird, die wiederum bevorzugt die DNA irreversibel bindet. Dazu ist im Falle des C18 Materials ein spezieller Puffer erforderlich (beispielsweise Triethylammoniumacetat). Der Überstand wird entfernt und es wird entweder mit Puffer oder Wasser (oder beidem) nachgewaschen, um die nachfolgende Bisulfit Reaktion mit so reinem Ausgangsmaterial wird möglich durchzuführen.

**[0050]** In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens ist die Bindung der DNA an die Oberfläche kovalent. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die DNA unmittelbar in dem Immobilisierungsschritt auch isoliert. Die Isolierung der DNA erfolgt bevorzugt aus Vollblut oder Serum.

**[0051]** In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante erfolgt die Isolierung der DNA aus lysiertem Gewebe. Die Lysis wird besonders bevorzugt mittels Proteinase K durchgeführt.

**[0052]** In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die Immobilisierung in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen oder 384 Gefäßen durchgeführt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

**[0053]** In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird die Immobilisierung in PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

**[0054]** Besonders bevorzugt erfolgt die Immobilisierung der DNA an einem Metalloxid, bevorzugt Aluminiumoxid. In einer weiteren besonders bevorzugten Verfahrensvariante erfolgt die Immobilisierung an einem hydrophoben Material und die Bindung ist nur unter den gewählten Pufferbedingungen im wesentlichen irrever-

sibel.

**[0055]** Die zu analysierende DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

**[0056]** Im zweiten Schritt des Verfahrens behandelt man die an die Oberfläche gebundene DNA bevorzugt mit Bisulfit, (= Disulfit, Hydrogensulfit) derart, 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.

**[0057]** Wird ein Bisulfitreagenz verwendet, so ist im Falle der C18 Oberfläche Trialkylammoniumbisulfit besonders bevorzugt, um eine feste Anbindung der DNA an die Oberfläche zu gewährleisten. Im Falle der Aluminiumoxidoberfläche wird bevorzugt Natriumbisulfit verwendet.

**[0058]** Die DNA-Probe denaturiert man besonders bevorzugt vor der Behandlung thermisch oder unter Verwendung eines alkalischen Reagenzes wie beispielsweise verdünnter (bevorzugt 0.1 bis 0.3 molarer) Natronlauge.

**[0059]** Wird für die Reaktion Bisulfit verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Für das erfindungsgemäße Verfahren sind zudem bevorzugt ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen.

**[0060]** Dabei kommen als denaturierende Reagenzien oder Lösungsmittel bevorzugt die folgenden Verbindungen oder Verbindungsklassen in Frage:

Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF. Allerdings ist auch die Einbettung der DNA in Agarose nach der Denaturierung möglich durch Zugabe derselben in gelöster Form und anschließendes Abkühlen, analog zu der von Olek et al veröffentlichten Methode. Die Agarose kann nach der Bisulfitbehandlung mit heissem Puffer oder Wasser thermisch entfernt.

**[0061]** Die anschließende alkalische Hydrolyse (bevorzugt: Tris Puffer pH 10 oder Ammoniak) führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Bevorzugt wird anschliessend die Desulfonierung der DNA (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt.

**[0062]** Im dritten Schritt des Verfahrens werden die zuvor verwendeten Reagenzien in einem Waschschrift entfernt. Dabei ist es wiederum entscheidend, dass die immobilisierte, nunmehr chemisch behandelt vorliegende DNA an die Oberfläche gebunden bleibt. Dies ist einfach

im Falle einer beispielsweise kovalenten Bindung an die Oberfläche. Dagegen ist wiederum ein entsprechender Puffer erforderlich, wenn eine Bindung über beispielsweise Triethylammoniumkationen an eine C18-Phase erfolgt. Dies erfordert dann auch in den Waschsritten einen Puffer, der die Bindung der DNA an die hydrophobe Phase fördert, wie beispielsweise ein Triethylammoniumacetat-Puffer.

**[0063]** Bevorzugt werden mehrere Waschschriffe ausgeführt, die besonders bevorzugt aus einem automatisierten Pipettierschritt bestehen, in welchem Wasser oder Puffer zugegeben wird, und aus einem nachfolgenden Pipettierschritt, in dem der jeweilige Puffer oder das Wasser wieder entfernt wird. Dies kommt beispielsweise bei einer Immobilisierung der DNA in einer Mikrotiterplatte und bei Verwendung eines handelsüblichen Pipettierroboters (z. B. von den Firmen Tecan oder Qiagen) zum tragen.

**[0064]** Im vierten Verfahrensschritt werden ausgewählte Abschnitte der immobilisierten, behandelten DNA amplifiziert.

**[0065]** Man amplifiziert die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird vorzugsweise in einem Reaktionsgefäß gemacht.

**[0066]** Den Verfahrensschritt kann man auch vorzugsweise in zwei Teilschritten durchführen. Man beginnt mit einer PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die die vorbehandelte DNA Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben. Danach führt man eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz durch, die jeweils zu einem Abschnitt der vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

**[0067]** In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird ein Amplifikationsschritt mit mehreren Primerpaaren als Multiplex-PCR ausgeführt. Besonders bevorzugt ist es auch, dass alle oder ein großer Teil der Amplifikate einer immobilisierten DNA Probe gepoolt werden und so gemeinsam einer weiteren Analyse zugeführt werden. Besonders bevorzugt wird die Reaktionsmischung nach der Amplifikation aus dem Reaktionsgefäß, an welches die immobilisierte DNA gebunden ist, entfernt. Damit steht die immobilisierte DNA als Templat für weitere Amplifikationen, bevorzugt wiederum mit zuvor nicht verwendeten Primern, zur Verfügung.

**[0068]** In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird daher die Amplifikation mehrmals mit unterschiedlichen Primern wiederholt, so dass das Verfahren die folgenden zusätzlichen Schritte aufweist:

1) die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschriffe entfernt.

2) weitere ausgewählte Abschnitte, welche von den zuvor amplifizierten verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

3) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

**[0069]** In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden diese Schritte mehrmals wiederholt, wobei in jeder Amplifikation nach Schritt 2) andere Abschnitte amplifiziert werden als in einer der vorangegangenen Amplifikationen.

**[0070]** Im letzten Verfahrensschritt und auch wenn die obigen zusätzlichen Schritte ausgeführt werden, werden die Amplifikate jeweils hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht. Dadurch kann unmittelbar auf den Methylierungsstatus ausgewählter Cytosinbasen in der DNA-Probe geschlossen werden.

**[0071]** Diese Sequenzanalyse und die nachfolgenden Schlussfolgerungen hinsichtlich des Methylierungsstatus können prinzipiell unter Verwendung vieler, dem Fachmann bekannter Methoden erfolgen, welche auch im Stand der Technik beschrieben sind.

**[0072]** Besonders bevorzugt erfolgt die Analyse durch Hybridisierung der Amplifikate an einen Oligonukleotidarray oder PNA (Peptide Nucleic Acids)-Array.

**[0073]** Es ist weiterhin bevorzugt, dass die Analyse während der Amplifikation durch eine Realtime PCR Methode erfolgt. Besonders bevorzugt ist damit eine Erfindungsvariante, in der von der DNA Extraktion, der Bisulfidbehandlung, der Amplifikation und der Detektion bevorzugt durch Realtime-PCR alle Schritte in einem Reaktionsgefäß ausgeführt werden können. Besonders bevorzugt in diesem Zusammenhang ist auch ein Verfahren, bei dem man die Analyse nach der Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß durch die Aufnahme einer Schmelzkurve durchführt und aus dem Schmelzverhalten auf die Basenzusammensetzung des Fragmentes und damit auf den Methylierungsstatus schließt.

**[0074]** Die Analyse kann auch durch Einbringen der Oberfläche in ein Massenspektrometer erfolgen, welches die Molekülmasse der Amplifikate, von Fragmenten der Amplifikate oder aber von Sonden, die spezifisch an die Amplifikate hybridisieren, bestimmt. Diese Information kann wiederum zur Identifizierung von Sequenzen herangezogen werden, wenn die Sequenz zum grossen Teil bereits bekannt ist. Es ist auch möglich, die gelösten Amplifikate separat in ein Massenspektrometer einzuführen und die Analyse nach dem Fachmann bekannten Methoden durchzuführen.

**[0075]** Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem die Analyse durch allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden oder PNAs (Peptide Nucleic Acids) an die zu untersuchenden Positionen in den Amplifikaten erfolgt.

**[0076]** In einer weiteren besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Analyse durch Hybridisie-

zung von Oligonukleotidprimern und einer nachfolgenden Primerextensionsreaktion oder einer Sequenzierreaktion durchgeführt.

**[0077]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen: Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

**[0078]** Ebenso bevorzugt ist die Verwendung eines Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

**[0079]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit, bestehend aus einem Reagenz zur Behandlung der DNA, mindestens zwei Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate, einer Festphase zur Immobilisierung der Proben-DNA, sowie optional weiteren Lösungen und einer Anleitung zur Durchführung mindestens einer der oben beschriebenen Verfahrensvarianten.

Beispiel:

Bisulfit-Behandlung von Promega- und M13-DNA in derivatisierten Reaktionsgefäßen

#### ANBINDUNG DER DNA

**[0080]** Für die Anbindung von DNA auf die mit Aluminiumoxid beschichtete Oberfläche der Reaktionsgefäße wurde EcoR1 geschnittene genomische DNA (Promega) und M13 Plasmid-DNA verwendet. Jeweils 160ng wurden in die entsprechenden Reaktionsgefäße pipettiert, mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt, auf einem Shaker kurz gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Gefäße zweimal mit je 50µl Wasser gewaschen. Um die Aktivität der verbleibenden Bindungsstellen auf der Tubeoberfläche herabzusetzen, wurden 10µl einer 5%igen Bovin-Serum-Albumin Lösung hinzu pipettiert, mit 40µl Wasser aufgefüllt und

ebenfalls bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Gefäße einmal mit jeweils 50µl Wasser gewaschen.

#### 5 BISULFIT-BEHANDLUNG

**[0081]** Die angebundene DNA wird bei 96°C ohne Zugabe von Wasser für 20 Minuten in einem Eppendorf-Mastercycler denaturiert. Die Gefäße werden alsdann schnellstmöglich entfernt und mit 6µl Dioxan versetzt, wodurch die Denaturierung der DNA erhalten bleibt. Für die Bisulfitreaktion wurden 10µl einer 0.75M Natriumbisulfit-Lösung, 2µl Radikalfänger (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure, 98,6mg in 1ml Dioxan) und 2µl Wasser zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden bei 50°C in einem Eppendorf-Mastercycler für fünf Stunden inkubiert.

#### 20 DESULFONIERUNG

**[0082]** Nach erfolgter Bisulfitreaktion wurden die Lösungen herauspipettiert und die Gefäße mit 100µl Wasser und, vorbereitend auf die Desulfonierung, mit 100µl einer 50mM Tris-HCl-Lösung gewaschen. Die Desulfonierung erfolgt mit 50µl einer 50mM Tris-HCl-Lösung bei pH9 für 20 Minuten bei 96°C. Nach dreimaligem Waschen mit je 50µl Wasser sind die Reaktionsgefäße einsatzbereit für eine Amplifikation mittels PCR.

#### 30 PCR

**[0083]** Die PCR wurde in einem Maßstab von 25µl angesetzt. Als Primer dienten für die Promega DNA 5'-TAA GTA TGT TGA AGA AAG ATT ATT GTA G-3' und 5'-TAA AAA CTA TCC CAT AAT AAC TCC CAA C-3', sowie 5'-ATT ACA AAA TCG CGC AAA-3' und 5'-AAG TCG GAG GTT AAA AAG GT-3' (MWG) für die M13 Plasmid-DNA. Die beiden jeweiligen Primer wurden in einer Lösung mit einer Konzentration von 12.5pmol/µl vorgelegt, 2µl dieser Primerpaarlösung in das entsprechende Tube pipettiert. Für die PCR wurden 2.5µl dNTP-Mix (Fermentas, Konzentration je dNTP 2.5µmol/µl), 0.3µl Hot Star Taq (Qiagen), 2.5µl 10x PCR Buffer Solution (Qiagen, 15mMol MgCl<sub>2</sub> im Puffer enthalten) und 17.7µl Wasser (Fluka) pro Ansatz in die Gefäße gegeben.

**[0084]** Die Kontrolle der PCR erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden 5µl Probe mit 3µl Loading Dye auf ein 1.4% Agarosegel (Eurogentec., Inc.) aufgetragen, als Laufpuffer diente 1xTBE. Die Fragmente wurden mittels Ethidiumbromid angefärbt, das Gel im UV abfotografiert.

Sequenzprotokoll

#### 55 [0085]

<110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zum Nachweis von cytosin-Methylierungen in immobilisierten DNA Proben

<160> 4

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

taagtatggt gaagaaagat tattgtag 28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

taaaaactat ccataataa ctccaac 28

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid DNA

<400> 3

attacaaaat cgcgcaaa 18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid DNA

<400> 4

aagtcggagg taaaaaggt 20

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben, wobei man die folgenden Verfahrensschritte ausführt:

a) die genomische DNA wird aus Zellen oder anderen begleitenden Materialien isoliert und im wesentlichen irreversibel an eine Oberfläche gebunden,

b) die an die Oberfläche gebundene DNA wird, bevorzugt mit einem Bisulfit (=Disulfit, Hydrogensulfit) derart behandelt, dass Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Du-

plex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,

c) die in Schritt b) verwendeten Reagenzien werden in einem Waschschrift entfernt,

d) ausgewählte Abschnitte der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

e) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** man folgende zusätzliche Schritte ausführt:

f) die Reagenzien und Produkte der Polymerasereaktion werden in einem Waschschrift entfernt,

g) weitere ausgewählte Abschnitte, welche von denen in Schritt d) verschieden sind, der immobilisierten DNA werden in einer Polymerasereaktion amplifiziert,

h) die Amplifikate werden hinsichtlich ihrer Sequenz untersucht.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Schritte f)-g) mehrmals wiederholt, wobei in jeder Amplifikation nach Schritt g) andere Abschnitte amplifiziert werden als in einer der vorangegangenen Amplifikationen.

4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bindung der DNA an die Oberfläche kovalent ist.

5. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die DNA unmittelbar in dem Immobilisierungsschritt auch isoliert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Isolierung der DNA aus Vollblut oder Serum erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Isolierung der DNA aus lysiertem Gewebe erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Lysis mittels Proteinase K durchführt.

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Immobilisierung in den Gefäßen einer Mikrotiterplatte mit 96 Gefäßen oder 384 Gefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden.

10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Immobilisierung in PCR-Reaktionsgefäßen erfolgt, wobei in den Gefäßen unterschiedliche DNA-Proben immobilisiert werden. 5
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Immobilisierung der DNA an einem Metalloxid, bevorzugt Aluminiumoxid, erfolgt. 10
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Immobilisierung an einem hydrophoben Material erfolgt und die Bindung nur unter den gewählten Pufferbedingungen im wesentlichen irreversibel ist. 15
13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** ein Amplifikationsschritt mit mehreren Primerpaaren als Multiplex-PCR ausgeführt wird. 20
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** alle oder ein großer Teil der Amplifikate einer immobilisierten DNA Probe gepoolt werden und so gemeinsam einer weiteren Analyse zugeführt werden. 25
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei dieser weiteren Analyse um die Hybridisierung an einen Oligonukleotidarray oder PNA (Peptide Nucleic Acids)-Array handelt. 30
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Analyse während der Amplifikation durch eine Realtime PCR Methode erfolgt. 35
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Analyse nach der Amplifikation im gleichen Reaktionsgefäß durch die Aufnahme einer Schmelzkurve erfolgt. 40
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Analyse durch allelspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden oder PNAs (Peptide Nucleic Acids) an die zu untersuchenden Positionen in den Amplifikaten erfolgt. 45
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Analyse durch Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und einer nachfolgenden Primerextensionsreaktion oder einer Sequenzierreaktion erfolgt. 50
20. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
21. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
22. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 19, bestehend aus
- einem Reagenz zur Behandlung der DNA gemäß Anspruch 1b, wobei durch das Reagenz Cytosin in eine vom Basenpaarungsverhalten in der DNA-Duplex her unterschiedliche Base umgewandelt wird, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt,
  - mindestens zwei Primeroligonukleotiden zur Herstellung von Amplifikaten,
  - einer Festphase zur Immobilisierung der Proben-DNA mit einer Oberfläche, die ein Metalloxid oder C18-Alkylketten aufweist.
23. Kit nach Anspruch 22, wobei die Oberfläche Aluminiumoxid aufweist.
24. Kit nach Anspruch 22, der zur irreversiblen Bindung der Proben-DNA an die C18-Alkylketten aufweisende Oberfläche einen Triethylammoniumacetat Puffer aufweist.
25. Kit nach Anspruch 22 oder 24, der zur Bisulfitbehandlung der Proben-DNA bei einer C18-Alkylketten aufweisenden Oberfläche Trialkylammoniumbisulfit aufweist.
26. Kit nach Anspruch 22 oder 23, der zur Bisulfitbehandlung der Proben-DNA bei einer Aluminiumoxid

aufweisenden Oberfläche Natriumbisulfit aufweist.

27. Kit nach einem der Ansprüche 22 bis 26, der mehrere Primerpaare zur Durchführung einer Multiplex-PCR aufweist.

### Claims

1. A method for the analysis of cytosine methylation patterns in genomic DNA samples, wherein the following method steps are conducted:

- a) the genomic DNA is isolated from cells or other accompanying materials and bound essentially irreversibly to a surface;
- b) the DNA bound to the surface is treated, preferably with a bisulfite (= disulfite, hydrogen sulfite), in such a way that cytosine is converted into a base that is different in its base pairing behaviour in the DNA duplex, while 5-methylcytosine remains unchanged;
- c) the reagents used in step b) are removed in a washing step;
- d) selected segments of the immobilized DNA are amplified in a polymerase reaction;
- e) the amplified products are investigated with respect to their sequence.

2. The method according to claim 1, further **characterized in that** the following additional steps are conducted:

- f) the reagents and products of the polymerase reaction are removed in a washing step;
- g) other selected segments of the immobilized DNA, which are different from those in step d), are amplified in a polymerase reaction;
- h) the amplified products are investigated with respect to their sequence.

3. The method according to claim 2, further **characterized in that** steps f)-g) are repeated several times, whereby in each amplification according to step g), segments other than those in one of the preceding amplifications are amplified.

4. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** the binding of the DNA to the surface is covalent.

5. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** the DNA is also isolated directly in the immobilizing step.

6. The method according to claim 5, further **characterized in that** the DNA is isolated from whole blood or blood serum.

7. The method according to claim 5, further **characterized in that** the DNA is isolated from lysed tissue.

8. The method according to claim 7, further **characterized in that** the lysis is conducted by means of proteinase K.

9. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** the immobilization is conducted in the wells of a microtiter plate with 96 wells or 384 wells, in which different DNA samples are immobilized in the wells.

10. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** the immobilization is conducted in PCR reaction wells, whereby different DNA samples are immobilized in the wells.

11. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** the DNA is immobilized on a metal oxide, preferably aluminium oxide.

12. The method according to one claims 1 to 10, further **characterized in that** the immobilization is made on a hydrophobic material, and the binding is substantially irreversible only under the selected buffer conditions.

13. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** an amplification step is conducted with several pairs of primers as a multiplex PCR.

14. The method according to one of the preceding claims, further **characterized in that** all amplified products of an immobilized DNA sample, or a large portion thereof, are pooled, and thus are jointly introduced to further analysis.

15. The method according to claim 13 or 14 further **characterized in that** this further analysis involves the hybridization to an oligonucleotide array or PNA (peptide nucleic acid) array.

16. The method according to one of claims 1 to 14, further **characterized in that** the analysis is conducted during the amplification by a realtime PCR method.

17. The method according to one of claims 1 to 14, further **characterized in that** the analysis is conducted after the amplification in the same reaction well by plotting a melting-point curve.

18. The method according to one of claims 1 to 14, further **characterized in that** the analysis is conducted by allele-specific hybridization of oligonucleotides or PNAs (peptide nucleic acids) at the positions to be

investigated in the amplified products.

19. The method according to one of claims 1 to 14, further **characterized in that** the analysis is conducted by hybridization of oligonucleotide primers and a subsequent primer extension reaction or a sequencing reaction.
20. Use of a method according to one of the preceding claims for the diagnosis and/or prognosis of adverse events for patients or individuals, whereby these adverse events belong to at least one of the following categories: undesired drug interactions; cancer diseases; CNS malfunctions, damage or disease; symptoms of aggression or behavioural disturbances; clinical, psychological and social consequences of brain damage; psychotic disturbances and personality disorders; dementia and/or associated syndromes; cardiovascular disease, malfunction and damage; malfunction, damage or disease of the gastrointestinal tract; malfunction, damage or disease of the respiratory system; lesion, inflammation, infection, immunity and/or convalescence; malfunction, damage or disease of the body as a consequence of an abnormality in the development process; malfunction, damage or disorder of the skin, the muscles, the connective tissue or the bones; endocrine and metabolic malfunction, damage or disease; headaches or sexual malfunction.
21. Use of a method according to one of the preceding claims for distinguishing cell types or tissues or for investigating cell differentiation.
22. A Kit for performing a method according to one of the claims 1 to 19, comprising
- a reagent for the treatment of DNA according to claim 1b, whereby the reagent converts cytosine into a base that is different in its base pairing behaviour in the DNA duplex, while 5-methylcytosine remains unchanged,
  - at least two primer oligonucleotides for producing the amplified products,
  - a solid phase for immobilizing the sample DNA with a surface comprising a metal oxide or C18-alkyl chains.
23. The kit according to claim 22, whereby the surface comprises aluminium oxide.
24. The kit according to claim 22, comprising a triethyl ammonium acetate buffer for the irreversible binding of the DNA samples to the C18-alkyl chains comprising surface.
25. The kit according to claim 22 or 24, comprising trialkyl ammonium bisulfite for the bisulfite treatment of DNA

samples in the case of a C18-alkyl chains comprising surface.

26. The kit according to claim 22 or 23, comprising sodium bisulfite for the bisulfite treatment of DNA samples in the case of a aluminium oxide comprising surface.
27. The Kit according to any one of the claims 22 to 26, comprising several pairs of primers for conducting a multiplex PCR.

### Revendications

1. Procédé pour l'analyse de schémas de méthylation de cytosine dans des sondes d'ADN génomique, où on réalise les étapes de procédé suivantes :
- a) l'ADN génomique est isolé de cellules ou d'autres matériaux accompagnants et lié de manière essentiellement irréversible à une surface,
  - b) l'ADN lié à la surface est traité, de préférence avec un bisulfite (= disulfite, hydrogénosulfite), de manière telle que la cytosine est transformée en une base différente en ce qui concerne le comportement d'appariement de bases dans le duplex d'ADN, alors que la 5-méthylcytosine reste inchangée,
  - c) les réactifs utilisés dans l'étape b) sont enlevés dans une étape de lavage,
  - d) des sections choisies de l'ADN immobilisé sont amplifiées dans une réaction de polymérisation,
  - e) les produits amplifiés sont analysés en ce qui concerne leur séquence.
2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce qu'on** réalise les étapes supplémentaires suivantes :
- f) les réactifs et les produits de la réaction de polymérisation sont éliminés dans une étape de lavage,
  - g) d'autres sections choisies, qui sont différentes de celles de l'étape d), de l'ADN immobilisé sont amplifiées dans une réaction de polymérisation,
  - h) les produits amplifiés sont analysés en ce qui concerne leur séquence.
3. Procédé selon la revendication 2, **caractérisé en ce qu'on** répète plusieurs fois les étapes f)-g), où, dans chaque amplification selon l'étape g), d'autres sections que celles dans les amplifications précédentes sont amplifiées.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications

- précédentes, **caractérisé en ce que** la liaison de l'ADN à la surface est covalence.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'on** isole également l'ADN directement dans l'étape d'immobilisation. 5
  6. Procédé selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** l'isolement de l'ADN est réalisé à partir de sang complet ou de sérum. 10
  7. Procédé selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** l'isolement de l'ADN est réalisé à partir d'un tissu lysé. 15
  8. Procédé selon la revendication 7, **caractérisé en ce qu'on** réalise la lyse au moyen de protéinase K.
  9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** l'immobilisation est réalisée dans des cuvettes d'une planque de microtitrage à 96 ou 384 cuvettes, différentes sondes d'ADN étant immobilisées dans les cuvettes. 20
  10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** l'immobilisation est réalisée dans des cuvettes de réaction de PCR, différentes sondes d'ADN étant immobilisées dans les cuvettes. 25
  11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** l'immobilisation de l'ADN est réalisée sur un oxyde métallique, de préférence de l'oxyde d'aluminium. 30
  12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, **caractérisé en ce que** l'immobilisation est réalisée sur un matériau hydrophobe et la liaison n'est essentiellement irréversible que dans les conditions de tampon choisies. 35
  13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce qu'on** réalise une étape d'amplification avec plusieurs paires d'amorces comme PCR multiplex. 40
  14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** tous les produits amplifiés ou une grande partie de ceux-ci d'une sonde d'ADN immobilisée sont rassemblés et introduits ensemble dans une nouvelle analyse. 45
  15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, **caractérisé en ce qu'il** s'agit, pour cette nouvelle analyse, de l'hybridation sur une puce d'oligonucléotides ou une puce de PNA (Peptide Nucleic Acids - acides nucléiques peptidiques). 50
  16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, **caractérisé en ce que** l'analyse est réalisée pendant l'amplification par un procédé de PCR en temps réel.
  17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, **caractérisé en ce que** l'analyse après l'amplification est réalisée dans la même puce de réaction par l'enregistrement d'une courbe de fusion.
  18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, **caractérisé en ce que** l'analyse est réalisée par une hybridation spécifique d'allèles d'oligonucléotides ou de PNA (Peptide Nucleic Acids - Acides nucléiques peptidiques) sur les positions à étudier dans les produits amplifiés.
  19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, **caractérisé en ce que** l'analyse est réalisée par hybridation d'amorces d'oligonucléotides et une réaction d'extension d'amorce consécutive ou une réaction de séquençage.
  20. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes pour le diagnostic et/ou le pronostic d'événements désavantageux pour des patients ou des individus, ces événements désavantageux appartenant au moins à l'une des catégories suivantes : effets de médicaments non souhaités ; cancers ; dysfonctionnements, troubles ou maladie du SNC ; symptômes d'agression ou troubles du comportement ; conséquences cliniques, psychologiques et sociales de dommages au cerveau ; troubles psychotiques et troubles de la personnalité ; démence et/ou syndromes associés ; maladies, dysfonctionnement et dommage cardiovasculaire; dysfonctionnement, trouble ou maladie du tractus gastro-intestinal; dysfonctionnement, dommage ou maladie du système respiratoire ; blessure, inflammation, infection, immunité et/ou convalescente - dysfonctionnement, dommage ou maladie du corps comme déviation dans le processus de développement ; dysfonctionnement, dommage ou maladie de la peau, des muscles, du tissu conjonctif ou des os ; dysfonctionnement, dommage ou maladie endocrinien(ne) et métabolique céphalées ou dysfonctionnement sexuel.
  21. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes pour distinguer les types de cellules ou les tissus ou pour étudier la différenciation cellulaire.
  22. Kit pour réaliser un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, constitué par
    - un réactif pour le traitement de l'ADN selon la revendication 1b, le réactif transformant la cyto-

sine en une base différente en ce qui concerne le comportement d'appariement de bases dans le duplex d'ADN, alors que la 5-méthylcytosine reste inchangée,

- au moins deux oligonucléotides formant une amorce pour la préparation de produits amplifiés, 5
  - une phase solide pour immobiliser l'ADN des amorces, présentant une surface qui présente un oxyde métallique ou des chaînes alkyle en C<sub>18</sub>. 10
- 23.** Kit selon la revendication 22, la surface présentant de l'oxyde d'aluminium. 15
- 24.** Kit selon la revendication 22, qui présente, pour la liaison irréversible de l'ADN des amorces à la surface présentant des chaînes alkyle en C<sub>18</sub>, un tampon de type acétate de triéthylammonium. 20
- 25.** Kit selon la revendication 22 ou 24, qui présente, pour le traitement au bisulfite de l'ADN des amorces, dans le cas d'une surface présentant des chaînes alkyle en C<sub>18</sub>, du bisulfite de trialkylammonium. 25
- 26.** Kit selon la revendication 22 ou 23, qui présente, pour le traitement au bisulfite de l'ADN des amorces, dans le cas d'une surface présentant de l'oxyde d'aluminium, du bisulfite de sodium. 30
- 27.** Kit selon l'une quelconque des revendications 22 à 26, qui présente plusieurs paires d'amorces pour la réalisation d'une PCR multiplex. 35

35

40

45

50

55

## IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

## In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 9500669 A [0006]
- WO 9928498 A, Olek [0006]
- WO 9746705 A [0009]
- WO 9515373 A [0009]
- WO 9545560 A [0009]
- WO 0070090 A [0011]
- US 5994065 A [0012]
- US 6291166 B [0043]

## In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **OLEK A ; OSWALD J ; WALTER J.** A modified and improved method for bisulphate based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.*, 15. Dezember 1996, vol. 24 (24), 5064-6 [0004]
- **REIN T ; DEPAMPHILIS ML ; ZORBAS H.** Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res.*, 15. Mai 1998, vol. 26 (10), 2255-64 [0005]
- **ZESCHNIGK M ; LICH C ; BUITING K ; DÖRFLER 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.*, Marz 1997, vol. 5 (2), 94-8 [0006]
- **OLEK A ; WALTER J.** The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.*, November 1997, vol. 17 (3), 275-6 [0006]
- **GONZALGO ML ; JONES PA.** Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.*, 15. Juni 1997, vol. 25 (12), 2529-31 [0006]
- **XIONG Z ; LAIRD PW.** COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, 15. Juni 1997, vol. 25 (12), 2532-4 [0006]
- **PAULIN R ; GRIGG GW ; DAVEY MW ; PIPER AA.** Urea improves efficiency of bisulphate-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res.*, 01. November 1998, vol. 26 (21), 5009-10 [0007]
- **GRIGG G ; CLARK S.** sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioassays*, Juni 1994, vol. 16 (6), 431-6 [0009]
- **ZESCHNIGK M ; SCHMITZ B ; DITTRICH B ; BUITING K ; HORSTHEMKE B ; DÖRFLER 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.*, Marz 1997, vol. 6 (3), 387-95 [0009]
- **FEIL R ; CHARLTON J ; BIRD AP ; WALTER J ; REIK W.** Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphate genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.*, 25. Februar 1994, vol. 22 (4), 695-6 [0009]
- **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*, 19. Mai 1995, vol. 157 (1-2), 261-4 [0009]
- **HERMAN JG ; GRAFF JR ; MYOHANEN S ; NELKIN BD ; BAYLIN SB.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 03. September 1996, vol. 93 (18), 9821-6 [0010]
- *Nature Genetics*, Januar 1999, vol. 21 [0012]
- **KARAS M ; HILLENKAMP F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.*, 15. Oktober 1988, vol. 60 (20), 2299-301 [0014]
- **GUT, I. G. ; BECK, S.** DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*, 1995, vol. 1, 147-157 [0015]
- **GUT, I. G. ; BECK, S.** A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.*, 1995, vol. 23, 1367-1373 [0015]

专利名称(译)	检测固定化DNA样品中胞嘧啶甲基化的方法		
公开(公告)号	<a href="#">EP1438437B1</a>	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	EP2002802274	申请日	2002-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	埃皮吉諾米克斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	AG EPIGENOMICS		
当前申请(专利权)人(译)	AG EPIGENOMICS		
[标]发明人	BERLIN KURT BALLHAUSE MATTHIAS GUTIG DAVID		
发明人	BERLIN, KURT BALLHAUSE, MATTHIAS GÜTIG, DAVID		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/6827 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6827 C12Q2565/518 C12Q2531/113 C12Q2523/125		
代理机构(译)	舒伯特, 克莱门斯		
优先权	10154317 2001-10-26 DE		
其他公开文献	EP1438437A2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了一种检测固定化DNA样品中胞嘧啶甲基化的方法。在第一个方法步骤中，从细胞或其他相关材料中分离基因组DNA，并基本上不可逆地与表面结合。然后优选用亚硫酸氢盐处理与表面结合的DNA，使得胞嘧啶在DNA双链体中转化为不同于碱基配对关系的碱基，而5-甲基胞嘧啶保持不变。然后在洗涤步骤中除去用过的试剂。最后，在聚合酶反应中扩增固定化DNA的选定区段，并检查扩增物的序列。