



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 18 182 T2 2008.02.07**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 421 211 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 18 182.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB02/03941**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 758 554.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/020974**

(86) PCT-Anmeldetag: **30.08.2002**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.03.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.05.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **14.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

944951 31.08.2001 US

(73) Patentinhaber:

**The Chinese University of Hong Kong, Hongkong,
CN**

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(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**

(72) Erfinder:

**LO, Yuk Ming Dennis, Homantin, Kowloon, Hong
Kong, CN; POON, Lit Man, Tsuen Wan NT, Hong
Kong, CN**

(54) Bezeichnung: **METHODEN UM DNS VON VERSCHIEDENEN INDIVIDUEN NACHZUWEISEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Anwesenheit von DNA, die von verschiedenen Individuen stammt, in Körperflüssigkeiten ist ein gut bekanntes biologisches Phänomen in vielen klinischen und biologischen Szenarien. Z.B. wird im Anschluß an die Knochenmarkstransplantation das hämatopoietische System des Transplantatempfängers aus veränderlichen Anteilen von Spender- und Empfängerzellen bestehen. Die Bestimmung der Menge von Zellen des Spenders oder Empfängers wurde durch den Nachweis von genetischen Unterschieden zwischen dem Spender und Empfänger durchgeführt, einschließlich Geschlecht (Mangioni et al., Bone Marrow Transplant 20:969–73 (1997)) und DNA Polymorphismen (Roux et al., Blood 79:2775–83 (1992)). Die Folge dieses Ansatzes ist, daß, wenn die analysierte Region keinen genetischen Unterschied zwischen dem Spender und Empfänger trägt, die Analyse durch den vorliegenden Ansatz dann nicht möglich sein wird.

[0002] In einem anderen Beispiel wurde früher der Nachweis von fötaler DNA in maternalem Plasma und Serum während der Schwangerschaft gezeigt (Lo et al., Lancet 350:9076:485–7 (1997)). Diese Technologie hat gezeigt, daß fötale DNA, die aus maternalem Plasma und Serum isoliert wird, für die nicht-invasive pränatale Diagnose verwendet werden kann (Lo et al., N Eng J Med, 339(24):1734–8 (1998); Fass et al., Lancet 352(9135):1196 (1998); Amicucci et al., Clin Chem 46(2):301 (2000); Chen et al., Prenat Diagn 20(4):335–7 (2000); Saito et al.; Lancet 356:1170 (2000)). Die klinische Anwendung des Phänomens wurde durch die relativ hohen absoluten relativen Konzentrationen solcher zirkulierten fötaler DNA in maternalem Plasma und Serum gefördert (Lo et al., Am J Hum Genet 62:768–775 (1998)). Unter Verwendung dieses Ansatzes wurde der nicht-invasive pränatale Nachweis einer Zahl von Zuständen erreicht, einschließlich fötalem Rhesus-D-Status (Lo et al., New Eng J Med 339:1734–1738 (1998)), myotonischer Dystrophie (Amicucci et al., Clin Chem 46:301–302 (2000)) Achondroplasie (Saito et al., Lancet 356:1170(2000)) und bestimmten chromosomalen Translokationen (Chen et al., Prenat Diag 20:335–357 (2000); Chen et al., Clin Chem 47:937–939 (2001)). Alle diese augenblicklichen Ansätze verwendeten den Nachweis von DNA Sequenzen, die vom Vater vererbt wurden und von denjenigen der Mutter unterscheidbar sind (Bianchi, Am J Hum Genet 62(4):763 (1998)). Genauer wurde vom Nachweis der DNA, die der Fötus von der Mutter geerbt hat in maternalem Plasma oder Serum angenommen, daß dieser unmöglich ist. Ähnliche Beschränkungen wurden auch für den Nachweis von fötalen Kern-tragenden Zellen beschrieben, die aus der zellulären Fraktion von maternalem Blut isoliert wurden (Lo et al., Ann NY Acad Sci, 731:204 (1994)).

[0003] Andere haben aberrant methylierte DNA aus Krebspatienten nachgewiesen. Dieses wurde für Patienten mit einer Vielzahl von Krebsarten, einschließlich Lungen- (Esteller, et al., Cancer Res 59(1):67 (1999)) und Leberkrebs (Wong et al., Cancer Res 59(1):71 (1999)), berichtet.

[0004] Kürzlich richtete sich ein großer Teil des Interesses auf die Biologie von epigenetischen Phänomenen, nämlich Prozesse, die den Phänotyp verändern, die jedoch nicht mit Veränderungen in der DNA Sequenz assoziiert sind (Wolffe, Science 286:486 (1999)). Einer der am besten charakterisierten epigenetischen Prozesse ist die DNA Methylierung (Wolffe et al., Curr Biol. 10:R463–R465 (1999)). Ein Verfahren zur Unterscheidung von DNA Spezies, die von verschiedenen Individuen abstammen in biologischen Flüssigkeiten unter der Verwendung von epigenetischen, anders als genetischen Unterschieden, zwischen den DNA Spezies wäre sehr wertvoll. Z.B. würde der epigenetische Nachweis von fötaler DNA in einer Probe der Mutter einen signifikanten Fortschritt zur Verfügung stellen, der zusätzliche Screening- und diagnostische Verfahren ermöglicht.

Zusammenfassung der Erfindung

[0005] In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Differenzierung von DNA Spezies, die von verschiedenen Individuen abstammen, in einer biologischen Probe. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Verfahren der vorliegenden Erfindung dazu verwendet, um fötale DNA in einer Probe der Mutter zu unterscheiden oder nachzuweisen oder um die DNA eines Organspenders von der DNA eines Organempfängers zu unterscheiden.

[0006] Der Fachmann im Stand der Technik wird erkennen, daß von einem Individuum erhaltene biologische Probe von jeder flüssigen oder Zellprobe genommen sein kann, jedoch ist in bevorzugten Ausführungsformen die Körperflüssigkeit Plasma oder Serum. In bevorzugten Ausführungsformen werden die DNA Spezies durch Beobachten von epigenetischen Unterschieden in den DNA Spezies, wie z.B. Unterschieden in der DNA Methylierung, unterschieden. Z.B. kann in Situationen, wo eine DNA Spezies von einem Mann abstammt und eine DNA Spezies von einer Frau abstammt, der epigenetische Marker das inaktivierte X-Chromosom des weibli-

chen Individuums sein. In solchen Ausführungsformen können die methylierten DNA Sequenzen auf dem inaktivierten X-Chromosom dazu verwendet werden, um DNA nachzuweisen, die von dem weiblichen Individuum abstammt. In einigen Ausführungsformen können die epigenetischen Unterschiede in Zellen analysiert werden. Weiter können in einigen Ausführungsformen die epigenetischen Unterschiede unter der Verwendung von in-situ Methylierungs-spezifischer Polymerasekettenreaktion analysiert werden. Zusätzlich können epigenetischen Unterschiede verwendet werden, um Zellen von den jeweiligen Individuen zu sortieren oder zu isolieren oder DNA aus den jeweiligen Individuen aufzureinigen. Die Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können mit oder ohne ein Messen der Konzentration an DNA Spezies durchgeführt werden, jedoch werden in bevorzugten Ausführungsformen die Konzentrationen von DNA Spezies mit den jeweiligen epigenetischen Unterschieden gemessen. Solche Messung an Konzentrationen schließt die Messung der jeweiligen DNA Methylierungsunterschiede in Ausführungsformen ein, wobei die DNA Methylierungsunterschiede der epigenetische Marker sind. In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird Natriumbisulfit zu der biologischen Probe oder zu der DNA Spezies direkt hinzugegeben, um die DNA Methylierungsunterschiede nachzuweisen. Jedoch kann in anderen Ausführungsformen eine Methylierungs-spezifische Polymerasekettenreaktion, wie sie dem Fachmann im Stand der Technik gut bekannt ist, verwendet werden, um die DNA Methylierungsunterschiede nachzuweisen. In noch anderen Ausführungsformen kann DNA Sequenzierung oder Primerverlängerung verwendet werden, um die Methylierungsunterschiede nachzuweisen.

[0007] In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zum Nachweis von Abnormalitäten in einem Fötus durch Nachweisen von fötaler DNA in einer biologischen Probe, die von einer Mutter erhalten wurde. Die Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung stellen eine Nachweis von fötaler DNA in einer mütterlichen Probe zur Verfügung, durch Unterscheiden der fötalen DNA von der maternalen DNA, basierend auf epigenetischen Markern, wie z.B. Unterschieden in der DNA Methylierung. Durch Anwendung solcher Verfahren kann fötale DNA, die für eine genetische Anomalie oder genetisch basierte Erkrankung prädiktiv ist, identifiziert werden, wodurch Verfahren zur pränatalen Diagnose zur Verfügung gestellt werden. Diese Verfahren sind für jede und alle Schwangerschafts-assoziierten Zustände anwendbar, für die Methylierungsveränderungen identifiziert wurden, die mit einem Erkrankungszustand assoziiert sind. Beispielhafte Erkrankungen, die diagnostiziert werden können, schließen z.B. Präeklampsie, eine chromosomale Aneuploidie, einschließlich, jedoch nicht begrenzt auf Trisomie 21, Prader-Willi Syndrom und Angelman Syndrom, ein.

[0008] Wie bei den breiter differenzierenden Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung ist die von der Mutter erhaltene biologische Probe bevorzugterweise Plasma oder Serum. Die Unterscheidung zwischen maternaler und fötaler DNA kann mit oder ohne Quantifizieren der Konzentration von fötaler DNA in maternalem Plasma oder Serum durchgeführt werden. In Ausführungsformen, wobei die fötale DNA quantifiziert wird, kann die gemessene Konzentration dazu verwendet werden, eine Schwangerschafts-assoziierte Erkrankung vorherzusagen, zu verfolgen oder zu diagnostizieren oder zu prognostizieren. In bevorzugten Ausführungsformen ist der bestimmte Fötus-abgeleitete genetische Marker mit einer fötalen Erkrankung assoziiert, und in einigen Ausführungsformen wird eine epigenetische Charakteristik in fötalen Zellen in der Plazenta als ein Fötus-spezifischer Marker in maternalem Plasma oder Serum verwendet.

[0009] In einem dritten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Differenzierung von DNA Spezies, die von einem Organspender abstammen, von denjenigen eines Organempfängers. Wie bei den weiteren Differenzierungsverfahren des ersten Aspekts der Erfindung, ist die erhaltene biologische Probe bevorzugterweise Plasma oder Serum. Die Unterscheidung zwischen DNA von dem Organspender und dem Organempfänger oder potentiellen Organspender und potentiellen Organempfänger kann mit oder ohne Quantifizierung der Konzentration von DNA in der biologischen Probe durchgeführt werden. Diese Ausführungsform ist besonders brauchbar in Fällen, wo die Transplantation eine Knochenmarkstransplantation ist. Solche Messungen können dazu verwendet werden, um das klinische Fortschreiten des Transplantationsrezipienten insbesondere im Hinblick auf Organabstoßung vorherzusagen.

[0010] In einem vierten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Kits zur Unterscheidung von DNA Spezies, die von verschiedenen Individuen abstammen, in einer biologischen Probe. Solche Kits sind z.B. brauchbar zur Unterscheidung oder beim Nachweis der Anwesenheit von fötaler DNA in einer maternalen biologischen Probe oder zur Unterscheidung von DNA von einem Organspender oder potentiellen Organspender von der eines Organempfängers oder potentiellen Organempfängers. Die Kits gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen eine oder mehrere Reagenzien zur Ermittlung des Methylierungsstatus der maternalen DNA, wie z.B. Natriumbisulfit und eines oder mehrere Reagenzien zum Nachweis der Anwesenheit von DNA, wie z.B. ein Gel. Zusätzlich können solche Kits eine oder mehrere Reagenzien zur Amplifizierung der Menge von DANN, die in der Probe vorhanden ist, einschließen, wie z.B. eines oder mehrere Reagenzien zur Durchführung der Polymerasekettenreaktions-Amplifikation. Solche Reagenzien sind dem Fachmann im Stand der Technik gut

bekannt. Weiterhin können solchen Kits eine oder mehrere Vorrichtungen zum Erhalt einer maternalen DNA Probe einschließen. Solche Vorrichtungen sind dem Fachmann im Stand der Technik gut bekannt. Insbesondere können die Kits gemäß der vorliegenden Erfindung zum Diagnostizieren einer Erkrankung verwendet werden, die insgesamt oder teilweise durch eine genetische Anomalie, wie z.B. eine Mutation, Substitution oder Deletion in der gesamten oder einem Teil einer DNA Sequenz, die in einem Fötus vorhanden ist, verursacht wird. Beispielhafte Erkrankungen, die diagnostiziert werden können, schließen z.B. Präeklampsie, eine chromosomale Aneuploidie, einschließlich, jedoch nicht begrenzt auf Trisomie 21, Prader-Willi Syndrom und Angelman Syndrom, ein.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0011] Fig. 1 zeigt die Ergebnisse eines Tests, der methylierte und unmethylierte DNA Sequenzen des Androgenrezeptorgens nachweist. Insgesamt wurden 6 männliche und 11 weibliche gesunde Subjekte aufgenommen. Von allen männlichen Kontrollsubjekten wurde nur das nichtmethylierte Androgenrezeptorgen in diesen Proben wie erwartet nachgewiesen (Fig. 1A). Im Gegensatz dazu wurden sowohl nicht-methylierte und methylierte Androgenrezeptorgen DNA Sequenzen in weiblichen Kontrollsubjekten beobachtet (Fig. 1A). Die Nachweisraten von methylierten und nicht-methylierten Androgenrezeptorgen in diesen weiblichen Subjekten waren jeweils 100% und 82%. Wenn DNA Proben aus diesem Test weggelassen wurden, wurde kein positives Signal beobachtet (Fig. 1A). Interessanterweise wurden positive Signale für sowohl methylierte und nicht-methylierte DNA Sequenzen in allen männlichen Knochenmarkstransplantationsempfängern mit weiblichen Spender beobachtet, was anzeigt, daß Zellen aus weiblichen Spender in dem Blutkreislauf von männlichen Empfängern existieren.

[0012] Fig. 2 stellt eine schematische Darstellung der unterschiedlich methylierten Region (DMR) der menschlichen IGF2-H19 Region dar. Die zwei 450-bp Wiederholungs- (A1 und A2) und sieben 400-bp Wiederholungs-(B1–B7) Einheiten sind gezeigt. Die potentiellen Methylierungsstellen auf der DNA des oberen Stranges der untersuchten Region werden durch offene Kreise dargestellt. Die untersuchte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) Stelle (A/G) wird durch einen offenen Kasten angezeigt. Offene Pfeile stellen die Position der Vorwärts (for) und Reversen (rev) Primer in PCR Reaktionen dar, die jeweils für die methylierten (M) und nicht-methylierten (U) Allele spezifisch sind. Die Sequenzen dieser MSP Primer sind gezeigt. Sequenzunterschiede zwischen Bisulfit-behandelter DNA und unbehandelter DNA werden fett kursiv hervorgehoben, und die Sequenzunterschiede zwischen methylierter (paternalvererbter) und nicht-methylierter (maternal-vererbter) DNA sind fett unterstrichen.

[0013] Fig. 3 zeigt den Nachweis von methylierter (pternaler) DNA in drittem Trimester- (a) und zweitem Trimester- (b) maternalem Plasma. Die DNA Sequenz von methylierten Allelen in maternalem Buffy-Coat (Panel 1), fötalem Buffy-Coat oder amniotischer Flüssigkeit (Panel 2), pränatalem maternalem Plasma (Panel 3) und postnatalem maternalem Plasma (Panel 4) Proben ist gezeigt. Die Anwesenheit von methylierter fötaler DNA in der pränatalen maternalen Plasmaprobe wird durch * angezeigt. Die polymorphe (SNP) Stelle ist in roten Buchstaben gezeigt.

[0014] Fig. 4 zeigt den Nachweis von nicht-methylierter (mütterlich-vererbter) fötaler DNA in maternalem Plasma. (a) Nicht-methylierte DNA Sequenzen wurden in maternalem Buffy-Coat (Panel 1) und einer drittes Trimester maternalen Probe (Panel 2) unter der Verwendung von direkter Sequenzierung nachgewiesen. Die Anwesenheit von nicht-methylierter fötaler DNA in maternalem Plasma wird durch * angezeigt. (b) Nicht-methylierte fötale DNA (Pfeil) wurde in zwei drittes Trimester maternalen Plasmaproben unter der Verwendung des Primerverlängerungsassays nachgewiesen. (c) Nicht-methylierte fötale DNA (Pfeil) wurde in einer zweites Trimester maternalen Plasmaprobe unter der Verwendung des Primerverlängerungsassays nachgewiesen. Die Produkte aus den Kontrollreaktionen die nur Primer enthielten, unmethyliertes G Allel oder nicht-methyliertes A Allel sind gezeigt. Die Größen (nt) der Reaktionsprodukte sind an der Unterseite gezeigt. •, nichtverwendeter Primer; □ nachgewiesenes Allel.

Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen

[0015] In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Differenzierung von DNA Spezies, die von verschiedenen Individuen abstammen, in einer biologischen Probe. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Verfahren der vorliegenden Erfindung dazu verwendet, um fötale DNA in einer mütterlichen Probe zu unterscheiden oder nachzuweisen oder DNA eines Organspenders von der DNA eines Organempfängers zu unterscheiden.

[0016] Der Fachmann im Stand der Technik wird erkennen, daß die biologische Probe von einem Individuum von jeder Flüssigkeits- oder Zellprobe genommen werden kann, jedoch ist in bevorzugten Ausführungsformen die Körperflüssigkeit Plasma oder Serum. In bevorzugten Ausführungsformen werden die DNA Spezies durch beobachten der epigenetischen Unterschiede in den DNA Spezies, wie z.B. Unterschiede in der DNA-Methylierung unterschieden. Z.B. kann in Situationen, wo eine DNA Spezies von einem Mann abstammt und eine DNA Spezies von einer Frau abstammt, der epigenetische Marker das inaktivierte X-Chromosom des weiblichen Individuums sein. In solchen Ausführungsformen können methylierte DNA Sequenzen des inaktivierten X-Chromosoms dazu verwendet werden, um DNA nachzuweisen, die von dem weiblichen Individuum abstammt. In einigen Ausführungsformen können die epigenetischen Unterschiede innerhalb von Zellen analysiert werden. Weiter können in einigen Ausführungsformen die epigenetischen Unterschiede unter der Verwendung von in-situ Methylierung zu spezifischer Polymerasekettenreaktion analysiert werden. Zusätzlich können die epigenetischen Unterschiede verwendet werden, um die Zellen von den jeweiligen Individuen zu sortieren oder zu isolieren oder DNA von den jeweiligen Individuen aufzureinigen. Die Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können mit oder ohne Messung der Konzentrationen an DNA Spezies durchgeführt werden, jedoch werden in bevorzugten Ausführungsformen die Konzentrationen von DNA Spezies mit den jeweiligen epigenetischen Unterschieden gemessen. Solche Konzentrationsmessungen schließen das Messen der jeweiligen DNA Methylierungsunterschiede in Ausführungsformen ein, wobei die DNA Methylierungsunterschiede der epigenetische Marker sind. In besonders bevorzugten Ausführungsformen wird Natriumbisulfit zu der biologischen Probe oder zu der DNA Spezies direkt hinzugegeben, um die DNA Methylierungsunterschiede nachzuweisen. Jedoch kann in anderen Ausführungsformen eine Methylierungs-spezifische Polymerasekettenreaktion, wie sie dem Fachmann im Stand der Technik gut bekannt ist, verwendet werden, um die DNA Methylierungsunterschiede nachzuweisen. In noch anderen Ausführungsformen kann DNA Sequenzierung oder Primerverlängerung verwendet werden, um die Methylierungsunterschiede nachzuweisen.

[0017] Wie hier verwendet ist der Ausdruck „biologische Probe“ als jede Flüssigkeits- oder zelluläre Probe oder Gemisch davon einschließlich vorgesehen, die von einem lebenden Organismus erhalten wurde. Speziell schließt der Begriff Gewebebiopsie, Serum, Plasma oder amniotische Flüssigkeitsproben ein.

[0018] Wie hier verwendet ist der Begriff „epigenetischer Unterschied“ vorgesehen, um jeglichen molekularen oder strukturellen Unterschied anders als die primäre Polynukleotidsequenz zu umfassen. Z.B. kann dies Unterschiede in der Methylierung einschließen.

[0019] Wie hier verwendet ist der Ausdruck „DNA“ vorgesehen als jegliche Sequenz von mehr als einem Nucleotid, wie z.B. Polynukleotide, Genfragmente und vollständige Gensequenzen, zu umfassen.

[0020] Wie hier verwendet wird der Ausdruck „Methylierungs-spezifische PCR“ dazu verwendet, um ein Verfahren zu beschreiben in dem DNA mit Natriumbisulfit behandelt wird und dann PCR Amplifikation unterzogen wird. Diese Technik basiert auf dem Prinzip, daß die Behandlung mit der DNA mit Bisulfit zur Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinresten in Uracil führt. Methylierte Cytosinreste bleiben im Gegensatz dazu unverändert. Daher sind die Sequenzen von methylierten und nicht-methylierten genomischen Regionen im Anschluß an die Bisulfit-Umwandlung unterschiedlich und durch Sequenz-spezifische PCR Primer unterscheidbar.

[0021] Die vorliegende Erfindung verwendet das Phänomen von genomischem Imprinting, um die Beschränkungen des Stands der Technik zu überwinden. Beim genomischem Imprinting werden DNA Sequenzen biochemisch modifiziert, ohne eine Veränderung in der DNA Sequenz. Wenn dieser Prozeß zur unterschiedlichen Modifikation der fötalen und maternalen DNA führt, dann kann dieser Unterschied zur Unterscheidung von fötaler von maternaler DNA in maternalem Plasma und Serum verwendet werden. Dieses Phänomen kann auch zur Unterscheidung von fötalen Zellen von maternalen Zellen in der zellulären Fraktion von maternalem Blut verwendet werden. Zusätzlich kann dieses Prinzip auch dazu verwendet werden, um maternale Zellen oder DNA nachzuweisen, die in dem Körper des Fötus/Baby eingetreten sind/ist (Lo, et al., Blood 88(11):4390–5 (1966); Lo, et al., Clin Chem, 46(9):1301–9 (2000); Maloney et al., J Clin Invest 104(1):41–7 (1999)). Dieses Phänomen kann auch in vielen anderen klinischen Szenarien verwendet werden, wobei Zellen oder DNA-Sequenzen als innerhalb des Körpers eines Individuums vorhanden gefunden werden, wie z.B. im Anschluß an Knochenmarkstransplantation (Lo et al., Br J Haematol 89(3):645–9 (1995)) oder fester Organtransplantation (Starzl et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 6(3):292–8 (1997); Lo et al., Lancet 351(9112):1329–30 (1998); Zhang, Clin Chem 45(10):1741–6 (1999)).

[0022] Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Entwicklung eines Geschlechts-unabhängigen und Polymorphismus-unabhängigen Markers für fötale DNA in maternalem Plasma/Serum. Um einen Geschlechts-unabhängigen und Polymorphismus-unabhängigen fötalen Marker zu entwickeln, kann man DNA-Sequenzen ver-

wenden, die bevorzugterweise und spezifisch im Trophoblasten methyliert vorliegen (Ohgane et al., *Dev Genet*, 22(2):132–40 (1998)). Dieses überwindet die augenblickliche Limitierung, die einfach nur die DNA von einem männlichen Fötus im Plasma/Serum der Mutter nachweisen kann (durch Verwendung des Y-Chromosoms als dem Ziel)(Lo, et al., *Am J Hum Genet*, 62(4):768 (1998)). Sie stellt Nachweisverfahren zur Verfügung, die unterschiedlich sind von einer Abhängigkeit von Sequenzunterschieden in fötaler und maternaler DNA, um solch eine Unterscheidung durchzuführen (Tang et al., *Clin Chem* 45(11):2033–5 (1999); Pertl et al., *Hum Genet* 106:45–49 (2000)).

[0023] Die Entwicklung von molekularen Nachweisverfahren, wie zum Beispiel der PCR, hat viele wirksame Werkzeuge zur Überwachung von Chimerismen im Anschluß an Knochenmarkstransplantation (BMT) zur Verfügung gestellt. Einer der am meisten verwendeten PCR-basierten Tests zum Nachweis von post-BMT-Chimerismen in Geschlechts-fehlgepaarten Fällen ist die PCR für Sequenzen auf dem Y-Chromosom (Lo et al., *Br J Haematol* 89:645–9 (1995)). Die Einschränkung dieser Strategie ist, daß sie nur in Fällen verwendet werden kann, wobei der Spender männlich und der Empfänger weiblich ist. Die vorliegende Erfindung stellt ein System zur Verfügung, das in Situationen angewendet werden kann, wo der Spender weiblich ist und der Empfänger männlich ist. Die Tatsache, daß das Phänomen der Lyonisierung nur in Frauen existiert, kann verwendet werden, um einen weiblich-spezifischen Marker zu entwickeln. Bei diesem Phänomen wird eines der zwei X-Chromosomen in einem weiblichen Individuum zufällig inaktiviert, wobei bei inaktivierten Genen Methylierung auftritt. Dies ermöglicht daher einen Test zum Nachweis von weiblicher DNA in einem Überschuß von männlicher DNA und kann so bei BMT mit weiblichen Spender und männlichen Empfängern angewendet werden.

[0024] In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zum Nachweis von Abnormalitäten in einem Fötus durch Nachweisen von fötaler DNA in einer biologischen Probe, die von einer Mutter erhalten wurde. Die Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung stellen den Nachweis von fötaler DNA in einer mütterlichen Probe durch Unterscheiden der fötalen DNA von der mütterlichen DNA, basierend auf epigenetischen Marker, wie zum Beispiel Unterschieden in der DNA-Methylierung, zur Verfügung. Unter der Verwendung solcher Verfahren kann fötale DNA, die für eine Anomalie oder eine Erkrankung prädiktiv ist, identifiziert werden, wodurch Verfahren zur pränatalen Diagnose zur Verfügung gestellt werden. Diese Verfahren sind für jegliche und alle Schwangerschafts-assoziierten Zustände anwendbar, für die Methylierungsveränderungen, die mit einem Erkrankungszustand assoziiert sind, identifiziert sind. Beispielhafte Erkrankungen, die diagnostiziert werden können, schließen zum Beispiel Präeklampsie, eine chromosomale Aneuploidie, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Trisomie 21, Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom, ein.

[0025] Wie bei den breiter differenzierenden Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung ist die biologische Probe, die von der Mutter erhalten wurde, bevorzugterweise Plasma oder Serum. Die Unterscheidung zwischen maternaler und fötaler DNA kann mit oder ohne Quantifizierung der Konzentration von fötaler DNA in maternalem Plasma oder Serum durchgeführt werden. In Ausführungsformen wobei die fötale DNA quantifiziert wird kann die gemessene Konzentration dazu verwendet werden, um eine Schwangerschafts-assoziierte Erkrankung vorherzusagen, zu überwachen oder zu diagnostizieren. In bevorzugten Ausführungsformen ist der bestimmte, Fötus-abgeleitete epigenetische Marker mit einer fötalen Erkrankung assoziiert, und in einigen Ausführungsformen wird eine epigenetische Charakteristik in fötalen Zellen in der Plazenta als ein Fötus-spezifischer Marker in maternalem Plasma oder Serum verwendet.

[0026] Die vorliegende Erfindung verwendet unterschiedlich methylierte fötale DNA-Sequenzen, die nicht im Hinblick auf die DNA-Sequenz von maternaler DNA unterscheidbar sein müssen, wie Marker für nicht-invasive pränatale Diagnose. Dieser neue Ansatz kann Fötus-Mutter-Paare, die im herkömmlichen Ansatz nicht informativ sind, in informativ für die pränatale Diagnose konvertieren. Daher stellt die vorliegende Erfindung eine Plattform zur Verfügung, auf der eine neue Generation von nicht-invasiven pränatalen Tests aufgebaut werden kann.

[0027] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung basieren auf dem Nachweis von unterschiedlich methylierter DNA von fötalem Ursprung im Plasma oder Serum von schwangeren Frauen. Unterschiedlich methylierte DNA-Sequenzen, die Einzelnuldeotid-Polymorphismen enthalten können, werden bevorzugterweise durch Methylierungs-spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen; jedoch kann im Prinzip jedes Nachweisverfahren für unterschiedlich methylierte DNA verwendet werden. Dieser Ansatz ermöglicht die Verwendung von herkömmlichen, nicht-informativen fötalen DNA-Markern für die pränatale Diagnose.

[0028] Die vorliegende Erfindung ermöglicht den Nachweis oder die Vorhersage der Anwesenheit von jeglicher Erkrankung des Fötus oder der Mutter, die mit einer Veränderung des Methylierungsstatus einer DNA-Sequenz assoziiert ist. Beispiele schließen Imprinting-Erkrankungen, wie zum Beispiel Prader-Willi-Syndrom, ein

(Kubota et al., Nat Genet 16(1):16–7 (1997)). Die vorliegende Erfindung stellt einen neuen Typ an Tests auf Präeklampsie zur Verfügung, die als Imprinting-Erkrankung vorgeschlagen wurde (Graves, Reprod Fertl Dev 10(1):23–9 (1998)). Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin einen neuen Typ an Tests auf chromosomale Aneuploidien, einschließlich Down-Syndrom (Trisomie 21) zur Verfügung, die mit Methylierungsveränderungen assoziiert sein können (Yu et al., Proc Natl Acad Sci U S A 94(13):6862–7 (1997)).

[0029] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Methylierungsunterschieden zwischen der Mutter und dem Fötus, wodurch die Begrenzungen des Stands der Technik beim Nachweis von fötaler DNA in maternalem Plasma überwunden wird.

[0030] In einem dritten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Unterscheidung von DNA-Spezies, die von einem Organspender abstammen, von denjenigen eines Organempfängers. Wie bei den breiter differenzierenden Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung ist die erhaltene biologische Probe bevorzugterweise Plasma oder Serum. Die Unterscheidung zwischen DNA von dem Organspender und Organempfänger oder potentiellen Organspender und potentiellen Organempfänger kann mit oder ohne Quantifizieren der Konzentration von DNA in der biologischen Probe durchgeführt werden. Diese Ausführungsform ist besonders brauchbar in Fällen, wo die Transplantation eine Knochenmarkstransplantation ist. Solche Messungen können dazu verwendet werden, um das klinische Fortschreiten des Transplantat-Empfängers vorherzusagen, insbesondere wenn auf Organabstoßung angewandt.

[0031] In einem vierten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Kits zur Unterscheidung von DNA-Spezies, die von verschiedenen Individuen abstammen, in einer biologischen Probe. Solche Kits sind zum Beispiel zur Unterscheidung oder beim Nachweis der Anwesenheit von fötaler DNA in einer mütterlichen biologischen Probe brauchbar oder zur Unterscheidung von DNA von einem Organspender oder potentiellen Organspender von der eines Organempfängers oder potentiellen Organempfängers. Die Kits gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen eines oder mehrere Reagenzien zur Ermittlung des Methylierungszustands der maternalen DNA, wie zum Beispiel Natriumbisulfit und eines oder mehrere Reagenzien zum Nachweis der Anwesenheit von DNA, wie zum Beispiel ein Gel. Zusätzlich können solche Kits eines oder mehrere Reagenzien zur Amplifizierung der Menge an DNA, die in der Probe vorhanden ist, einschließen, wie zum Beispiel eines oder mehrere Reagenzien zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktions-Amplifikation. Solche Reagenzien sind dem Fachmann gut bekannt. Weiterhin können solche Kits eine oder mehrere Vorrichtungen zum Erhalten einer maternalen DNA-Probe einschließen. Solche Vorrichtungen sind dem Fachmann gut bekannt. Insbesondere können die Kits gemäß der vorliegenden Erfindung zur Diagnose einer Erkrankung, die insgesamt oder teilweise durch eine genetische Anomalie verursacht wird, wie zum Beispiel eine Mutation, Substitution oder Deletion oder Duplikation in der gesamten oder einem Teil einer DNA-Sequenz, die in einem Fötus vorhanden ist, verwendet werden. Beispielhafte Erkrankungen, die diagnostiziert werden können schließen zum Beispiel Präeklampsie, eine chromosomale Aneuploidie, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf Trisomie 21, Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom, ein.

BEISPIEL 1

Nachweis von post-Knochenmarkstransplantations-Chimerismus epigenetischer Ansatz

Materialien und Methoden

Subjekte und Proben

[0032] Vier männliche Knochenmarkstransplantationsempfänger, die Knochenmark von weiblichen Spender erhielten, und 17 normale gesunde Subjekte wurden für diese Studie aufgenommen. Buffy Coat (BC) von allen EDTA-Blutproben wie aufgenommen wurden geerntet und bei -20°C wie beschrieben gelagert (Lo et al., Am J Hum Genet 62:768–75 (1998)).

DNA-Isolierung

[0033] DNA wurde aus dem BC unter der Verwendung eines Nukleon-DNA-Extraktion-Kits (Scotlabs) gemäß den Empfehlungen des Herstellers extrahiert.

Bisulfit-Umwandlung

[0034] Die Bisulfit-Modifikation von DNA-Proben wurde unter Verwendung eines CpGenome-DNA-Modifika-

tion-Kits (Intergen) wie durch den Hersteller angewiesen durchgeführt.

[0035] Durch die Bisulfit-Umwandlung werden nicht-methylierte Cytosin-Reste in Uracil umgewandelt, während methylierte Cytosin-Reste unverändert bleiben (Herman et al., Proc Natl Acad Sci U S A 93:9821–6 (1996)). Der Sequenzunterschied zwischen methylierter und nichtmethylierter DNA im Anschluß an die Bisulfit-Umwandlung wird dann unter der Verwendung von verschiedenen PCR-Primern unterschieden. 1 µg an BC-DNA wurde in einer Bisulfit-Umwandlungsreaktion verwendet.

Methylierungs-spezifische PCR (MSP)

[0036] Die MSP-Tests wurden von dem Protokoll wie durch Herman et al., supra beschrieben modifiziert. Die Primer M-for (5'-GCGAGCGTAGTATTTTTTCGGC-3') und M-rev (5'-AACCAAATAACCTATAAAACCTCTACG-3') wurden für die methylierte Sequenz entworfen, während die Primer U-for (5'-GTTGTGAGTGTAGTATTTTTTGGT-3') und U-rev (5'-CAAATAACCTATAAAACCTCTACA-3') für die nicht-methylierte Sequenz entworfen wurden. Fünf µl Bisulfit-behandelte DNA wurden in eine 50 µl-PCR-Reaktion, enthaltend 5 µl 10x Taq-Man-Puffer A (PE Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂, 10 pmol dNTPs, 20 pmol jedes der entsprechenden MSP-Primer und 1,25 U-AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase (PE Applied Biosystems) hinzugefügt. Die Reaktionsgemische wurden thermisch zyklert (methylierte Allele: 95°C für 45 Sekunden, 58°C für 30 Sekunden, 72°C für 20 Sekunden; nichtmethylierte Allele: 95°C für 45 Sekunden, 50°C für 30 Sekunden, 72°C für 20 Sekunden) für 45 Zyklen, mit einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 8 Minuten bei 95°C. Die PCR-Produkte wurden dann durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

Ergebnisse

[0037] Dieses Experiment stellt einen MSP-Test zur Verfügung, um methylierte und nichtmethylierte DNA-Sequenzen des Androgen-Rezeptorgens nachzuweisen. Insgesamt wurden 6 männliche und 11 weibliche gesunde Subjekte aufgenommen. Von allen männlichen Kontrollsubjekten wurde nur das nicht-methylierte Androgen-Rezeptorgen in diesen Proben wie erwartet nachgewiesen ([Fig. 1A](#)). Im Gegensatz dazu wurden sowohl nicht-methylierte als auch methylierte Androgen-Rezeptorgen-DNA-Sequenzen in weiblichen Kontrollsubjekten beobachtet ([Fig. 1A](#)). Die Nachweisraten von methylierten und nicht-methylierten Androgen-Rezeptorgen in diesen weiblichen Subjekten waren jeweils 100% und 82%. Wenn DNA-Proben aus dem MSP-Test weggelassen wurden, wurde kein positives Signal beobachtet ([Fig. 1A](#)). Interessanterweise wurden positive Signale für sowohl methylierte als auch nichtmethylierte DNA-Sequenzen in allen männlichen Geschlechts-gepaarten Knochenmarkstransplantationsempfängern beobachtet (100%), was anzeigt, daß Zellen des weiblichen Spenders im Blutkreislauf der männlichen Empfänger existieren.

[0038] Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, daß methylierte Gene auf dem inaktivierten X-Chromosom von weiblichen Individuen als ein weiblich-spezifischer Marker in der Chimerismen-Forschung verwendet werden können. Dieser Test ist auch für die Untersuchung von anderen Typen von post-Transplantation-Chimerismen anwendbar, die ein Gemisch von männlichen und weiblichen Zellen oder DNA einschließen. Beispiele schließen zelluläre Chimerismen im Anschluß an feste Organtransplantation (Starzl et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 6:292–8 (1997)), post-Transplantations-Plasma-DNA-Chimerismen (Lo et al., Lancet 351:1329–30 (1998)) und urinäre DNA-Chimerismen (Zhang et al., Clin Chem 45:1741–6 (1995)) ein. Zusätzlich besteht auch viel kürzliches Interesse an der Passage von Zellen und DNA von der Mutter in den Fötus während der Schwangerschaft (Lo et al., Blood 88:4390–5. (1996), Maloney et al., J Clin Invest 104:41–7 (1999); Lo et al., Clin Chem 46:1301–9 (2000)). Die entwickelten epigenetischen Marker sollten auch bei Chimerismen von maternalem Ursprung in männlichen Nachkommen verwendbar sein.

[0039] Der augenblickliche Test kann in ein quantitatives Format entwickelt werden, wobei zum Beispiel Real-Time-PCR-Technologie (Lo et al., Cancer Res 59:3899–903 (1999)) verwendet wird. Solch eine Entwicklung würde es uns ermöglichen, die Spiegel von Chimerismus in einer bestimmten Person zu überwachen. Klinisch kann ein solcher Test eine Rolle bei der Überwachung von Graft-Akzeptanz in BMT haben. Im Fall von urinären oder Plasma-DNA-Chimerismen könnte ein solcher Test auch zur Überwachung von Graft-Abstoßung verwendet werden.

BEISPIEL 2

Unterschiedliche DNA-Methylierung zwischen Fötus und Mutter als eine Strategie zum Nachweis von fötaler DNA in maternalem Plasma

[0040] Das vorliegende Experiment zeigt, daß bei Verwendung einer unterschiedlich methylierten Region im menschlichen IGF2-H19-Lokus als einem epigenetischen Marker in maternalem Plasma der Nachweis eines Allels möglich ist, das der Fötus von der Mutter geerbt hat. Diese Ergebnisse erweitern die pränatalen diagnostischen Möglichkeiten von fötaler DNA in maternalem Plasma erheblich, wobei sie die Entwicklung eines Geschlechts- und Polymorphismusunabhängigen fötal-spezifischen Markers in mütterlichem Plasma ermöglichen und neue Strategien für die pränatale Diagnose von Imprinting-Erkrankungen und bestimmten chromosomalen Aneuploidien.

Materialien und Methoden

Subjekte und Proben

[0041] Proben wurden von schwangeren Frauen mit informierter Zustimmung gesammelt. Insgesamt wurden jeweils 21 und 18 Frauen im zweiten Trimester (17–21 Wochen) und dritten Trimester (37–42 Wochen) der Schwangerschaft für diese Studie aufgenommen. Keines der aufgenommenen Subjekte wies eine Präeklampsie oder vorgezogene Wehen in der augenblicklichen Schwangerschaft auf. EDTA-mütterliches Blut und fötale amniotische Flüssigkeitsproben wurden von den Zweiten-Trimester-Fällen wie vorher beschrieben gesammelt (Lo et al., *Am J Hum Genet* 62:768–775 (1998)). Für die Fälle des dritten Trimesters sammelten wir EDTA-mütterliche Blutproben bei 2 bis 3 Stunden vor normaler vaginaler Geburt. EDTA-fötale Nabelschnur-Blutproben wurden auch unmittelbar nach der Geburt wie beschrieben gesammelt (Lo et al., *Clin Chem* 46:1903–1906 (2000)). Plasma und Buffy Coat von allen aufgenommenen Blutproben wurden geerntet und bei –20°C gelagert, wie beschrieben (Lo et al., *Am J Hum Genet* 62:768–775 (1998)), mit der Ausnahme, daß Plasmaproben bei 16000 g rezentrifugiert wurden. Die amniotischen Flüssigkeitsproben wurden bei 4°C gelagert.

DNA-Isolierung

[0042] Die DNA wurde von Plasma und amniotischen Flüssigkeitsproben unter der Verwendung eines QIAamp-Blut-Kits (Qiagen) extrahiert. Typischerweise wurden 800 µl an Plasma oder amniotischer Flüssigkeit für die DNA-Extraktion pro Säule verwendet. Ein Elutionsvolumen von 50–110 µL wurde verwendet. Die DNA wurde aus dem Buffy-Coat unter der Verwendung eines Nukleon-DNA-Extraktions-Kits (Scotlabs) gemäß den Empfehlungen des Herstellers extrahiert.

Genotypisierung der DMR polymorphen Region

[0043] Die DMR im menschlichen IGF2-H19-Lokus enthält zwei 450-bp Wiederholungs- und sieben 400-bp Wiederholungs-Einheiten (Nakagawa et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:591–596 (2001)) (Fig. 2). Ein A/G-SNP innerhalb des DMR (Nakagawa et al., *supra*) wurde als ein Marker in unserer Untersuchung ausgewählt (Fig. 2). Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde dazu verwendet, um den SNP in sowohl maternalen als auch fötalen DNA-Proben zu amplifizieren. Primer wurden unter der Verwendung der Sequenz des Homo sapiens H19-Gens (Genbank-Zugangsnummer AF125183) aufgebaut. Typischerweise wurden 2 bis 5 µl eluierte DNA, gereinigt aus maternalem Buffy-Coat, Nabelschnur-Buffy-Coat oder amniotischer Flüssigkeit zu einer 25 µl PCR-Reaktion hinzugefügt, enthaltend 2,5 µl 10x TagMan-Puffer A (PE Applied Biosystems), 3mM MgCl₂, 6,26 pmol dNTPs, 5 pmol Primer (vorwärts: 5'-ggACGGAATTGGTTGTAGTT-3'; revers: 5'-AGG-CAATTGTCAGTTCAGTAA-3') und 0.625 U-AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase (PE Applied Biosystems) (95°C für 8 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen von 95°C für 1 Minute, 56°C für 20 Sekunden; 72°C für 20 Sekunden). Für den Vorwärts-Primer entsprachen die Nukleotide im „upper“-Fall den Positionen 7927 bis 7944 der H19-Sequenz (Genbank-Zugangsnummer AF125183). Für den reversen Primer waren die Nukleotide komplementär zu den Positionen 8309 bis 8329 der H19-Sequenz. Die PCR-Produkte wurden dann durch Agarosegel-Elektrophorese und DNA-Sequenzierung analysiert.

Bisulfit-Umwandlung

[0044] Die Bisulfit-Modifikation von DNA-Proben wurde unter der Verwendung eines CpGenome-DNA-Modifikations-Kits (Intergen) wie durch den Hersteller angewiesen durchgeführt. Mit der Bisulfit-Umwandlung würden nicht-methylierte Cytosin-Reste in Uracil umgewandelt; während methylierte Cytosin-Reste unverändert

bleiben würden (Herman et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:9821–9826 (1996)). Der Sequenzunterschied zwischen methylierter und nicht-methylierter DNA im Anschluß an die Bisulfit-Umwandlung könnte dann unter der Verwendung von verschiedenen PCR-Primern unterschieden werden. Im Allgemeinen wurden 1 µg von Buffy Coat-DNA aus dem maternalen oder Nabelschnurblut oder 93 µl eluierte DNA gereinigt aus maternalem Plasma oder amniotischer Flüssigkeit in einer Bisulfit-Umwandlungsreaktion verwendet. Die Bisulfit-behandelte DNA wurde dann in 25–50 µl 1µ-Tris-EDTA eluiert.

Methylierungs-spezifische PCR (MSP)

[0045] Die MSP-Tests wurden von dem Protokoll wie beschrieben (Herman et al, 1996) modifiziert. Fünf µl Bisulfit-behandelte DNA wurden zu einer 50 µl-PCR-Reaktion, enthaltend 5 µl 10x TagMan-Puffer A (PE Applied Biosystems), 2,5 mM MgCl₂, 10 pmol dNTPs, 20 pmol jedes der entsprechenden MSP-Primer (**Fig. 2**) und 1,25 U-AmpliTaQ-Gold-DNA-Polymerase (PE Applied Biosystems) hinzugefügt. Die Primer M-for und M-rev (**Fig. 2**) wurden für die methylierte Sequenz entworfen, während die Primer U-for und U-rev (**Fig. 2**) für die nichtmethylierte Sequenz entworfen wurden. Die Reaktionsgemische wurden thermisch zyklert (methylierte Allele: 95°C für 45 Sekunden, 55°C für 20 Sekunden, 72°C für 20 Sekunden; nicht-methylierte Allele: 95°C für 45 Sekunden, 49°C für 20 Sekunden, 72°C für 20 Sekunden) für 50 (Buffy Coat und amniotische Flüssigkeits-DNA) oder 56 (Plasma-DNA) Zyklen, mit einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 8 Minuten bei 95°C. Die PCR-Produkte wurden dann durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Reaktionsprodukte wurden unter der Verwendung von Microspin S-300 HR-Säulen (Amersham Pharmacia) für die DNA-Sequenzierung oder den Primer-Extension-Test gereinigt.

DNA-Sequenzierung

[0046] Die gereinigten PCR-Produkte wurden unter der Verwendung eines ABI-Prism-dRhodamine-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kits (PE Applied Biosystems) und den entsprechenden Vorwärts-Primern des PCR-Produkts sequenziert. Die Sequenzierungsprodukte wurden unter der Verwendung eines ABI-Prism-310-genetischen Analysers (PE Applied Biosystems) analysiert.

Primer-Extension-Test

[0047] Zwei µl des gereinigten MSP-Produkts wurden zu einer 25 µl-Reaktion, enthaltend 50 µM ddATP (2',3'-Dideoxyadenintriphosphat), 50 µM dGTP, 50 µM dTTP, 0,2 pmol Cys-5-markierten Primer (5'-GGGT-TATTTGGGAATAGGATATTTA-3'), 4 U-Thermo-Sequense (Amersham Pharmacia) und 1,43 µl konzentrierten Puffer hinzugefügt. Die Reaktionen wurden für 40 Zyklen thermisch zyklert (95°C für 30 Sekunden, 51°C für 20 Sekunden, 72°C für 20 Sekunden). Der Cys-5-markierte Primer war 25 Nukleotide (nt) lang und die polymorphe Stelle war 2 nt von dem 3'-Ende des Primers entfernt. Für das A-Allel würde die Inkorporation des ddATP an dieser polymorphen Stelle eine Ketten-Termination produzieren, was zu einem Verlängerungsprodukt von 27 nt führen würde (d.h. 25 + 2 nt). Für das G-Allel würde die Kettenverlängerung bis zum nächsten A-Rest fortschreiten, der 5 nt von dem 3'-Ende des Primers entfernt war, was zu einem Verlängerungsprodukt von 30 nt führen würde (d.h. 25 + 5 nt). Die Reaktionsprodukte wurden unter der Verwendung eines 14 % denaturierenden Polyacrylamidgels elektrophoriert und unter der Verwendung eines ALF-Express-Sequencers (Amersham Pharmacia) analysiert. Die Daten wurden durch das AlleleLinks-Programm (Amersham Pharmacia) analysiert.

Ergebnisse

Genotypisierung von DMR

[0048] Neununddreißig schwangere Frauen wurden in diese Studie aufgenommen. Der maternale Genotyp am SNP innerhalb der DMR (**Fig. 2**) wurde durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten aus der Buffy Coat-DNA bestimmt. Die Zahl von schwangeren Frauen mit jedem der möglichen Genotypen war 17 (GG, 43,6%), 16 (AG, 41,0%) und 6 (AA, 15,4%).

Nachweis von fötaler DNA in Plasma aus Frauen, die für einen biallelischen Polymorphismus heterozygot sind

[0049] Die 16 Frauen, die für den SNP heterozygot waren (d.h. AG), wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Da dies ein biallelischer Polymorphismus ist, wurden diese Frauen nicht als informativ an diesem polymorphen Locus für den Nachweis von fötaler DNA in maternalem Plasma betrachtet, basierend auf früheren Kriterien (Lo et al., Ann N Y Acad Sci 731:204–213 (1994); Bianchi, Am J Hum Genet 62:763–764 (1998)). Um

zu zeigen, daß eine differentielle Methylierung an dieser genomischen Region es uns ermöglichen würde, diese Begrenzung zu überwinden, wurde maternale DNA Bisulfit-behandelt und durch MSP amplifiziert, unter der Verwendung der in [Fig. 2](#) gezeigten Primer. Ähnlich wurde fötale DNA, die aus amniotischer Flüssigkeit isoliert wurde (Proben des zweiten Trimesters) oder Buffy-Coat von Nabelschnurblut (Proben des dritten Trimesters) PCR und MSP unterzogen, um den Imprinting-Status der fötalen Allele zu bestimmen.

[0050] Unter den 16 ausgewählten Fällen waren die methylierten (d.h. paternal-vererbten) Allele der fötalen Proben von vier dritten Trimestern und sieben zweiten Trimestern von den methylierten Allelen der respektiven Mütter verschieden ([Fig. 3a, b](#); vergleiche Panels 1 und 2). Um zu testen, ob es diese differentielle Methylierung zwischen Fötus und Mutter ermöglichen würde, die fötalen Allele aus maternalem Plasma nachzuweisen, wurde maternale Plasma-DNA aus diesen Fällen einer Bisulfit-Umwandlung unterzogen, gefolgt von MSP. Interessanterweise konnte das paternal-vererbte, methylierte fötale Allel in zwei Dritten-Trimester- und vier Zweiten-Trimester-maternalen Plasmaproben nachgewiesen werden ([Fig. 3a, b](#); Panel 3). Um die Möglichkeit auszuschließen, daß diese Beobachtungen schlicht durch die Anwesenheit von aberrant methylierter maternaler DNA in maternalem Plasma verursacht wurden, sammelten wir eine post-natale maternale Plasmaprobe (~3,5 Jahre nach Geburt) von einem der positiven Fälle für die weitere Untersuchung. Wir beobachteten das zusätzlich methylierte Allel in dieser post-natalen Probe nicht ([Fig. 3a](#), Panel 4), was anzeigte, daß das zusätzlich methylierte Allel in der maternalen Probe während der Schwangerschaft vom Fötus abstammte. Zusätzlich wurde kein positives Signal in dem Plasma von nicht-informativen Fällen (n = 4, Daten nicht gezeigt) gefunden, was weiter die Spezifität dieses MSP-Tests zeigte. Zusammengefasst zeigen diese Daten an, daß die Verwendung von differentieller Methylierung zwischen Mutter und Fötus den Nachweis von fötaler DNA in maternalem Plasma erlaubt, sogar in Fällen, die unter den bereits existierenden Kriterien als nicht-informativ betrachtet werden.

Nachweis von fötal-abgeleitete, maternal-vererbter DNA aus maternalem Plasma

[0051] Wir testeten dann, ob die Verwendung von differentieller Methylierung zwischen Mutter und Fötus es uns möglicherweise ermöglichen würde, ein Allel nachzuweisen, das der Fötus von der Mutter geerbt hat. Dieser Typ von Analyse wurde bis jetzt als unmöglich betrachtet (Lo et al., *Ann N Y Acad Sci* 731:204–213 (1994), Bianchi, *Am J Hum Genet* 62:763–764 (1998)). Da das maternal-vererbte Allel nicht-methyliert war, wurden die Primer U-for und U-rev ([Fig. 2](#)) verwendet, um das nicht-methylierte Allel im Anschluß an die Bisulfit-Umwandlung zu amplifizieren. Unter den 16 analysierten Fällen waren drei maternale Proben des dritten Trimesters und fünf des zweiten Trimesters informativ. In diesen Fällen besaß der Fötus ein nichtmethyliertes Allel, das von dem nicht-methylierten Allel der Mutter verschieden war. Diese Ergebnisse implizierten, daß in diesen Fällen die Mutter das Ursprungs-Allel von ihrem Vater aufwies und dies an den Fötus weitergegeben hat. Von diesen 8 informativen Fällen wurde nur ein schwaches positives Signal in einer der Proben des dritten Trimesters nach direkter Sequenzierung beobachtet ([Fig. 4a](#), vergleiche Panel 1 und Panel 2).

[0052] Wir schlußfolgerten daraus, daß das schwache Signal in diesem einzelnen positiven Fall und die geringe Nachweisrate des nicht-methylierten fötalen Allels aus maternalem Plasma an der geringen Sensitivität des direkten Sequenzierungsverfahrens liegen kann. Um die Sensitivität des Nachweises zu verbessern, verwendeten wir einen sensitiveren Primer-Verlängerungstest, um das nicht-methylierte fötale Allel aus den MSP-Reaktionsprodukten nachzuweisen. Da der SNP ein A/G-Polymorphismus war, wurde ddATP als ein Reaktionssubstrat in dem Primer-Verlängerungstest verwendet. Die verlängerten Reaktionsprodukte der A- und G-Allele waren jeweils 27 und 30 nt lang. Kein fötal-spezifisches Reaktionsprodukt war in den entsprechenden maternalen Buffy-Coat-Proben vorhanden ([Fig. 4b, c](#); maternale BC). Überraschenderweise wurden fötal-spezifische Verlängerungsprodukte in zwei maternalen Plasmaproben des dritten Trimesters ([Fig. 4b](#), Pfeil) und einer des zweiten Trimesters ([Fig. 4c](#), Pfeil) beobachtet, was die Anwesenheit von nicht-methylierter fötaler DNA in maternalem Plasma anzeigt. Als Kontrollen war keiner der getesteten nicht-informativen Fälle in diesem Test positiv (n = 5, Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal die Brauchbarkeit der Verwendung von epigenetischen Markern, um eine fötal-abgeleitete maternal-vererbte DNA-Sequenz aus maternalem Plasma nachzuweisen.

Diskussion

[0053] Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verwendung von epigenetischen Markern die herkömmlichen Begrenzungen des Nachweises von fötaler DNA in maternalem Plasma überwindet. Es ist möglich, ein paternal-vererbtes fötales Allel nachzuweisen, das genetisch von einem maternalen Allel nicht unterscheidbar ist, aus dem Plasma der Mutter, durch die Verwendung von epigenetischen Unterschieden zwischen der Mutter und dem Fötus. Ähnlich ist es möglich, ein maternal-vererbtes fötales Allel aus maternalem Plasma nachzu-

weisen. Dieser neue epigenetische Ansatz wird daher das Repertoire von Erkrankungen erweitern, wobei fötale DNA im maternalen Plasma verwendet werden kann.

[0054] Auch bei der Verwendung von relativ insensitiven Verfahren, wie zum Beispiel der direkten Sequenzierung und der Primer-Verlängerung, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß es möglich ist, differentiell methylierte, fötale DNA-Sequenzen aus maternalem Plasma nachzuweisen. Es wurde eine geringere Sensitivität im Nachweis der nicht-methylierten fötalen DNA im maternalen Plasma gefunden (**Fig. 4**), verglichen mit den analogen Tests für das methylierte Allel (**Fig. 3**). Unter der Verwendung von sensitiveren Nachweissystemen, wie zum Beispiel der Allel-spezifischen PCR (Newton et al., *Nucleic Acids Res* 17:2503–2516 (1989)) und Real-Time Methylierungs-spezifischer PCR (Lo et al., *Cancer Res* 59:3899–3903 (1999); Eads et al., *Nucleic Acids Res* 28:E32 (2000)), könnte die Sensitivität von Plasma-basierter epigenetischer Analyse verbessert werden. Die Entwicklung von Real-Time Methylierungsspezifischer PCR ist besonders interessant, da sie die Möglichkeit der Quantifizierung von fötal-spezifischer Methylierung in maternalem Plasma eröffnet, wie bereits für den Nachweis von Tumor-DNA im Kreislauf erhalten wurde (Kawakami et al., *J Natl Cancer Inst* 92:1805–1811 (2000)).

[0055] Die mögliche Einführung von fötaler DNA in maternalem Plasma als ein Routine-prä-natales diagnostisches Tool hat Fragen in Hinblick auf den Bedarf eines generischen Markers für zirkulierende fötale DNA aufgeworfen (Lo et al., *Am J Hum Genet* 62:768–775 (1998); Avent et al., *Vox Sang* 78:155–162 (2000)). Die meisten Vorschläge für solch einen Marker haben sich bis jetzt auf die Verwendung von genetischen Polymorphismen zwischen der Mutter und dem Fötus beschränkt (Tang et al., *Clin Chem* 45:2033–2035 (1999); Pertl et al., *Hum Genet* 106:45–49 (2000)). Die vorliegende Demonstration der Brauchbarkeit von epigenetischen Markern für den fötalen DNA-Nachweis in maternalem Plasma eröffnet einen neuen Ansatz für die Entwicklung eines Geschlechts-unspezifischen und Polymorphismus-unspezifischen fötalen Markers in maternalem Plasma. Ein Weg, auf dem dies erreicht werden kann, ist es, das Phänomen der Gewebe-spezifischen Methylierung (Grunau et al., *Hum Mol Genet* 9:2651–2663 (2000)) zu nutzen. Da der Trophoblast als die vorherrschende Zellpopulation zur Freisetzung von fötaler DNA in maternales Plasma vorgeschlagen wurde, ermöglicht die Auffindung von Trophoblast-spezifischen Methylierungsmustern die Entwicklung eines generischen, epigenetischen, fötalen Markers in maternalem Plasma. Biologisch kann die Verwendung von Gewebe-spezifischen Methylierungsmarkern es einem auch ermöglichen, direkt die Frage zu adressieren, inwieweit fötale Zelltypen für die Freisetzung von fötaler DNA in maternales Plasma verantwortlich sind.

[0056] Die epigenetische Analyse von maternalem Plasma weist offensichtliche Anwendungen im Hinblick auf Erkrankungen auf, die mit genomischem Imprinting assoziiert sind, wie zum Beispiel das Prader-Willi-Syndrom (Pfeifer, *Lancet* 356:1819–1820 (2000)). Diese Strategie kann auch diagnostisches Potential für Erkrankungen wie zum Beispiel Präeklampsie aufweisen, wobei mit Imprinting versehene Gene als eine-Rolle-spielend angenommen wurden (Graves, *Reprod Fertil Dev* 10:23–29 (1998)).

[0057] Die mögliche Anwendung von fötaler DNA in maternalem Plasma zum prä-natalen Nachweis von fötalen chromosomalen Aneuploidien ist ein Thema, das seit der Entdeckung des Phänomens sehr diskutiert wurde (Lo et al., *Lancet* 350:485–487 (1997), Bianchi, *Am J Hum Genet* 62:763–764 (1998)). Die Auffindung von quantitativen Unterschieden zwischen den zirkulierenden fötalen DNA-Spiegeln in der Aneuploidie, verglichen mit euploiden Schwangerschaften (Lo et al., *Clin Chem* 45:1747–1751 (1999), Zhong et al., *Prenat Diagn* 20:795–798 (2000)) bietet ein Verfahren zur Abschätzung des Risikos von fötalen chromosomalen Aneuploidien aus maternalem Plasma. Die kürzliche Entdeckung von apoptotischen fötalen Zellen in maternalem Plasma („Plasma-abgeleitete Zellen“)(Van Wijk et al., *Clin Chem* 46:729–731 (2000)) bietet noch einen weiteren Ansatz zum Nachweis von Aneuploidie aus maternalem Plasma (Poon et al., *Lancet* 356:1819–1820 (2000)). Interessanterweise eröffnen die vorliegenden Daten noch einen weiteren potentiellen Ansatz zum Nachweis von fötalen chromosomalen Aneuploidien. Dies basiert auf der Beobachtung, daß aberrante DNA-Methylierungsmuster mit chromosomalen Aneuploidien assoziiert sein können (Kuromitsu et al., *Mol Cell Biol* 17:707–712 (1997); Yu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6862–6867 (1997)). Daher ist es möglich, epigenetische Marker zum Nachweis solcher aberranten, methylierten fötal-DNA-Sequenzen aus maternalem Plasma zu entwickeln. Solche Marker stellen eine Spezifität zur Verfügung, verglichen mit einer einfachen Quantifizierung von fötaler DNA in maternalem Plasma (Lo et al., *Clin Chem* 45:1747–1751 (1999); Zhong et al., *Prenat Diagn* 20:795–798 (2000)) und eine bessere Geeignetheit für eine Anwendung in großem Maßstab, verglichen zu Verfahren basierend auf „Plasma-abgeleiteten Zellen“ (Poon et al., *Lancet* 356:1819–1820 (2000)).

[0058] Fötale epigenetische Marker können auch in der Analyse von fötalen Zellen verwendet werden, die aus der zellulären Fraktion von maternalem Blut isoliert wurden. Dieses zieht die Vorteile aus kürzlichen Daten, die zeigen, daß eine Methylierungsanalyse in einer in-situ-Weise durchgeführt werden könnte (Nuovo et al.,

Proc Natl Acad Sci USA 96:12754–12759 (1999)).

[0059] Mit der kürzlichen Erkenntnis, daß föto-maternales „Trafficking“ ein bidirektionaler Prozeß ist (Lo et al., Blood 88:4390–4395 (1996); Maloney et al., J Clin Invest 104:41–47 (1999)), können epigenetische Marker auch dazu verwendet werden, um zellulären und DNA-Transfer von der Mutter zum Fötus zu untersuchen. Solch ein Ansatz kann auch Anwendungen bei der Untersuchung von anderen Typen von Chimerismen haben, wie zum Beispiel post-Transplantations-hämopoietischem Chimerismus (Starzl et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 6:292–298 (1997)) und urinärem DNA-Chimerismus (Zhong et al., Clin Chem 45:1741–1746 (1999)).

[0060] Mit unserem verbesserten Verständnis des menschlichen Genoms und der Entwicklung von Hochdurchsatz-Array-basierten Technologien für die Methylierungsanalyse (Van et al., Clin Cancer Res 6:1432–1438 (2000)) erwarten wir, daß die Zahl von brauchbaren fötalen epigenetischen Markern sich über die nächsten paar Jahre hinweg schnell erhöhen wird. Solch eine Entwicklung wird ein klinisch relevantes Panel von fötalen epigenetischen Markern zur Verfügung stellen, die auf eine synergetische Weise mit herkömmlichen genetischen Markern in maternalem Plasma verwendet werden können.

Sequenzprotokoll

<110> The Chinese University of Hong Kong
Lo, Yuk Ming Dennis
Poon, Lit Man

<120> Methods for Detecting DNA Originating From Different
Individuals

<130> C30755

<140> PCT/GB02/03941

<141> 2002-08-30

<150> US 09/944,951

<151> 2001-08-31

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:androgen
receptor gene methylated sequence
methylation-specific PCR (MSP) primer M-for

<400> 1

gcgagcgtag tatttttcgg c

21

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:androgen
receptor gene methylated sequence
methylation-specific PCR (MSP) primer M-rev

<400> 2

aaccaataa cctataaac ctctacg

27

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:androgen
receptor gene unmethylated sequence
methylation-specific PCR (MSP) primer U-for

<400> 3

gttgtgagtg tagtattttt tggg

24

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:androgen
 receptor gene unmethylated sequence
 methylation-specific PCR (MSP) primer U-rev

<400> 4
 caaataacct ataaaacctc taca 24

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single
 nucleotide polymorphism (SNP) within
 differentially methylated region (DMR) of human
 IGF2-H19 region amplification PCR forward primer

<400> 5
 ggacggaatt ggttgtagtt 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single
 nucleotide polymorphism (SNP) within
 differentially methylated region (DMR) of human
 IGF2-H19 region amplification PCR reverse primer

<400> 6
 aggcaattgt cagttcagta a 21

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single
 nucleotide polymorphism (SNP) site within
 differentially methylated region of human IGF2-H19
 region methylated allele methylation-specific PCR
 (MSP) forward primer M-for

<400> 7
 ttaattgggg ttcgttcg 18

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single
 nucleotide polymorphism (SNP) site within
 differentially methylated region of human IGF2-H19
 region methylated allele methylation-specific PCR
 (MSP) reverse primer M-rev

 <400> 8
 cccgacctaa aaatctaata cga 23

 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single
 nucleotide polymorphism (SNP) site within
 differentially methylated region of human IGF2-H19
 region unmethylated allele methylation-specific PCR
 (MSP) forward primer U-for

 <400> 9
 ggtttggttg tggaaatggt tt 22

 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:single
 nucleotide polymorphism (SNP) site within
 differentially methylated region of human IGF2-H19
 region unmethylated allele methylation-specific PCR
 (MSP) reverse primer U-rev

 <400> 10
 cccaacctaa aaatctaata caa 23

 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer
 extension assay Cys-5-labeled primer

 <400> 11
 gggttatttg ggaataggat attta 25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Unterscheidung von DNA-Spezies, die aus Zellen von verschiedenen Individuen abstam-

men, wobei die DNA-Spezies in einer biologischen Probe vorhanden sind, die von einem der Individuen erhalten wurde, wobei das Verfahren den Schritt von Nachweisen eines Methylierungsunterschieds zwischen den DNA-Spezies von den verschiedenen Individuen umfasst.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biologische Probe eine flüssige oder zelluläre Probe oder ein Gemisch davon ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biologische Probe Plasma oder Serum ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die biologische Probe Blut ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eines der Individuen eine schwangere Frau ist, und das andere Individuum ein ungeborener Fötus ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eines der Individuen ein Transplant-Empfänger ist, und das andere Individuum ein Organspender ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Transplantation eine Knochenmarkstransplantation ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend den Schritt von Messen der Konzentration der DNA-Spezies.

9. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend den Schritt von Hinzufügen von Natriumbisulfit zu der biologischen Probe oder zu der DNA-Spezies.

10. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend den Schritt von Durchführen einer Methylierungsspezifischen Polymerase-Kettenreaktion.

11. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend die Schritte von Amplifizieren der DNA-Spezies, um ein PCR Produkt zu erzeugen, und Sequenzieren des PCR Produkts.

12. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend den Schritt von Durchführen einer Primerverlängerung.

13. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die biologische Probe maternales Plasma oder Serum ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, weiter umfassend den Schritt von Messen der Konzentration an fötaler DNA in dem maternalen Plasma oder Serum.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Konzentration der gemessenen fötalen DNA verwendet wird, um eine Erkrankung vorherzusagen, zu überwachen oder zu diagnostizieren oder zu prognostizieren.

16. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Methylierungsunterschied mit einer fötalen oder maternalen Erkrankung assoziiert ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Erkrankung eine chromosomale Aneuploidie ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die chromosomale Aneuploidie Trisomie 21 (Down-Syndrom) ist.

19. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe von Präeklampsie, einer Imprinting-Erkrankung, Prader-Willi Syndrom und Angelman Syndrom.

20. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der in fötalen Zellen nachgewiesene Methylierungsunterschied als ein Fötus-spezifischer Marker verwendet wird.

21. Verfahren nach Anspruch 6, weiter umfassend den Schritt von Messen der Konzentration von Organspender- und Transplant-Empfänger-DNA.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die Konzentration an Organspender- und Transplant-Empfänger-DNA verwendet wird, um den klinische Fortschritt des Transplant-Empfängers vorherzusagen.

23. Verfahren nach Anspruch 1, wobei eines der Individuen männlich ist, und das andere Individuum ist weiblich.
24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei der Methylierungsunterschied auf einem inaktivierten X Chromosom der Frau nachgewiesen wird.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei eine methylierte DNA Sequenz auf dem inaktivierten X Chromosom verwendet wird, um DNA nachzuweisen, die von der Frau abstammt.
26. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Methylierungsunterschied innerhalb von Zellen analysiert wird.
27. Verfahren nach Anspruch 26, wobei der Methylierungsunterschied unter der Verwendung von in-situ Methylierungs-spezifischer Polymerase-Kettenreaktion analysiert wird.
28. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Methylierungsunterschied dazu verwendet wird, um Zellen von den Individuen zu sortieren oder zu isolieren oder dazu verwendet wird, um DNA von den Individuen zu reinigen.
29. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Methylierungsunterschied in fötalen Zellen in der Plazenta nachgewiesen wird.
30. Verwendung eines Kits zur Unterscheidung von DNA Spezies, die von Zellen aus verschiedenen Individuen abstammen, wobei die DNA-Spezies in einer biologischen Probe vorhanden sind, die von einem der Individuen erhalten wurde, wobei das Kit eines oder mehrere Reagenzien zur Ermittlung des Methylierungsstatus einer Spezies an DNA umfasst.
31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei das Reagenz zur Ermittlung des Methylierungsstatus Natriumbisulfit ist.
32. Verwendung nach Anspruch 30, weiter umfassend eines oder mehrere Reagenzien zum Nachweis der Anwesenheit von DNA.
33. Verwendung nach Anspruch 30, weiter umfassend eines oder mehrere Reagenzien zur Amplifikation von DNA, die in der biologischen Probe vorhanden ist.
34. Verwendung nach Anspruch 30, weiter umfassend eine oder mehrere Vorrichtungen zum Erhalten einer DNA Probe.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

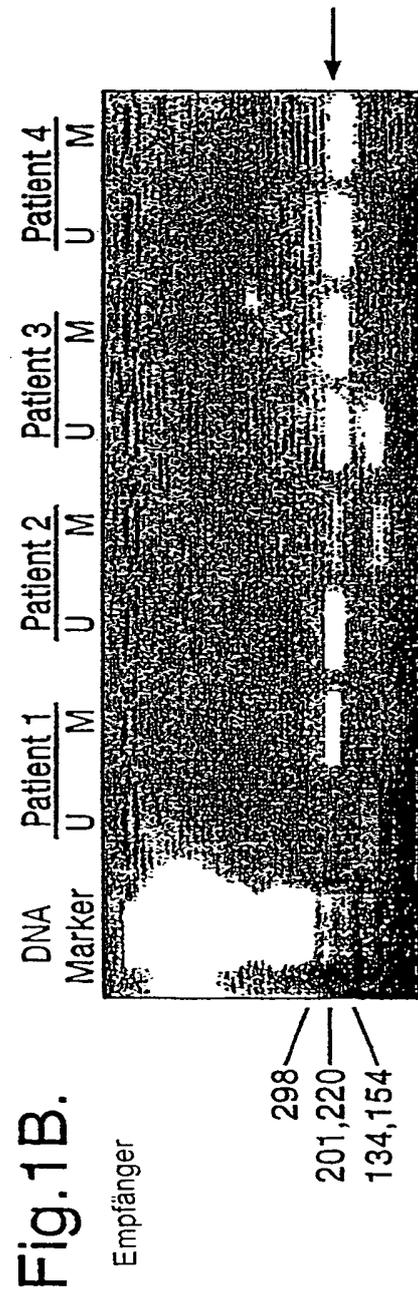
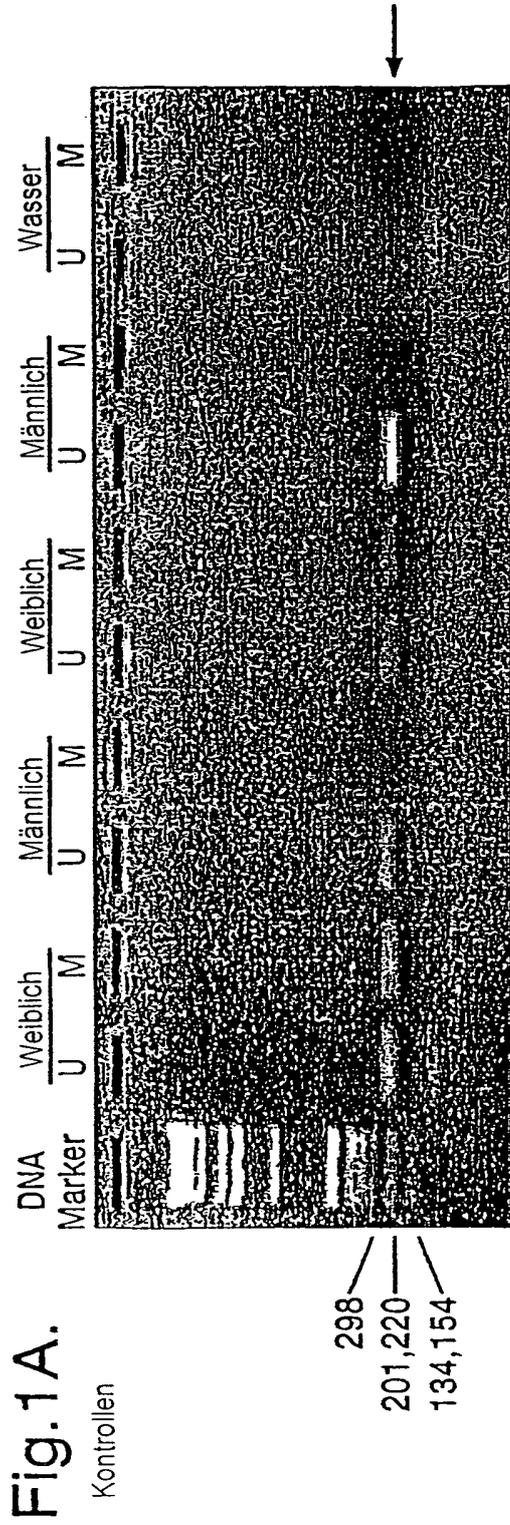
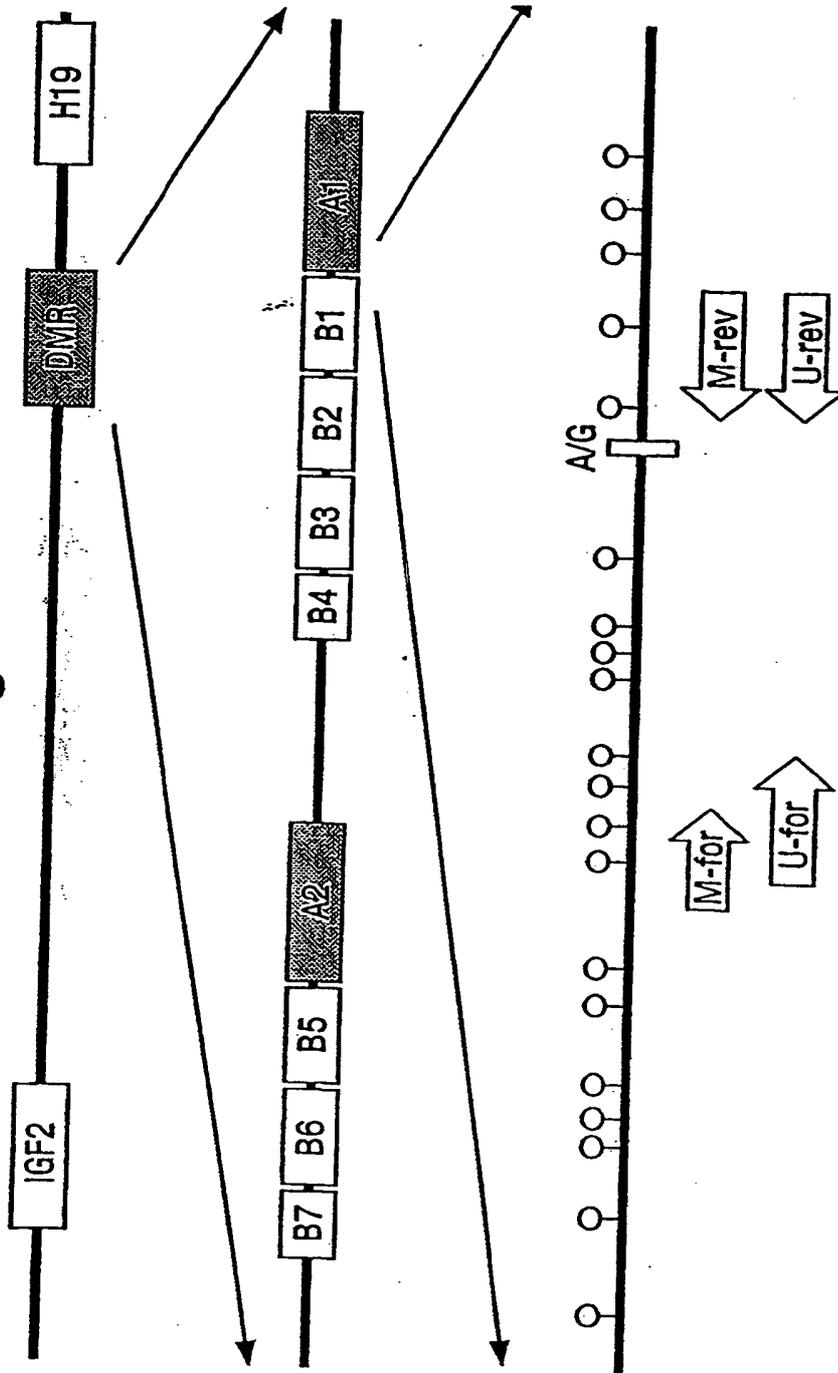


Fig.2.



M-for: 5' -TTAAATTGGGGTTGGTTGG-3'
M-rev: 5' -CCCGACCTAAAATCTAATACGA-3'
U-for: 5' -CGTTIGTTGTGGAAATGTTT-3'
U-rev: 5' -CCCAACCTAAAATCTAATACAA-3'

Fig.3A.

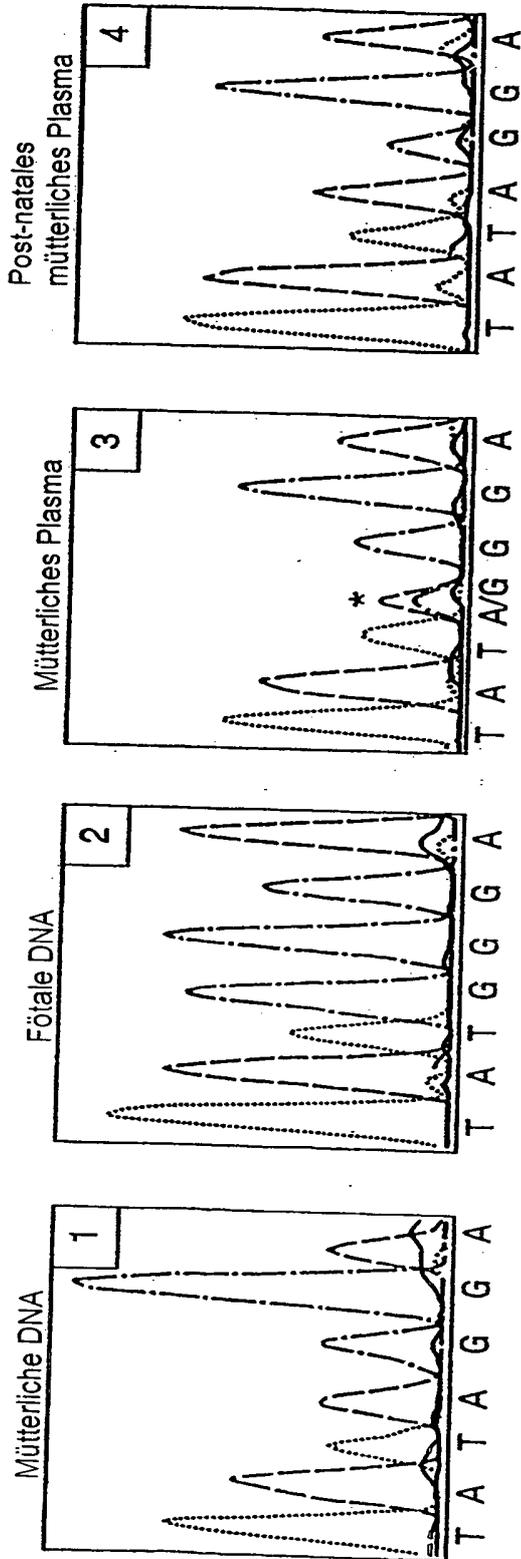


Fig.3B.

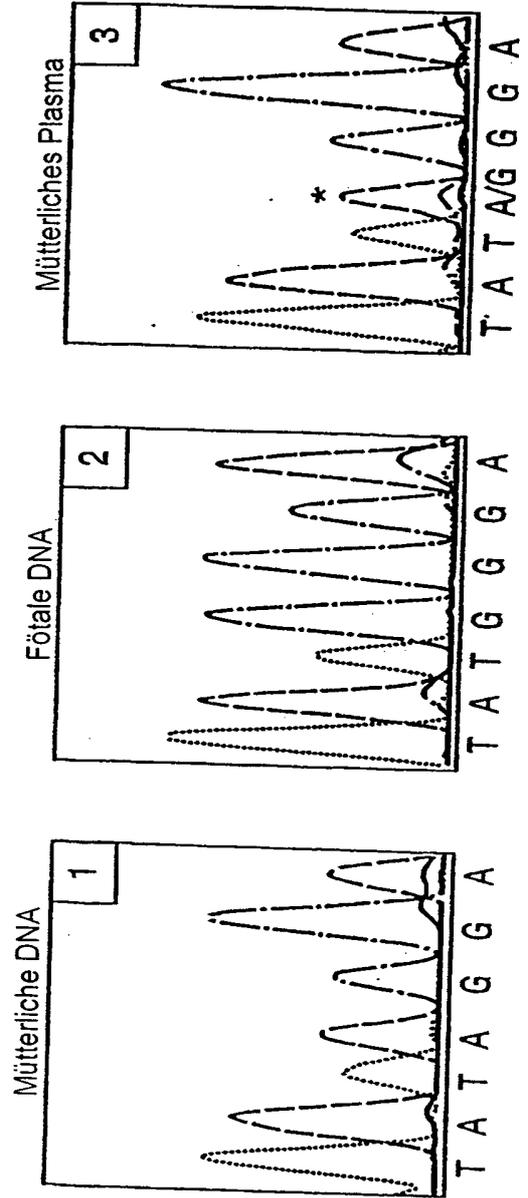


Fig.4A.

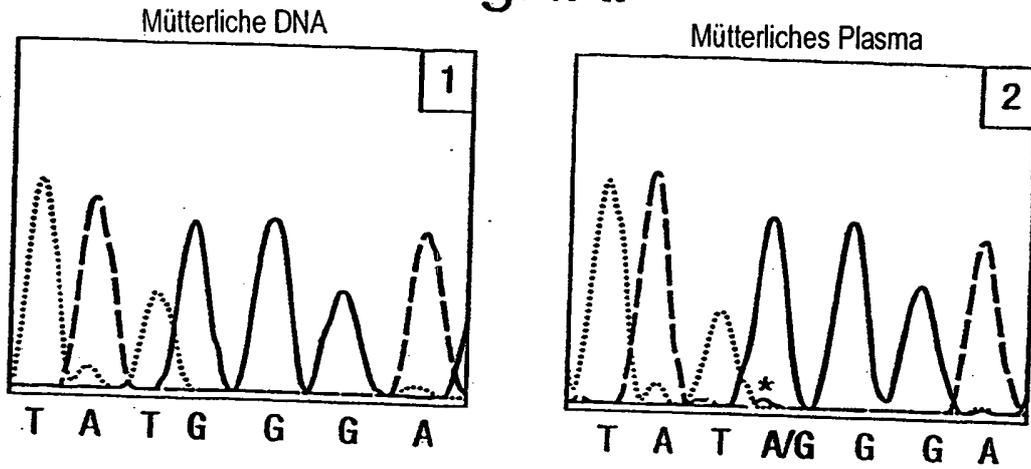


Fig.4b.

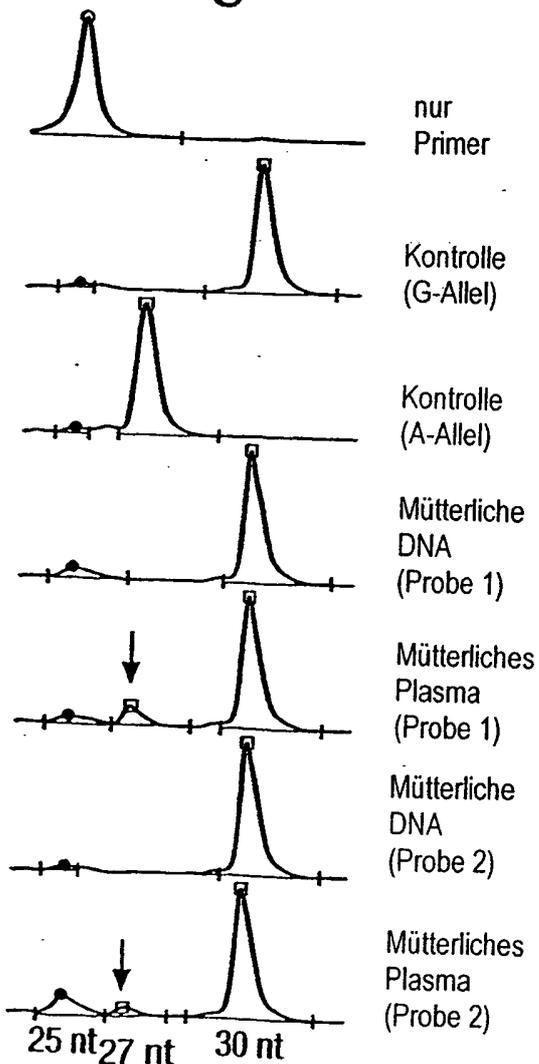


Fig.4c.

