



(10) **DE 10 2017 126 248 B4** 2019.10.17

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2017 126 248.2**
(22) Anmeldetag: **09.11.2017**
(43) Offenlegungstag: **09.05.2019**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **17.10.2019**

(51) Int Cl.: **C12Q 1/6881 (2018.01)**
C12Q 1/6883 (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Epiontis GmbH, 12489 Berlin, DE

(74) Vertreter:
**BOEHMERT & BOEHMERT Anwaltspartnerschaft
mbB - Patentanwälte Rechtsanwälte, 80336
München, DE**

(72) Erfinder:
Olek, Sven, Dr., 12207 Berlin, DE

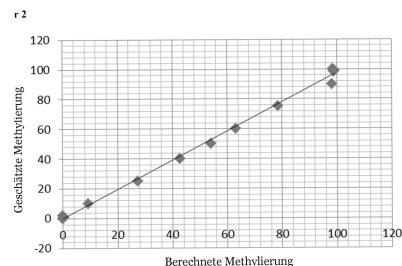
(56) Ermittelte Stand der Technik:

KIRBY, M.K. [u.a.]: Genome-wide DNA methylation measurements in prostate tissues uncovers novel prostate cancer diagnostic biomarkers and transcription factor binding patterns. BMC Cancer (elektronisch veröffentlicht 17.04.2017) 17 (1):273, Seiten 1-10

ZHANG, C. [u.a.]: Epigenetics in myeloid derived suppressor cells: a sheathed sword towards cancer. Oncotarget (2016) 7 (35):57452-57463

(54) Bezeichnung: **ERGIC1 als epigenetischer Marker zur Identifizierung von Immunzellen, insbesondere monozytischen myeloid-abgeleiteten Suppressor-Zellen (mMDSCs)**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Identifizierung von monozytischen Myeloid-abgeleiteten Suppressorzellen (mMDSCs) in einer von einem Säuger stammenden Probe, umfassend das Analysieren einer Modifikation, vorzugsweise des Methylierungsstatus, von mindestens einer CpG-Position in der Säuger-Genregion für Endoplasmatic Reticulum -Golgi Intermediate Compartment 1 (ERGIC1), wobei vorzugsweise die analysierte Genregion die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 umfasst, wobei eine Demethylierung oder fehlende Methylierung oder Modifikation in der Genregion für eine mMDSC im Vergleich zu einer nicht-mMDSC indikativ ist.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, insbesondere ein in vitro Verfahren, zur Identifizierung spezifischer Immunzellen, insbesondere von MDSCs, umfassend die Analyse einer Modifikation, vorzugsweise des Methylierungsstatus, von mindestens einer CpG-Position in der Säuger-Genregion für das Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment 1 (ERGIC1), wobei eine Demethylierung oder fehlende Methylierung oder Modifikation dieser Genregion für eine MDSC indikativ ist, wenn diese mit einer nicht-MDSC verglichen wird. Die Analysen gemäß der Erfindung können spezifische Subpopulationen von MDSCs, nämlich monozytische MDSCs (mMDSCs) auf epigenetischer Ebene identifizieren und sie von allen anderen Zellen in komplexen Proben, wie zum Beispiel anderen Blut- oder Immunzellen, unterscheiden. Zudem stellt die vorliegende Erfindung ein verbessertes Verfahren zur Quantifizierung von mMDSCs, insbesondere in komplexen Proben, zur Verfügung. Das Verfahren kann ohne einen Schritt der Aufreinigung und/oder Anreicherung der Zellen, vorzugsweise durch Verwendung von Vollblut und/oder nicht-trypsinisiertem Gewebe, durchgeführt werden.

[0002] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit zur Durchführung der oben genannten Verfahren sowie deren jeweilige Anwendungen. Es ist ein Ziel dieser Erfindung, ein neuartiges, robusteres Mittel zum quantitativen Nachweis und zur Messung von mMDSCs des Blutes in allen soliden Organen oder Geweben oder einer anderen Körperflüssigkeit eines Säugers bereitzustellen.

Hintergrund der Erfindung

[0003] MDSC (Myeloid-abgeleitete Suppressorzellen) sind eine heterogene Gruppe von Immunzellen aus der myeloischen Abstammungslinie, einer Familie von Zellen, die aus Stammzellen des Knochenmarks stammen. Bestimmte Subpopulationen von MDSCs, sogenannte mMDSCs, expandieren stark in pathologischen Situationen wie chronischen Entzündungen und Krebs, infolge einer veränderten Hämatopoese. MDSCs unterscheiden sich von anderen myeloischen Zelltypen insofern, dass sie eher starke immunsuppressive Aktivitäten als immunstimulierende Eigenschaften aufweisen. Ähnlich wie andere myeloische Zellen interagieren MDSCs mit anderen Immunzelltypen, einschließlich T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, um deren Funktionen zu regulieren. Obwohl ihre Wirkungsmechanismen noch nicht geklärt sind, deuten klinische und experimentelle Befunde daraufhin, dass Krebsgewebe mit hoher Infiltration von MDSCs mit schlechter Prognose für die Patienten und Therapieresistenz assoziiert sind.

[0004] Obwohl nahezu alle Zellen in einem Individuum das exakt gleiche Komplement des DNA-Codes enthalten, müssen höhere Organismen unterschiedliche Muster der Genexpression in den verschiedenen Gewebetypen aufweisen und aufrechterhalten. Die meisten Genregulationen sind vorübergehend, abhängig vom aktuellen Zustand der Zelle und Veränderungen der äußeren Reize. Persistente Regulation hingegen ist eine primäre Rolle der Epigenetik - vererbare Regulationsmuster, die die grundlegende genetische Codierung der DNA nicht verändern. Die DNA-Methylierung ist die archetypische Form der epigenetischen Regulation; sie dient als stabiles Gedächtnis für Zellen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der langfristigen Identität verschiedener Zelltypen. Kürzlich wurden andere Formen der epigenetischen Regulation entdeckt. Neben der „fünften Base“ 5-Methylcytosin (mC), finden sich eine sechste (5-Hydroxymethylcytosin, hmC), siebte (5-Formylcytosin, fC) und achte (5-Carboxycytosin, cC) (Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution *Science* 18 May 2012, Vol. 336 no. 6083 pp. 934-937).

[0005] Das primäre Ziel der genannten DNA-Modifikationen ist die Zwei-Nukleotidsequenz Cytosin-Guanin (eine ‚CpG Position‘); in diesem Zusammenhang kann Cytosin (C) einer einfachen chemischen Modifikation unterzogen werden, um formyliert, methyliert, hydroxymethyliert oder carboxyliert zu werden. Im menschlichen Genom ist die CG-Sequenz viel seltener als erwartet, außer in bestimmten, relativ dichten Clustern, den sogenannten ‚CpG-Inseln‘. CpG-Inseln sind häufig mit Gen-Promotern assoziiert, und es wird geschätzt, dass mehr als die Hälfte der menschlichen Gene CpG-Inseln aufweisen (Antequera und Bird, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11995-9, 1993).

[0006] Eine abweichende Methylierung der DNA ist häufig mit der Transformation von gesunden zu kanzergen Zellen verbunden. Zu den beobachteten Effekten gehören genomweite Hypomethylierung, erhöhte Methylierung von Tumorsuppressorgenen, und Hypomethylierung vieler Onkogene (zusammengefasst, zum Beispiel, von Jones und Laird, *Nature Genetics* 21:163-167, 1999; Esteller, *Oncogene* 21:5427-5440, 2002; und Laird, *Nature Reviews/Cancer* 3:253-266, 2003). Methylierungsprofile wurden als tumorspezifisch erkannt (d.h. Veränderungen im Methylierungsmuster bestimmter Gene oder sogar einzelner CpGs sind diagnostisch für

bestimmte Tumorarten), und es gibt jetzt eine umfassende Sammlung an diagnostischen Markern für Blut-, Brust-, Darm-, Speiseröhren-, Magen-, Leber-, Lunge-, und Prostata-Krebs (z.B. zusammengefasst von: Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003).

[0007] Für eine der kürzlich beschriebenen Modifikationen des Cytosins, 5-Hydroxymethylierung, wurde der Nutzen einer oxidativen Bisulfit-Sequenzierung zur Kartierung und Quantifizierung von 5hmC in den CpG-Inseln gezeigt (Michael J. Booth et al. Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18 May 2012, Vol. 336 no. 6083 pp. 934-937). Hohe Konzentrationen von 5hmC wurden in CpG-Inseln in Verbindung mit Transkriptionsregulatoren und in langgestreckten Kernelementen gefunden. Es wird vermutet, dass sich diese Regionen epigenetischer Reprogrammierung in embryonalen Stammzellen unterziehen können.

[0008] US 2016-0237493 beschreibt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Identifizierung von Biomarkern und insbesondere zur Identifizierung von Biomarkern zur Verwendung bei der Erstellung klinischer Gutachten, wie z.B. Frühdiagnose, Diagnose, Krankheitsstadium, Krankheitsschwere, Krankheitsuntertyp, Reaktion auf Therapie oder prognostische Gutachten. In einem bestimmten Beispiel werden die Techniken angewendet, um die Beurteilung von Patienten zu ermöglichen, die unter SIRS (Systemisches Entzündungssyndrom) leiden, bei denen ein Verdacht auf SIRS besteht oder bei denen klinische Symptome von SIRS vorliegen, wobei diese entweder infektions-negative SIRS oder infektions-positive SIRS andeuten können. EPIC1 wird als ein IRS-Biomarker-Gen erwähnt.

[0009] WO 2012/162660 beschreibt Verfahren unter Verwendung von DNA-Methylierungsassays zur Identifizierung einer Zelle oder eines Zellgemisches und zur Quantifizierung von Veränderungen in der Verteilung der Zellen im Blut oder in Geweben sowie zur Diagnose, Prognose und Behandlung von Krankheiten, insbesondere Krebs. Diese Verfahren verwenden frische und archivierte Proben.

[0010] Vor diesem Hintergrund ist es Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes und vor allem robusteres Verfahren basierend auf der DNA-Methylierungsanalyse als überlegenes Werkzeug bereitzustellen, um spezifische Immunzellen, insbesondere bestimmte Subpopulationen von MDSCs, komfortabler und zuverlässiger nachzuweisen, zu identifizieren, zu unterscheiden und zu quantifizieren.

[0011] Die vorliegende Erfindung löst das oben genannte Problem durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Identifizierung von bestimmten Myeloid-abgeleiteten Suppressor-Zellen (MDSCs) in einer von einem Säuger abstammenden Probe, umfassend das Analysieren einer Modifikation, vorzugsweise des Methylierungsstatus von mindestens einer CpG-Position in einer Säuger-Genregion für Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment 1 (ERGIC1), wobei vorzugsweise die analysierte Genregion eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 ist, und wobei eine Demethylierung oder fehlende Methylierung oder Modifikation dieser Genregion für eine monozytische MDSC indikativ ist, wenn diese mit einer nicht-monozytischen MDSC verglichen wird.

[0012] Das vorliegende Verfahren ist im Stande, monozytische Myeloid-abgeleitete Suppressor-Zellen (mMDSC) zu identifizieren, die ein wichtiger Bestandteil des immunosuppressiven Milieus sind. In Mäusen exprimieren monozytische MDSCs hohe Konzentrationen des Ly6C-Oberflächenmarkers mit geringer oder keiner Expression des Ly6G-Markers, während eine andere Gruppe, die sogenannten granulozytischen MDSCs, Ly6C und in hohen Konzentrationen Ly6G exprimiert. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung sind humane mMDSCs definiert als CD15⁻ CD14⁺ CD33⁺ CD11b⁺ HLADR⁺. Granulozytische, humane MDSCs sind CD15⁺. Eine dritte Fraktion scheint CD15⁺ CD14⁺ zu sein, und somit erkennt die vorliegende Erfindung nicht-CD15-MDSCs.

[0013] Das Gen für humanes ERGIC1 findet sich auf Ensembl. Ensembl-ID: ENSG00000113719.

[0014] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfasst die Genregion alle genomischen Regionen, die sich auf ERGIC1 beziehen und dafür kodieren. Dazu gehören Enhancer-Regionen, Promoter-Region(en), Introns, Exons und nicht-kodierende Regionen (5'- und/oder 3'-Regionen), die zu ERGIC1 gehören. Bevorzugt ist also ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung, wobei die mindestens eine CpG-Position in der 5'-Region stromaufwärts vom Transkriptionsstart, der Promoterregion, den 5'- oder 3'-nicht-translatierten Regionen, Exon, Intron, Exon/Intron-Grenzen und/oder in der 3'-Region stromabwärts vom Transkriptionsstopp des analysierten Gens vorhanden ist. Der Säuger ist vorzugsweise eine Maus, Ziege, Hund, Schwein, Katze, Kuh, Ratte, Affe oder Mensch. Bei Bedarf können die Proben entsprechend gepoolt werden.

[0015] Die vorliegende Erfindung basiert weiterhin auf der überraschenden Identifizierung einer Region des ERGIC1-Gens durch die Erfinder als spezifischer epigenetischer Marker, der die Identifizierung von MDSCs, ebenso wie die klinische Routineanwendung dieser Analyse erlaubt.

[0016] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ermöglicht die genomische Region von ERGIC1, insbesondere gemäß SEQ ID Nr. 1 die Identifizierung von MDSCs. Überraschenderweise ist das unterscheidende Muster der Bisulfit-konvertierbaren und nicht-konvertierbaren Cytosine für MDSCs besonders und sogar ausschließlich auf die genomische Region gemäß SEQ ID Nr. 1 beschränkt, wie durch Verwendung des Amplikons gemäß SEQ ID Nr. 1, und insbesondere der Bisulfit-konvertierten Sequenz gemäß der SEQ ID Nr. 2 oder 3 gezeigt wird.

[0017] Die Erfinder konnten zeigen, dass in MDSCs die CpG-Motive wie offenbart nahezu vollständig demethyliert sind (d.h. zu mehr als 70%, vorzugsweise 80%, vorzugsweise mehr als 90% und am meisten bevorzugt mehr als 95%), wobei die gleichen Motive in allen anderen Immunzellen vollständig methyliert sind.

[0018] Die differentielle Methylierung der CpG-Motive innerhalb der zuvor genannten Regionen ist ein wertvolles Werkzeug zur Identifizierung von MDSCs, wie es benötigt wird/oder zumindest wertvoll ist zur Identifizierung und Quantifizierung dieser Zellen bei Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen, Krebs, Allergien, primären und sekundären Immundefekten, wie z.B. HIV-Infektionen und AIDS, Graft versus Host (GvH), hämatologischen Malignomen, rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, oder einem zytotoxischen T-Zell-abhängigen Immunstatus in jedem vorstellbaren diagnostischem Zusammenhang. Der Assay ermöglicht die Messung von MDSCs ohne Aufreinigung oder Färbeverfahren.

[0019] Ein weiterer bevorzugter Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst dann weiterhin eine Quantifizierung der relativen Menge an MDSCs, basierend auf dem Vergleich der relativen Menge der Methylierungsfrequenz in der analysierten Region mit der relativen Menge der Methylierungsfrequenz in einem Kontrollgen, wie z.B. GAPDH. Diese Quantifizierung wird somit auf der Grundlage des Verhältnisses der Bisulfit-konvertierbaren DNA zur nicht-konvertierbaren DNA in der genetischen Region von ERGIC1 (z.B. von SEQ ID Nr. 1), wie hierin beschrieben und analysiert, erreicht. Weiter bevorzugt ist eine Quantifizierung der relativen Menge an mMDSCs, basierend auf einer (vorzugsweise parallelen oder gleichzeitigen) Analyse der relativen Menge an Bisulfit-konvertierbarer DNA der zellspezifischen Region für ERGIC1 und der relativen Menge an Bisulfit-konvertierbarer DNA der nicht-zellspezifischen Gene (vorzugsweise ausgewählte „Kontrollgene“ oder „Kontrollregionen“, wie z.B. das Gen für GAPDH).

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst die Analyse der Bisulfit-Konvertibilität die Amplifikation mit mindestens einem Primer passender Primerpaare, die basierend auf SEQ ID Nr. 1 geeignet gestaltet werden können, vorzugsweise Oligomere gemäß einer der SEQ ID Nrn. 4 bis 11.

[0021] Im Gegensatz zu FACS- und mRNA-Messungen können durch Anwendung des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung die Messung(en) und Analysen unabhängig von der Aufreinigung, Lagerung - und bis zu einem gewissen Grad auch in Bezug auf die Gewebequalität - durchgeführt werden.

[0022] Vorzugsweise erfolgt die Amplifikation durch ein Polymerase-Enzym, eine PCR oder eine chemische Amplifikationsreaktion oder andere Amplifikationsverfahren, die dem Fachmann wie unten beschrieben bekannt sind, d.h. im Rahmen von MSP, HeavyMethyl, Scorpion, MS-SNUPE, MethylLight, Bisulfit-Sequenzierung, methylspezifische Restriktionsassays und/oder digitale PCR (siehe, zum Beispiel Kristensen und Hansen PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment *Clinical Chemistry* 55:8 1471-1483 (2009)).

[0023] Mit der Amplifikation wird ein Amplikon der ERGIC1-Genregion erzeugt, das ein besonders bevorzugtes „Werkzeug“ zur Durchführung des/der Verfahren(s) gemäß der vorliegenden Erfindung ist. Folglich stellen Oligomere gemäß einer der SEQ ID Nrn. 4 bis 11 oder ein amplifiziertes Amplikon unter Verwendung eines Primerpaares basierend auf SEQ ID Nr. 4 und 5, 6 und 7, oder 9 und 10, wie hierin erwähnt, eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar. So können die SEQ ID Nrn. 1 bis 3 (und, sofern benötigt, die dazu komplementäre Sequenzen) verwendet werden, um Primer für die Amplifikation zu gestalten, d.h. in der relevanten Sequenz als „beacons“ dienen. Gleichermaßen können zusätzliche Primer und Sonden basierend auf dem Amplikon gemäß SEQ ID Nr. 1 aufgebaut werden. Die Amplifikation kann entweder in der genomischen und/oder der Bisulfit- (d.h. „konvertierten“) DNA-Sequenz erfolgen.

[0024] Der Fachmann wird darüber hinaus in der Lage sein, spezifische Untergruppen der CpG-Positionen auszuwählen, um so die Anzahl der zu analysierenden Stellen zu minimieren, beispielsweise mindestens eine der CpG-Positionen, die aus einer CpG-Position in einem Amplikon gemäß SEQ ID Nr. 1 ausgewählt ist, und vorzugsweise aus den CpG-Positionen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, und 15 im Amplikon 2505 gemäß der SEQ ID Nr. 1. Die Positionen werden ab dem 5'-Ende eines generierten und analysierten Amplikons numerisch gezählt und werden in **Fig. 1** als AMP2505:37, 56, 62, 71, 121, 170, 227, 234, 247, 264, 271, 389 und 421 bezeichnet. Bevorzugt werden Kombinationen aus 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, oder 10 Positionen, deren Analyse ausreichend Daten und/oder Informationen liefert, um im Kontext der vorliegenden Erfindung aussagekräftig zu sein.

[0025] Der Fachmann wird darüber hinaus in der Lage sein, spezifische Untergruppen der CpG-Positionen auszuwählen, um die Anzahl der zu analysierenden Stellen zu minimieren, beispielsweise mindestens eine der CpG-Positionen 62 im Amplikon Nr. 2505 der ERGIC1-spezifischen Bisulfit-konvertierbaren Region (SEQ ID Nr. 1) oder alle in den Bisulfit-konvertierbaren Region gemäß SEQ ID Nr. 1 vorhandenen Positionen. Eine oder mehrere der Positionen 234 und/oder 37 können ausgeschlossen werden.

[0026] Um die Bisulfit-Konvertibilität der CpG-Positionen zu analysieren, kann jedes bekannte Verfahren zur Analyse der DNA-Methylierung verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst die Analyse des Methylierungsstatus ein Verfahren ausgewählt aus Methylierungs-spezifischem enzymatischem Verdau, Bisulfit-Sequenzierung, einer Analyse ausgewählt aus Promotermethylierung, CpG-Insel-Methylierung, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE oder anderen Methoden, die auf dem Nachweis amplifizierter DNA beruhen. Diese Verfahren sind dem Fachmann gut bekannt und finden sich in der entsprechenden Literatur.

[0027] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Verfahren für Routineanwendungen, beispielsweise auf einem DNA-Chip, geeignet. Basierend auf den obigen Informationen und der entsprechenden Literatur kann der Fachmann das obere Verfahren wie oben beschrieben an diese Einstellungen anpassen.

[0028] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung wird dieses Verfahren ohne einen Aufreinigungs- und/oder Anreicherungsschritt der zu identifizierenden Zellen durchgeführt, vorzugsweise durch Verwendung von Vollblut und/oder nicht-trypsiniertem Gewebe.

[0029] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung, umfasst die Identifizierung eine Unterscheidung der MDSCs von allen wesentlichen peripheren Blutzelltypen und/oder nicht-Blutzellen, vorzugsweise, aber nicht ausschließlich, CD19+ B-Zellen; CD8+ zytotoxischen T-Zellen; CD 15+ Granulozyten; verschiedenen MDSC-Fraktionen, einschließlich der nur-CD14+, CD14+CD 124+, CD14+HLADR- und CD14CD15 zweifach positiven Zellen; CD56+NK-Zellen; und CD4+ T-Helfer-Zellen.

[0030] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung, wird die Probe aus einer Körperflüssigkeit eines Säugers, einschließlich vom Säuger abstammender Blutproben, oder einem Gewebe, Organ oder einer Probe von Leukozyten oder einer aufgereinigten oder separierten Fraktion eines solchen Gewebes, Organs oder Leukozyten oder einer Zelltypprobe, ausgewählt. Die Proben können bei Bedarf entsprechend gepoolt werden.

[0031] Ein anderer bevorzugter Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst dann weiter den Schritt des Schlussfolgerns auf den Immunstatus des Säugers, basierend auf den MDSCs. Die MDSCs können quantifiziert werden und als Richtwert zur relativen Quantifizierung weiterer detaillierter Unterpopulationen verwendet werden oder sie können als prädiktiver und/oder Screening und/oder diagnostischer und/oder prognostischer und/oder unerwünschter Ereignisfaktor verwendet werden, oder sie können verwendet werden, um diese Population schließlich zur Bestimmung des gesamten Immunaktivierungsstatus nachzuweisen.

[0032] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung leidet der Säuger oder leidet wahrscheinlich an Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßungen, Infektionskrankheiten, Krebs und/oder Allergien, wie unter anderem an Trypanosoma Cruzi-Infektion, Malaria und HIV-Infektion, hämatologischen Malignomen, wie chronischer myeloischer Leukämie, Multiplem Myelom, Non-Hodgkin-Lymphom, Hodgkin-Krankheit, chronischer lymphatischer Leukämie, Graft versus Host- und Host versus Graft-Krankheit, Mycosis fungoides, extranodalem T-Zell-Lymphom, kutanen T-Zell-Lymphom, anaplastischem Großzell-Lymphom, angioimmunoblastischem T-Zell-Lymphom und anderen T-Zell-, B-Zell- und NK-Zell-Neoplasien, T-Zell-Mangel, wie unter anderem Lymphozytopenie, schwerer kombinierter Immundefizienz

(SCID), Omenn-Syndrom, Knorpel-Haar-Hypoplasie, erworbenem Immundefizienz-Syndrom (AIDS) und Erbkrankheiten, wie DiGeorge-Syndrom (DGS), Chromosomenbruchsyndrom (CBS), Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus Erythematoses, Sjögren-Syndrom, systemische Sklerose, Dermatomyositis, primäre biliäre Zirrhose, primäre sklerosierende Cholangitis, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Psoriasis, Vitiligo, bullösem Pemphigoid, Alopecia Areata, idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie, Typ 1 Diabetes mellitus, Morbus Basedow, Hashimoto-Thyreoiditis, Myasthenia gravis, IgA-Nephropathie, membranöser Nephropathie und perniziöser Anämie; und B-Zell- und T-Zell-Kombinationsstörungen wie Ataxie-Telangiektasien (AT) und Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS); und Karzinomen, wie unter anderem Brustkrebs, Darmkrebs, Magenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Leberzellkarzinom, Cholangiokarzinom, Melanom sowie Kopf- und Halskrebs.

[0033] Ein weiterer bevorzugter Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren wie oben, das weiterhin die Messung und/oder Überwachung der Menge an mMDSCs als Reaktion auf chemische und/oder biologische Substanzen, die dem Säuger verabreicht werden, d.h. als Reaktion auf eine Behandlung des Patienten, umfasst. Das Verfahren umfasst die Schritte wie oben und den Vergleich der relativen Menge der identifizierten Zellen mit einer früher oder gleichzeitig genommenen Probe von demselben Säuger und/oder mit einer Kontrollprobe. Basierend auf den Ergebnissen, wie erhalten durch die/das Verfahren der Erfindung, kann der behandelnde Arzt auf den Immunstatus des Patienten schließen und eine Behandlung der zugrunde liegenden Erkrankung anpassen.

[0034] Vorzugsweise wird das Verfahren ohne einen Schritt der Aufreinigung und/oder Anreicherung von Zellen durchgeführt, vorzugsweise durch Verwendung von Vollblut und/oder nicht-trypsinisiertem Gewebe oder jeder anderen biologischen Probe, die potentiell die mMDSCs enthält, wie z.B. einer Probe für den Zelltransfer in einen Patienten.

[0035] Ein weiterer bevorzugter Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren wie oben, das weiterhin die Formulierung der identifizierten mMDSCs für die Transplantation in einen Patienten umfasst. Pharmazeutische Präparate für diese Zwecke und Verfahren zu ihrer Herstellung werden nach den bekannten Verfahren in der Transplantationsmedizin durchgeführt.

[0036] Ein weiterer bevorzugter Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung betrifft ein Oligomer gemäß einer der SEQ ID Nrn. 4 bis 11, oder ein Amplikon gemäß SEQ ID Nrn. 1 bis 3.

[0037] Noch ein weiterer bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Kit zur Identifizierung, Quantifizierung, und/oder Überwachung von MDSCs in einem Säuger, basierend auf der Analyse der Bisulfit-Zugänglichkeit von CpG-Positionen in der Genregion von ERGIC1, umfassend Komponenten zur Durchführung eines Verfahrens gemäß nach einem der Ansprüche 1 bis 12, insbesondere ein Kit umfassend a) ein Bisulfitreagenz und b) Materialien zur Analyse des Methylierungsstatus der CpG-Positionen ausgewählt aus den CpG-Positionen in der Region gemäß SEQ ID Nr. 1, wie etwa ein Oligomer ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ ID Nrn. 4 bis 11.

[0038] Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Verwendung von Oligomeren oder Amplikons, oder eines Kits gemäß der vorliegenden Erfindung, zur Identifizierung und/oder Überwachung der MDSCs in einem Säuger, wie hier beschrieben.

[0039] Wie bereits erwähnt wurden kürzlich drei neue Cytosin-Modifikationen entdeckt. Deshalb wird erwartet, dass zukünftige wissenschaftliche Erkenntnisse epigenetische Modifikationsmuster korrigieren, die in der Vergangenheit beschrieben wurden. Diese bisherigen Muster der Cytosin-Modifikationen umfassen Bisulfit-konvertierbares (nicht-methyliertes, nicht-modifiziertes) und nichtkonvertierbares (methyliertes, modifiziertes) Cytosin. Beide Termini müssen, wie beschrieben, korrigiert werden. Nach den neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen (i) umfasst nichtkonvertierbares Cytosin 5-Methylcytosin (mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (hmC), und (ii) Bisulfit-konvertierbares (d.h. die „Bisulfit-Konvertibilität“) Cytosin 5-Formylcytosin (fC), 5-Carboxycytosin (cC), ebenso wie nicht-modifiziertes Cytosin.

[0040] Zusätzlich basieren die bisherigen Erfindungen auf i) dem Verhältnis von Bisulfit-konvertierbarem Cytosin zur gesamten Chromatinmenge (Zelltyp-unabhängig, 100 % Bisulfit-konvertierbarer DNA-Lokus) oder ii) auf dem Verhältnis von Bisulfit-konvertierbarem Cytosin (fC, cC, nicht-modifizierte Cytosine) zu nicht-Bisulfit konvertierbarem Cytosin (hmC und mC). Diese Verhältnisse charakterisieren Zelltyp, Zelldifferenzierung, Zellstadium sowie pathologische Zellstadien. Daher werden neue Techniken zu neuartigen spezifischeren Ergebnisse führen und könnten aktuelle zellspezifische, Zellstadium-spezifische sowie pathologische Muster epige-

netischer Modifikationen ergänzen und somit potenzielle neue Biomarker definieren. Es können neue Verhältnisse, die als Biomarker bestimmt werden sollen, definiert werden als:

Biomarker Verhältnis = a/b

$a = \sum (C \text{ und/oder } mC \text{ und/oder } hmC \text{ und/oder } fC \text{ und/oder } cC)$

$b = \sum (C \text{ und/oder } mC \text{ und/oder } hmC \text{ und/oder } fC \text{ und/oder } cC),$

wobei a und b sich durch eine von bis zu vier Arten von Modifikationen voneinander unterscheiden. Die Auf-
findung neuer DNA-Modifikationen wird diese Aufzählung erweitern.

[0041] Für den Zweck der Definition für die vorliegende Anwendung beziehen sich „epigenetische Modifikationen“ in der DNA-Sequenz durch die Terminologie auf (i) Bisulfit-konvertierbares Cytosin (5-Formylcytosin, (fC) und/oder 5-Carboxycytosin (cC)) und (ii) nicht-Bisulfit-konvertierbares Cytosin ((einschließlich 5-Methylcytosin (mC), 5-Hydroxymethylcytosin, (hmC)). Da beide Methylierungsarten, mC und hmC, nicht Bisulfit-konvertierbar sind, ist es nicht möglich, zwischen diesen beiden zu unterscheiden. Ebenso sind fC, cC und nicht-modifiziertes Cytosin Bisulfit-konvertierbar und können auch nicht voneinander unterschieden werden. Die Bezeichnung „methylierte“ DNA umfasst sowohl mC als auch hmC. Die Bezeichnung „nicht-methylierte“ DNA umfasst fC, cC, und nicht-modifizierte DNA. Es wird erwartet, dass in Zukunft neue Varianten von DNA-Modifikationen entdeckt werden. Jede Art der Modifikation wird entweder Bisulfit-konvertierbar sein oder nicht. Da die vorliegende Erfindung jedoch zuverlässig zwischen den beiden Gruppen unterscheidet, werden diese neuartigen Modifikationen auch als Marker einsetzbar sein.

[0042] Darüber hinaus werden neben den DNA-Modifikationen auch Histone post-translational modifiziert, die die Interaktion mit der DNA und nuklearen Proteinen verändern. Zu den Modifikationen gehören Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Citrullinierung und ADP-Ribosylierung. Der Kern der Histone H2A, H2B und H3 kann ebenfalls modifiziert werden. Histon-Modifikationen sind an verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Genregulation, DNA-Reparatur, Chromosomenkondensation (Mitose) und Spermatogenese (Meiose) beteiligt. Auch für diese Modifikationen ist ein spezifisches Modifikationsmuster spezifisch für verschiedene Zelltypen, Zellstadien, Differenzierungsstatus und ein solches Muster kann analysiert werden für Bisulfit-Konvertibilität oder ähnliche Verfahren, um bestimmte Zellen und Zellstadien zu identifizieren. Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Verwendung dieser Modifikationen.

[0043] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erfinder unter Verwendung der genetischen Region ER-GIC1 und insbesondere des hier beschriebenen Amplikons als Marker sehr spezifisch MDSCs und in ihrem Verhältnis zu anderen Zelltypen in einer Probe, zum Beispiel zu anderen Blutzellen, identifiziert, quantifiziert und insbesondere unterschieden haben.

[0044] Die Erfindung wird nun in den folgenden Beispielen und unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren und das Sequenzprotokoll näher beschrieben, ohne darauf beschränkt zu sein. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden alle hier zitierten Referenzen in ihrer Gesamtheit aufgenommen.

Fig. 1 zeigt die Analyse der CpG-Positionen auf den Amplikons Nrn. 2505 (SEQ ID Nr. 1) gemäß der Erfindung. Die horizontalen Kästchen in der Tabelle entsprechen den CpG-Positionen im analysierten Amplikon (z.B. CpG 2, 3, 4, ... etc.) mit den angegebenen Positionen (**37, 56, 62, 71, 121, 170, 227, 234, 247, 264, 271, 389, und 421** entsprechend zu CpG 2, 3, ...etc.) und die Spalten entsprechen den analysierten Zelltypen. Positionen **1 (24)**, und **15 (431)**, die außerdem analysiert wurden, sind nicht aufgeführt. Die vertikalen Kästchen (Spalten) entsprechen den analysierten Zellfraktionen.

Fig. 2 zeigt die Ergebnisse bezüglich der Linearität und Spezifität des TpG-spezifischen PCR-Systems gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0045] SEQ ID Nr. 1 repräsentiert die genomische Sequenz des Amplikons AMP2505 gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0046] SEQ ID Nr. 2 repräsentiert die Bisulfit-konvertierte (**b2F**), zuvor modifizierte (**CpG**) Sequenz mit umwandlungsresistenten CpG-Resten.

[0047] SEQ ID Nr. 3 repräsentiert die Bisulfit-konvertierte (**b2F**), zuvor modifizierte (**TpG**) Sequenz mit keinen umwandlungsresistenten CpG-Resten.

[0048] SEQ ID Nrn. 4 bis 11 zeigen Oligomere (Primer und Sonden), die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

BEISPIELE

Beispiel 1

[0049] Um die gewünschte mMDSC-Subpopulation zu identifizieren, wurde eine qPCR an Bisulfit-konvertierten Proben aus der humanen Genomregion gemäß der Sequenz AMP2505, SEQ ID Nr.1, durchgeführt. Relevante CpGs sind fett dargestellt und unterstrichen.

GAGGGAAATGAGTAGGTGAACAAACCGAGTGAGTTTTTCGCCTCACTCCCTGGCACTCGGC
 ACCCGAGGGCTCCGACAGGCTGGTGGCCAGGGCTGACCAGCCAGAGTTTCATCTAAAAGC
 CTCGATGGCTATTTTTGGGACAAATGACCCACCACTTCCAATGACTTGCTCCGAAATGGC
 ATCTAATTTTCATTAAGCCTTGGAACAGTGACATCACAAGTGCCTGCCCGGTAGCCCGCCC
 ACATATGGCGAACCACAGAGTGATCCGAGATTCGTCTGCAAGAACAGGGGAGAATAA
 GGTCCCAAGCAGCAAAAGTTAAAATAGCAAAGCTGAGGCATTCTGCTATGAAAAGAAAT
 TACAGATGAAATCCATTAGTCAGACATTTCCAGCGGCAGTTTCCTTGCTTGGGAGCAGGG
 GAAGACCGTGTTTATTCGGGGTTGGGCTCTGCAGCCATTCC

[0050] SEQ ID Nr. 2 repräsentiert die Bisulfit-konvertierte (**b2F**), zuvor modifizierte (**CpG**) Sequenz mit umwandlungsresistenten CpG-Resten. Relevante CpGs sind fett dargestellt und unterstrichen.

AAAAAATAAATAAATAAACAACAACGAATAAATTTTTCGCCTCACTCCCTAACACTCGAC
 ACCGAAAACTCCGACAACTAATAACCAAACTAACCAACCAAAATTTTCATCTAAAAAC
 CTCGATAACTATTTTTAAAACAAATAACCCACCACTTCCAATAACTTACTCCGAAATAAC
 ATCTAATTTTCATTAACCTTAAAAACAATAACATCACAATACCTACCCGATAACCCGCCC
 ACATATAACGAACCACAAAATAATCCGAAATTCGTCTACAAAAACAAAAAAACTAA
 AATCCCAAACAACAAAATTAATAAACAACAACTAAACATTCTACTATAAAAAAAAT
 TACAAATAAAATCCATTAATCAAACATTTCCAACCGACAATTTTCCTTACTTAAAAACAAAA
 AAAACGTATTTATTCGAAATTAACTCTACAACCATTCC

[0051] SEQ ID Nr. 3 repräsentiert die Bisulfit-konvertierte (**b2F**), zuvor modifizierte (**TpG**) Sequenz mit keinen umwandlungsresistenten CpG-Resten. Relevante Positionen sind fett dargestellt und unterstrichen.

AAAAAATAAATAAATAAACAACACAAATAAATTTTTCACCTCACTCCCTAACACTCAAC
 ACCCAAAAACTCCCAACAACTAATAACCAAACTAACCAACCAAAATTTTCATCTAAAAAC
 CTCAATAACTATTTTTAAAACAAATAACCCACCACTTCCAATAACTTACTCCCAAAATAAC
 ATCTAATTTTCATTAACCTTAAAAACAATAACATCACAATACCTACCCCATAACCCACCC
 ACATATAACAAACCACAAAATAATCCCAAAATTCATCTACAAAAACAAAAAAACTAA
 ATCCCAAACAACAAAATTAATAAACAACAACTAAACATTCTACTATAAAAAAAAT
 ACAATAAAATCCATTAATCAAACATTTCCAACCAACAATTTTCCTTACTTAAAAACAAAA
 AAAACATATTTATTCAAAATTAACTCTACAACCATTCC

[0052] Für das tatsächliche epigenetische Profiling der Amplikon-Region in Blutzellsubtypen waren die analysierten Immunzellsubpopulationen wie folgt (siehe Fig. 1)

1. Als Target-Population: CD15- CD14+ CD33+ CD11b+, HLADR+
2. CD19+ B Zellen; CD8+ zytotoxische T Zellen; CD15+ Granulozyten; verschiedene MDSC Fraktionen, inklusive nur die CD14+, CD14+CD124+, CD14+HLADR-, CD14CD15 zweifach positiv; CD56+NK Zellen; und CD4+ T-Helfer-Zellen.

[0053] Die folgenden Primer und Sonden wurden für die qPCR (TpG Variante; demethyl-spezifisch; CpG Variante; methyl-spezifisch) verwendet:

Vorwärts-Amplifizierungsprimer	2505-fwd	GAGGGAATGAGTAGGTGAATAA (SEQ ID Nr. 4)
Rückwärts-Amplifizierungsprimer	2505-rev	AAAATAACTACAAAACCCAACC (SEQ ID Nr. 5)
Vorwärts-Primer TpG-spezifisch	2505_TpG-fwd	CCCTAACACTCAACACCA (SEQ ID Nr. 6)
Rückwärts- Primer TpG-spezifisch	2505_TpG-rev	GGGTTATTTGTTTTAAAAATAGTTATTG (SEQ ID Nr. 7)
Sonde TpG-spezifisch	2505_TpG-pro	TGGTTATTAGTTTGTGGAGTTTTTGGT (SEQ ID Nr. 8)
Vorwärts-Primer CpG-spezifisch	2505_CpG-fwd	CCCTAACACTCGACACCG (SEQ ID Nr. 9)
Rückwärts- Primer CpG-spezifisch	2505_CpG-rev	GGGTTATTTGTTTTAAAAATAGTTATC (SEQ ID Nr. 10)
Sonde CpG-spezifisch	2505_CpG-pro	TTTTGGTTATTAGTTTGTCTGGAGTTTTCTGG (SEQ ID Nr. 11)

[0054] Die Linearität und Spezifität des TpG-spezifischen PCR-Systems wurde unter Verwendung von Test-Templates (Plasmid-DNA) gezeigt, die entweder CpG- oder TpG-Varianten der in silico konvertierten Sequenzen enthielten. Die entsprechenden Werte zwischen den tatsächlich gemessenen qPCR-Ergebnissen (berechnete Methylierung) verglichen mit den vorbereiteten Verdünnungen (geschätzte Methylierung) sind in **Fig. 2** gezeigt. Die Zelltypspezifität (wie durch qPCR gemessen) war wie folgt:

Immunzelltyp	qPCR-Detektion [%]
Gewünschte MDSC-Subpopulation	68.5
CD8+ T-Zellen	0.9
CD56+ NK-Zellen	0.1
B-Zellen	0.1
CD14+ Monozyten	0.1
CD4+ T-Zellen	0.5
CD15+ Granulozyten	0.1

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO ST.25. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMaregister aufgerufen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung von monozytischen Myeloid-abgeleiteten Suppressorzellen (mMDSCs) in einer von einem Säuger stammenden Probe, umfassend das Analysieren einer Modifikation, vorzugsweise des Methylierungsstatus, von mindestens einer CpG-Position in der Säuger-Genregion für Endoplasmatic Reticulum -Golgi Intermediate Compartment 1 (ERGIC1), wobei vorzugsweise die analysierte Genregion die Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 umfasst, wobei eine Demethylierung oder fehlende Methylierung oder Modifikation in der Genregion für eine mMDSC im Vergleich zu einer nicht-mMDSC indikativ ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine CpG Position in der 5'-Position stromaufwärts vom Transkriptionsstarts, der Promoterregion, der 5'- oder 3'-nicht-translatierten Regionen, Exon, Intron, Exon/Intron Grenze und/oder in der 3'-Region stromabwärts vom Transkriptionsstopps der analysierten Genregion vorliegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die mindestens eine CpG-Position ausgewählt ist aus einer CpG, ausgewählt aus den CpG-Positionen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und 15 im Amplikon gemäß SEQ ID Nr. 1 und vorzugsweise ausgewählt aus den CpG-Positionen 3, 4, 5, 6, 7, 8, und 9 in einem Fragment des Amplikons Nr. 2505 oder in einem Fragment der Bisulfit-konvertierten Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 oder 3.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Analyse der Bisulfit-Konvertibilität ein Verfahren ausgewählt aus Methylierungs-spezifischen enzymatischen Verdau, Bisulfitsequenzierung, einer Analyse ausgewählt aus Promotermethylierung, CpG-Insel-Methylierung, MSP, HeavyMethyl, MethyLight, Ms-SNuPE, und anderen Verfahren, die auf dem Nachweis amplifizierter DNA beruhen, umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, weiter umfassend eine Quantifizierung der relativen Menge an mMDSCs, basierend auf dem Vergleich der relativen Mengen der Methylierungsfrequenz in der analysierten Region, mit der relativen Mengen der Methylierungsfrequenz in einem Kontrollgen, wie beispielsweise GAPDH.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Probe aus einer Körperflüssigkeit eines Säugers, einschließlich menschlicher Blutproben, oder einer Blutprobe aus einem Gewebe, Organ, Knochenmark oder Zelltyp-Blutprobe, einer Probe von Blutlymphozyten oder einer Fraktion davon ausgewählt ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, weiter umfassend ein Unterscheiden der mMDSC von allen oder von mindestens einem der Zelltypen, ausgewählt aus CD19+ B-Zellen; CD8+ zytotoxischen T-Zellen; CD 15+ Granulozyten; verschiedenen MDSC-Fraktionen, einschließlich nur-CD14+, CD14+CD124+, CD14+HL-ADR- und CD14CD15 zweifach positive Zellen; CD56+NK-Zellen; und CD4+ T-Helfer-Zellen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Verfahren ohne einen Schritt der Aufreinigung und/oder zur Anreicherung der zu identifizierenden Zellen durchgeführt wird, vorzugsweise unter Verwendung von Vollblut und/oder nicht-trypsinisiertem Gewebe.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, weiter umfassend den Schritt des Schlussfolgerns auf den Immunstatus des Säugers, basierend auf den identifizierten mMDSCs.

10. Verfahren zur Überwachung der Menge an mMDSCs in einem Säuger, umfassend die Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 5 bis 9 und weiterhin den Vergleich der relativen Menge der identifizierten Zellen mit einer früher oder gleichzeitig entnommenen Probe desselben Säugers und/oder mit einer Kontrollprobe.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, weiter umfassend die Messung und/oder die Überwachung der Menge der mMDSCs als Reaktion auf chemische und/oder biologische Substanzen, die dem Säuger verabreicht werden.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Säuger an Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen, Infektionskrankheiten, Krebs und/oder Allergie leidet oder wahrscheinlich daran leidet.

13. Kit zur Identifizierung, Quantifizierung und/oder Überwachung von mMDSCs in einem Säuger, basierend auf der Analyse der Bisulfit-Zugänglichkeit der CpG-Positionen in der Genregion von Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment 1 (ERGIC1), umfassend die Komponenten zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12, insbesondere ein Kit umfassend a) ein Bisulfitreagenz, und b) Materialien zur Analyse des Methylierungsstatus der CpG-Positionen ausgewählt aus den CpG-Positionen in der Region gemäß SEQ ID Nr: 1, wie beispielsweise ein Oligomer ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ ID Nrn: 4 bis 11.

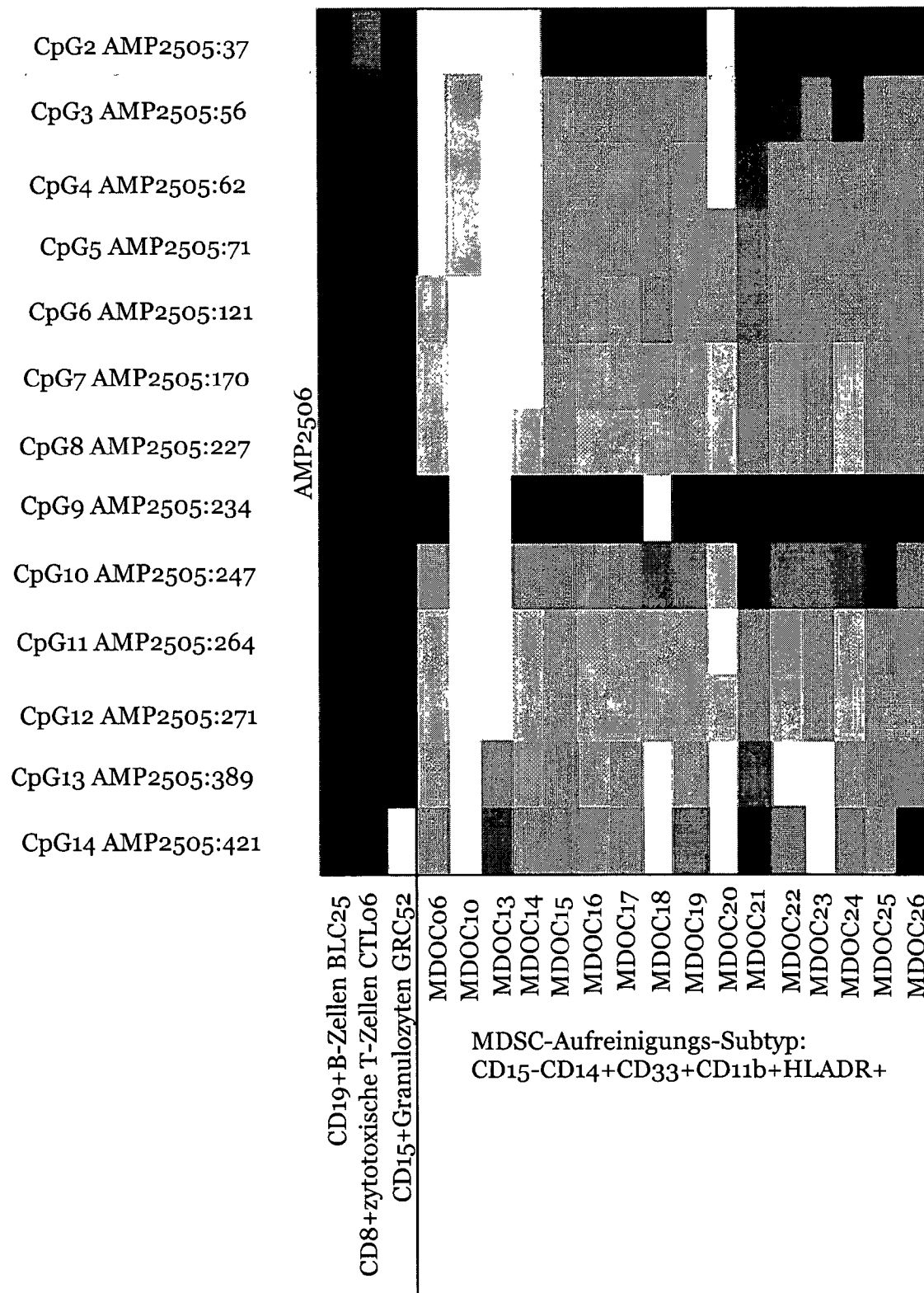
14. Ein Oligomer gemäß einer der SEQ ID Nrn. 4 bis 11, oder des Amplikons gemäß SEQ ID Nrn. 1 bis 3.

15. Verwendung des Kits nach Anspruch 13, oder des Oligomers oder Amplikons nach Anspruch 14 zur Identifizierung, Quantifizierung und/oder Überwachung von mMDSCs in einem Säuger.

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen

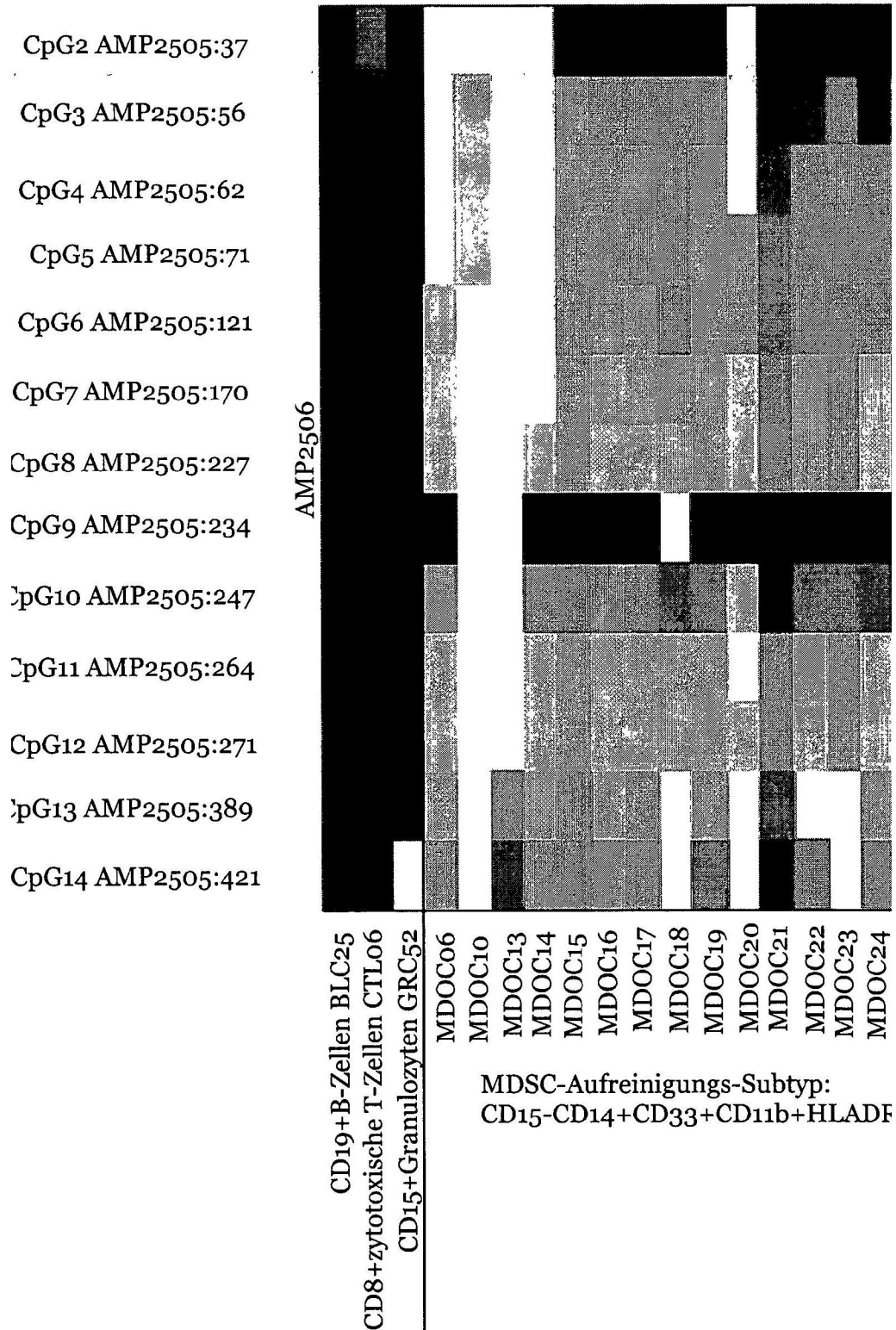
Anhängende Zeichnungen

Figur 1 a



31867DE

Figur 1 a



Figur 2

