

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500038

(P2005-500038A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 25/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/02	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-507556 (P2003-507556)	(71) 出願人	503467908 ヤンゼン、ブルクハルト
(86) (22) 出願日	平成14年6月20日 (2002.6.20)		オーストリア共和国、アー-1080 ヴ イーン、ラウドンガッセ 69/39
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月19日 (2003.12.19)	(71) 出願人	503467919
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/006820		ルーカス、トレヴォー
(87) 国際公開番号	W02003/001212		オーストリア共和国、アー-1160 ヴ イーン、キルヒシュテットナーガッセ 3 /9
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)	(74) 代理人	100065226 弁理士 朝日奈 宗太
(31) 優先権主張番号	60/299,765	(74) 代理人	100098257 弁理士 佐木 啓二
(32) 優先日	平成13年6月22日 (2001.6.22)	(74) 代理人	100117112 弁理士 秋山 文男
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多発性硬化症のヒトの診断方法

(57) 【要約】

多発性硬化症 (MS) または MS を発症する危険性のあるヒトの診断方法が記載される。この方法は、以下の工程、多発性硬化症 (MS) または MS を発症する危険性のあるヒト由来の体液または組織の試料を提供する工程であって、該試料が、MS または MS となる危険性のないヒトから採取された場合に野生型 SCF - アポトーシス応答遺伝子 - (wt - SARG - 1 -) タンパク質および wt - SARG - 1 をコードする核酸のうち少なくとも 1 つを含む工程、該試料中の、wt - SARG - 1 - タンパク質または wt - SARG - 1 をコードする核酸の存在を検出する工程、ならびに wt - SARG - 1 - タンパク質または wt - SARG - 1 をコードする核酸が該試料中に存在しない場合、MS または MS となる危険性があると診断する工程を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

多発性硬化症（MS）またはMSを発症する危険性のあるヒトの診断方法であって、該方法が、以下の工程、

多発性硬化症（MS）またはMSを発症する危険性のあるヒト由来の体液または組織の試料を提供する工程であって、該試料が、MSまたはMSとなる危険性のないヒトから採取された場合に野生型SCF-アポトーシス応答遺伝子-（wt-SARG-1-）タンパク質およびwt-SARG-1をコードする核酸のうち少なくとも1つを含む工程、
該試料中の、wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸の存在を検出する工程、ならびに

10

wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸が該試料中に存在しない場合、MSまたはMSとなる危険性があると診断する工程、
を包含する方法。

【請求項2】

前記試料が、ヒトの血液、血漿、血清、リンパ液、神経細胞を含む組織、脳脊髄液、腫瘍組織、骨髄、神経組織、皮膚、髪、涙、羊水穿刺材料を含む胎児材料、子宮組織、唾液、糞便または精子に由来する請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記試料中の、wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸の存在を検出する工程が、さらにSARG-1またはSARG-1-タンパク質の非wt形態の存在の検出を含む請求項1または2記載の方法。

20

【請求項4】

SARG-1の非wt形態が、それぞれ、1つの核酸残基またはアミノ酸残基においてwt-SARG-1またはwt-SARG-1-タンパク質とは異なる請求項3記載の方法。

【請求項5】

wt-SARG-1をコードする核酸が、核酸増幅法、一本鎖構造多型（SSCP）分析、制限分析、マイクロアレイ技術、プロテオミクスなどからなる群から選択される方法によって検出される請求項1、2、3または4記載の方法。

【請求項6】

前記核酸増幅法が、ポリメラーゼ連鎖反応法である請求項5記載の方法。

30

【請求項7】

前記wt-SARG-1-タンパク質が、wt-SARG-1-タンパク質抗体、とくにモノクローナル抗体を用いて検出される請求項1、2、3、4、5または6記載の方法。

【請求項8】

前記wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸の存在を検出する工程が、スクリーニング試験において行われる請求項1、2、3、4、5、6または7記載の方法。

【請求項9】

癌または癌となる危険性のあるヒトを診断する方法であって、該方法が、以下の工程
癌または癌となる危険性のあるヒト由来の体液または組織の試料を提供する工程であって、該試料が、癌または癌となる危険性のないヒトから採取された場合に野生型SCF-アポトーシス応答遺伝子-（wt-SARG-1-）タンパク質およびwt-SARG-1をコードする核酸のうち少なくとも1つを含む工程、
該試料中の、wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸の存在を検出する工程、ならびに

40

wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸が該試料中に存在しない場合、癌または癌となる危険性があると診断する工程、
を包含する方法。

【請求項10】

50

前記試料が、ヒトの血液、血漿、血清、リンパ液、神経細胞を含む組織、脳脊髄液、腫瘍組織、骨髄、神経組織、皮膚、髪、涙、羊水穿刺材料を含む胎児材料、子宮組織、唾液、糞便または精子に由来する請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記試料中の、w t - S A R G - 1 - タンパク質または w t - S A R G - 1 をコードする核酸の存在を検出する工程が、さらに S A R G - 1 または S A R G - 1 - タンパク質の非 w t 形態の存在の検出を含む請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】

S A R G - 1 の非 w t 形態が、それぞれ、1 つの核酸残基またはアミノ酸残基において w t - S A R G - 1 または w t - S A R G - 1 - タンパク質とは異なる請求項 11 記載の方法。 10

【請求項 13】

w t - S A R G - 1 をコードする核酸が、核酸増幅法、ポリメラーゼ連鎖反応法、一本鎖構造多型 (S S C P) 分析、制限分析、マイクロアレイ技術またはプロテオミクスからなる群から選択される方法によって検出される請求項 9、10、11 または 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記 w t - S A R G - 1 - タンパク質が、w t - S A R G - 1 - タンパク質抗体、とくにモノクローナル抗体を用いて検出される請求項 9、10、11、12 または 13 記載の方法。 20

【請求項 15】

前記 w t - S A R G - 1 - タンパク質または w t - S A R G - 1 をコードする核酸の存在を検出する工程が、スクリーニング試験において行われる請求項 9、10、11、12、13 または 14 記載の方法。

【請求項 16】

配列番号 1 の配列を含む核酸分子。

【請求項 17】

配列番号 1 の配列を含む核酸分子であって、該核酸分子において 1 つの核酸残基が、異なる核酸分子に変更され、好ましくは、該変更により異なる S A R G - 1 - タンパク質アミノ酸配列を生じる核酸分子。 30

【請求項 18】

前記変更が、配列番号 1 の 67 位での T から C への変更、配列番号 1 の 74 位での A から G への変更、配列番号 1 の 89 位での A から G への変更、配列番号 1 の 289 位での C から T への変更および配列番号 1 の 359 位での C から T への変更から選択される請求項 17 記載の核酸分子。

【請求項 19】

コード領域に欠失を含み、該欠失が、好ましくは 3 核酸残基長である請求項 16 記載の核酸分子。

【請求項 20】

配列番号 1 およびその変異形態から選択される核酸フラグメントを含む請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 記載の方法を行うための核酸プローブであって、該フラグメントが、12 以上、好ましくは 15 以上、とくに 20 以上の核酸残基の長さを有する核酸プローブ。 40

【請求項 21】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 22】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ポリペプチドにおいて 1 つのアミノ酸残基が、変更または欠失されているポリペプチド。

【請求項 23】

前記変更が、P h e 23 から L e u 23 への変更、A s p 25 から G l y 25 への変更 50

、 G l u 3 0 から G l y 3 0 への変更、 H i s 9 7 から T y r 9 7 への変更および S e r 1 2 0 から P h e 1 2 0 への変更から選択される請求項 2 2 記載のポリペプチド。

【請求項 2 4】

抗体調製物の作製方法であって、該方法が、配列番号 2 のアミノ酸配列またはその変異形態を含むポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを動物に投与する工程、該動物に該ポリペプチドに対する抗体を産生させる工程、該動物由来の抗体を含有する体液または組織を抽出する工程、および該ポリペプチドに対する抗体調製物を該体液または組織から調製する工程を包含する方法。

【請求項 2 5】

抗体調製物の作製方法であって、該方法が、配列番号 2 のアミノ酸配列またはその変異形態を含むポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを動物に投与する工程、該動物に該ポリペプチドに対する抗体を産生させる工程、該動物の脾臓を採取する工程、該脾臓と適切なハイブリドーマ生成細胞との融合細胞を調製する工程、該ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する工程、該ハイブリドーマ細胞をクローニングおよび培養し、それによってモノクローナル抗体を発現する工程、ならびに該モノクローナル抗体を調製する工程を包含する方法。

10

【請求項 2 6】

w t - S A R G - 1 - タンパク質または w t - S A R G - 1 をコードする核酸の存在を検出する手段を含む、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 記載の方法を行うためのキット。

20

【請求項 2 7】

前記手段が、抗 w t - S A R G - 1 タンパク質抗体、w t - S A R G - 1 に選択的に結合する核酸プローブ、w t - S A R G - 1 に選択的な領域を規定する核酸プライマー、該核酸プローブもしくは該核酸プライマーを含むチップまたはタンパク質が S A R G - 1 に結合するアッセイから選択される請求項 2 6 記載のキット。

【請求項 2 8】

前記タンパク質が S A R G - 1 に結合するアッセイが、変異特異的抗体を含む抗体またはペプチドを用いるアッセイ、E L I S A、ウエスタンブロッティングアッセイ、フローサイトメトリーアッセイおよび共焦点顕微鏡を含む免疫組織化学技術を使用するアッセイから選択される請求項 2 7 記載のキット。

30

【請求項 2 9】

変異または欠失した S A R G - 1 を含む非ヒト遺伝子組換え動物であって、該変異または欠失した S A R G - 1 が、組換え核酸技術によって該動物のゲノムに導入され、かつそこに安定に組み込まれている遺伝子組換え動物。

【請求項 3 0】

前記導入が、前記動物の胚幹細胞において行われている請求項 2 9 記載の非ヒト遺伝子組換え動物。

【請求項 3 1】

前記動物がマウスである請求項 3 0 記載の非ヒト遺伝子組換え動物。

【請求項 3 2】

S A R G - 1 または S A R G - 1 変異体の活性を調節するための S A R G - 1 結合タンパク質の使用。

40

【請求項 3 3】

S A R G - 1 結合タンパク質の活性を調節するための S A R G - 1 またはそのフラグメントの使用。

【請求項 3 4】

多発性硬化症の治療または予防用医薬を調製するための S A R G - 1 結合タンパク質の使用。

【請求項 3 5】

多発性硬化症の治療または予防用医薬を調製するための S A R G - 1 またはそのフラグメ

50

ントの使用。

【請求項36】

癌、好ましくは、骨髄増殖症候群、多血症、脊髄形成異常症および骨髄性白血病、とくに急性骨髄性白血病の治療または予防用医薬を調製するためのSARG-1結合タンパク質の使用。

【請求項37】

癌、好ましくは、骨髄増殖症候群、多血症、脊髄形成異常症および骨髄性白血病、とくに急性骨髄性白血病の治療または予防用医薬を調製するためのSARG-1またはそのフラグメントの使用。

【請求項38】

前記SARG-1結合タンパク質が、タンパク質-O-マンノシルトランスフェラーゼ1 (POMT1)、微小管結合タンパク質1A (MAP1A)、ATPase、Na⁺/K⁺トランスポーティング1ポリペプチド(ATP1B1)、SWI/SNF複合体60kDaサブユニット(BAF60c)、-アクチニン2、エキソン16、rabGDP解離インヒビター(GDI1)およびプロテオソーム26Sサブユニット、ATPase3 (PSMC3)からなる群から選択されることを特徴とする請求項32、33、34および36記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多発性硬化症(MS)またはMSを発症する危険性のあるヒトの診断方法に関する。さらに、本発明は、癌または癌となる危険性のあるヒトの診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症(MS)は、北ヨーロッパのカフカス人の最大0.1%の人口が冒される末梢神経系(CNS)の一般的な脱髄疾患であり、そして未同定の末梢神経組織の抗原に対して指向される自己免疫症候群であると考えられている。MS発症に対する感受性の決定は複雑であり、そして環境的な因子および遺伝的な因子(およそ20%の患者が、1人以上の罹患した親族を有している(Chataway et al, 1998))の両方に左右される(Ebers et al, 1995; Sawcer and Goodfellow, 1998; Sadovnick et al, 2000)。多原発生疾患(polygenetic disease)であると考えられているが、MSに関連する遺伝子を単離するために、候補遺伝子アプローチが取られている(Weinshenker and Kantarci, 2000)。カフカス人のハプロタイプDRB*1501-DQA1*0102-DQB1*0602(Haines et al, 1998)およびプロテインチロシンホスファターゼレセプタータイプC(protein tyrosine phosphatase receptor-type C)における点突然変異(Jacobsen et al, 2000)との関連性が、同様の症例に関連する。最近、MSにおけるT細胞排除、ならびに神経および希突起膠細胞の損傷の両方において、アポトーシスの重要性が認識されている(reviewed in Zipp, 2000)。

【0003】

しかし、MSの少なくとも一部の症例において家族性遺伝的継承が明らかであるが、今日まで明らかなマーカーは報告されていない。単なるMSの認識、または危険の関連性の提供でさえも、治療または予防的措置の早期開始に非常に有益である。

【0004】

したがって、本発明の目的は、MSに対する明らかな徴候、および明らかな相関性を与える、MSのための有効な診断系を提供することである。

【発明の開示】

【0005】

したがって、本発明の内容は、多発性硬化症(MS)またはMSを発症する危険性のあるヒトの診断方法であって、該方法は、以下の工程によって特徴付けられる：

多発性硬化症(MS)またはMSを発症する危険性のあるヒト由来の体液または組織の試

10

20

30

40

50

料を提供する工程であって、該試料が、MSまたはMSとなる危険性のないヒトから採取された場合に野生型SCF-アポトーシス応答遺伝子1-(SCF Apoptosis-Response Gene1-)(wt-SARG-1-)タンパク質およびwt-SARG-1をコードする核酸のうち少なくとも1つを含む工程、

該試料中の、wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸の存在を検出する工程、ならびに

wt-SARG-1-タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸が該試料中に存在しない場合、MSまたはMSとなる危険性があると診断する工程。

【0006】

驚くべきことに、SARG-1タンパク質は、MSの非常に特異的なマーカーであることが判明した。変異SARG-1タンパク質を有するヒトか、またはSARG-1における変異のためにいかなるSARG-1タンパク質も発現しないヒトは、MSの明らかに高い危険性を有する。SARG-1タンパク質の免疫組織化学的局在性に対する研究によると、このタンパク質はCNSの灰白質または白質に局在することを示した。アポトーシス誘導におけるSARG-1の役割は、家族性MSの場合、SARG-1の変異状態を解析するために、候補遺伝子アプローチを進展させるものである。実際、20人の非関連性の家族性MS患者由来のDNAが、SARG-1座のPCR増幅およびDNA配列決定によって調査され、そして、健常な対照由来のSARG-1配列と比較された。全ての対照試料は、野生型SARG-1ゲノム配列を示すが、MS患者由来のDNAにおいては、20中6のDNA試料のみが、PCRによって増幅可能であったことが見出された。すなわち、20中14は、いかなる検出可能なSARG-1シグナルをも示さなかった。ほかの6人の患者のうち4人において、遺伝的な変更が見られた。ヌクレオチド67位でのT-Cの点突然変異は、アミノ酸23位でのフェニルアラニンのロイシンへの置換を生じる(アミノ酸およびヌクレオチドの番号は、図4~8による)。ヌクレオチド359位でのC-Tの点突然変異は、アミノ酸120位でのセリンのフェニルアラニンへの置換を生じる(図16)。ヌクレオチド89位でのA-Gの点突然変異は、アミノ酸30位でのグルタミン酸のグリシンへの置換を生じる(図17)。アミノ酸116と121との間のコドンの欠失は、セリン残基の消失を生じる(図18)。20以上の対照DNA試料の配列決定では、野生型配列のみを示した。

【0007】

驚くべきことに、野生型のSARG-1またはSARG-1タンパク質における変化がいくつかの癌細胞においても見られることが観察された。30以上の癌細胞の配列解析において、G残基は通常280位に存在するので、94位はバリン(Aヌクレオチド)またはメチオニン(Tヌクレオチド)の代わりにロイシン残基となる。ヒトメラノーマ細胞系において、SARG-1に2つの変異が見られる：アスパラギン酸のグリシンへの置換を生じるヌクレオチド74位のA-Gの点突然変異およびアミノ酸97位のヒスチジンのチロシンへの置換を生じるヌクレオチド289位のC-Tの点突然変異。

【0008】

これらの変異に關与する制限部位が多く存在する：ヌクレオチド67位でのT-Cは、多くの制限部位、Eco88I、XhoI、PaeR7I、Sfr274I、Ama781I、BcoI、BsoBI、AvaIを生じる；ヌクレオチド359位でのC-Tは、さらなる制限部位BseRIを生じる。

【0009】

したがって、本発明のさらなる目的は、癌または癌となる危険性のあるヒトの診断方法に關し、該方法は、以下の工程によって特徴付けられる：

癌または癌となる危険性のあるヒト由来の体液または組織の試料を提供する工程であって、該試料が、癌または癌となる危険性のないヒトから採取された場合にwt-SARG-1タンパク質およびwt-SARG-1をコードする核酸のうち少なくとも1つを含む工程、

該試料中の、wt-SARG-1タンパク質またはwt-SARG-1をコードする核酸

10

20

30

40

50

の存在を検出する工程、ならびに

w t - S A R G - 1 タンパク質または w t - S A R G - 1 をコードする核酸が該試料中に存在しない場合、癌または癌となる危険性があると診断する工程。

【 0 0 1 0 】

試料の出所は、通常、診断されるべき癌または疾患の性質に依存する。本発明によるとくに好ましい試料は、ヒトの血液、血漿、血清、リンパ液、神経細胞を含む組織、脳脊髄液、腫瘍組織、骨髄、神経組織、皮膚、髪、涙、羊水穿刺材料を含む胎児材料 (fetal material including amniocentesis material)、子宮組織、唾液、糞便、精子などを含む全生検材料を由来とするものである。

【 0 0 1 1 】

基本的には、試料中の、w t - S A R G - 1 タンパク質または w t - S A R G - 1 をコードする核酸の存在を検出するためのいかなる方法も、本発明にしたがい適用され得る。好ましくは、S A R G - 1 変異体が存在する場合、変異体が存在するという情報を与えるか、または変異形態 (mutant form) の性質を詳細に分析するかのいずれかによって、特定の S A R G - 1 変異体を特徴付ける方法が適用される。

【 0 0 1 2 】

とくに、点突然変異 (すなわち、それぞれ 1 つの核酸残基または 1 つのアミノ酸残基において w t - S A R G - 1 または w t - S A R G - 1 タンパク質とは異なる S A R G - 1 の非 w t 形態) の存在の検出は、本発明において好ましくあり得る。本発明による方法は、それらの点突然変異、とくに異なるアミノ酸配列となる点突然変異 (たとえば、野生型 S A R G - 1 タンパク質からの 1 つのアミノ酸残基の変更) を同定するために設計され得る。

【 0 0 1 3 】

w t - S A R G - 1 タンパク質またはコードする核酸の存在を検出するための適切な方法は、当技術分野において公知であり、好ましくは、w t - S A R G - 1 をコードする核酸は、核酸増幅方法 (とくにポリメラーゼ連鎖反応法)、一本鎖構造多型 (single-strand conformation polymorphism) (S S C P) 分析、制限分析、マイクロアレイ技術、プロテオミクスなどによって検出される。これらの方法は、ハイスループット基準において、迅速で信頼性が高く、かつ容易に実施可能であることが示されている。これらの試験は、標準組織または体液試料 (たとえば、血液、髪または唾液) に対して実施できる。

【 0 0 1 4 】

一方、w t - S A R G - 1 タンパク質の存在を検出するための好ましい方法は、たとえば、E L I S A 形式において、w t - S A R G - 1 タンパク質抗体 (とくに、モノクローナル抗体) の適用を包含する。このような抗体は、高度な規格化の潜在性ととともに工業的な規模で容易に産生され得る。

【 0 0 1 5 】

本発明による方法は、とくにスクリーニング試験形式に適用するのに適する。

【 0 0 1 6 】

S A R G - 1 のイントロン / エキソン構造を図 1 9 において提供する。翻訳開始部位のイニシエーターコンセンサス Y Y C A R R に下線を付す。ドナー (G U) およびアクセプター (A G) のスプライス部位にイタリック体で下線を付す。エキソンは太字である。コードエキソン配列はイタリック体である。S A R G - 1 はヒト染色体 2 0 q 1 2 ~ 1 3 . 1 2 に位置される。

【 0 0 1 7 】

本発明はまた、さらなる態様、すなわち、ヒトの野生型 S A R G - 1 をコードする配列番号 1 (図 4) による配列を含む核酸分子に関する。このような核酸は、診断のために使用されるだけでなく、治療的な分子または遺伝子配列を提供することによって (たとえば、アンチセンス方法、すなわち低分子薬の設計によって)、遺伝子治療の態様のために使用され得る。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、配列番号 1 の配列を含む核酸分子を包含する。ここで、該核酸分子におい

10

20

30

40

50

て、1つの核酸残基が、異なる核酸残基によって変更され(たとえば、TがC、GまたはAで置換される)、該変更が、好ましくは異なるSARG-1タンパク質のアミノ酸配列を生じる。

【0019】

とくに好ましい変更は、配列番号1の67位におけるTからCへの変更、配列番号1の74位におけるAからGへの変更、配列番号1の89位におけるAからGへの変更、配列番号1の289位におけるCからTへの変更、および配列番号1の359位におけるCからTへの変更から選択される。これらの変更は、MS患者または癌細胞においてすでに観察された変更に関する。生存可能な表現型において生じるさらなる変更もまた好ましい。

【0020】

本発明による核酸分子における他の好ましい変異は、コード領域における欠失、好ましくは1つ以上のコドン(たとえば、3つの核酸、または6、9、12個の核酸など)の欠失を含む。それらの変異の1つは、アミノ酸116と121との間のコドンの欠失を導き、セリン残基の消失を生じる(図19)。SARG-1タンパク質において非機能的なSARG-1を導く変異はまた、制御領域内(5'または3')および/または配列内(とくに正確なスプライシングに重要な位置)に位置され得る。

【0021】

本発明による核酸分子が診断目的で使用される場合、全配列を使用する必要はない。プローブとしての使用または本発明による方法の実施のために、配列番号1のフラグメント、好ましくは12以上、より好ましくは15以上、とくに20以上の核酸残基の長さを有するフラグメントは、たとえば、核酸試料もしくは染色体試料でさえも同定もしくは単離するためのプローブ、またはPCRプライマーなどとして、様々な試験、とくにそれらのプローブを用いる診断試験を実施するのに適する。

【0022】

本発明による核酸分子は、配列番号1によるコード配列に限定されるものではなく、この遺伝子の全エキソン/イントロン構造を含むゲノム複製体(genomic counterparts)にも関し、とくに非野生型形態のタンパク質(または非翻訳形態のタンパク質)を生じる非コード領域における模倣体もまた、本発明に包含される。

【0023】

本発明はまた、この核酸分子によってコードされるポリペプチド(たとえば、配列番号2によるアミノ酸配列を含む)にも関する。コンセンサスAsn-X-Ser/Thr(アミノ酸残基131~133)を含む単一の潜在的なN-グリコシル化部位が存在する。

MDPNPRAALERQQLRLRERQKFFEDILQPETFVFP LSHL
HLESQRPPIGSISSEMEVNVDTLEQVELIDLGD PDAADVFL
PCEDPPPTPQS S GVDNHLEELSLPVPTSDRTTSRTSSSS
SDSSTNLHSPNPSSDDGADTPLAQSDEEEERGDGGAEPGAC
S

【0024】

全てのトレオニンおよびセリン残基は、O-グリコシル化され得る。コンピューターの予想は、セリン残基91、108、113、117、118、119、120、121、123、124および133、ならびにトレオニン残基88、107、111、112、115および125のグリコシル化の高い可能性を示す。

【0025】

同様に、全てのトレオニンおよびセリン残基は、リン酸化され得る。コンピューターの予想は、セリン残基54、92、108、113、116、117、118、119、120、121、123、124、129、133および144、ならびにトレオニン残基61、88、107、112および139のリン酸化の高い可能性を示す。

【0026】

潜在的なプロテインキナーゼ認識部位の他に、シグナル配列、特徴的なドメインまたは他の3次元構造は全く検出されなかった。もちろん、アミノ酸残基の変更または欠失を有す

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列もまた、本発明によって包含される。

【0027】

本発明によるポリペプチドのアミノ酸残基の変更は、好ましくは、アミノ酸残基 P h e 2 3、A s p 2 5、G l u 3 0、H i s 9 7 および S e r 1 2 0、とくに P h e 2 3 から L e u 2 3 への変更、A s p 2 5 から G l y 2 5 への変更、G l u 3 0 から G l y 3 0 への変更、H i s 9 7 から T y r 9 7 への変更、および S e r 1 2 0 から P h e 1 2 0 への変更から選択される。

【0028】

本発明は、以下に記載するように、(急性)骨髄性白血病または他の白血病サブタイプのための特異的なマーカーとして、S A R G - 1 変異体形態を提供する。S A R G - 1 遺伝子の欠失は、マーカーとして機能するために部分的または完全であり得る。そのようなマーカーの存在または非存在をスクリーニングする診断試験は、当業者に容易に想到でき、かつ実施できる。

10

【0029】

本発明による好ましいポリペプチドは、組換え的に産生される。それは、w t - S A R G - 1 タンパク質と比較して構造的な相違(たとえば、示差的グリコシル化、とくに非相同グリコシル化)を示す。

【0030】

本発明はまた、抗体調製物の作製方法にも関する。この方法は、本発明によるポリペプチドを動物に投与する工程、該動物に該ポリペプチドに対する抗体を産生させる工程、抗体を含有する体液または組織を該動物から抽出する工程、および該ポリペプチドに対する抗体調製物を、該体液または組織から調製する工程を含む。この方法は、とくにポリクローナル抗体の作製に適用可能である。

20

【0031】

モノクローナル抗体の作製に関しては、そのような抗体調製物を作製する方法が好ましく、その方法は、本発明によるポリペプチドを動物に投与する工程、該動物に該ポリペプチドに対する抗体を産生させる工程、該動物の脾臓を採取する工程、該脾臓細胞とハイブリドーマ生成細胞との融合細胞を調製する工程、該ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製する工程、該ハイブリドーマ細胞をクローニングおよび培養し、それによってモノクローナル抗体を発現する工程、ならびに該モノクローナル抗体を調製する工程を含む。当業者は、それによって、このような目的に容易に利用可能である方法(たとえば、"Antibodies: A laboratory manual" by Ed Harlow, Cold Spring Harbor Laboratory; David Lane, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, 1988に記載された方法)に基づく。もちろん、ファージディスプレイペプチドもまた容易に作製され得る。

30

【0032】

本発明はまた、インビトロでの本発明による診断方法を実施するためのキットに関する。このキットは、少なくとも w t - S A R G - 1 タンパク質または w t - S A R G - 1 をコードする核酸の存在を検出する手段を含む。当業者は、本出願の開示を基に、大多数の適切な代替物(たとえば、抗 w t - S A R G - 1 タンパク質抗体、w t - S A R G - 1 に選択的に結合する核酸プローブ、w t - S A R G - 1 に選択的な領域を規定する核酸プライマー、該核酸プローブまたは該核酸プライマーを含むチップ)を予見できる。他の好ましい手段またはアッセイは、タンパク質が S A R G - 1 (たとえば、変異特異的抗体を含む抗体またはペプチド)に結合するアッセイ、E L I S A、ウエスタンブロットティングアッセイ、フローサイトメトリーアッセイ、および共焦点顕微鏡を含む免疫組織化学技術を使用するアッセイである。

40

【0033】

本発明のさらなる局面は、本発明の遺伝子組換え非ヒト動物モデル、とくに S A R G - 1 遺伝子の変異またはノックアウトされた動物モデルに関する。S A R G - 1 ノックアウトマウスはとくに好ましい。そのようなモデル(とくにマウスモデル)を提供する方法は、

50

当業者に容易に利用可能である。そのような動物モデルは、S A R G - 1 の遺伝的な変化 (variations) および変異の研究に非常に有用である (とくにその M S 関連障害に関して)。

【0034】

用語「遺伝子組換え (transgenic)」は、本明細書において、哺乳類細胞 (とくに生存動物の哺乳類細胞) のゲノムに人工的に挿入されている、またはそうしようとする遺伝的材料を記載するために使用される。導入遺伝子は、永続的または一時的な遺伝的变化 (好ましくは、永続的な遺伝的变化) を意味する、細胞の形質転換のために使用され、それは、外因性の D N A の挿入ののちに細胞において誘導される。永続的な遺伝的变化は、通常、細胞のゲノムに D N A を導入することによって達成される。安定な組込みのためのベクターとしては、プラスミド、レトロウイルスおよび他の動物ウイルス、Y A C などがあげられる。目的の遺伝子組換え動物としては、たとえば、ウシ、豚、ヤギ、ウマなど、とくにげっ歯類 (ラット、マウスなど) があげられる。

10

【0035】

遺伝子組換え動物は、染色体外の要素として存在する外因性の核酸配列を含有し、安定にその細胞 (とくに生殖細胞) の全てまたは一部に組み込まれる。他に示されない限り、遺伝子組換え動物は、生殖細胞の配列に安定な変化を含むと仮定される。動物の最初の構築の間、細胞の一部のみが変更されたゲノムを有する「キメラ」または「キメラ動物」が作製される。キメラは、主に、所望の遺伝子組換え動物を作製するために、育種目的に使用される。ヘテロ接合性の変更 (heterozygous alteration) を有する動物は、キメラの育種によって作製される。オスおよびメスのヘテロ接合体は、代表的には、ホモ接合体の動物を産生するために飼育される。

20

【0036】

遺伝子組換え動物は2つの群に分類され、口語で「ノックアウト」および「ノックイン」と称する。本発明において、ノックアウトは、内因性 S A R G - 1 の1つまたは両方の対立遺伝子における部分的または完全な機能の消失を有する。ノックインは、内因性の遺伝子から変更された遺伝子配列および機能を有する導入された導入遺伝子を有する。このノックアウトとノックインとは組み合わせられ得、その結果、自然に存在する遺伝子は無効にされ、そして、変更された形態が導入される。

30

【0037】

ノックアウトにおいて、好ましくは、標的遺伝子の発現は検出不可能であるか、または少量である。S A R G - 1 のノックアウトは、本明細書において記載されるように、ヒトにおける情勢に適切なモデルとして実施するために、S A R G - 1 タンパク質の機能が実質的に減少されており、その結果、発現が検出不可能であるか、または少量レベルのみ存在するか、または本発明の教示により変異されることを意味する。これは、コード配列の変異または破壊の導入 (たとえば、1つ以上の終始コドンの挿入、D N A フラグメントの挿入など)、コード配列の欠失、終始コドンのコード配列への置換などを含む種々の機構によって達成され得る。いくつかの場合、外因性の導入遺伝子は、最終的にゲノムから欠失されるので、本来の配列へ純変化 (net change) する。「ノックアウト」を達成するために、異なるアプローチが使用され得る。本来の遺伝子の全てまたは一部の染色体の欠失が誘導され得る。その欠失としては、非コード領域 (とくにプロモーター領域、3' 調節配列、エンハンサー) の欠失、または S A R G - 1 の発現を活性化する遺伝子の欠失があげられる。機能的ノックアウトはまた、本来の遺伝子の発現をブロックするアンチセンス構築物の導入によって達成され得る (たとえば、Li and Cohen (1996) Cell 85: 319-329 参照)。「ノックアウト」はまた、条件付きのノックアウト (たとえば、ここで、標的遺伝子の変更を促進する基質に対する動物の暴露、標的遺伝子部位での組換えを促進する酵素 (たとえば、Cre-lox 系における Cre) の導入、または出生後に標的遺伝子の変更を指向する他の方法によって、標的遺伝子の変更が生じる) を含む。

40

【0038】

標的遺伝子の「ノックイン」は、本来の S A R G - 1 の変更された発現または機能を生じ

50

る、宿主細胞ゲノムにおける変更を意味する。増大した（異所性を含む）または減少した発現は、標的遺伝子のさらなるコピーの導入によって、または標的遺伝子の内因性コピーの促進された発現を提供する調節配列を作動可能に挿入することによって達成され得る。それらの変化は構成的または条件付きである。すなわち、アクチベーターまたはリプレッサーの存在に依存する。

【0039】

外因性遺伝子は、通常、その動物宿主とは異なる種から得られるか、またはそのコード配列もしくは非コード配列において変更されるかのいずれかである。導入された遺伝子は、野生型遺伝子、自然に存在する多型または変異、あるいは遺伝的に操作された配列（たとえば、コード領域または非コード領域に、欠失、置換または挿入を有する配列）であり得る。導入された配列は、野生型のヒトもしくは動物のSARG-1タンパク質またはその変異体をコードし得る、あるいはレポーター遺伝子に作動可能に連結されたSARG-1プロモーターを利用し得る。導入された遺伝子がコード配列である場合は、構成的または誘導性であり得るプロモーター、および宿主動物における発現に必要な他の調節配列に、通常、作動可能に連結される。「作動可能に連結される（された）（operably linked）」によって、適当な分子（たとえば、転写アクチベータータンパク質）が調節配列に結合される場合に遺伝子発現を可能にするような方法で、DNA配列および調節配列が結合されることを意味する。

10

【0040】

目的の特定の構築物としては、アンチセンスSARG-1（本来のSARG-1発現、ドミナントネガティブSARG-1変異体の発現、およびSARG-1の過剰発現を遮断し得る）があげられるが、これに限定されるものではない。lacZなどの検出可能なマーカーは遺伝子座に導入され得る。ここで、発現のアップレギュレーションが、表現型に容易に検出される変化をもたらす。レポーター遺伝子またはコード領域と組合わせた、SARG-1プロモーター領域を利用する構築物がまた目的とされる。

20

【0041】

DNA結合、転写調節などにおける異なるエキソンの役割を決定するために、一連の少量の欠失および/または置換がSARG-1になされ得る。SARG-1タンパク質が正常に産生されない細胞におけるSARG-1タンパク質の発現の提供によって、細胞行動に変化を誘導できる。

30

【0042】

相同組換えのためのDNA構築物は、所望の遺伝子修飾を有する少なくとも一部のSARG-1を含み、かつ標的化された遺伝子座と相同な領域を含む。無作為な組込みのためのDNA構築物は、組換えを仲介するために相同な領域を含む必要がない。都合のよいことに、陽性および陰性選択のためのマーカーを含む。相同組換えを介した標的遺伝子修飾を有する細胞を作製する方法は、当技術分野において公知である。哺乳類細胞をトランスフェクションする種々の技術については、Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185: 527-537を参照されたい。

【0043】

胚幹（ES）細胞については、ES細胞系が使用されるか、または胚細胞が宿主（たとえば、マウス、ラット、モルモットなど）から新鮮に得られ得る。そのような細胞は、適当な線維芽細胞フィーダー層において増殖されるか、または白血病阻害因子（LIF）などの適当な増殖因子の存在下で増殖される。ES細胞が形質転換される場合、それらは遺伝子組換え動物を産生するために使用される。形質転換ののち、適当な培地中のフィーダー層上に細胞が置かれる。前記構築物を含む細胞は、選択培地を使用することによって検出され得る。コロニーが成長するための十分な時間ののち、コロニーが採取され、そして構築物の相同組換えまたは組込みの発現が分析される。陽性であるコロニーは、ついで胚操作および胚盤胞注入（blastocyst injection）のために使用され得る。胚盤胞は4～6週齢の過剰排卵したメスから得られる。ES細胞は、トリプシン処理され、そして、その修飾細胞は、胚盤胞の胞胚腔に注入される。注入ののち、胚盤胞は、偽妊娠のメスの各子宮

40

50

角 (uterine horn) に戻される。メスは、ついで期間が空けられ、そして、得られる同腹子は、構築物を有する変異細胞についてスクリーニングされた。様々な表現型の胚盤胞およびES細胞を提供することによって、キメラの子孫は容易に検出され得る。

【0044】

キメラ動物は、修飾遺伝子の存在がスクリーニングされ、そして、該修飾を有するオスおよびメスは、ホモ接合体の子孫を産生するために交配される。遺伝子の変更に成長でのいくつかの時点で致死を引き起こす場合、組織もしくは器官は、同種または類似遺伝子性のグラフトもしくはトランスプラント、またはインビトロ培養物として維持され得る。

【0045】

ヒトSARG-1の結合パートナーとしては、タンパク質-O-マンノシルトランスフェラーゼ (POMT1)、微小管結合タンパク質1A (MAP1A)、ATPase、Na⁺/K⁺ トランスポーティング 1 ポリペプチド (Na⁺/K⁺ transporting beta 1 polypeptide) (ATP1B1)、SWI/SNF 複合体 60 kDa サブユニット (BAF60c)、 α -アクチニン2、エキソン16、rab GDP解離インヒビター1 (GDI1) およびプロテオソーム 26S サブユニット、ATPase3 (PSMC3) があげられる。

10

【0046】

SARG-1タンパク質 (変異体を含む) の活性を調節するためのSARG-1結合タンパク質を使用することは、本発明のさらなる態様であり、かつ逆もまた同様である。さらに、SARG-1 (野生型) またはSARG-1結合タンパク質は、有効量のSARG-1またはSARG-1結合タンパク質 (あるいはその複合体) を、MSまたは癌患者に投与することによって、MSまたは癌、好ましくは、骨髄増殖症候群、多血症、脊髄形成異常症および骨髄性白血病 (とくに急性骨髄性白血病) の治療のために使用され得る。wt-SARG-1タンパク質の代わりに、そのような患者の有利な治療に適し得るSARG-1のフラグメント (たとえば、SARG-1結合タンパク質に結合するフラグメント) もまた使用され得る。そのようなフラグメントの最小の必要条件は、当業者 (とくに本明細書に記載したマウスモデルを使用する当業者) に容易に見出される。

20

【0047】

さらに、前記方法を実施例および図面によって記載するが、それらに限定されるものではない。

30

【実施例】

【0048】

幹細胞アポトーシス中に誘導される新規SCF-アポトーシス応答遺伝子 (SARG-1) の同定

SCF依存性骨髄単球の祖先 (SCF dependent myelomonocytic progenitors) からの増殖因子の除去は、細胞周期非依存性アポトーシス (cell cycle-independent apoptosis) を急速に誘導する結果となる。95%以上のSCF剥奪培養物は、増殖因子除去から12時間後にバイタルダイ (vital dyes) を除くにもかかわらず、この時点ののちのSCFによる再刺激に対して増殖性の応答は見られない。ディファレンシャルディスプレイスクリーニングを行ない、骨髄単球幹細胞の自己再生および増殖因子除去により誘導されたアポトーシスの過程中的、中期~初期 (4時間) のmRNA発現の差異を調査した。規定されたプライマー (Bauer et al, 1993) のセット (ディスプレイ系) を用いるディファレンシャルディスプレイPCR (Liang and Pardee 1992, 1995; Liang et al, 1993) による、全細胞性mRNA種のおよそ1/3の増幅は、自己再生前駆体に存在しないアポトーシスの際に誘導される1つのフラグメントを同定した。このバンドのゲル切出し、および増幅のPCR IIベクター (Invitrogen) へのTACクローニングののち、特異的発現の誘導を、非依存的培養物から単離調製した放射線標識化cDNAとハイブリダイズしたドットプロットしたプラスミド調製物を示す逆ノーザン法において確認した (図1)。全ての陽性と同定された示差的に調節されたクローンを配列決定し、そして同一の342塩基対の挿入物 (下流および上流のディファレンシャルディスプレイプライマー対を除く) が含

40

50

まれることを見出した。

【0049】

SARG-1 cDNA の分子量および組織発現。胚発達中の調節

前記で見出された342bpのフラグメントの放射性標識、および多様な組織のノーザンプロット(Clontech)の調査により、およそ1300bp長の成熟mRNAが、ラット、マウスおよびヒトの組織において示された。偏在的な低発現が見られるなか、脳および心臓において最高の発現レベルが見られた(図2)。様々な段階のマウスの胚発達から単離された固定化mRNAのノーザンプロットを、放射性標識された342bpのフラグメントで調査し、7日後にSARG-1 mRNAが最高レベルであった発達の間および17日目の遺伝子産物の再発現の間の、SARG-1 mRNAの調節を証明した(図3)。

10

【0050】

ラット、マウスおよびヒトの全長SARG-1のクローニング

さらなるSARG-1配列情報を、ラット脳のMarathon-ready cDNA(Clontech)に連結したアダプターから、ポリメラーゼ連鎖反応による5' cDNA末端の迅速増幅(RACE)法によって得た。プライマーを342bpの配列の3'隣接末端で構築し、そして、PCR産物をpCR(登録商標)TAクローニングベクター(Invitrogen)にクローニングし、そして配列決定した。全長のSARG-1の1062bp遺伝子転写物を配列決定し、そしてそれは158アミノ酸のタンパク質をコードする479bpのオープンリーディングフレームを有する。全長のラットSARG-1 cDNAを有するマウス株129SvJ由来の細菌の人工染色体バンクをスクリーニングすることによって、マウスSARG-1を単離した。相同のクローンを単離し、そしてXhoIフラグメントを配列決定した。ついで、マウスの成熟SARG-1のRNAを、マウス脳cDNAからPCRによって同定した。ヒトSARG-1を、脳cDNAのファージバンクから全長のラット配列との相同性によって単離し、そして配列決定した。全長のヒトSARG-1遺伝子座を、健全なボランティアの末梢血単核細胞から単離した染色体DNA由来のSARG-1 cDNAにわたる(spanning)プライマーを用いるPCRによって増幅した。ラット、マウスおよびヒトのSARG-1の全長配列を図4、5および6に示す。

20

【0051】

ラット、マウスおよびヒトの配列間の相同性

ラットおよびマウスのSARG-1は、それぞれ核酸において93%、そして予想タンパク質レベルにおいて96%の相同である。ヒトのSARG-1は、マウスおよびラットのSARG-1に対して、それぞれ核酸レベルにおいて83%および84%、そして予想タンパク質レベルにおいて84%および86%の相同性を示し(図7および8)、20番染色体長腕に位置しており(20q13.12(Deloukas et al., 2001))、広範囲の脊髄増殖症候群において共通してその染色体の欠失が起こる(Wattel et al., 1993 and Bench et al., 2000)。配列は潜在的なPEST領域(Rechsteiner et al., 1996)(+)、単一の保存された潜在的なN-グリコシル化部位(#)、および3つの保存されたPKC(§)ならびにカゼインキナーゼII(*)リン酸化部位を含む(図5B参照)。

30

【0052】

抗SARG-1抗体によるSARG-1分布の分析

SARG-1抗体を、最初の15アミノ酸、ならびにキーホールリンペットヘモシアニンに結合するマウス、ラットおよびヒトのSARG-1のC末端部分に対応するペプチド(MDPNPRALERQQLRおよびDEEEERGDGGAEPGA)でニワトリを免疫することによって調製した。IgYを卵黄から調製し、そして特異的抗体をカラム固定化ペプチドを用いるアフィニティークロマトグラフィーによって調製した。

40

【0053】

マウス組織の5mmのアセトン固定化切断面の免疫組織化学分析において、特異的抗SARG-1 IgY抗体を、2次抗体を結合した抗IgYペルオキシダーゼによって視覚化し、神経組織におけるSARG-1タンパク質の広範囲の発現を検出した。SARG-1染色は、大脳皮質全体(図9A)、および小脳の顆粒、ブルキニエ細胞および分子細胞層

50

(図9B)で見られた。脊髄において、SARG-1は、神経細胞体、樹状突起、グリア細胞および血管を含む灰白質、ならびに大部分が有髄神経線維からなる白質の両方で発現された(図9C)。SARG-1発現はまた、予備末梢神経プロセスとともに局在化する(colocalised)(図9D)。SARG-1はまた、心筋(図9E)、肺の繊毛上皮(図9F)ならびに回腸および結腸の上皮細胞(データは示さない)において偏在的に発現される。マウス胚組織の染色は、神経組織、脳、心臓、胎盤、子宮、コルチ器官、真皮(顆粒層)および内臓の内層の強度の染色を証明した(データは示さない)。

【0054】

SARG-1過剰発現細胞の作製

Me1JUSOメラノーマ細胞株を、10%のウシ胎仔血清、ならびに100ユニット/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンおよび0.25 μ g/mlのアンホテリシンB(全てGibcoBRL製)を含有する抗生物質-抗カビ物質の混合物を補充したダルベッコ修飾イーグル培地(DMEM)で、37 $^{\circ}$ Cで5%CO₂を含有する完全な湿潤空気環境下で維持した。ヒトSARG-1コード配列(hSARG-1₄₈₆)を、標準的な分子生物学的手法(Sanbrook et al, 1989)によりC末端の血球凝集素(HA)ペプチド配列とインフレームでCMVプロモーターの制御下のpMH発現ベクター(Roche)にクローン化した。6ウェルプレートにおける半混合培養物を、Fugene(Roche)の存在下で、このベクター(pMH-SARG-1-HA)または空のベクターでトランスフェクションし、そしてネオマイシンに対して耐性を示すクローンを単離した。

【0055】

神経細胞の培養系においてSARG-1の発現および機能を調査するために、標準的な分子生物学的手法(Sanbrook et al, 1989)を用いて、SARG-1₄₇₇および増強緑色蛍光タンパク質の両方の内部のIRES配列を介してバイシストロニックに翻訳するCMVプロモーターの制御下にあるpIRESSII-EGFP真核生物発現ベクター(Clontech)にラットSARG-1コード配列(rSARG-1₄₇₉)をクローニングした。ラット褐色細胞腫PC12細胞株を、8%のウマ血清、8%のウシ胎仔血清、ならびに100ユニット/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンおよび0.25 μ g/mlのアンホテリシンB(全てGibcoBRL製)を含有する抗生物質-抗カビ物質の混合物を補充したDMEMで、37 $^{\circ}$ Cで5%CO₂を含有する完全な湿潤空気環境下で維持した。6穴プレートにおける半混合培養物を、無血清Opti-MEM(Gibco)においてDNAに対して6:1の比の取り込み増強カチオン性脂質(the uptake enhancing cationic lipid mix)の混合物pF \times 1(Invitrogen)の存在下で、pIRES2-EGFP-SARG-1または空のベクターで18時間トランスフェクションした。800mg/mlのジェネティシン(Gibco)における選択ののち、トランスフェクションした安定なコロニーを個々のウェルから採取し、そして同様のEGFP蛍光を有するクローンを独立したトランスフェクションから展開した。

【0056】

ラットおよびヒトの成熟タンパク質の翻訳後修飾

アミノ酸配列から予想したラット、マウスおよびヒトのSARG-1タンパク質の分子量は、それぞれ17186.52、17193.52および17492.76である。SARG-1に対するIgY抗体は、ウエスタンブロッティングにおいて、天然のPC12細胞において低レベルで発現した28kDの種を検出する。それらの細胞へのpIRES2-EGFP-SARG-1のトランスフェクションの際に、この種の発現レベルが増大する。ヒトSARG-1タンパク質の分子量を、pMH-SARG-1-HAでトランスフェクションされたMe1JUSOメラノーマ細胞由来の細胞抽出物のウエスタンブロッティングによって検出した。抗HAMONOクローナル抗体3F10(Roche)は、28kDで移動する単一の種を検出した(図10)。

【0057】

トランスフェクションされたSARG-1タンパク質の細胞レベル下の局在

S A R G - 1 でトランスフェクションした P C 1 2 細胞の免疫組織化学染色により、S A R G - 1 遺伝子産物の限定的な細胞質の局在を証明した。抗 H A モノクローナル抗体 3 F 1 0 による免疫組織化学分析もまた、小胞体のためのマーカーとして使用される結合タンパク質 (b i p) の発現とともに主に局在化する、S A R G - 1 タンパク質の限定的な細胞質の局在を証明した (図 1 1) 。 H A - S A R G - 1 のゴルジ特異的抗原コートタンパク質 (b - c o p) との共通の局在は最小である。対照的に、S A R G - 1 発現は、リソソーム特異的タンパク質 L A M P - 2 の発現と部分的に重複する。

【 0 0 5 8 】

アポトーシスにおける S A R G - 1 の役割、および神経細胞培養物の分化

プロテインキナーゼインヒビターであるスタウロスポリンによる P C 1 2 細胞の処理は、100 n M の濃度で神経突起という結果 (outgrowth) を誘導し (Hashimoto and Hagino, 1989) 、そして 1 m M 以上の濃度でアポトーシスを誘導する (Fu et al, 1999) 。神経突起という結果を生じるベクター対照培養物 (図 1 2) と比較して、S A R G - 1 の過剰発現 P C 1 2 細胞では、100 n M のスタウロスポリン (Calbiochem) による処理において生存率が迅速に消失した。S A R G - 1 の過剰発現 P C 1 2 培養物における細胞死は、細胞減少、プログラム細胞死特有の形態の発生、およびアポトーシスプロセス特有のフローサイトメトリーによる細胞周期分析 (図 1 3) におけるエタノール固定化細胞由来の D N A の消失 (Fraker et al, 1995) を伴う。スタウロスポリン類似物 K 2 5 2 a (A l e x i s) 、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼインヒビター L Y - 2 9 4 0 0 2 (A l e x i s) もしくは W o r t m a n n i n (C a l b i o c h e m) 、 M A P キナーゼキナーゼインヒビター P D 9 8 0 5 9 (A l e x i s) またはプロテインキナーゼ C インヒビター B i s i n d o l y l m a l e i m i d e I (A l e x i s) では同様の効果は見られない。S A R G - 1 の過剰発現もまた、神経成長因子により誘導された P C 1 2 細胞の末端分化を促進する (図 1 4) 。

【 0 0 5 9 】

S A R G - 1 結合タンパク質の単離

酵母ツーハイブリッドスクリーニングは、市販の Clontech 製 マッチメーカーシステム (Matchmaker system) により実行可能である。標準的な方法を用いて B a m H I および E c o R I 制限部位を用いる P C R によって、全長 h S A R G - 1 コード配列を p G B K T 7 シャトルベクター (Clontech) にクローニングすることによって、ベイトプラスミドを構築する (シャトルベクター p G B K T 7 : h S A R G - 1 のコード領域を、E c o R I および B a m H I 制限部位を用いる P C R 増幅によって、酵母 A D H 1 プロモーター (P) の制御下で、c - m y c タグを含む G A L 4 D N A 結合ドメイン (D N A - B D) のアミノ酸 1 ~ 1 4 7 に、C 末端が融合するようにクローニングし、そして T R P 1 栄養マーカーを用いて酵母において選択する) 。ついで、この構築物を、M A T a 酵母株 A H 1 0 9 (アデニン (A d e) 、ヒスチジン (H i s) 、ロイシン (L e u) およびトリプトファン (T r p) について栄養要求性であり、合成脱落 (S D) - T r p 培地上での増殖によって p G B K T 7 で選択される) を使用し、リチウムアセテート形質転換した。M A T Y 1 8 7 (A d e⁻、H i s⁻、L e u⁻ および T r p⁻) 酵母株において予め形質転換された p A C T 2 において一方向に構築したヒト脳のマッチメーカーライブラリー (Clontech) を購入し、そして少なくとも 3×10^6 クローンを、h S A R G - 1 - 1 で形質転換された A H 1 0 9 と接合させた (シャトルベクター p A C T 2 : ヒト脳ライブラリー挿入物は、酵母 A D H 1 プロモーター (P) の制御下で、G A L 4 活性化ドメインのアミノ酸 7 6 8 ~ 8 8 1、S V 4 0 T 抗原核移行配列、および H A エピトープタグに、C 末端が融合するようにインフレームで一方向にクローニングされ、そして L E U 2 栄養マーカーを用いて酵母において選択される) 。接合体は、それぞれ L e u⁻ および T r p⁻ 選択、ならびに、これと同時に、X - G a l (5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド) を含有する - H i s⁻、- A d e プレート上で H I S 3、A D E 2 および M E L 1 のレポーター遺伝子活性化によるタンパク質相互作用によって単離される。陽性コロニーを再ストリークし、さらに - ガラクトシダーゼによる l a c Z レポ

10

20

30

40

50

ーターの活性化について試験した。陽性コロニーの挿入物をPCRによって増幅し、制限消化によって繰り返し部分を同定し、そして陽性の相互作用物を、その挿入物のアダプター末端から短時間配列決定 (short run sequencing) によって同定した。潜在的な相互作用物の同一性を、それぞれバイオテクノロジー情報に関する公衆センター (the national centre for biotechnology information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) および欧州バイオインフォマティクス研究所 (European bioinformatics institute) (www.ebi.ac.uk/fasta33/) の重複のない発現配列タグデータベース (non-redundant and expressed sequence tag data bases) に対するFASTAおよびBLASTサーチによって確認し、GAL4活性化ドメインとインフレームでクローニングされた特徴付けられたタンパク質を同定した。ついで、単一のpACT2プラスミドを、アンピシリン選択下でのE. coliの形質転換およびpGBKT7-SARG-1と、-Ade、-His、-Leu、-Trp、X-galプレート上での青色コロニー成長によって選択されるライブラリー挿入物を含むpACT2とでのAH109の共形質転換によって再試験された陽性相互作用によって回収した。ベイトおよびライブラリーの遺伝子を、適当なc-mycおよびHAエピトプタグ化真核生物発現ベクターにクローニングし、さらに相互作用物を、インピットで翻訳されたか、または一時的に共トランスフェクションされたHEK293細胞由来かのいずれかの、共免疫沈降タンパク質のウエスタンブロットティングによって確認した。後者はまた、全長のコード配列のクローニングおよび単離ののちの共焦点顕微鏡分析によって共局在化実験される。相互作用のパートナーのSARG-1との細胞共発現を、利用可能な抗体を用いて得られる一連の発生学的スライドの染色または同定配列のインサイチュハイブリダイゼーションのいずれかによって調査した。既知の結合パートナーの同定は、アンチセンスまたはRNAi方法の開発により、標的発現を特異的に減少させることができる、または特異的機能的インヒビターの使用により、PC-12アポトーシスおよび分化で見られた表現型の変化をさらに特徴付けることができる。結合パートナーの同定はまた、特異的に阻害もされ得るSARG-1発現によって影響される生化学的経路を同定する。同定された結合パートナーのノックアウトモデルは、SARG-1欠損マウスと交配され得る。

10

20

【0060】

ピットフォール分析 (Pitfall analysis)

関連組織を、SARG-1がどこで高度に発現し、かつ細胞株モデルにおける分化およびアポトーシスにおいて役割を果たすのか解析した。ヒト遺伝子バンクを分析することにより、既知RNA配列の迅速な同定が可能である。SARG-1配列は、転写の活性化を減少できる細胞質移行シグナルを含まない。SARG-1のトランスフェクションは、PC-12またはMelJus細胞に対して直接的に害はないので、酵母において害とは考えられない。マッチメーカーシステムは、人工産物を排除するために種々のプロモーター構築物を有する多様なレポーター遺伝子を使用し、そして多くの結合パートナーを単離するために使用されている (Corset et al, 2000; Galiegue et al, 1999; Ono et al, 2000; White et al, 2000)。ベクター構築物の効果的な一時的共トランスフェクションが可能である真核細胞系 (HEK293) を、推定結合パートナーを迅速にスクリーニングするために使用した。

30

40

【0061】

ベイトとしてヒトSARG-1タンパク質を用いてヒト脳cDNAバンクをスクリーニングするための酵母ツーハイブリッド分析において、以下の結合パートナーを単離した。

1: ホモサピエンスのタンパク質-O-マンノシルトランスフェラーゼ1 (POMT1)、(LC2) mRNA: (gi: 12734916)

2: ホモサピエンスの微小管結合タンパク質1A (MAP1A)、mRNA (XM_012387)

3: ホモサピエンスのATPase、Na⁺/K⁺ トランスポーティング 1 ポリペプチド (ATP1B1)、mRNA (gi: 4502276)

4: ヒトのSWI/SNF 複合体 60 kDaサブユニット (BAF60c) mRNA

50

(g i : 1 5 4 9 2 4 6)

5 : ホモサピエンスの - アクチニン 2 に関する A C T N 2 遺伝子、エキソン 1 6 (g i : 6 4 4 8 5 5 7)

6 : ホモサピエンスの r a b G D P 解離インヒビター (G D I 1)、m R N A (g i : 4 5 0 3 9 7 0)

7 : ホモサピエンスのプロテオソーム (プロソーム (prosome)、マクロパイン (macropain)) 2 6 S サブユニット、A T P a s e 3 (P S M C 3)、m R N A (g i : 4 5 0 6 2 1 0)

これら結合タンパク質のうち、とくに A T P a s e 1 ポリペプチドが、S A R G - 1 との結合に関して、薬剤の標的としての使用にとくに興味深いものである。

10

【 0 0 6 2 】

条件付き S A R G - 1 ノックアウトマウスの作製

ベクター構築物と染色体の標的配列との間の効果的な相同組換えは、通常、薬剤耐性カセットに近接する少なくとも 2 k b の相同物を有する、7 k b の相同性の種特異的領域によって達成される (Johnson et al., 1995)。マウスの S A R G - 1 遺伝子座を、P C R によって完全に増幅し (2 4 2 0 b p)、そして 3 つのイントロンが存在することを配列決定により証明した。

【 0 0 6 3 】

置換ベクターの構築について、S A R G - 1 遺伝子座に隣接するおよそ 2 . 5 k b の付加的な非コード染色体配列情報を、1 2 9 S v J マウスにおいて得る。この目的を達成するために、放射線標識化 S A R G - 1 c D N A 配列または完全な m S A R G - 1 遺伝子座の P C R 産物を使用して、1 2 0 k b の平均挿入物サイズを有する 1 2 9 S v J マウスの細菌人工染色体 (B A C) ライブラリー (Incyte genomics) または 9 ~ 2 3 k b の挿入物サイズを有する Lambda Fix (登録商標) I I ファージ (Stratagene) において構築された 1 2 9 S v J マウスゲノムライブラリーを、標準的な方法でスクリーニングした。クローニングまたはファージの単離ののち、コード領域に隣接するゲノム配列 (およそ 2 . 5 k b) を、S A R G - 1 コード配列内部に対するプライマーを用いる単離されたクローンの直接的な配列決定、S A R G - 1 配列を有するクローン化された制限断片の配列決定、または逆 P C R のいずれかによって特徴付けた。得られた配列情報を使用して、P C R プライマーを設計し、1 2 9 S v J m S A R G - 1 ゲノム配列を、条件付 / ハイボモルフ p D E L B O Y - 3 X 標的化ベクターに挿入した (Rossi et al, 2001)。このベクターは、遺伝子欠失に潜在的に関連する問題を克服する性質を有する。人工的な表現型が、調節の崩壊、ならびに標的遺伝子座および隣接遺伝子のスプライシングを導き得る、ネオマイシンカセットの転写活性のために、ノックアウトマウスにおいて出現した (Pham et al, 1996; Olson et al, 1996)。p D E L B O Y - 3 X ベクター中のネオマイシンカセットは、F l i p レコンビナーゼ (f r t) 部位に隣接される。F l i p レコンビナーゼ (f r t) 部位は、インビトロおよびインビボでの選択カセットの効果的な切出しを可能にする。p D E L B O Y - 3 X で安定にトランスフェクションされた細胞の、F l i p レコンビナーゼを発現するベクターによる一時的なトランスフェクションにより、ネオマイシンカセットが切出される。

20

30

40

【 0 0 6 4 】

最近開発されたツール (たとえば、F l i p レコンビナーゼ - G F P 融合タンパク質ベクター) は、たとえば、蛍光活性化細胞の選別によってインビトロでの F l i p - 触媒組換え事象を富化させる (Sabath et al., 2000)。逆に、マウスの、増強された F L P を偏在的に発現する 1 2 9 S v J F L P e r 欠損マウスとのかけ合わせにより、インビボにおいてネオマイシンカセットが切出される。さらに、p D E L B O Y - 3 X ベクター中の l o x P 部位間の S A R G - 1 コード配列のクローニングは、インビトロでの c r e レコンビナーゼ発現プラスミドでのトランスフェクションか、または組織特異的な領域 (manor) において c r e レコンビナーゼ発現動物を用いて作製されたマウスのインビボでのかけ合わせのいずれかによって、ヌル対立遺伝子が発現する。この方法により、ヘテロ接合体の

50

胚の致死性に関連する問題が排除され、そしてタンパク質機能の正確な組織特異的分析がなされる。ノックアウトマウスは標準的な手順で作製される (Papaioannou and Johnson, 2000; Gu et al, 1993)。手短に言うと、胚幹細胞 (ES) を線状の p D E L B O Y - 3 X - S A R G - 1 によって電気穿孔法によってトランスフェクションし、そして相同組換え事象をネオマイシン/ガンシクロピア処理によって選択し、そしてクローンを PCR、または標的化配列外部に対する放射線標識化プローブによるサザンブロッティングによってスクリーニングする。胚盤胞を、ESクローンを注入された妊娠3.5日目のマウスから単離し、そして偽妊娠マウスに再移植した。キメラの毛色選択ののち、動物を正常 1 2 9 S v J マウスと交配させ、育種株 (breeding line) を作製した。そののち、ホモ接合体を、相互交配によって得る。マウスの表現型を、標準的な手順によってスクリーニングする。胚および成体組織から調製された組織学的切片の分析、細胞死アッセイと組合わせた磁気共鳴画像分析 (たとえば、TdT-触媒 dUTP-Xニック末端標識 (TdT-mediated dUTP-X nick end labelling) (TUNEL)) は、それぞれ、発生中の分化およびアポトーシスにおける S A R G - 1 の役割の直接的な証拠を提供する。細胞分析としては、造血幹細胞の特徴付け (コロニー形成アッセイ、分化抗原のクラスターのためのフローサイトメトリー分析) および神経培養系におけるアポトーシス応答測定があげられる。

10

【0065】

ピットフォール解析

前記したように、p D E L B O Y - 3 X ベクターは、ネオマイシンカセットからの転写によって産生された人工産物を排除し、そしてヘテロ接合体の胚の致死性という問題を克服する。スクリーニングはまた、c - k i t 遺伝子に単一の変異を有する動物の利用可能性によって補助される。S A R G - 1 結合パートナーの同定について、ノックアウトマウスの存在が、S A R G - 1 欠損マウスとの交配を可能にし、これにより表現型がさらに明らかとなる。

20

【0066】

細胞の局在性

B a l b / c マウスを交配させ、そして胚を7、11日 (タイラー段階 10 ~ 19)、14 および 17 日目に単離し、そして液体窒素で素早く凍結させた。5 μ m の矢状横断連続切片 (transverse and sagittal consecutive sections) をクリオスタット上で作製し、必要になるまで凍結した。S A R G - 1 発現を、アセトン固定化 m S A R G - 1 を検出する抗 S A R G - 1 I g Y を用いて、切片に対して標準的な免疫組織化学分析により分析する。発現パターンを、標準的な発生学のテキスト (Kaufman, 1992) およびマウスアトラスならびに遺伝子発現データベースプロジェクト (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>) を参考にして同定する。17日目の胚における発現パターンを、成体マウス組織で見られた発現パターンとさらに関連付ける。S A R G - 1 結合パートナーの同定ののち、共発現研究を、免疫組織化学 (抗体が利用できる場合) か、またはインサイチュハイブリダイゼーションのいずれかによって行う。

30

【0067】

エピトープタグ化 S A R G - 1 の細胞レベル下の局在性および生化学的特徴

細胞質、小胞の細胞レベル下の S A R G - 1 の局在性を、エピトープタグ化 S A R G - 1 で安定的にトランスフェクションした H E K 2 9 3、M e l J u s o または P C - 1 2 細胞の二重染色によって決定する。H A タグを、ラットモノクローナル抗 H A m A b で染色し、そしてビオチン標識化モノクローナル抗アイソタイプ m A b、続いて、蛍光色素標識ストレプトアビジンで視覚化する (F I T C、S、フィコエリトリンまたは c y 5)。細胞小器官に局在化する抗原を、直接的に標識するか、または二次抗体を使用するかのいずれかで、B i p / G R P 7 8 (小胞体)、c o p (ゴルジ複合体)、L a m p - 1 (リソソーム) および A b - 2 (ミトコンドリア) に対する抗体で検出し、Z e i s s レーザースキャン顕微鏡で分析した。クローニングされかつ天然の S A R G - 1 (予想質量 17 K d) は、S D S - F A G E において 28 K d で移動する。H A タグ化 S A R G - 1 のグリコシル化を、まず、抗 H A マトリクスに対する免疫沈降および過ヨウ素酸酸化による

40

50

グリコシル化残基の検出、ビオチンヒドラジドの取り込みおよびウエスタンブロット上でのストレプトアビジン標識アルカリホスファターゼでの検出によって調べた。N - および O - 特異的な酵素的脱グリコシル化反応を、それぞれ、PNGase F および O - グリコシダーゼ (Bio-Rad) により実施し、そして SARG - 1 の分子量をウエスタンブロットティングによって観察する。SARG - 1 配列は、保存的なプロテインキナーゼ C およびカゼインキナーゼ II の部位 (これらは、アポトーシスレギュレーター (apoptotic regulators) をリン酸化することで知られる) を含む (Verma et al., 2001)。NGF (PKC 活性化を導く) による Trk 活性化 (Patapoutian et al., 2001) と、PC - 12 におけるプロテインキナーゼインヒビタースタウロスポリン (リン酸化により SARG - 1 機能を調節すると示唆される) による処理との間で、表現型に相違が見られた。可能性のある SARG - 1 リン酸化を調べるために、免疫沈降された SARG - 1 を、ウエスタンブロットティング分析においてホスホトレオニンおよびホスホセリンに対するポリクローナル抗体により調査し、そしてホスファターゼ処理したタンパク質と比較した。ついで、変異 SARG - 1 の真核生物系発現プラスミドを、潜在的なカゼインキナーゼ II リン酸化部位を欠失するために、部位特異的変異によって作製し、これを使用して PC - 12 細胞をトランスフェクションし、プロテインキナーゼインヒビタースタウロスポリンの効果を観察する。

10

【0068】

MS 試料中の変異の分析

SARG - 1 タンパク質の CNS の灰白質および白質への免疫組織化学的局在性ならびにアポトーシス誘導における SARG - 1 の役割は、家族性 MS の症例における SARG - 1 の変異状態を分析するための候補遺伝子アプローチを促進した。20 人の血縁関係のない家族性多発性硬化症患者由来の DNA を、SARG - 1 遺伝子座の PCR 増幅および DNA 配列決定によって調査し、そして健全な対照と SARG - 1 配列を比較した。全対照試料は、野生型 SARG - 1 ゲノム配列を示した。MS 患者のうち、20 人中 6 人のみの DNA 試料を、PCR によって増幅することができた。使用したプライマーセットは、全コード領域、イントロン 2 / エキソン 3、ならびにエキソン 1、2 および 3 に特異的なプライマーの対に及んだ。対照 GAPDH プライマーを、全試料について陽性であった。PCR 産物を産生した 20 人中 6 人の試料において、増幅物を pCR (登録商標) II ベクター (Invitrogen) に TA クローニングし、そして配列決定した。6 人中 4 人の患者において、遺伝子の変異が見られた。ヌクレオチド 67 位での T C の点突然変異は、アミノ酸 23 位でのフェニルアラニンのロイシンへの置換を生じる (図 16)。ヌクレオチド 359 位での C T の点突然変異は、アミノ酸 120 位でのフェニルアラニンのセリンへの置換を生じる (図 17)。ヌクレオチド 89 位での A G の点突然変異は、アミノ酸 30 位でのグリシンのグルタミン酸への置換を生じる (図 18)。アミノ酸 116 と 121 との間のコドンの欠失は、セリン残基の消失を生じる (図 19)。20 以上の対照 DNA 試料の配列決定では、野生型の配列のみを示した。

20

30

【0069】

多型および他の変異

30 以上の癌細胞株の配列分析において、ヒト配列におけるヌクレオチド 280 位 (コード配列) の多型は、アミノ酸配列の 94 位でのバリン (g 残基 (示した))、メチオニン (a) またはロシン (t) 残基のいずれかとなる。ヒトメラノーマ細胞株において、SARG - 1 における 2 つの変異が見出される (ヌクレオチド 74 位での A G の点突然変異は、アスパラギン酸のグリシンへの置換を生じ、そしてヌクレオチド 289 位での C T の点突然変異は、アミノ酸 97 位でのヒスチジンのチロシンへの置換を生じる)。したがって、そのような SARG - 1 変異は、ヒトメラノーマの適切なマーカーである。

40

【0070】

表

67	T	C	=	F	L	23
74	A	G	=	E	G	25

50

89 A G = E G 30
 289 C T = H Y 97
 359 C T = S F 120
 S 116-121

【 0 0 7 1 】

[参考文献]

- Bauer et al. (1993), NAR: 21: 4272-4280
 Bench et al. (2000), Oncogene 19,3902-3913
 Chataway et al. (1998), Brain 121,1869-1887
 Corset et al. (2000), Nature 407: 747-750 10
 Deloukas et al. (2001), Nature 414: 865-871
 Ebers et al. (1995), Nature 377,150-151
 Fraker, in "Cell death", edited by Schwartz et al., Methods in Cell Biology, Vol 46, Academic press, San Diego, CA pp57-76
 Fu et al. (1999), J. Biol. Chem. 274,7264-7271
 Galiegue et al. (1999), J. Biol. Chem. 274: 2938-2952
 Gu et al. (1993), Cell 73: 1155-1164
 Haines et al. (1998) Hum. Mol. Genet. 7,1229-1234
 Hashimoto et al. (1989), Exp. Cell Res., 184,351-359
 Jacobson et al. (2000) Nature Genetics, 26,495-499 20
 Johnson et al. (1995), Gene Probes 2, A Practical Approach, Oxford University Press, chapter 12,313-327
 Kaufman (1992), "The Atlas of Mouse Development" Academic Press, London
 Liang et al. (1992), Science: 257: 967-971
 Liang et al. (1993), NAR: 21: 3269-3275
 Liang et al. (1995), Current opinions in Immunology: 7: 274-280
 Lucas et al. (1999), FASEBJ. 13,263-272
 Olson et al. (1996), Cell 5: 1-4
 Ono et al. (2000), J. Biol. Chem. 275: 31145-31154
 Papaioannou et al. (2000) in "Gene Targeting-A Practical Approach" ed. by Joyner 30
 Patapoutian et al. (2001), Curr. Opin. Neurobiol. 11 : 272-280
 Pham et al. (1996), PNAS 93: 13090-13095
 Rechsteiner et al. (1996), TIBS 21: 267-271
 Rossi et al. (2001), EMBO j. 20: 2844-2856
 Sabath et al. (2000), Biotechniques 5: 966-972
 Sadovnick et al. (2000), Clin. Genet. 58,431-435
 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning a laboratory manual (second edition).
 Sawcer et al. (1998), Curr. Opin. Immunol. 10,697-703
 Verma et al. (2001), J. Biol. Chem. 276: 4671-4676
 Wattel et al. (1993), Leuk. Res. 17: 921-926 40
 Weinshenker et al. (2000), Neurology, 54,542-544
 White et al. (2000), PNAS 97: 13967-13972
 Zipp (2000), Cell Tissue Res. 301,163-171

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 2 】

【 図 1 】 アポトーシスの際のラット S A R G - 1 遺伝子の誘導を証明する逆ノーザンブロット (reverse northern blot) を示す。プラスミド D N A をナイロン膜上にスポットし、そしてアポトーシス幹細胞から単離された放射線標識化 c D N A とハイブリダイズした。 S A R G - 1 の 5 ' 領域 (矢印) を含むプラスミドは、アポトーシス細胞に存在する c D N A のみとハイブリダイズする。自己再生細胞由来の対照 c D N A は、背景レベルしか 50

示さなかった（データは示さない）。

【図2】ラットの多様な組織のノーザンブロットを示す。342bpのSARG-1フラグメントを放射線標識し、そして異なるラットの組織から単離されたRNAとハイブリダイズした。およそ1.4Kbの種（species）が、偏在した組織分布で観察され、そして脳および心臓において最も高い発現が観察された。

【図3】マウスの胚組織のノーザンブロットを示す。342bpのSARG-1フラグメントを放射線標識し、そして胚発達の様々な段階から単離されたRNAとハイブリダイズした。1.4Kbの種の明らかな調節が、7日後に最高レベルで見られ、そして遺伝子産物の再発現は17日目に見られた。

【図4-1】ラット、マウスおよびヒトのSARG-1の全長cDNA配列を示す。 10

【図4-2】ラット、マウスおよびヒトのSARG-1の全長cDNA配列を示す。

【図5-1】ラット、マウスおよびヒト間の、SARG-1の全長cDNA配列の比較を示す。

【図5-2】ラット、マウスおよびヒト間の、SARG-1の全長cDNA配列の比較を示す。

【図6】推定アミノ酸配列に対応して、ラット、マウスおよびヒトのSARG-1の全長コード配列を示す。

【図7】ラット、マウスおよびヒト間の、SARG-1のDNAコード配列の比較を示す。

【図8】ラット、マウスおよびヒト間の、SARG-1のアミノ酸コード配列の比較を示す。 20

【図9】抗SARG-1ペプチド抗体による、マウス組織の免疫組織化学分析を示す。茶色の反応産物はSARG-1発現を示す。A：マウスの大脳皮質（倍率×40）、B：小脳（×40）、C：脊髄（×40）、D：末梢神経（×60）、E：心臓（×40）およびF：肺組織（×40）

【図10】pMH-SARG-1-HAでトランスフェクションされたMelJUSOメラノーマ細胞由来の細胞抽出物のウエスタンブロットにより検出されたSARG-1タンパク質を示す。抗HAモノクローナル抗体3F10は、28kDで移動する単一の種を検出した。

【図11】抗-HAモノクローナル抗体3F10によって検出されるpMH-SARG-1-HAでトランスフェクションされたMelJUSO細胞において、タンパク質の細胞質の局在性を証明する、ヒトSARG-1タンパク質の免疫組織化学分析を示す。 30

【図12】100nMのスタウロスポリン処理された、空のベクターまたはpIRES2-EGFP-SARG-1でトランスフェクションされたPC12培養物の生存率を示す。

【図13】24時間、100nMのスタウロスポリン処理された、空のベクターまたはpIRES2-EGFP-SARG-1でトランスフェクションされたPC12細胞のフローサイトメトリー分析を示す。アポトーシスの誘導を特徴付けるサブG₀/G₁ピークが、SARG-1過剰発現細胞においてのみ見られた。

【図14】空のベクターでトランスフェクションされた細胞（ ）と比較した際の、促進されたNGF-仲介末端分化（NGF-mediated terminal differentiation）を受けるSARG-1タンパク質を過剰発現するPC12細胞（黒四角）を示す。 40

【図15】家族性多発性硬化症における遺伝子変更を示す。ヌクレオチド67位のT Cの点突然変異は、アミノ酸23位のロイシンのフェニルアラニンへの置換を生じる。

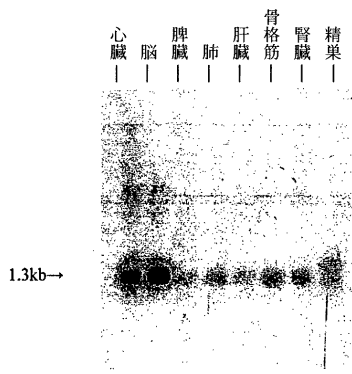
【図16】家族性多発性硬化症における遺伝子変更を示す。ヌクレオチド359位のC Tの点突然変異は、アミノ酸120位のフェニルアラニンのセリンへの置換を生じる。

【図17】家族性多発性硬化症における遺伝子変更を示す。ヌクレオチド89位のA Gの点突然変異は、アミノ酸30位のグリシンのグルタミン酸への置換を生じる。

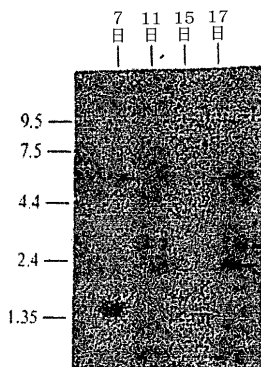
【図18】家族性多発性硬化症における遺伝子変更を示す。アミノ酸116と121との間のコドンの欠失は、セリン残基の消失を生じる。 50

【図19-1】SARG-1イントロン/エキソン構造を示す。
 【図19-2】SARG-1イントロン/エキソン構造を示す。

【図2】



【図3】

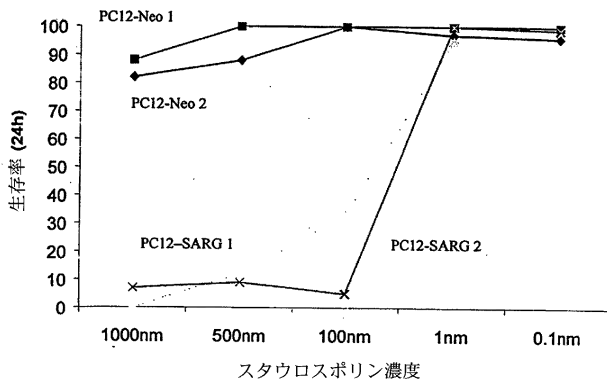


【図4-1】

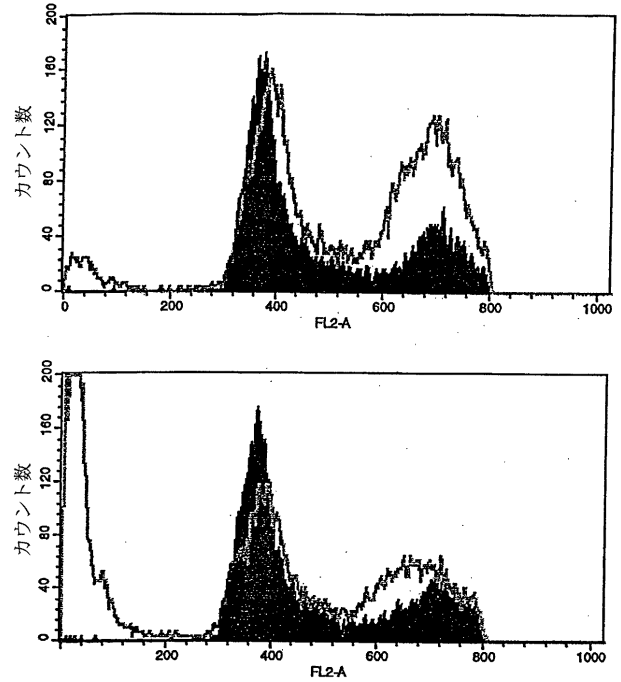
```

>rSARG, 1037 塩基
CCAGACTGGAAGCGAAGGCTGTGTGCTGGGATGCCAGCTGCCAGGGGG
TGCTTAAGCCTTGGCCCCCACTACTTTCTGTTTCAGCCCCACTTCTGTGC
GTGCTTACTCCATTACCCCCAGGGGCTGACATGGACCCAAATCCACGAG
CAGCCCTGGAGCGGCAGCAGCTGCGTCTCAGGGAGCGGAGAAGTTCTTC
GAGGACATTTACAGCCAGACAGAGTTTGTTCCTCCCTATCCCATCTI
GCATCTCGAGTCAAAAGACCCCCATAGGTAGCATCTCCTCGATGGAAG
TGAATGGACACACTGGAGCAGGTGAATTTATTGACCTTGGGATCAG
GATGGAGCAGATGTCTTACCTTGTGAGGATTCCTCCACTCCCACTCCCA
GAGGCTGTGAGTGGATGACACCCAGAGGCTGAGCCTCTGTGTACCCA
CCTTAGACAGGACCACTCCGGACTCTCTTGTCTTGAATCTCTTCCCTC
AACCTGGCAGCTCAAATCCNAGTGTGGGGAGGAGACCTCCCTTGGC
ACAGCTGACGAGGAGGATGGGCGGTGGAGGGGAGAACCTGGACCTT
GCAGCTAGCAGAGGCCCTTACAACTGAGCATCTGGGTCTTCCATG
GAGAGGAGACCTTAGGTCACACAGCACTCTGAGAAGACCTGACACTT
TACTTACATCAGCACCAGGGAGGAGGATGGTGGATGTTGCTGA
GAGTAGCCTCCCGCTTTACTGATAACGCTGCTGCTGCCACGCCCC
ACAGTGCTTTCTTCTGAGGTAGGACTTCCAGTGAGACTCTCGAAGTGA
GGTGGACAAAGTGCACCTGTTTCTTACTCCCTCTGCCCCCAATGA
TCCTGTAGTCTCCACTAGTCTCCTAAGCCAGTGTCTCTGAGGGAAGTT
CTGAGGAGTTCACCTTTGAGTATCTGCTGCTATAAGTCTTCTGCGG
AACGGATATGGTATAATAATAATAATACTGTACC
>hSARG, 1029 塩基
CCAGACCGAAGCAGGCTGTGTGCTGGGATCCACGCCGCGGCTGCTC
CTPCCACGCCGCCGCGCGCTGTGCGGAGCCACCCAGGAGCCAGC
GGGGCGCGGCGCTGACAGGGCTGACATGGACCCAAATCCGAGAGCACC
CTGGAGCGCCAAAGCTGCGGCTCCGGAGAGGCGAGAAGTTCTTGGGA
CATTTTACAGCCAGAGACAGAGTTTGTCTCCCTCTGCCATCTGCACC
TGGAGTCAAAAGACCCCCATAGGTAGCATCTGCTATGGAAGTGAAT
GTGGACACACTGGAGCAAGTGGATTTATGATCTGGGATCAGGATGG
AGCAGATGTGTCTTGCCTTGTGAGGAGTCTCGCCAGCTCCCCAGATGT
CTGGAGTGGATGACCATCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGGTACCCAGGCT
GACAGGACCATCCCGGACTCTCTTGTGCTGACTCTCCAACTCC
GCCAGTCCAAATCCAACTGATGGGAGGAGCACTCCCTTGGCCACAGT
CTGATGAGAGGAGCGGGATGACGGAGGCGAGGCTGACCTCGAGC
TAGCAGTGGGCTCGTACAGACTGACCAGCCGCTGTCTCCATGGAAA
GGAGACCTAGGCCAGAGGCTGGAGAAGACCTGACACTTCCCTACT
TCAGACCAAAGGAGGAGGATGGGATGGTGTGCTGAGAGTTAGC
CTCCCTGCTTTACCGTAACTGCTGCTGCCACGCCCCACAGTGTCT
TTTCTCTGAGGTAGGACTTCCAAGTGAGACTTGAAGGTGAGGTGGGAC
AAGACGAGCTGCTTTTACTGCTCCCTGCTGCCCCAGATGATCTGTG
TCTTCCAGAGTCTCTAAGCCAGTGTCTCTGAGGGATGTTCTGAGGA
GTTCCACTTCCAGTATCTGCTCTATAAGTCTTTTGGGACAGGAT
ATGGTATAATAATAATAATAATAATACC
>hSARG, 1082 塩基
CCAGGCGGAGCCGCGGCCCACTGTTGGATGCTGGCTGCACTGGGGC
GCCCAAGCCAGGTCCCTCTGCTCTCTTTGACTTTCAGCTGTAC
TTGTTTGTCTCTACCCCGAGGAGCTGACATGGACCCAAATCCCTGGG
CGCCCTGGAGCGCCAGCAGCTCCGCTTCCGGAGCGGCAAAATCTTC
GAGGACATTTACAGCCAGACAGAGTTTGTCTTCTCTGCTCCATCT
GCATCTCGATCGCAGAGACCCCCATAGGTAGTATCTCATCCATGGAAG
TGAATGTGGACACACTGGAGCAAGTGAACCTATTGACCTTGGGACCCG
GATCGAGCAGATGTGTTCTTGCCTTGGGAAGATCTCCACCAACCCCA
GTCCTTGGGGTGGACCACTTGGAGGAGCTGAGCCTCCGCGTGCCTA
CATCAGACAGGACCACTTAGGACCTCTCTCTCTCTCTCTCGACTCC
TCCACCAACTGCA?AGCCCAAATCCAAGTATGATGAGCAGATACGCC
CTTGGCACAGTGGATGAGAGGAGGAAAGGCTGATGGAGGGCCAGGAC
CTGGAGCTTGGCTTGGCTTGGCTGGCCCTCCCTACAGCTGACACGCTG
GCTATCTCCATGAGGACACAGGCCACCCAGGCTGCTGGGAGAA
ACCAGACTTTTACTTGCAGTAGGACCAAGGAGTGGGAAGGATGTTGGGA
TTGTGACTTTCTAAGAAATTAACCTCTCTGCTTTACTGCTAATTTT
TCTGCTGCAACCTCCACAGTTTTGGCTTACTCTGAGATAGTAT
  
```

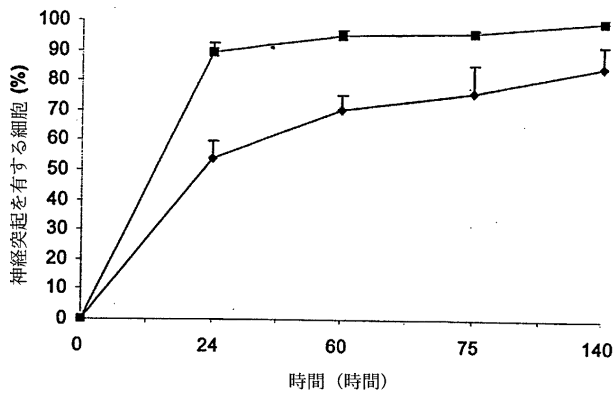

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

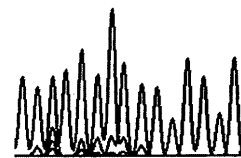


【 図 1 5 】

家族性多発性硬化症患者におけるコード配列のヌクレオチド67位のt→cの点突然変異。アミノ酸23位のフェニルアラニン (F) のロイシン (L) への置換。

21 22 23 24 25
K F L E D

AAA|TTC|CTC|GAG|GAC



野生型 1 MDPNPRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPPPIGSISSMEVND 60
 変異 1 MDPNPRALERQQLRLRERQKFFLEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPPPIGSISSMEVND 60

野生型 61 TLEQVELIDLGGPDAADVFLPCEDPPPTQSSGVDNHLLEELSLPVPTSDRRTSRITSSSSS 120
 変異 61 TLEQVELIDLGGPDAADVFLPCEDPPPTQSSGVDNHLLEELSLPVPTSDRRTSRITSSSSS 119

野生型 121 SDSSTNLHSFNPSDDGADTFLAQSDDEEEERGDDGGAEPGACS 161
 変異 120 SDSSTNLHSFNPSDDGADTFLAQSDDEEEERGDDGGAEPGACS 160

【 図 19 - 2 】

ACGTCCTGTCAGGGTAGGTGATATAATCTCTATTTTATAAGCAGGAAATT
 AGGCTCAGAGAAGTTAAGTCACATTGTAGCCAGAAGGTAGATAAACTGGA
 ATTCAATGTCCTGCTGACTCCAAAGCCATATGCTTAACCTGTAAAGATAGA
 TATTCTTTTAATTAATACTGCTACTATTTATTGTAGGGCTTACTATGCCAG
 ACATTTTATAAGCATTCTTAGGTTTATTCOCAAACCCTTTGGGGATGT
 AGGTATCCCTTTTATTTTCAGAGGAGGAACAGAGTCTTGAAGGGAAA
 GTGACTGCTCAAAGCCACTCAGCAGCAATAAGTGATGTAGGTGGAACTT
 GAACTCTTGCCATTCAATGACCTGACTGTAGATCCOAGACATGGTGTAAAT
 GACGTGGAAGGAGCTGGCAGTCAGGAGATGGTGTACTTAATCCTGGCTCT
 TTGCTGGATTGGCAAAGTCACTTTGGACAAGTCTCTGCCCACTGTGGAC
 TTTAGTTACTCCTGGCCAGATAATCTTTAAGAGTTCTCTGAAGCCCTGTT
 TGTGGCCTGACCAGCTTTTCTCTCTGGGCAG

エキソン3

+276

GGTGGACAACCATTTGGAGGAGCTGAGCCTGCCGTACATCAGACAGGACCAATCTAGG
 ACCTCCTCCTCCTCCTCCGACTCCTCCACCAACTGCATAGCCCAATCCAAAGTATGATGG
 AGCAGATAAGCCCTTGGCACAGTCGGATGAAGAGGAGAAAGGGTGTGGAGGGCAGAGCTG
 GAGCCTGCAGCTAG

+485

CAGTGGGCCCTGCCCTACAGACTGACCAGCTGGCTATTTCTCCATGAGACCACAGGCCAGCC
 AGAGCCTGTGGGAGAAGACCAGACTCTTTACTTGCAGTAGGCACCAGAGGTGGGAAGGATGGTG
 GGATTGTGTACCTTTCTAAGAATTAACCT
 CTCTGCTTTACTGCTAATTTTCTGCTGCAACCTCCCAACAGTTT
 TGGCTTACTCCTGAGATATGATTTGCAATGAGGAGAGAGAAGATGAGGT
 TGGACAAGATGCCACTGCTTTTCTTAGCACTCTTCCCTCCCTAAACCAT
 CCGTAGTCTCTAATACAGTCTCTCAGACAGTGTCTCTAGATGGATGT
 GAACTCCTTAACCTCATCAAGTAAGTGGTACTCAAGCCATGCTGCCCTCT
 TACATCCTTTTGGAAACAGAGCACGGTATAATAATAAATAATAATAATA
 ATGCC

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/001212 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
 (21) International Application Number: PCT/EP02/06820
 (22) International Filing Date: 20 June 2002 (20.06.2002)
 (25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English
 (30) Priority Data: 60/299,765 22 June 2001 (22.06.2001) US
 (71) Applicants and
 (72) Inventors: JANSEN, Burkhard [AT/AT]; Laudongasse 69/39, A-1080 Wien (AT); LUCAS, Trevor [GB/AT]; Kirchstettnergasse 3/9, A-1160 Wien (AT).
 (74) Agents: SONN, Helmut et al., Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).
 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DI, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PG, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
 Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
 For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/001212 A2

(54) Title: A METHOD FOR DIAGNOSING A PERSON HAVING MULTIPLE SCLEROSIS

(57) Abstract: Described is a method for diagnosing a person having multiple sclerosis (MS) or being at risk of developing MS, comprising the following steps: - providing a sample of a body fluid or tissue from said person, said sample containing at least one of the wild type SCL/Apoptosis-Response Gene- (wt-SARG-1-) protein and nucleic acids encoding wt-SARG-1, if taken from a person not having MS or a risk of acquiring MS; - detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample and diagnosing MS or a risk of acquiring MS, if wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 are not present in said sample.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 1 -

A method for diagnosing a person having multiple sclerosis

The invention relates to a method for diagnosing a person having multiple sclerosis (MS) or being at risk of developing MS. Further, the invention relates to a method for diagnosing a person having cancer or being at risk of acquiring cancer.

Multiple sclerosis (MS) is a common demyelinating disease of the central nervous system (CNS) affecting up to 0.1% of the north European caucasian population and is considered an auto-immune syndrome directed against unidentified central nervous tissue antigens. The determination of susceptibility to MS development is complex and governed by both environmental and genetic factors (Ebers et al, 1995; Sawcer and Goodfellow, 1998; Sadovnick et al, 2000) with approximately 20% of patients having one or more affected relatives (Chataway et al, 1998). Although thought to be a polygenetic disease, candidate gene approaches have been adopted to isolate genes linked to MS (Weinshenker and Kantarci, 2000). Association with the caucasian haplotype DRB*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 (Haines et al, 1998) and a point mutation in the protein tyrosine phosphatase receptor-type C (Jacobsen et al, 2000) have been linked to some cases. Recently, the importance of apoptosis in both T cell elimination and damage to neurons and oligodendrocytes in MS have been recognised (reviewed in Zipp, 2000).

However, to date no clear marker has been reported, although at least a portion of MS cases are clearly familial inherited. A mere recognition of MS or even providing a risk association would be very beneficial for early onset of therapy or preventive measures.

It is therefore an object of the present invention to provide an efficient diagnosis system for MS giving a clear indication and a clear correlation to this disease.

The subject matter of the invention is therefore a method for diagnosing a person having multiple sclerosis (MS) or being at risk of developing MS, characterised by the following steps:

- providing a sample of a body fluid or a tissue from said per-

CONFIRMATION COPY

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 2 -

- son, said sample containing at least one of the wild type SCF-Apoptosis-Response Gene 1-(wt-SARG-1-) protein and nucleic acids encoding wt-SARG-1, if taken from a person not having MS or a risk of acquiring MS,
- detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample and
 - diagnosing MS or a risk of acquiring MS, if wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 are not present in said sample.

Surprisingly, SARG-1 protein turned out to be a very specific marker for MS. Persons having either mutated SARG-1 protein or not expressing any SARG-1 protein due to mutations in SARG-1, have a clearly enhanced risk of MS. Investigations on the immunohistochemical localisation of SARG-1 protein indicated that this protein is located in the grey and white matter of the CNS. The role of SARG-1 in apoptotic induction prompted a candidate gene approach to analyse the mutational status of SARG-1 in cases of familial MS. Indeed, DNA from 20 unrelated familial MS patients was examined by PCR amplification and DNA-sequencing of the SARG-1 locus and compared to SARG-1 sequences from healthy controls. It was found that all control samples demonstrated wild-type SARG-1 genomic sequences whereas in DNA from MS patients only 6 from 20 DNA samples were even able to be amplified by PCR, i.e. 14 from 20 did not show any detectable SARG-1 signals. In 4 of the 6 other patients genetic alterations were seen. A T → C point mutation at nucleotide 67 resulting in a substitution of phenylalanine with leucine at amino acid 23 (numbering of amino acids and nucleotides according to Figures 4-8); a C → T point mutation at nucleotide 359 resulting in the substitution of phenylalanine for serine at amino acid 120 (Fig.16), A → G point mutation a nucleotide 89 resulting in the substitution of glycine for glutamic acid at amino acid 30 (Fig. 17), deletion of a codon between amino acid 116 and 121 resulting in the loss of a serine residue (Fig.18). Sequencing of only 20 control DNA samples revealed only wild-type sequence.

Surprisingly, it was also observed that changes in wild type SARG-1 or SARG-1 protein was seen in several cancer cells. In sequence analysis of over 30 cancer cells, a G residue is always

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 3 -

present at position 280 resulting in a leucine residue at position 94 instead of a valine (A nucleotide) or methionine (T nucleotide). In a human melanoma cell line two mutations in SARG-1 are found: A → G point mutation at nucleotide 74 resulting in the substitution of aspartic acid for glycine and a C → T point mutation at nucleotide 289 resulting in the substitution of histidine for thymosine at amino acid 97.

There is a number of restriction sites involved in these mutations: T → C at nucleotide 67 creates a number of restriction sites: Eco88I, XhoI, PaeR7I, Sfr274I, Ama781I, BcoI, BsoBI, AvaI; C → T at nucleotide 359 creates an additional BseRI restriction-site.

Therefore, a further object of the present invention relates to a method for diagnosing a person having cancer or being at risk of acquiring cancer, characterised by the following steps:

- providing a sample of a body fluid or tissue from said person, said sample containing at least one of the wt SARG-1 protein and nucleic acids encoding wt-SARG-1, if taken from a person not having cancer or being at risk of acquiring cancer,
- detecting the presence of wt-SARG-1 protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample and
- diagnosing cancer or a risk of acquiring cancer, if wt-SARG-1 protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 are not present in said sample.

The source of the sample is always dependent on the nature of the cancer or disease to be diagnosed. Especially preferred samples according to the present invention are derived from human blood, plasma, serum, lymph, nerve-cell containing tissue, cerebrospinal fluid, all biopsy-material, including tumor tissue, bone marrow, nervous tissue, skin, hair, tears, fetal material including amniocentesis material, uterine tissue, saliva, faeces, sperm, etc.

In principle, any method for detecting the presence of wt-SARG-1 protein or nucleic acid encoding wt-SARG-1 in the sample may be applied according to the present invention. Preferably methods are applied which allow also a characterisation of specific SARG-1 mutants if present, either by giving the information that a mu-

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 4 -

tant is present or by analysing the nature of the mutant form in detail.

Especially detecting the presence of point mutations may be preferred within the present invention, i.e. non-wt-forms of SARG-1 differing from wt-SARG-1 or wt-SARG-1 protein in one nucleic acid residue, or one amino acid residue, respectively. The method according to the present invention may be designed to identify those point mutations, especially point mutations leading to the different amino acid sequence, e.g. exchange of one amino acid residue from the wild type SARG-1 protein.

Suitable methods for detecting the presence of wt-SARG-1 protein or nucleic acids encoding are known in the art, preferably nucleic acids encoding wt-SARG-1 are detected by nucleic acid amplification methods, especially polymerase chain reaction methods, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, restriction analysis, microarray technology, proteomics, etc. These methods have been shown as being fast, highly reliable and easily conductable on a high throughput basis. Those tests could be performed on standard tissue or body fluid samples, such as blood, hair or saliva.

On the other hand, preferred methods for detecting the presence of wt-SARG-1 protein encompass the application of a wt-SARG-1 protein antibody, especially a monoclonal antibody, e.g. in a ELISA-format. Such antibodies may be easily produced on an industrial scale with a high degree of standardisation potential.

The method according to the present invention is especially suited to be applied within a screening test format.

The SARG-1 intron/exon structure is given in Fig. 19. The transcription start site initiator consensus YYCARR is underlined. Donor (GU) and acceptor (AG) splice sites are underlined in italics; exons are in bold type. Coding exon sequences are in italic. SARG-1 is located on human chromosome 20q12-13.12.

The present invention also relates to a further aspect, to a nucleic acid molecule comprising a sequence according to

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 5 -

Seq.ID.No.1 (Fig. 4) encoding human wild-type SARG-1. Such nucleic acids may be used for diagnosis but also for therapeutic aspects by providing therapeutic molecules or gene sequences for gene therapy aspects, e.g. by antisense strategies, design of small molecule drugs.

The present invention also encompasses nucleic acid molecules comprising a sequence according to Seq.ID.No.1, wherein one nucleic acid residue is exchanged by a different nucleic acid residue (e.g. T is replaced by C, G or A) wherein said exchange preferably results in a different SARG-1-protein amino acid sequence.

Especially preferred exchanges are selected from a T to C exchange at position 67 of Seq.ID.No.1, an A to G exchange at position 74 of Seq.ID.No.1, an A to G exchange at position 89 of Seq.ID.No.1, a C to T exchange at position 289 of Seq.ID.No.1 and a C to T exchange at position 359 of Seq.ID.No.1. These exchanges relate to exchanges already observed in MS patients or cancer cells. Further exchanges resulting in a viable phenotype are also preferred.

Other preferred mutations in the nucleic acid molecule according to the present invention comprises a deletion in the coding region, preferably a deletion of one or more codons (e.g. 3 nucleic acids, or 6, 9, 12, etc.). One of these mutations leads to the deletion of a codon between amino acids 116 and 121, resulting in the loss of a serine residue (Fig. 19). Mutations leading to non-functional SARG-1 on SARG-1 protein may also be located in the controlling regions (5' or 3') and/or in the sequences, especially at critical positions for correct splicing.

When the nucleic acid molecule according to the present invention is used for a diagnostic purpose, it is not necessary to use the whole sequence. For use as a probe or performing a method according to the present invention a fragment of Seq.ID.No.1, preferably having a length of at least 12, more preferred at least 15, especially at least 20, nucleic acid residues is suitable for performing various tests, especially diagnostic tests with these probes, e.g. as a probe to identify or isolate nucleic acid sam-

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 6 -

ples or even chromosomal samples or as PCR primers, etc.

The nucleic acid molecules according to the present invention are not restricted to the coding sequence according to Seq.ID.No.1, but also relate to the genomic counterparts including the whole-exon/intron-structure of this gene, especially also imitations in the non-coding region resulting in non-wild type forms of the protein (or non-translated forms of the protein) are encompassed by the present invention.

The present invention also relates to a polypeptide being encoded by this nucleic acid molecule, e.g. comprising an amino acid sequence according to Seq.ID.No.2. There is single potential N-glycosylation site with consensus Asn-X-Ser/Thr (amino acid residues 131-133)

```
MDPNPRAALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPFIGSISSEMEVNVDTLEQV
ELIDLGDPAADVFLPCEDPPPTPQSSGVDNHLEELSLPVPTSDRRTTSRTSSSSSSDSSSTNLHSP
NPSDDGADTFLAQSDEEEERDGGAEFGACS
```

All threonine and serine residues may be O-glycosylated. Computer predictions indicate high likelihood of glycosylation of serine residues 91, 108, 113, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124 and 133 and the threonine residues 88, 107, 111, 112, 115 and 125.

Similarly, all threonine and serine residues may be phosphorylated. Computer predictions indicate high likelihood of phosphorylation of serine residues 54, 92, 108, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 123, 124, 129, 133 and 144 and the threonine residues 61, 88, 107, 112 and 139.

No signal sequences, characteristic domains or other 3-dimensional structures have been detected other than potential protein kinase recognition sites. Of course, also amino acid sequences also having an amino acid residue exchange or a deletion are also encompassed by the present invention.

Amino acid residue exchanges of the polypeptide according to the present invention are preferably selected from amino acid residues Phe23, Asp25, Glu30, His97 and Ser120, especially Phe23 to Leu 23, Asp25, to Gly25, Glu30 to Gly30, His97 to Tyr97 and

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 7 -

Ser120 to Phe120 exchanges.

The present invention provides SARG-1 mutant forms as specific markers for (acute) myeloid leukaemia or other leukaemia subtypes as described hereinafter. Deletions of the SARG-1 gene may be partial or full to serve as marker. Diagnostic tests for screening for the presence or absence of such a marker are easily conceivable and reduced to practice by the skilled man in the art.

Preferred polypeptides according to the present invention are recombinantly produced which exhibit structural differences compared to wt-SARG-1 protein, e.g. differential glycosylation, especially non-homogeneous glycosylation.

The present invention also relates to a method for making an antibody preparation comprising administering a polypeptide according to the present invention to an animal, allowing said animal to generate antibodies against said polypeptide, extracting antibody-containing body fluids or tissue from said animal and preparing an antibody preparation against said polypeptide from said body fluids or tissue. This method is especially applicable for making polyclonal antibodies.

For making monoclonal antibodies a method for making such an antibody preparation is preferred, comprising administering a polypeptide according to the present invention to an animal, allowing said animal to generate antibodies against said polypeptide, removing the spleen of said animal, preparing fusion cells of said spleen cells with suitable hybridoma generating cells, generating hybridoma cells producing monoclonal antibodies against said polypeptide, cloning and culturing said hybridoma cells, thereby expressing monoclonal antibodies, and preparation of said monoclonal antibodies. The skilled man in the art thereby relies on methods readily available for such purposes and e.g. described in "Antibodies: A laboratory manual" by Ed Harlow, Cold Spring Harbor Laboratory; David Lane, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, 1988. Of course, also phage display peptides may also easily be generated.

The present also relates to a kit for performing the in vitro di-

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 8 -

agnosing method according to the present invention which comprises at least means for detecting the presence of wt-SARG-1 protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1. The skilled man in the art can envisage the basis of the disclosure of the present application a wide number of suitable alternatives, e.g. anti-wt-SARG-1 protein antibodies, nucleic acid probes selectively binding to wt-SARG-1, nucleic acid primers defining a region being selective for a wt-SARG-1, a chip comprising said nucleic acid probes or said nucleic acid primers. Other preferred means or assays are assays in which proteins bind to SARG-1 such as antibodies or peptides including mutation specific antibodies, ELISAS, Western Blotting assays, flow cytometry assays and assays using immunohistochemical techniques including confocal microscopy.

A further aspect of the present invention relates to a transgenic non-human animal model of the present invention, especially an animal wherein the SARG-1 gene has been mutated or knocked out. A SARG-1 knock out mouse is especially preferred. Methods for providing such models, especially the mouse models, are readily available to the skilled man in the art. Such an animal model is extremely useful in studying genetic variations and mutations of SARG-1, especially with respect to its MS-related disorders.

The term "transgenic" is used herein to describe genetic material that has been or is about to be artificially inserted into the genome of a mammalian cell, particularly a mammalian cell of a living animal. The transgene is used to transform a cell, meaning that a permanent or transient genetic change, preferably a permanent genetic change, is induced in a cell following incorporation of exogenous DNA. A permanent genetic change is generally achieved by introduction of the DNA into the genome of the cell. Vectors for stable integration include plasmids, retroviruses and other animal viruses, YACs, and the like. Of interest are transgenic mammals, e.g. cows, pigs, goats, horses, etc., and particularly rodents, e.g. rats, mice, etc.

Transgenic animals comprise an exogenous nucleic acid sequence present as an extrachromosomal element or stably integrated in all or a portion of its cells, especially in germ cells. Unless otherwise indicated, it will be assumed that a transgenic animal

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 9 -

comprises stable changes to the germline sequence. During the initial construction of the animal, "chimeras" or "chimeric animals" are generated, in which only a subset of cells have the altered genome. Chimeras are primarily used for breeding purposes in order to generate the desired transgenic animal. Animals having a heterozygous alteration are generated by breeding of chimeras. Male and female heterozygotes are typically bred to generate homozygous animals.

Transgenic animals fall into two groups, colloquially termed "knockouts" and "knockins". In the present invention, knockouts have a partial or complete loss of function in one or both alleles of the endogenous SARG-1. Knockins have an introduced transgene with altered genetic sequence and function from the endogenous gene. The two may be combined, such that the naturally occurring gene is disabled, and an altered form introduced.

In a knockout, preferably the target gene expression is undetectable or insignificant. A knock-out of a SARG-1 means that function of the SARG-1 protein has been substantially decreased so that expression is not detectable or only present at insignificant levels or mutated according to the teachings according to the present invention to perform as suitable model for the situation in humans as described herein. This may be achieved by a variety of mechanisms, including introduction of a mutation or disruption of the coding sequence, e.g. insertion of one or more stop codons, insertion of a DNA fragment, etc., deletion of coding sequence, substitution of stop codons for coding sequence, etc. In some cases the exogenous transgene sequences are ultimately deleted from the genome, leaving a net change to the native sequence. Different approaches may be used to achieve the "knock-out". A chromosomal deletion of all or part of the native gene may be induced, including deletions of the non-coding regions, particularly the promoter region, 3' regulatory sequences, enhancers, or deletions of genes that activate expression of SARG-1. A functional knock-out may also be achieved by the introduction of an anti-sense construct that blocks expression of the native genes (for example, see Li and Cohen (1996) Cell 85:319-329). "Knock-outs" also include conditional knock-outs, for example where alteration of the target gene occurs upon exposure of

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 10 -

the animal to a substance that promotes target gene alteration, introduction of an enzyme that promotes recombination at the target gene site (e.g. Cre in the Cre-lox system), or other method for directing the target gene alteration postnatally.

A "knock-in" of a target gene means an alteration in a host cell genome that results in altered expression or function of the native SARG-1. Increased (including ectopic) or decreased expression may be achieved by introduction of an additional copy of the target gene, or by operatively inserting a regulatory sequence that provides for enhanced expression of an endogenous copy of the target gene. These changes may be constitutive or conditional, i.e. dependent on the presence of an activator or represser.

The exogenous gene is usually either from a different species than the animal host, or is otherwise altered in its coding or non-coding sequence. The introduced gene may be a wild-type gene, naturally occurring polymorphism or mutation, or a genetically manipulated sequence, for example having deletions, substitutions or insertions in the coding or non-coding regions. The introduced sequence may encode wild-type human or animal SARG-1 protein or a mutation thereof, or may utilize the SARG-1 promoter operably linked to a reporter gene. Where the introduced gene is a coding sequence, it is usually operably linked to a promoter, which may be constitutive or inducible, and other regulatory sequences required for expression in the host animal. By "operably linked" is meant that a DNA sequence and a regulatory sequence(s) are connected in such a way as to permit gene expression when the appropriate molecules, e.g. transcriptional activator proteins, are bound to the regulatory sequence(s).

Specific constructs of interest, include, but are not limited to anti-sense SARG-1, which will block native SARG-1 expression, expression of dominant negative SARG-1 mutations, and over-expression of a SARG-1. A detectable marker, such as lac Z may be introduced into the locus, where upregulation of expression will result in an easily detected change in phenotype. Constructs utilizing the SARG-1 promoter region, in combination with a reporter gene or with the coding region are also of interest.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 11 -

A series of small deletions and/or substitutions may be made in the SARG-1 to determine the role of different exons in DNA binding, transcriptional regulation, etc. By providing expression of SARG-1 protein in cells in which it is otherwise not normally produced, one can induce changes in cell behavior.

DNA constructs for homologous recombination will comprise at least a portion of the SARG-1 with the desired genetic modification, and will include regions of homology to the target locus. DNA constructs for random integration need not include regions of homology to mediate recombination. Conveniently, markers for positive and negative selection are included. Methods for generating cells having targeted gene modifications through homologous recombination are known in the art. For various techniques for transfecting mammalian cells, see Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537.

For embryonic stem (ES) cells, an ES cell line may be employed, or embryonic cells may be obtained freshly from a host, e.g. mouse, rat, guinea pig, etc. Such cells are grown on an appropriate fibroblast-feeder layer or grown in the presence of appropriate growth factors, such as leukemia inhibiting factor (LIF). When ES cells have been transformed, they may be used to produce transgenic animals. After transformation, the cells are plated onto a feeder layer in an appropriate medium. Cells containing the construct may be detected by employing a selective medium. After sufficient time for colonies to grow, they are picked and analyzed for the occurrence of homologous recombination or integration of the construct. Those colonies that are positive may then be used for embryo manipulation and blastocyst injection. Blastocysts are obtained from 4 to 6 week old superovulated females. The ES cells are trypsinized, and the modified cells are injected into the blastocoel of the blastocyst. After injection, the blastocysts are returned to each uterine horn of pseudopregnant females. Females are then allowed to go to term and the resulting litters screened for mutant cells having the construct. By providing for a different phenotype of the blastocyst and the ES cells, chimeric progeny can be readily detected.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 12 -

The chimeric animals are screened for the presence of the modified gene and males and females having the modification are mated to produce homozygous progeny. If the gene alterations cause lethality at some point in development, tissues or organs can be maintained as allogeneic or congenic grafts or transplants, or in in vitro culture.

Binding partners of human SARG-1 include protein-O-mannosyltransferase 1 (POMT1), microtubule-associated protein 1 A (MAP1A), ATPase, Na⁺/K⁺ transporting beta 1 polypeptide (ATP1B1), SWI/SNF complex 60 KDa subunit (BAF60c) alpha-Actinin 2, exon 16, rab GDP dissociation inhibitor 1 (GDI1) and proteasome 26 S subunit, ATPase 3 (PSMC3).

It is a further aspect of the present invention to use SARG-1 binding proteins for modulating activity of SARG-1 proteins (including mutants) and vice versa. Moreover, SARG-1 (wild type) or SARG-1 binding proteins may be used for treating MS or cancer, preferably myeloproliferative disorders, polycythaemia, myelodysplasia and myeloid leukaemia, especially acute myeloid leukaemia, by administering an effective amount of SARG-1 or SARG-1 binding protein (or a complex thereof) to an MS or cancer patient. Instead of wt-SARG-1 protein, also fragments of SARG-1 may be used which are suitable for advantageous treatment of such patient (e.g. fragments binding to the SARG-1 binding proteins). Minimum requirements for such fragments are easily found by the skilled man in the art especially using the mouse models described herein.

The method is further described by the examples and drawing figures, without being restricted thereto.

Fig. 1 shows reverse northern blot demonstrating induction of the rat SARG-1 gene during apoptosis. Plasmid DNA was spotted onto nylon membranes and hybridised with radiolabelled cDNA isolated from apoptotic stem cells. Plasmids containing the 5' region of SARG-1 (arrowed) hybridise with cDNA only present in apoptotic cells. Control cDNA from self-renewing cells showed only background levels (data not shown).

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 13 -

Fig. 2 shows rat multiple tissue northern blot. The 342bp SARG-1 fragment was radiolabelled and hybridised with RNA isolated from different rat tissues. A species of approximately 1.4Kb is observed with an ubiquitous tissue distribution and highest expression in brain and heart.

Fig. 3 shows mouse embryonic tissue northern blot. The 342bp SARG-1 fragment was radiolabelled and hybridised with RNA isolated from various stages of embryonic development. Clear regulation of a 1.4Kb species is seen with highest levels after 7 days and re-expression of the gene product on day 17.

Fig. 4 shows full length rat mouse and human SARG-1 cDNA sequences.

Fig. 5 shows comparisons between full length rat mouse and human SARG-1 cDNA sequences.

Fig. 6 shows full length rat, mouse and human SARG-1 coding sequences with corresponding predicted amino acid sequence.

Fig. 7 shows comparison between the rat, mouse and human SARG-1 DNA coding sequences.

Fig. 8 shows comparison between the rat, mouse and human SARG-1 amino acid coding sequences.

Fig. 9 shows immunohistochemical analysis of mouse tissue with anti-SARG-1 peptide antibodies. A brown reaction product indicates SARG-1 expression. A: Mouse cerebral cortex (magnification x40), B: Cerebellum (x40), C: Spinal chord (x40), D: Peripheral nerve (x60), E: Heart (x40) and F: Lung tissue (x40).

Fig. 10 shows SARG-1 protein detected by western blotting of cellular extracts from MelJUSO melanoma cells transfected with pMH-SARG-1-HA. Anti-HA monoclonal antibody 3F10 detected a single species which migrates at 28kD.

Fig. 11 shows immunohistochemical analysis of human SARG-1 protein in MELjuso cells transfected with pMH-SARG-1-HA detected by

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 14 -

the anti-HA monoclonal antibody 3F10 demonstrating cytoplasmatic localisation of the protein.

Fig. 12 shows viability of PC12 cultures transfected with empty vector or pIRES2-EGFP-SARG-1 treated with 100nM staurosporine.

Fig. 13 shows flow cytometrical analysis of PC12 cells transfected with empty vector or pIRES2-EGFP-SARG-1 treated with 100nM staurosporine for 24h. A sub G₀/G₁ peak characteristic for the induction of apoptosis is seen only in SARG-1 over-expressing cells.

Fig. 14 shows PC12 cells that overexpress SARG-1 protein (■) undergo accelerated NGF-mediated terminal differentiation when compared to cells transfected with empty vector (◆).

Fig. 15 shows genetic alteration in familial multiple sclerosis. A T → C point mutation at nucleotide 67 resulting in the substitution of leucine for phenylalanine amino acid 23.

Fig. 16 shows genetic alteration in familial multiple sclerosis. A C → T point mutation at nucleotide 359 resulting in the substitution of phenylalanine for serine at amino acid 120.

Fig. 17 shows genetic alteration in familial multiple sclerosis. An A → G point mutation at nucleotide 89 resulting in the substitution of glycine for glutamic acid at amino acid 30.

Fig. 18 shows genetic alteration in familial multiple sclerosis. Deletion of a codon between amino acids 116 and 121 resulting in the loss of a serine residue.

Fig. 19 shows the SARG-1 intron/exon structure.

Examples :

Identification of a novel SCF-Apoptosis-Response-Gene (SARG-1) induced during stem cell apoptosis

Withdrawal of growth factor from SCF dependent myelomonocytic

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 15 -

progenitors results in rapid induction of cell cycle-independent apoptosis. Although over 95% of SCF-deprived cultures exclude vital dyes 12 hours after growth factor withdrawal, no proliferative response is seen on restimulation with SCF after this time point. A differential display screen was conducted to examine immediate-early (four hour) mRNA expression differences during the processes of myelomonocytic stem cell self-renewal and apoptosis induced by growth factor withdrawal. Amplification of approximately 1/3 of all cellular mRNA species by differential display PCR (Liang and Pardee 1992, 1995; Liang et al, 1993) with defined primer (Bauer et al, 1993) sets (Display systems) identified one fragment induced during apoptosis not present in self-renewing precursors. Following gel excision of this band and TA cloning into the pCR³II vector (Invitrogen) of reamplificants, specific expression induction was confirmed in a reverse northern procedure with representative dot blotted plasmid preparations hybridised with radiolabelled cDNA isolated prepared from independent cultures (Fig.1). All positively identified differentially regulated clones were sequenced and found to contain an identical 342 base pair insert (excluding the downstream and upstream differential display primer pairs).

Molecular weight of SARG-1 cDNA and tissue expression. Regulation during embryonic development

Radioactive labelling of the 342bp fragment discovered above and probing of multiple tissue northern blots (Clontech) showed an approximately 1300bp length for the mature mRNA in rat, mouse and human tissues. An ubiquitous low expression was seen with highest expression levels in brain and heart (Fig.2). Northern blots of immobilised mRNA isolated from different stages of murine embryonic development probed with the radioactively labelled 342bp fragment demonstrated regulation of SARG-1 mRNA during development with highest levels after 7 days and re-expression of the gene product on day 17 (Fig.3).

Cloning of full length rat, murine and human SARG-1.

Additional SARG-1 sequence information was obtained by a 5' rapid amplification of cDNA ends polymerase chain reaction (RACE) pro-

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 16 -

cedure from adapter ligated rat brain Marathon-ready cDNA (Clontech). A primer was constructed at the 3' proximal end of the 342bp sequence and the PCR product cloned into the pCR® TA cloning vector (Invitrogen) and sequenced. The full length SARG-1 1062bp gene transcript was sequenced and has a 479bp open reading frame which encodes a 158 amino acid protein. Murine SARG-1 was isolated by screening a bacterial artificial chromosome bank derived from mouse strain 129SvJ with the full length rat SARG-1 cDNA. Homologous clones were isolated and a Xho I fragment sequenced. Mature murine SARG-1 RNA was then identified by PCR from mouse brain cDNA. Human SARG-1 was isolated from a phage bank of brain cDNA by homology to the full length rat sequence and sequenced. The full human SARG-1 locus was amplified by PCR with primers spanning the SARG-1 cDNA from chromosomal DNA isolated from the peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers. The full length sequences of rat, mouse and human SARG-1 are shown in Figs. 4, 5 and 6.

The Homologies between rat, mouse and human sequences

Rat and mouse SARG-1 are 93% at the nucleic acid and 96% homologous at the predicted protein levels, respectively. Human SARG-1 displays 83% and 84% homologies to mouse and rat SARG-1 at the nucleic acid level and 84% and 86% homologies at the predicted protein levels, respectively (Figs. 7 and 8), and is localised to the long arms of chromosome 20 (at 20q13.12 (Deloukas et al., 2001)), deletion of which are a common occurrence in a wide range of myeloproliferative disorders (Wattel et al, 1993 and Bench et al., 2000). Sequences contain a potential PEST region (Rechsteiner et al. 1996) (+), a single conserved potential N-glycosylation site (#) and three conservers PKC(\$) and casein kinase II (*) phosphorylation sites (see Fig. 5B).

Analysis of SARG-1 distribution with anti-SARG-1 antibodies

SARG-1 antibodies were prepared by immunising chickens with a peptides (MDPNPRAALERQQLR and DEEEERGDGGAEPGA) corresponding to the first 15 amino acids and to the c-terminal part of mouse, rat and human SARG-1 coupled to keyhole limpet hemocyanin. IgY was

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 17 -

prepared from egg yolks and specific antibody prepared by affinity chromatography with column-immobilised peptide.

In immunohistochemical analysis of 5mm acetone-fixed sections of mouse tissue, specific anti-SARG-1 IgY antibodies visualised with anti-IgY peroxidase conjugated second step antibodies, detected wide expression of the SARG-1 protein in nervous tissue. SARG-1 staining is seen throughout the cerebral cortex (Fig.9A) and within the granular, Purkinje and molecular cell layers of the cerebellum (Fig.9B). In the spinal chord, SARG-1 is expressed in both the gray matter neurophil containing nerve cell bodies, dendrites, glial cells and blood vessels and the white matter consisting largely of myelinated nerve tracts (Fig.9C). SARG-1 expression is also colocalised to occasional peripheral nerve processes (Fig.9D). SARG-1 is also ubiquitously expressed in cardiac muscle, (Fig.9E), lung ciliated epithelia (Fig.9F) and epithelial cells of the ileum and colon (data not shown). Staining of mouse embryonic tissue demonstrated strong staining of neural tissue, brain, heart, placenta, uterus, the organ of corti, the dermis (stratum granulosum) and lining of the gut (data not shown).

Generation of SARG-1 over-expressing cells

The MelJUSO melanoma cell line was maintained in Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and an antibiotic-antimycotic mix containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin B (all from GibcoBRL) in a fully humidified air atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. The human SARG-1 coding sequence (hSARG-1₃₆₆) was cloned into the pMH expression vector (Roche) by standard molecular biology procedures (Sanbrook et al, 1989) under the control of a CMV promoter in frame with a c-terminal hemagglutinin (HA) peptide sequence. Semi-confluent cultures in 6 well plates were transfected with this vector (pMH-SARG-1-HA) or empty vector in the presence of Fugene (Roche) and clones isolated which displayed resistance to neomycin.

To examine the expression and function of SARG-1 in a neural cell culture system, standard molecular biology techniques (Sanbrook

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 18 -

et al, 1989) were used to clone the rat SARG-1 coding sequence (rSARG-1₄₇₉) into the pIRESII-EGFP eukaryotic expression vector (Clontech) under the control of a CMV promoter which bicistronically translates through an internal IRES sequence both SARG-1₄₇₉ and enhanced green fluorescent protein. The rat pheochromocytoma PC12 cell line was maintained in DMEM supplemented with 8% horse serum, 8% fetal calf serum and an antibiotic-antimycotic mix containing 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.25 µg/ml amphotericin B (all from GibcoBRL) in a fully humidified air atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Semi-confluent cultures in 6-well plates were transfected with pIRES2-EGFP-SARG-1 or empty vector for 18 h in the presence of the uptake enhancing cationic lipid mix pFxl (Invitrogen) at a 6:1 lipid to DNA ratio in serum-free Opti-MEM (Gibco). Stable transfectant colonies were picked from separate wells after selection in 800 mg/ml geneticin (Gibco) and clones with similar EGFP fluorescence expanded from independent transfections.

Post translational modification of mature rat and human proteins

The molecular weights of rat, mouse and human SARG-1 protein predicted from the amino acid sequences are 17186.52, 17193.52 and 17492.76, respectively. IgY antibodies against SARG-1 detect a 28kD species in western blotting expressed at low levels in native PC12 cells. Upon transfection of pIRES2-EGFP-SARG-1 into these cells, expression levels of this species increase. The molecular weight of human SARG-1 protein was determined by western blotting of cellular extracts from MelJUSO melanoma cells transfected with pMH-SARG-1-HA. Anti-HA monoclonal antibody 3F10 (Roche) detected a single species which migrates at 28kD (Fig.10).

Subcellular localisation of transfected SARG-1 protein

Immunohistochemical staining of SARG-1 transfected PC12 cells demonstrated an exclusive cytoplasmatic localisation for the SARG-1 gene product. Immunohistochemical analysis with anti-HA monoclonal antibody 3F10 also demonstrated an exclusive cytoplasmatic localisation for the SARG-1 protein (Fig.11) primarily colocalising with expression of binding protein (bip) used as

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 19 -

marker for the endoplasmatic reticulum. Co-localisation of HA-SARG-1 with the golgi-specific antigen coat protein (b-cop) is minimal. In contrast, SARG-1 expression partly overlaps with expression of the lysosomal specific protein LAMP-2.

Role of SARG-1 in apoptosis and differentiation of neural cell cultures

Treatment of PC12 cells with the protein kinase inhibitor staurosporine induces neurite outgrowth at concentrations of 100nM (Hashimoto and Hagino, 1989) and apoptosis at concentrations above 1mM (Fu et al, 1999). SARG-1 over-expressing PC12 cells undergo a rapid loss in viability on treatment with 100nM staurosporine (Calbiochem) in comparison to vector control cultures (Fig.12) which undergo neurite outgrowth. Cell death in SARG-1 over-expressing PC12 cultures is accompanied by cell shrinkage, development of a morphology characteristic of programmed cell death and loss of DNA from ethanol fixed cells in flow cytometrical cell cycle analyses (Fig.13) characteristic of the apoptotic process (Fraker et al, 1995). No similar effects are seen with the staurosporine analogue K252a (Alexis), the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors LY-294002 (Alexis) or Wortmannin (Calbiochem), the MAP kinase kinase inhibitor PD 98059 (Alexis) or the protein kinase C inhibitor Bisindolylmaleimide I (Alexis). Over-expression of SARG-1 also enhances terminal differentiation of PC12 cells induced by nerve growth factor (Fig.14).

Isolation of SARG-1 binding proteins

Yeast two hybrid screening are performable with the commercially available Matchmaker system from Clontech. The bait plasmid is constructed by cloning the full length hSARG-1 coding sequence into the pGBKT7 shuttle vector (Clontech) by PCR using the BamH1 and EcoR1 restriction sites using standard methods (shuttle vector pGBKT7: The coding region of hSARG-1 is cloned as a c-terminal fusion to amino acids 1-147 of the GAL4 DNA binding domain (DNA-BD) containing a c-myc tag under the control of the yeast ADH1 promoter (P) by PCR amplification using the EcoR1 and BamH1 restriction sites and selected in yeast using the TRP1 nutri-

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 20 -

tional marker). This construct is then used to lithium acetate transform the MATa yeast strain AH109 which is auxotrophic for adenine (Ade⁻), histidine (His⁻), leucine (Leu⁻) and tryptophan (Trp⁻) and selected for pGBKT7 by growth on synthetic dropout (SD)-Trp medium. A human brain matchmaker library (Clontech) directionally constructed in pACT2 pretransformed in the MAT α Y187 (Ade⁻, His⁻, Leu⁻ and Trp⁻) yeast strain is purchased and at least 3x10⁶ clones mated with AH109 transformed hSARG-1-1 (shuttle vector pACT2: Human brain library inserts are directionally cloned in frame as c-terminal fusions to amino acids 768-881 of the GAL4 activation domain, the SV40 T-antigen nuclear localization sequence and a HA epitope tag under the control of the yeast ADHI promoter (P) and selected in yeast using the LEU2 nutritional marker). Zygotes are isolated by Leu⁻ and Trp⁻ selection and protein interactions simultaneously by reporter gene activation of HIS3, ADE2, and MEL1 on -His, -Ade plates containing X- α -Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-a-D-galactopyranoside), respectively. Positive colonies are restreaked and additionally tested for lacZ reporter activation with β -galactosidase. The inserts from positive colonies are amplified by PCR, repeats identified by restriction digestion and positive interactors identified by short run sequencing from the adapter end of the insert. The identity of potential interactors are ascertained by FASTA and BLAST searches against non-redundant and expressed sequence tag data bases at the national centre for biotechnology information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) and European bioinformatics institute (www.ebi.ac.uk/fasta33/) interfaces, respectively, to identify characterized proteins cloned in frame with the GAL4 activation domain. Single pACT2 plasmids are then recovered by transformation of E. coli under ampicillin selection and positive interactions retested by cotransformation of AH109 with pGBKT7-SARG-1 and pACT2 containing the library insert selected by blue colony growth on -Ade, -His, -Leu, -Trp, X- α -gal plates. Bait and library genes are cloned into appropriate c-myc and HA epitope tagged eukaryotic expression vectors and interactions further confirmed by Western blotting of coimmunoprecipitated proteins either translated in vitro or from transiently cotransfected HEK 293 cells. The latter also allows colocalization experiments by confocal microscopical analysis following cloning and isolation of full length coding sequences. The cellular co-expression of interaction partners with SARG-1 is examined

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 21 -

by either staining of sequential embryological slides generated with antibodies where available or by in situ hybridization of identified sequences. The identification of known binding partners enables the development of antisense or RNAi strategies to specifically reduce target expression or allows the use of specific functional inhibitors to further characterise the phenotypic changes seen in PC-12 apoptosis and differentiation. Binding partner identification also identifies the biochemical pathways which are influenced by SARG-1 expression which may also be specifically inhibited. Knockout models for identified binding partners may be crossed with the SARG-1 deficient mouse.

Pitfall analysis

A relevant tissue is analysed where SARG-1 is highly expressed and plays a role in differentiation and apoptosis in a cell line model. Human gene banks are analysed to enable rapid identification of known RNA sequences. The SARG-1 sequence contains no cytoplasmic localization signals which could reduce transcriptional activation. Transfection of SARG-1 is not directly toxic to PC-12 or MelJuso cells and is therefore unlikely to be toxic in yeast. The matchmaker system uses multiple reporter genes with different promoter constructs to eliminate artefacts and has been used to isolate a number of binding partners (Corset et al, 2000; Galiegue et al, 1999; Ono et al, 2000; White et al, 2000). A eukaryotic cell line (HEK293) which allows efficient transient co-transfection of vector constructs is used to allow rapid screening of putative binding partners.

In a yeast two-hybrid analysis using the human SARG-1 protein as a bait to screen a human brain cDNA bank the following binding partners were isolated:

- 1: Homo sapiens protein-O-mannosyltransferase 1 (POMT1), (LC2)mRNA: (gi:12734916)
- 2: Homo sapiens microtubule-associated protein 1A (MAP1A), mRNA (XM_012387)
- 3: Homo sapiens ATPase, Na+/K+transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1, mRNA (gi:4502276)
- 4: Human SWI/SNF complex 60 KDa subunit (BAF60c) mRNA (gi:

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 22 -

1549246)

5: Homo sapiens ACTN2 gene for alpha-Actinin 2, exon 16 (gi:6448557)

6: Homo sapiens rab GDP dissociation inhibitor 1 (GDI1), mRNA (gi:4503970)

7: Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3 (PSMC3), mRNA (gi: 4506210)

Of these binding proteins, especially the ATPase beta 1 polypeptide is of specific interest for use as a pharmaceutical target with respect to the binding to SARG-1.

Generation of a conditional SARG-1 knockout mouse

Effective homologous recombination between vector construct and chromosomal target sequences is normally achieved by a species specific region of homology of 7kb with at least 2kb of homologous material adjacent to the drug resistance cassette (Johnson et al., 1995). The murine SARG-1 locus has been fully amplified by PCR (2420bp) and sequencing demonstrated the presence of 3 introns.

For construction of the replacement vector, approximately 2.5kb of additional non-coding chromosomal sequence information flanking the SARG-1 locus are obtained in the 129SvJ mouse. To this end, a radiolabelled SARG-1 cDNA sequence or a PCR product of the entire mSARG-1 locus is used to screen a 129SvJ mouse bacterial artificial chromosome (BAC) library (Incyte genomics) with an average insert size of 120kb or a 129SvJ mouse genomic library constructed in Lambda FIX[®] II phage (Stratagene) with insert sizes of 9 to 23kb, by standard methods. Following clone or phage isolation, genomic sequences flanking the coding region (approximately 2.5kb) is characterized by either direct sequencing of isolated clones with primers internal to the SARG-1 coding region, sequencing of cloned restriction fragments bearing SARG-1 sequences or by inverse PCR. The sequence information obtained is used to design PCR primers to insert 129SvJ mSARG-1 genomic sequences into the conditional/hypomorphic pDELBOY-3X targeting vector (Rossi et al, 2001). This vector incorporates features

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 23 -

that overcomes problems potentially associated with gene deletion. Artifacts phenotypes are generated in knockout mice due to the transcriptional activity of the neomycin cassette which can lead to disrupted regulation and splicing of the target locus and neighbouring genes (Pham et al, 1996; Olson et al, 1996). The neomycin cassette in the pDELBOY-3X vector is flanked by flip recombinase (frrt) sites which permit efficient excision of the selection cassette in vitro and in vivo. Transient transfection of cells stably transfected with pDELBOY-3X with a vector expressing Flp recombinase leads to excision of the neomycin cassette.

Recently developed tools such as Flp recombinase-GFP fusion protein vectors, for example, allow enrichment of Flp-mediated recombination events in vitro by fluorescence activated cell sorting (Sabath et al., 2000). Conversely, crossing mice with the 129SvJ FLPper deleter mouse ubiquitously expressing enhanced FLP allows excision of the neomycin cassette in vivo. In addition, cloning of SARG-1 coding sequences between the loxP sites in the pDELBOY-3X vector permits generation of a null allele either in vitro by transfection with cre recombinase expressing plasmids or in vivo by crossing mice generated with animals expressing cre recombinase in a tissue specific manner. This strategy eliminates problems associated with heterozygote embryonic lethality and allows the precise tissue specific analysis of protein function. Knockout mice are generated by standard procedures (Papaioannou and Johnson, 2000; Gu et al, 1993). Briefly, embryonic stem cells (ES) are transfected by electroporation with linearized pDELBOY-3X-SARG-1 and homologous recombination events selected by neomycin/gancyclovir treatment and clones screened by PCR or southern blotting with a radiolabelled probe external to the targeting sequences. Blastocytes are isolated from 3.5 day pregnant mice, injected with ES clones and reimplanted in pseudopregnant mice. Following coat colour selection of chimeras, founder animals are mated with normal 129SvJ mice to produce a breeding line. Homozygotes are subsequently be obtained by inter-breeding. The phenotype of mice are screened by standard procedures. Analysis of histological sections prepared from embryonic and adult tissue, magnetic resonance imaging analysis combined with cell death assays such as TdT-mediated dUTP-X nick end labelling (TUNEL) provides direct evidence of the role of SARG-1 in differentiation

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 24 -

and apoptosis, respectively, during development. Cellular analysis includes hematopoietic stem cell characterisation (colony forming assays, flow cytometrical analysis for cluster of differentiation antigens) and apoptotic response measurements in neural culture systems.

Pitfall analysis

As described above, the pDELBOY-3X vector eliminates artefacts produced by transcription from the neomycin cassette and overcomes the problems of heterozygote embryonic lethality. Screening is also aided by the availability of animals which have a single mutation in the c-kit gene. Identification of SARG-1 binding partners for which knockout mice exist allows breeding with SARG-1 deficient mice to further clarify phenotype.

Cellular localization

Balb/c mice are mated and embryos isolated at 7, 11 (Theiler's stages 10-19), 14 and 17 days and snap frozen in liquid Nitrogen. 5µm transverse and sagittal consecutive sections are made on a cryostat and frozen until required. SARG-1 expression is analysed by standard immunohistochemical analysis on sections with anti-SARG-1 IgY which detects acetone-fixed mSARG-1. Expression patterns are identified by reference to standard embryological texts (Kaufman, 1992) and the mouse atlas and gene expression database project (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>). Expression patterns in 17 days embryos are additionally correlated with those seen in adult murine tissue. Following identification of SARG-1 binding partners, co-expression studies are performed either by immunohistochemistry if antibodies are available or in situ hybridisation.

Subcellular localization and biochemical characterization of epitope tagged SARG-1

The cytoplasmic, vesicular subcellular localization of SARG-1 is determined by double staining of HEK293, Me1Juso or PC-12 cells stably transfected with epitope-tagged SARG-1. The HA tag is stained with rat monoclonal anti HA mAb and visualised with a biotinylated monoclonal anti-isotype mAb followed by fluorochrome

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 25 -

conjugated streptavidin (FITC, S, phycoerythrin or cy5). Organelle localized antigens are detected with antibodies to Bip/GRP78 (endoplasmic reticulum), β -cop (Golgi complex), Lamp-1 (lysosomes) and Ab-2 (mitochondria) either conjugated directly or by the use of second step antibodies and analysed on a Zeiss laser scan microscope. Cloned and native SARG-1 (predicted mass 17Kd) migrates at 28Kd in SDS-PAGE. Glycosylation of HA-tagged SARG-1 is initially investigated by immunoprecipitation on an anti-HA matrix and detection of glycosylated residues by periodate oxidation, incorporation of biotin hydrazide and detection with streptavidin conjugated alkaline phosphatase on western blots. N- and O-specific enzymatic deglycosylation reactions are performed with PNGase F and O-Glycosidase (Bio-Rad), respectively, and the molecular weight of SARG-1 monitored by western blotting. The SARG-1 sequence contains consensus protein kinase C and casein kinase II sites which are known to phosphorylate apoptotic regulators (Verma et al, 2001). The phenotypical differences seen between Trk activation by NGF which leads to PKC activation (Patapoutian et al., 2001) and treatment with the protein kinase inhibitor staurosporine in PC-12 possibly suggesting regulation of SARG-1 function by phosphorylation. To examine possible SARG-1 phosphorylation, immunoprecipitated SARG-1 is probed with polyclonal antibodies against phosphothreonine and phosphoserine in Western blotting analysis and compared to phosphatase-treated protein. Mutant SARG-1 eukaryotic expression plasmids are then generated by site directed mutagenesis to delete potential casein kinase II phosphorylation sites and used to transfect PC-12 cells to monitor the effects of the protein kinase inhibitor staurosporine.

Analysis of Mutation in MS Samples

The immunohistochemical localisation of SARG-1 protein to the grey and white matter of the CNS and the role of SARG-1 in apoptotic induction prompted a candidate gene approach to analyse the mutational status of SARG-1 in cases of familial MS. The DNA from twenty unrelated familial multiple sclerosis patients was examined by PCR amplification of the SARG-1 locus and DNA sequencing and compared to SARG-1 sequences from healthy controls. All control samples demonstrated wild type SARG-1 genomic sequences. From MS patients, only 6 from 20 DNA samples were able to be am-

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 26 -

plified by PCR. Primer sets used spanned the whole coding region, intron 2/exon 3, and primer pairs specific for exons 1, 2 and 3. Control GAPDH primers were positive for all samples. In 6/20 samples that produced a PCR product, amplicants were TA cloned into the PCR[®]II vector (Invitrogen) and sequenced. In 4/6 patients, genetic alterations were seen. A T → C point mutation at nucleotide 67 resulting in the substitution of phenylalanine for leucine amino acid 23 (Fig 16). A C → T point mutation at nucleotide 359 resulting in the substitution of phenylalanine for serine at amino acid 120 (Fig 17). An A → G point mutation at nucleotide 89 resulting in the substitution of glycine for glutamic acid at amino acid 30 (Fig 18). Deletion of a codon between amino acids 116 and 121 resulting in the loss of a serine residue (Fig 19). Sequencing of over 20 control DNA samples revealed only wild type sequence.

Polymorphisms and Other Mutations

In sequence analysis of over 30 cancer cell lines, a polymorphism in the human sequence at nucleotide 280 (coding sequence) results in either valine (g residue; shown), methionine (a) or leucine (t) residues at position 94 of the amino acid sequence. In a human melanoma cell line, two mutations in SARG-1 are found: an A → G point mutation at nucleotide 74 resulting in the substitution of aspartic acid for glycine and a C → T point mutation at nucleotide 289 resulting in the substitution of histidine for tyrosine at amino acid 97. Such SARG-1 mutations therefore are suitable markers for human melanomas.

TABLE

67	T → C	=	F → L	23
74	A → G	=	E → G	25
89	A → G	=	E → G	30
289	C → T	=	H → Y	97
359	C → T	=	S → F	120
Δ		=	S	116-121

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 27 -

References

- Bauer et al. (1993), NAR: 21: 4272-4280
- Bench et al. (2000), Oncogene 19, 3902-3913
- Chataway et al. (1998), Brain 121, 1869-1887
- Corset et al. (2000), Nature 407: 747-750
- Deloukas et al. (2001), Nature 414: 865-871
- Ebers et al. (1995), Nature 377, 150-151
- Fraker, in "Cell death", edited by Schwartz et al., Methods in Cell Biology, Vol 46, Academic press, San Diego, CA pp57-76
- Fu et al. (1999), J. Biol.Chem. 274, 7264-7271
- Galiegue et al. (1999), J.Biol.Chem. 274: 2938-2952
- Gu et al. (1993), Cell 73: 1155-1164
- Haines et al. (1998) Hum.Mol.Genet. 7, 1229-1234
- Hashimoto et al. (1989), Exp. Cell Res., 184, 351-359
- Jacobson et al. (2000) Nature Genetics, 26, 495-499
- Johnson et al. (1995), Gene Probes 2, A Practical Approach, Oxford University Press, chapter 12, 313-327
- Kaufman (1992), "The Atlas of Mouse Development" Academic Press, London
- Liang et al. (1992), Science: 257: 967-971
- Liang et al. (1993), NAR: 21: 3269-3275
- Liang et al. (1995), Current opinions in Immunology: 7: 274-280

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 28 -

- Lucas et al. (1999), *FASEB J.* 13, 263-272
- Olson et al. (1996), *Cell* 5: 1-4
- Ono et al. (2000), *J. Biol.Chem.* 275: 31145-31154
- Papaoannou et al. (2000) in "Gene Targeting - A Practical Approach" ed. by Joyner
- Patapoutian et al. (2001), *Curr. Opin. Neurobiol.*11: 272-280
- Pham et al. (1996), *PNAS* 93: 13090-13095
- Rechsteiner et al. (1996), *TIBS* 21: 267-271
- Rossi et al. (2001), *EMBO j.* 20: 2844-2856
- Sabath et al. (2000), *Biotechniques* 5: 966-972
- Sadovnick et al. (2000), *Clin. Genet.* 58, 431-435
- Sambrock et al. (1989), *Molecular cloning a laboratory manual* (second edition).
- Sawcer et al. (1998), *Curr. Opin. Immunol.* 10, 697-703
- Verma et al. (2001), *J. Biol.Chem.* 276: 4671-4676
- Wattel et al. (1993), *Leuk. Res.* 17: 921-926
- Weinshenker et al. (2000), *Neurology*, 54, 542-544
- White et al. (2000), *PNAS* 97: 13967-13972
- Zipp (2000), *Cell Tissue Res.* 301, 163-171

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 29 -

Claims:

1. Method for diagnosing a person having multiple sclerosis (MS) or being at risk of developing MS, comprising the following steps:
 - providing a sample of a body fluid or tissue from said person, said sample containing at least one of the wild type SCF-Apoptosis-Response Gene- (wt-SARG-1-) protein and nucleic acids encoding wt-SARG-1, if taken from a person not having MS or a risk of acquiring MS, comprising
 - detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample and
 - diagnosing MS or a risk of acquiring MS, if wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 are not present in said sample.
2. Method according to claim 1, wherein said sample is derived from human blood, plasma, serum, lymph, nerve-cell containing tissue, cerebrospinal fluid, all biopsy-material, including tumor tissue, bone marrow, nervous tissue, skin, hair, tears, fetal material including amniocentesis material, uterine tissue, saliva, faeces or sperm.
3. Method according to claims 1 or 2, wherein said detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample further comprises detecting the presence of a non-wt-form of SARG-1 or SARG-1-protein.
4. Method according to claim 3, wherein non-wt-form of SARG-1 differs from wt-SARG-1 or wt-SARG-1-protein in one nucleic acid residue or amino acid residue, respectively.
5. Method according to any one of claims 1 to 4, wherein nucleic acids encoding wt-SARG-1 are detected by a method selected from the group consisting of a nucleic acid amplification method, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, restriction analysis, microarray technology, proteomics, etc.
6. Method according to claim 5, wherein said nucleic acid amplification method is a polymerase chain reaction method.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 30 -

7. Method according to any one of claims 1 to 6, wherein said wt-SARG-1-protein is detected using a wt-SARG-1-protein antibody, especially a monoclonal antibody.
8. Method according to any one of claims 1 to 7, wherein said detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 is performed within a screening test.
9. Method for diagnosing a person having cancer or being at risk of acquiring cancer, comprising the following steps:
- providing a sample of a body fluid or tissue from said person, said sample containing at least one of the wild type SCF-Apoptosis-Response Gene- (wt-SARG-1-) protein and nucleic acids encoding wt-SARG-1, if taken from a person not having cancer or being at risk of acquiring cancer, comprising
- detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample and
diagnosing cancer or a risk of acquiring cancer, if wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 are not present in said sample.
10. Method according to claim 9, wherein said sample is derived from human blood, plasma, serum, lymph, nerve-cell containing tissue, cerebrospinal fluid, all biopsy-material, including tumor tissue, bone marrow, nervous tissue, skin, hair, tears, fetal material including amniocentesis material, uterine tissue, saliva, faeces or sperm.
11. Method according to 9 or 10, wherein said detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample further comprises detecting the presence of a non-wt-form of SARG-1 or SARG-1-protein.
12. Method according to claim 11, wherein non-wt-form of SARG-1 differs from wt-SARG-1 or wt-SARG-1-protein in one nucleic acid residue or amino acid residue, respectively.
13. Method according to any one of claims 9 to 12, wherein nucleic acids encoding wt-SARG-1 are detected by a method selected

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 31 -

from the group consisting of a nucleic acid amplification method, polymerase chain reaction methods, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, restriction analysis, microarray technology or proteomics.

14. Method according to any one of claims 9 to 13, wherein said wt-SARG-1-protein is detected using a wt-SARG-1-protein antibody, especially a monoclonal antibody.

15. Method according to any one of claims 9 to 14, wherein said detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 is performed within a screening test.

16. Nucleic acid molecule comprising a sequence according to Seq.ID.No.1.

17. Nucleic acid molecule comprising a sequence according to Seq.ID.No.1, wherein one nucleic acid residue is exchanged by a different nucleic acid residue, preferably said exchange results in a different SARG-1-protein amino acid sequence.

18. Nucleic acid molecule according to claim 17, wherein the exchange is selected from a T to C exchange at position 67 of Seq.ID.No.1, a A to G exchange at position 74 of Seq.ID.No.1, a A to G exchange at position 89 of Seq.ID.No.1, a C to T exchange at position 289 of Seq.ID.No.1 and a C to T exchange at position 359 of Seq.ID.No.1.

19. Nucleic acid molecule according to claim 16, wherein it comprises a deletion in the coding region, said deletion being preferably 3 nucleic acid residues long.

20. Nucleic acid probe for performing a method according to claim 1 or 9 comprising a fragment of a nucleic acid selected from Seq.ID.No.1 and a mutated form thereof, said fragment having a length of at least 12, preferably at least 15, especially at least 20, nucleic acid residues.

21. Polypeptide comprising an amino acid sequence according to Seq.ID.No. 2.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 32 -

22. Polypeptide comprising an amino acid sequence according to Seq.ID.No. 2, wherein one amino acid residue is exchanged or deleted.
23. Polypeptide according to claim 22, wherein said exchange is selected from Phe23 to Leu23, Asp25 to Gly25, Glu30 to Gly30, His97 to Tyr97 and Ser120 to Phe120.
24. Method for making an antibody preparation comprising administering a polypeptide selected from the group consisting of a polypeptide comprising an amino acid sequence according to Seq.ID.No.2 or a mutated form thereof, to an animal, allowing said animal to generate antibodies against said polypeptide, extracting antibody-containing body fluids or tissue from said animal and preparing an antibody preparation against said polypeptide from said body fluids or tissue.
25. Method for making an antibody preparation comprising administering a polypeptide selected from the group consisting of a polypeptide comprising an amino acid sequence according to Seq.ID.No.2 or a mutated form thereof, to an animal, allowing said animal to generate antibodies against said polypeptide, removing the spleen of said animal, preparing fusion cells of said spleen with suitable hybridoma generating cells, generating hybridoma cells producing monoclonal antibodies against said polypeptide, cloning and culturing said hybridoma cells, thereby expressing monoclonal antibodies, and preparation of said monoclonal antibodies.
26. Kit for performing the method according to claim 1 or 9, comprising means for detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1.
27. Kit according to claim 26, wherein said means are selected from anti-wt-SARG-1-protein antibodies, nucleic acid probes selectively binding to wt-SARG-1, nucleic acid primers defining a region being selective for wt-SARG-1, a chip comprising said nucleic acid probes or said nucleic acid primers, or assays in which proteins bind to SARG-1.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 33 -

28. Kit according to claim 27, wherein said assays in which proteins bind to SARG-1 are selected from assays using antibodies or peptides including mutation specific antibodies, ELISAS, Western Blotting assays, flow cytometry assays and assays using immunohistochemical techniques including confocal microscopy.
29. A transgenic non-human animal comprising a mutated or deleted SARG-1, wherein said mutated or deleted SARG-1 has been introduced into the genome of said animal and stably integrated therein by recombinant nucleic acid techniques.
30. A transgenic non-human animal according to claim 29, wherein said introduction has been performed in an embryonic stem cell of said animal.
31. A transgenic non-human animal according to claim 30, wherein said animal is a mouse.
32. Use of a SARG-1 binding protein to modulate activity of SARG-1 or SARG-1 mutants.
33. Use of SARG-1 or fragments thereof to modulate activity of SARG-1 binding proteins.
34. Use of a SARG-1 binding protein for the preparation of a medicine to treat or prevent multiple sclerosis.
35. Use of SARG-1 or a fragment thereof for the preparation of a medicine to treat or prevent multiple sclerosis.
36. Use of a SARG-1 binding protein for the preparation of a medicine to treat or prevent cancer, preferably myeloproliferative disorders, polycythaemia, myelodysplasia and myeloid leukaemia, especially acute myeloid leukaemia.
37. Use of SARG-1 or a fragment thereof for the preparation of a medicine to treat or prevent cancer, preferably myeloproliferative disorders, polycythaemia, myelodysplasia and myeloid leukaemia, especially acute myeloid leukaemia.

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 34 -

38. Use according to claims 32 to 34 and 36, characterised in that said SARG-1 binding proteins are selected from the group consisting of protein-O-mannosyltransferase 1 (POMT1), microtubule-associated protein 1 A (MAP1A), ATPase, Na⁺/K⁺ transporting beta 1 polypeptide (ATP1B1), SWI/SNF complex 60 kDa subunit (BAF60c) alpha-Actinin 2, exon 16, rab GDP dissociation inhibitor 1 (GDI1) and proteasome 26 S subunit, ATPase 3 (PSMC3).

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

1/24

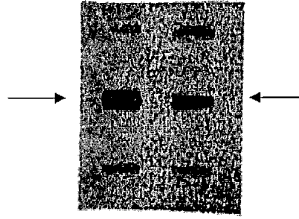


FIG.1

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

2/24

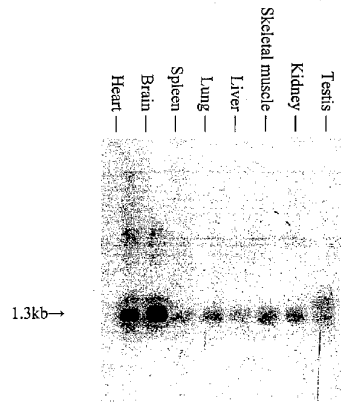


FIG.2

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

3/24

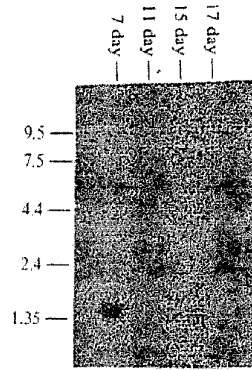


FIG.3

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

4/24

```

>rSARG, 1037 bases
CCAGACTGGAAGCGAAGGCTGTGTTGCTGGGATGCCAGCTGCCGAGGGGC
TGCTTAAGCCCTGGCCCCACTACTTCTGTTTCAGCCCCACTTCTGTGC
GTGCTTACTCCATACCCCCAGGGCTGACATGGACCCAAATCCACGAG
CAGCCCTGGAGCGGCAGCAGCTCCGCTCAGGGAGCGCCAGAAGTCTTC
GAGGACATTTACAGCCAGAGACAGAGTTTGTTTTCCCCCTATCCCATCT
GCATCTGAGTACAAAGACCCCCATAGGTAGCATCTCTCGATGGAAG
TGAATGTGGACACACTGGAGCAGTGGAAATTTATGACCTTGGGATCAG
GATGGAGCAGATGTCTTACCTTGTGAGGATTCCTTCCAACTCCCA
GAGGCTGTGAGTGGATGACCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGGTACCCA
CCTCAGACAGGACACATCCCGGACCTCTCTTGTCTCTGACTCCTCC
AACCTGGCAGTCCAAATCAAAGTATGGGGAGGAGCACTCCCTTGGC
ACAGTCTGACGAGGAGATGGGACGGTGGGAGGGCAGAACCTGGACCTT
GCAGTAGCAGAGGGCCCTTACAACTGAGCGATCTGGCTGTTCTCCATG
GAGAGGAGACCTTAGTCCACAGAGCACTGGAGAGACCTGACACTT
TACTTACATCAGCACCAGGGAGGAAAGGATGGTGGATGTTGCTCGA
GAGTTAGCCTCCCGCTTACTGATAACGGCTGTCTGTGCCACGCCCC
ACAGTGCTTTCTTCTGAGGTAGGACTTCAAAGTGGAGCTCTCGAAGTGA
GGTGGACAAGATGCCACTGTTTCTTACTCCCTCTGCCCCCAATGA
TCTGTAGTCTCCACTAGTCTCTAAGCCAGTGTCTGAGGAAAGAT
CTGAGGAGTCCACTTGCAGTTATCCTGCTCTATAAGTCTTCTGGG
AACAGGATATGGTATAAATAAATAAATAACTGTACC

>mSARG, 1029 bases
CCAGACCGAAGCGAAGGCTGTGTTGCTGGGATCCACCGCGGGCTGCTC
CTCCACGCCCCCGCGCTTGTGGGAGCGCACCCAGGGAGCCAGC
GGGGCGGGCGCTGCAGGGCTGACATGSAACCAATCCGAGAGCAGCC
CTGGAGCGCAACAGCTGCGCTCGGAGAGCCAGAGTCTCTTGAAGH
CTTTTACAGCCAGACAGAGTTTCTTCCCTTCCCTCTGACTGAGCC
TGGAGTACAAAGACCCCCATAGGTAGCATCTCTTATGAGACTGAT
GTGGACACTTGGAGCACTGGAGTTTATGATCTGGGATCAGATGG
AGCAGATCTTCTTGCCTTGTGAGGACTCCCGCAGCTCCCAAGATGT
CTGAGTGGATGACCATCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGGTACCCACTCT
GACAGGACCATCCCGGACCTCTCTTGTCTCTGACTCTCCAACT
GCCCACTCCAAATCCAAATGATGGGGAGGAGCACTCCCTTGGCAGT
CTGATGAGGAGGCGGGATGACCGAGGGCAGAGCTGGACCTTGCAGC
TAGCAGTGGCTCTGACAGACTGACCAACCGGCTGTCTCCATGGAAA
GGGACCTAGGCCAGCAGAGCTGGAGAGACTGACACTTTCCTTACT
TCAGCACCAAGGGAGGAAAGGATGGTGGATGGTGTGCTGAGAGTAGC
CTCCCTGCTTACCGTAAAGCTATCTGCTGCCACGCCCCACAGTCT
TTCTTCTGAGGTAGGACTCCAAAGTGAAGTGGAGGTGAGCTGGAC
AAGACCGAGTCTTCTTGTCTTCTGCTCCCTGCCCCCAGATCTCTGTG
TCTTCCACAGATCTCTAAGCCAGTGTCTGAGGGGATGTTCTGAGGA
GTTCCACTTCCAGTATCTGCTCTCTATAAGTCTTTTGGAAACAGGAT
ATGGTATAAATAAATAAATAAATAAATACC

>hSARG, 1082 bases
CCAGGCCGAGCGGAGGGGCCACTGTGGGATGCTGGCTGAGTGGGGC
GCCCAAGCCAGTCCCTCTGCTTCTGCTTTCAGCTTTCAGCTGTAC
TTGTTTGTCTCTTACCCCGCAGGAGCTGACATGGACCCAAATCCTCGG
CGGCCCTGGAGCCGAGCAGCTCCGCTTCGGGAGCGCCAAATCTTTC
GAGGACATTTACAGCCAGAGCAGAGTTTGTCTTCTCTGTCCCATCT
GCATCTGAGTCCGAGACCCCCATAGGTAGTATCTCATCCATGGAAG
TGAATGTGGACACTGGAGCAAGTGAAGTATTGACCTTGGGGACCCG
GATGAGCAGATGTCTTCTGCTTGGCAGATCTCCACCAACCCCCCA
GTCGCTGGGGTGGACAACCATTTGGAGGAGCTGAGCCTGCGGTGCTTA
CATCAGACAGGACCACTAGGACCTCTCTCTCTCTCTCCGACTCC
TCCACCAACTGCTAGCCAAATCAAAGTATGATGGAGCAGATACGCC
CTTGGCAACTCGATGAGAGAGGAGGAAAGGGTGTGAGGGGGCAGAGC
CTGGAGCCTGAGCTAGCAGTGGGGCCCTGCTTACAGACTGACCAAGCTG
CCTATCTCCACATGAGCACCAGGCCAGAGCTCTGGGAGAAAG
ACCAGACTCTTACTTGCAGTAGGCCACAGAGTGGGAAAGGATGGTGGGA
TTGTGTAACCTTCTAAGAAATTAACCTCTCTCTTACTGTAATTTT
TCCTGCTCAACCTCCACCAAGTTTTGGCTTACTCTGAGATATGATT

```

FIG. 4

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

6/24

FIG. 5

```

rSARG 1  SCAGAC TGGAGCGAGGCTGTCTGCTGGGATGCCAGCTGCCA TGGGCTGCTTAGGC
mSARG 1  SCAGACCGGAGCGA TGGCTGTCTGCTGGGAT TCAAC TCCG TACTGCTGCTCC
hsARG 1  SCAGACCGGAGC TGGGCTCCGCTGTGGGATGCTGGCTGCA TGGGCTCCCGAGCC

rSARG 61  TTGGCCCCACTACTTCTGTTTC AGCC CACTTCTGTCTCTCTTACTCCCTTAACC
mSARG 56  CAGCCCCCGC CCGCTTCTGGGAGCC AC CAGG A TCA TGGGCTCC CCGGCTG
hsARG 61  CAGG TCCCTCTCTTCTCTTCTCA TTTTCACTGTGACTTCTTCTGCTCTCTAGCC

rSARG 120  CAGGGGCTGACATGGACCCAAATCCCGAGCCGCTGGAGCCS CAGCAGCTGCCCTTC
mSARG 116  CAGGGGCTGACATGGACCCAAATCCCGAGCCGCTGGAGCCCA CAGCAGCTGCCCTTC
hsARG 120  GAGGAGCTGACATGGACCCAAATCCCGAGCCGCTGGAGCCAGCAGCTGCCCTTC

rSARG 180  ACGGAGCGGCAGAAAGTCTTCGAGGACATTTTACAGCCAGAGACAGATTTCTCTTCCCC
mSARG 175  CGGGAGCGGCAGAAAGTCTTTCGAGGACATTTTACAGCCAGAGACAGATTTCTCTTCCCC
hsARG 180  CGGAGCGGCAGAAATTCCTTCGAGGACATTTTACAGCCAGAGACAGATTTCTCTTCCCT

rSARG 240  CTATCCCATCTGCATCTGGAGTCCAGGCCGCCCTAGCTAGCATCTCTCCCTTCGAA
mSARG 235  CTGTCCCATCTGCCTCTCTAGTCCAGAGCCGCCCTAGCTAGCATCTCTCTCTTCGAA
hsARG 240  CTGTCCCATCTGCATCTGGAGTCCAGGCCGCCCTAGCTAGCATCTCTCTCTTCGAA

rSARG 300  CTCATCTGACACCTCTGAGCAGTCCATTTATTCAGCTTGGGATCAGGATCGAGCC
mSARG 295  CTCATCTGACACCTCTGAGCAGTCCATTTATTCAGCTTGGGATCAGGATCGAGCC
hsARG 300  CTCATCTGACACCTCTGAGCAGTCCATTTATTCAGCTTGGGATCAGGATCGAGCC

rSARG 360  TATGCTGTTCTTACTTGGAGGATTCCTT CACTCCCCAGTCTCTGGGATGGATGAC
mSARG 355  TATGCTGTTCTTACTTGGAGGATTCCTT CACTCCCCAGTCTCTGGGATGGATGAC
hsARG 360  TATGCTGTTCTTACTTGGAGGATTCCTT CACTCCCCAGTCTCTGGGATGGATGAC

rSARG 420  TCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGGTACCCAGCTCAGACAGGACACATCCCGGCTCC
mSARG 415  TATCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGGTACCCAGCTCTT CAGGACCCACATCCCGGCTCC
hsARG 420  TATTTCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGGTACCCAGCTCAGACAGGACCCACATCTTCCAGCTCC

rSARG 480  TCCCTGACCTCT TACTCTCCCT TCCCTGCCAGTCCAAATCCAGTGATGGGGA
mSARG 475  TCCCTGACCTCT TACTCTCCCT TCCCTGCCAGTCCAAATCCAGTGATGGGGA
hsARG 480  TCCCTCCCTCTCC TACTCTCCCACTCTGCTTCCCAATCCAGTGATGTGGA

rSARG 534  CAGACACCTCCCTTGGCAGATC TCA CAGGAGCA TGGGAC TGTGGAGGGCAGAA
mSARG 529  CAGACACCTCCCTTGGCAGATC TCA CAGGAGCA TGGGATG CAGGGGGCAGAG
hsARG 540  CAGATCCCTTGGCAGATGGGATCA CAGGAGCA TGGGATGATGGAGGGCAGAG

rSARG 591  CTGGACCTTCAGCTAGCAGAGCCCT CT TACAACCTCA CCAATGGCGTCTCC
mSARG 586  CTTGGACCTTCAGCTAGCAGTGGGCC CT TACAACCTGACCA CCGCTGTCTCC
hsARG 600  CTTGGACCTTCAGCTAGCAGTGGGCC CT TACAACCTGACCA CCGCTGTCTCC

rSARG 647  CATGGAGAGGACCTT AGCTCTT CACAGCAC TCTGGAGAGACCTGACACTTACT
mSARG 643  CATGGAGAGGACCTT AGCCCTT CACAGCAC TCTGGAGAGACCTGACACTTACT
hsARG 660  CATCTT TTAGCACACAGGCCCTT CACAGCAC TCTGGAGAGACCACTGACTTACT

```

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

7/24

FIG. 5 (Fortsetzung)

```

rSARG 705 TACATCAG ACCAAGGGAGGGAGCATGGTGG TGGTGTGGCTG AGRGTTAGC
mSARG 697 TACATCAG ACCAAGGGAGGGAGCATGGTGG TGGTGTGGCTG AGRGTTAGC
hsARG 716 TGCATAG ACCCAGAGGT GCGAGGATGGTGG TTTGTACCTTCTAAGATTAGC

rSARG 759 C TCCC ECITTTACTG AAGCGTTCCTGCTGGCCAGCCCCAG AGT SGTTH
mSARG 751 C TCCCAGCTTTACTG AAGCGTTCCTGCTGGCCAGCCCCAG AGT SGTTH
hsARG 775 C TCCATCCCTTTACTG AATTTTTCCTGCTGGAGC TCCACAGT TTTTGCTTA

rSARG 811 TTTCTGAGGTAGGACTTCCAGTGGAGACT CTAAGGTGAGGTGGGACAGATGCCACT
mSARG 803 TTTCTGAGGTAGGACTTCCAGTGGAGACT TCGAGGTGAGGTGGGACAGATGCCACT
hsARG 835 TTTCTGAGGTAGTATTATTTGAAATGAGGAGAGAGAGATGAGCTT GACCAAGATGCCACT

rSARG 870 E TTTTCTTA TCCCCCTCCGCCCCAATGATCCAGTACTC CCACI AGTCTCC
mSARG 862 C TTTTCTTA TCCCCCTCCGCCCCAATGATCCAGTACTC CCACI AGTCTCC
hsARG 894 E TTTTCTTA TCCCCCTCCGCCCCAATGATCCAGTACTC CCACI AGTCTCC

rSARG 926 AAGCCAGTCTCT TTAGGAAATCTGAGGACTTCCACTI TCCAG
mSARG 919 AAGCCAGTCTCT TTAGGAAATCTGAGGACTTCCACTI TCCAG
hsARG 954 AAGCAGTCTCTAGATC AATTAATCTCTTCTCAATCAG AAGGTGATCTCCAG

rSARG 972 TATCCCGCCCTATATAGTCCCTT TGGGACAGGATATGCTATAAATAATA T
mSARG 965 TATCCCGCCCTATATAGTCTTT TGGGACAGGATATGCTATAAATAATA T
hsARG 1014 CCAATGCGCCCTCTATATCCCTTT TGGGACAGGATATGCTATAAATAATA T

rSARG 1028 ATATATACC
mSARG 1020 ATATATACC
hsARG 1073 ATATATACC

```

B

```

rat 1 MDENPRLALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPFLSHLHLESQRPPIGSISSEVNWVI
human 1 MDENPRAALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPFLSHLHLESQRPPIGSISSEVNWVI

rat 61 TLEQVEFDLAPCGADVFLPCELSPPTPKNSGVNDPEELSILVPTSDRTTSRTSSSS
human 61 TLEQVEFDLGFPHADVFLPCELSPPTPKNSGVNDPEELSILVPTSDRTTSRTSSSS

rat 121 D--SSMLRSPNPSLCSGDTFLAQSDEEDGDSFGAEEGCS
human 121 SSSSNLHSPNPSLCSADTFLAQSDEEDERSDGGAEFGAS
*****

```

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

8/24

CODING

rSARG-coding

atggaccacaatccacgagcagcctggagggcagcagctgctctcagggagcggcagaagtctctgaggac
 atttacagccagagacagagttgtttcccccctatcccatctgcatctcgagtcacaagaccocccataggt
 agcatctcctcgatggaagtgaatgtgacacactggagcaggtggaatttatgacctggcgatcaggtatgga
 gcagatgtgtcttaccctgtgaggattctctccaactccccagaggtctggagtgatgaccaccagaggag
 ctgagcctgctggtaccacgtcagacagaccacatccggacctcctcctgtcctctgactcctccaacctg
 cgcagtccaaatccaagtgtgggggagagacactccctggcacagtctgacgaggagatggggcaggtgga
 ggggcagacctggacctgcagctag
 477bp

MDPNPRAALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFLSHLHLESQRPPIGSISSEMEVNDTLEQVEFIDLADQDG
 ADVFLPCEDSPPTPQRSVDDHPEELSLVPTSDRTTSRTSSLSDDSNLRSNPNFSDGGGDTPLAQSDDEEDGDDG
 GAEPGPFS

158 amino acids

mSARG-coding

ATGGACCCAAATCCGAGAGCAGCCTGGAGCGCCAAACAGCTGCGGCTCCGGGAGAGGCAGAAGTCTTT
 GAGGACATTTACAGCCAGAGACAGAGTTTGTCTTCCCCCTGCCATCTGCACCTGGAGTCACAAAGA
 CCCCCATAGTAGCATCTCGTCTATGGAAGTGAATGGACACACTGGAGCAAGTGAAGTTATGAT
 CTTGCGGATCAGGATGGAGCAGATGTGTTCTGCTTGTGAGGAGTCTCGCCAGCTCCCCAGATGCT
 GGATGGATGACCATCCAGAGGAGCTGAGCCTGCTGTAACCCAGCTCTGACAGGACCAATCCCGGACC
 TCCCTCTTCTCTGACTCTCCAACTGCGCAGTCCAAATCCAAAGTATGGGGGAGGAGACATCCC
 TTGGCACAGTCTGATGAGGAGGACGGGGATGACGGAGGGGACAGCCTGGACCTGCAGCTAG
 477bp

MDPNPRAALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFLSHLHLESQRPPIGSISSEMEVNDTLEQVEFIDLADQDG
 ADVFLPCESSPAPQMSVDDHPEELSLVPTSDRTTSRTSSLSDDSNLRSNPNFSDGGGDTPLAQSDDEEDGDDG
 GAEPGPFS

158 amino acids

hSARG-coding

ATGGACCCAAATCCGAGCGCCCTGGAGCGCCAGCAGCTCGCCTTCGGGACGGCAAAAATCTTCGAGGAC
 ATTTACAGCCAGAGACAGAGTTTGTCTTCCCTCTGTCCCATCTGCATCTCGAGTCGACAGACCCCCATAGGT
 AGTATCTCATCCAGAGTGAATGTGGACACACTGGAGCAAGTAGAATTTATTGACCTGGGGACCCGGATGCA
 CCAGATGTGTTCTTGCCTTCCGAGATCCTCCACCAACCCCCAGCTGCTGTTGGGTGGACACCATTTGGAGGAG
 CTGAGCCTCCCGGTGCCTACATCAGACAGGACCAATCTAGGACCTCCTCCTCCTCCTCCGACTCCTCCACC
 AACCTGCATAGCCAAATCCAAGTATGATGGAGCAGATAGCCCTTGGCACAGTGGATGAGGAGGAGAAAG
 GGTGATGGAGGGGACAGCCTGGAGCTGCAGCTAG
 486bp

MDPNPRAALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFLSHLHLESQRPPIGSISSEMEVNDTLEQVELIDLADQDPA
 ADVFLPCEDPFPPTPQSSVDNHEELSLVPTSDRTTSRTSSSSSDSNLHSPNPSDDGADTFLAQSDDEEER
 GGGGAEFGACS

161 amino acids

FIG. 6

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

9/24

```

rSARG-coding 1 ATGGAGCCCAATCCACGAGCCAGCCCTGGAGCGGAGCCAGCTGCCATTCAGGGAGGGCCAG
mSARG-coding 1 ATGGAGCCCAATCCCAACGAGCCCTGGAGCCCAACGAGCTGCCATTCAGGGAGGGCCAG
hsARG-coding 1 ATGGAGCCCAATCCATGGGCGAGCCCTGGAGCCCAACGAGCTGCCATTCAGGGAGGGCCAG

rSARG-coding 61 AACTTCTTCGAGGACATTTACAGCCAGAGACAGAGTTTCTTTTCCCCCTATCCCATCTG
mSARG-coding 61 AACTTCTTTTGGGACATTTACAGCCAGAGACAGAGTTTGTCTTCCCCCTGTCCCATCTG
hsARG-coding 61 AACTTCTTCGAGGACATTTACAGCCAGAGACAGAGTTTGTCTTTCTTGTGCCCATCTG

rSARG-coding 121 CATCTCGAGTCACAAGACCCCCCATAGGTAGCATCTCTCCATGGAAAGTGAATGTGGAC
mSARG-coding 121 CATCTCGAGTCACAAGACCCCCCATAGGTAGCATCTCTCTATGGAAAGTGAATGTGGAC
hsARG-coding 121 CATCTCGAGTCACAAGACCCCCCATAGGTAGTTTCTCATCATGCAAGTGAATGTGGAC

rSARG-coding 181 ACACCTGGAGCAGGTGGAAATTTATGACCTTGGGATCAGGATGGAGCAGATGTCTTCTTA
mSARG-coding 181 ACACCTGGAGCAAGTGGAGTTTATTGTTCTTCCGGATCAGGATGGAGCAGATGTCTTCTTG
hsARG-coding 181 ACACCTGGAGCAAGTGAATTTATGACCTTGGGATCAGGATGGAGCAGATGTCTTCTTG

rSARG-coding 241 CCTTGTGAGGATTCCTCTCCACTCCCCAGAGCTCTGGATGGATGACCCACACAGGAG
mSARG-coding 241 CCTTGTGAGGATTCCTCTCCACTCCCCAGATTTCTGGATGGATGACCATCCAGAGGAC
hsARG-coding 241 CCTTGTGAGGATTCCTCTCCACTCCCCAGCTCTCTGGATGGATGACCATTTGAGGAG

rSARG-coding 301 CTGAGCCTGCTGGTACCCACGTCAGACAGGACCACATCCCGGACCTCCTCTGTCTCT
mSARG-coding 301 CTGAGCCTGCTGGTACCCACGTCATGAGGACCACATCCCGGACCTCCTCTGTCTCTCT
hsARG-coding 301 CTGAGCCTGCTGGTACCCACGTCATGAGGACCACATCTATGAGCCTCCTCTCTCTCTCT

rSARG-coding 361 ---SACTCCTCC---ACCTGCCAGTCCAAATCCAGTGTGGGGAGGAGACACTCC
mSARG-coding 361 ---SACTCCTCC---ACCTGCCAGTCCAAATCCAGTGTGGGGAGGAGACACTCC
hsARG-coding 361 TCCSACTCCTCCCCAACCTGCTAGCCAAATCCAGTGTGGGGAGGAGACTCC

rSARG-coding 415 TTGGCCAGTCC---TCTGAGGAGT---TGGTCTGAGGGGGCAGACCTGGACCTTCC
mSARG-coding 415 TTGGCCAGTCC---TCTGAGGAGT---TGGTCTGAGGGGGCAGACCTGGACCTTCC
hsARG-coding 421 TTGGCCAGTCCGGATCAGT---TGGTCTGAGGGGGCAGACCTGGACCTTCC

rSARG-coding 472 AGCTAG
mSARG-coding 472 AGCTAG
hsARG-coding 481 AGCTAG

```

FIG. 7

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

10/24

```
rSARG-coding 1 MDPNPRAAALRQQLALRERQKTFEDILQPEFEVFPFLSHLHLESORPPTIGSISSEVNNVW
mSARG-coding 1 MDPNPRAAALRQQLALRERQKTFEDILQPEFEVFPFLSHLHLESORPPTIGSISSEVNNVW
hsARG-coding 1 MDPNPRAAALRQQLALRERQKTFEDILQPEFEVFPFLSHLHLESORPPTIGSISSEVNNVW

rSARG-coding 61 NLEQVBEIDLADQDGADVFLPCEDSPPTPCNSGVDDHPEELSLLVPTSDRTTSRTSSLSS
mSARG-coding 61 NLEQVBEIDLADQDGADVFLPCEDSPPTPCNSGVDDHPEELSLLVPTSDRTTSRTSSLSS
hsARG-coding 61 NLEQVBEIDLADQDGADVFLPCEDSPPTPCNSGVDDHPEELSLLVPTSDRTTSRTSSLSS

rSARG-coding 121 -DS -NLRSENFSDGGDTFLAQSDEEF -ILSGAEPGKCS
mSARG-coding 121 -DS -NLRSENFSDGGDTFLAQSDEEF -ILSGAEPGKCS
hsARG-coding 121 SDSS -NLRSENFSDGGDTFLAQSDEEF -ILSGAEPGKCS
```

FIG. 8

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

11/24

FIG. 9A

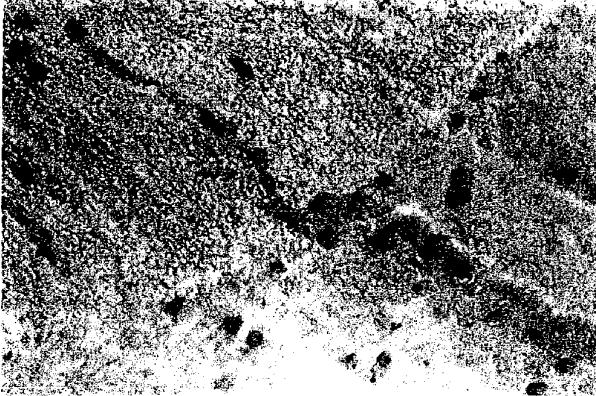
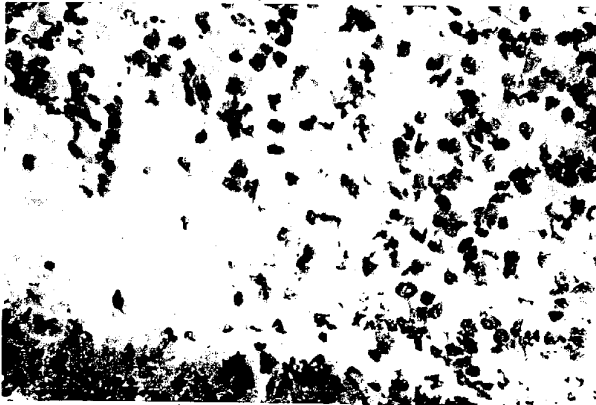


FIG. 9B



WO 03/001212

PCT/EP02/06820

12/24

FIG. 9C

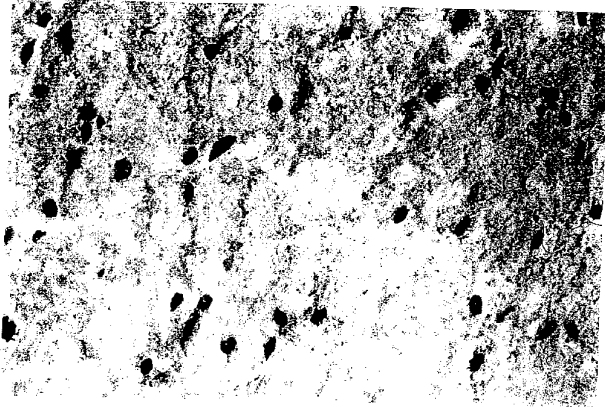
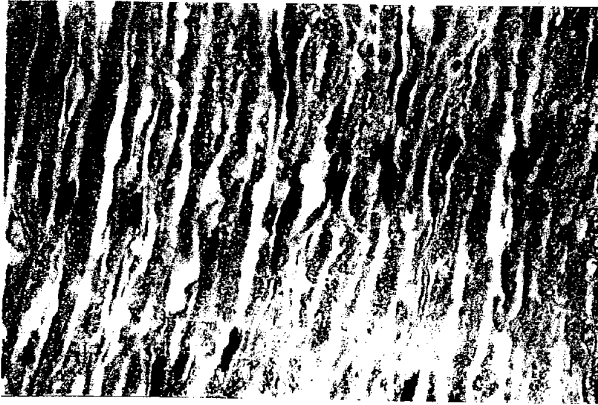


FIG. 9D

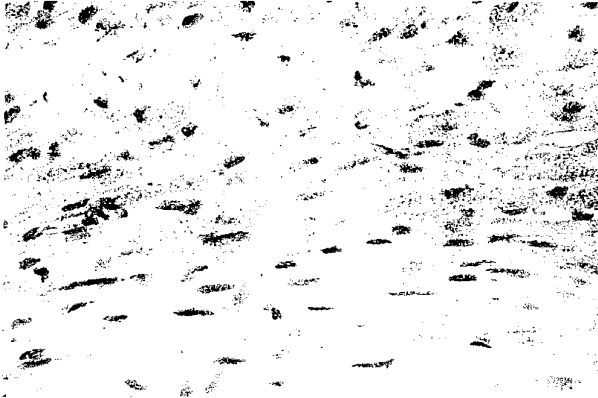


WO 03/001212

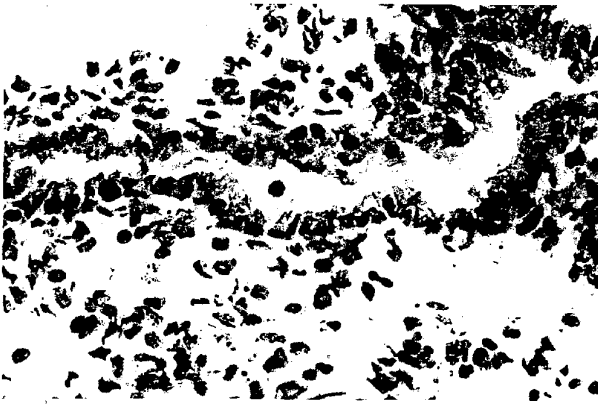
PCT/EP02/06820

13/24

E



F



WO 03/001212

PCT/EP02/06820

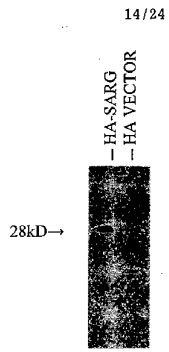


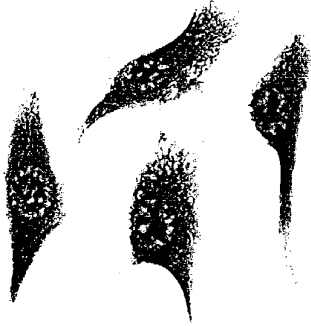
FIG.10

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

15/24

FIG. 11



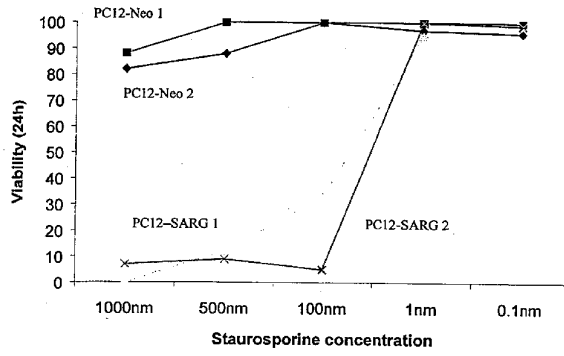


FIG. 12

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

17/24

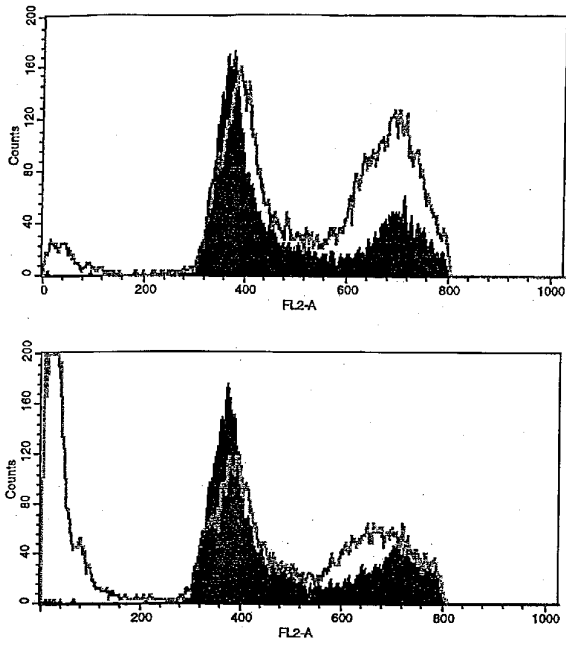


FIG. 13

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

18/24

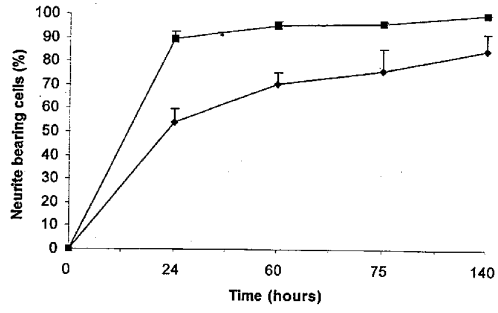


FIG. 14

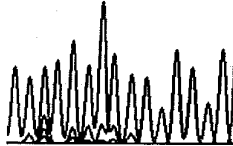
WO 03/001212

PCT/EP02/06820

19/24

t→c point mutation in a familial multiple sclerosis patient at nucleotide 67 of coding sequence. Substitution of phenylalanine (F) for leucine (L) at amino acid 23.

21	22	23	24	25
K	F	L	E	D
A	A	A	T	T
C	T	C	G	A
G	A	C	G	A



```

Wild type 1  MDPNPRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETERFVPLSHLHLESQRPPIGSISSEVNVND 60
Mutation 1  MDPNPRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETERFVPLSHLHLESQRPPIGSISSEVNVND 60

Wild type 61  TLEQVELIDLGGEDAADVFLFCEDPPPTQSSGVNHLLEELSLFVPTSDRTTSTRSSSS 120
Mutation 61  TLEQVELIDLGGEDAADVFLFCEDPPPTQSSGVNHLLEELSLFVPTSDRTTSTRSSSS 119

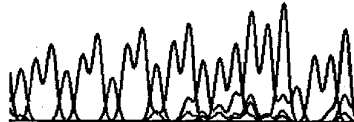
Wild type 121 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDEEERGGGAEFGACS 161
Mutation 120 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDEEERGGGAEFGACS 160
  
```

FIG. 15

c→t point mutation in a familial multiple sclerosis patient at nucleotide 359 of coding sequence. Substitution of Phenylalanine (F) for serine (S) at amino acid 120

115 116 117 118 119 120 121
T S S S S F S

A C C T C C T C C C T C C C T C C C T C C C



Wild type 1 MDPNPRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFLSHLHLESQRPPFGSISSMEVND 60
 Mutation 1 MDPNPRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFLSHLHLESQRPPFGSISSMEVND 60

Wild type 61 TLEQVELIDLGDPAADVFLPCEDPPPTQSSGVDNHLLELSLVPVTSDRVTSRISSSSS 120
 Mutation 61 TLEQVELIDLGDPAADVFLPCEDPPPTQSSGVDNHLLELSLVPVTSDRVTSRISSSSF 119

Wild type 121 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDEEERERDGGAEFGACS 161
 Mutation 120 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDEEERERDGGAEFGACS 160

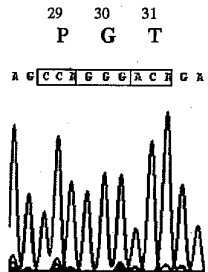
FIG. 16

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

21/24

a→g point mutation in a familial multiple sclerosis patient at nucleotide 89 of coding sequence. Substitution of glycine (G) for glutamic acid (E) at amino acid 30.



Wild type 1 MDPNFRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPPPTGSISSMEVNV D 60
 Mutation 1 MDPNFRALERQQLRLRERQKFFLEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPPPTGSISSMEVNV D 60

Wild type 61 TLEQVELIDLGGPDAADVFLCEDPPPTPQSSGVNDHLEELSLFVPTSDRRTSRTSSSS 120
 Mutation 61 TLEQVELIDLGGPDAADVFLCEDPPPTPQSSGVNDHLEELSLFVPTSDRRTSRTSSSS 119

Wild type 121 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDEEEERGGGAEFGACS 161
 Mutation 120 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDEEEERGGGAEFGACS 160

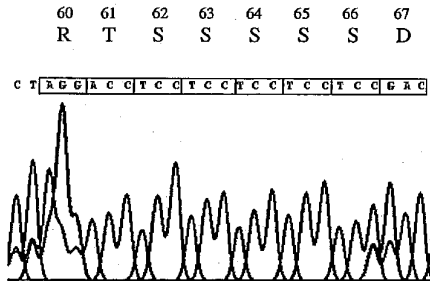
FIG. 17

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

22/24

Deletion of codon in familial multiple sclerosis patient. Loss of serine residue



Wild type 1 MDNFRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPPIGSISSEVNVND 60
 Mutation 1 MDNFRALERQQLRLRERQKFFEDILQPETEFVFPPLSHLHLESQRPPIGSISSEVNVND 60

Wild type 61 TLEQVELIDLGDPAADVFLPCEDEPPPTQSSGVDNHLLEELSLVPTSDRTTSRTSSSS 120
 Mutation 61 TLEQVELIDLGDPAADVFLPCEDEPPPTQSSGVDNHLLEELSLVPTSDRTTSRT-SSSS 119

Wild type 121 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDDEBERGDDGGAEPGACS 161
 Mutation 120 SDSSTNLHSPNPSDDGADTFLAQSDDEBERGDDGGAEPGACS 160

FIG. 18

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

24/24

FIG. 19 (Fortsetzung)

ACGTCCTGTCAGGGTAGGTGATATAATCTCTATTTTATAAGCAGGAAATF
AGGCTCAGAGAAGTTAAGTCACATTTAGCCAGAAGGTAGATAAACTGGA
ATTTCATGTCGTCTGACTCCAAAGCCCATATGCTTAACTTGTAAAGATAGA
TATTCCTTTAATTAATAACTGCTACTATTTATPTGATGGCTTACTATGCCAG
ACATTTTATAAGCATTCTTAGGTTTATTTCCCAAACCCCTTTGGGGATGT
AGGTATCCCTTTTATTTTGCAGAGGAGGAACAGAGTCTTGAAAGGGAAA
GTGACTTGCTCAAAGCCACTCAGCAGCAATAAGTGTAGGTGGAACCTT
GAACCTTGCCATTCATTGACCTGACTGTAGATCCAGACATGGTGAAT
GACGTGGAAGGAGCTGGCAGTCAGGAGATGGTGTCTTAAFCCTGGCTCT
TTGCTGGATTGGCAAAGTCACTTTGGACAAGTCTCTGCCCCACTGTGGAC
TTTAGTTACTCTGGCCAGATAATCTTTAAGAGTCTCTGAAGCCCTGTT
TGTGGCCTGACCAGCTTTTCTCTCTGGGCAG

EXON 3
+276
GGGTGGACAACCATTGGAGGAGCTGAGCCTGCCGTGCCTACATCAGACAGGACCACATCTAGG
ACCTCCTCCTCCTCCTCCTCCGACTCCTCCACCACTGCATAGCCCAAATCCAAGTGTGATGG
AGCAGATACGCCCTTGGCACAGTCGGATGAAGAGGGAAAAGGGGTGATGGAGGGCAGAGCCTG
GAGCCTGCAGCTAG

+485
CAGTGGGCCCTGCCTACAGACTGACCAGCTGGCTATFTCCACATGAGACCACAGCCCGCC
AGAGCCTGTCCGGAGAAGACCAGACTTTTACTTGCAGTAGGCACCAGAGGTGGGAAGGATGGTG
GGATTGTGTACCTTTCTAAGAAATTAACCTT
CTCCTGCTTTACTGCTAATTTTTCCTGCTGCAACCCCTCCACCACTTTT
TGGCTTACTCCTGAGATATGATTTGCAATGAGGAGAGAGAAGATGAGGT
TGGACAAGATGCCACTGCTTTTCTTAGCACICTTCCCTCCCTAAACCAT
CCCGTAGTCTTCTAATAACAGTCTCTCAGACAAGTGTCTCTAGATGGATGT
GAACCTCTTAACCTCATCAAGTAAGTGGTACTCAAGCCATGCTGCCTCCT
TACATCCTTTTGGAACAGACACGGTATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ATGCC

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 1 -
SEQUENCE LISTING

<110> Burkhard Dr., Jansen
Lucas Dr., Trevor

<120> Method for diagnosing a person having MS or being at
risk of developing MS

<130> method for diagnosing MS

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 486

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```
atggacccaa atcctcgggc cgccctggag cggcagcagc tccgccttcg ggagcggcaa 60
aaattcttcg aggacatttt acagccagag acagagtttg tctttcctct gtcccatctg 120
catctcagat cgcagagacc ccccataggt agtatctcat ccatggaagt gaatgtggac 180
acaactggagc aagtagaact tattgacctt ggggaccocg atgcagcaga tgtgttcttg 240
ccttgcggaag atcctccacc aacccccag tegtctgggy tggacaacca ttggaggag 300
ctgagcctgc cgggtcctac atcagacagg accacateta ggacctctc ctctctctec 360
tccgacctct ccaccaacct gcatagccca aatccaagt atgatggagc agatagcccc 420
ttggcacagt cggatgaaga ggaggaaagg ggtgatggag gggcagagcc tggagcctgc 480
agctag 486
```

<210> 2

<211> 161

<212> PRT

<213> human

<400> 2

```
Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
  1           5           10          15

Arg Glu Arg Gln Lys Phe Phe Glu Asp Ile Leu Gln Pro Glu Thr Glu
          20           25           30

Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
  35           40           45
```

WO 03/001212 2 PCT/EP02/06820

Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
50 55 60

Val Glu Leu Ile Asp Leu Gly Asp Pro Asp Ala Ala Asp Val Phe Leu
65 70 75 80

Pro Cys Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Gln Ser Ser Gly Val Asp Asn
85 90 95

His Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
100 105 110

Ser Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Asn Leu His
115 120 125

Ser Pro Asn Pro Ser Asp Asp Gly Ala Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser
130 135 140

Asp Glu Glu Glu Glu Arg Gly Asp Gly Gly Ala Glu Pro Gly Ala Cys
145 150 155 160

Ser

<210> 3
<211> 1083
<212> DNA
<213> human

<400> 3
ccaggccgga gccaggggccc ccaactgttgg gatgctggct gcagtggggc gccccaagcc 60
caggteccct ctgtcttctc ttctgacttt gcagctgtac ttgttttgc cctctaccgc 120
caggagctga catggaccca aatcctcggg ccgccctgga gcgccagcag ctccgccttc 180
gggagcggca aaaattcttc gaggacattt tacagccaga gacagagttt gcttttcttc 240
tgtcccatct gcatctcgag tcgcagagac ccccatagc tagtatctca tccatggaag 300
tgaatgtgga cacactggag caagtagaac ttattgacct tggggaccgc gatgcagcag 360
atgtgttctt gccttgcgaa gatctccac caaccoccca gtcgtctggg gtggacaacc 420
atttggagga gctgagcctg ccggtgccta catcagacag gaccacatct aggacctcct 480
ctcctctctc ctccgactcc tccaccaacc tgcatagcc aaatccaagt gatgatggag 540
cagatacgcc cttygcacag tcggatgaag aggaggaag ggggatgga ggggcagagc 600
ctggagcctg cagctagcag tggccctcg cctacagact gaccacgctg gctattctcc 660
acatgagacc acaggccag ccagagcctg tcgggagaag accagactct ttacttgcag 720
taggcaccag agtggggaag gatggtgga ttgtgtacct ttctaagaat taacctctc 780
ctgctttact gctaattttt tctgctgca accctcccac cagtttttg ettactctg 840
agatatgatt tgcaaatgag gagagagaag atgaggttg acaagatgcc actgcttttc 900
ttagcactct tccctcccct aaaccatccc gtagtctctc aatacagctc ctcagacaag 960
tgtctctaga ttgatgtgaa ctcttaact catcaagtaa ggtggtactc aagccatgct 1020

WO 03/001212

3

PCT/EP02/06820

gcctccttac atccttttttg gaacagagca cgggtataaat aataaactaa taataatatg 1080
cca 1083

<210> 4
<211> 1038
<212> DNA
<213> rat

<400> 4
ccagactgga agcgaaggct gtgttgctgg gatgccagct gccgaggggc tgcctlaagcc 60
ttggcccaca ctactttctg ttccagcccc acttctgtgc gtgtcttact ccattaccoc 120
caggggctga catggaccoca aatccacgag cagccttggg gccgcagcag ctgctctca 180
gggagcggca gaagtctctc gaggacattt tacagccaga gacagagttt gttttcccc 240
tatcccactc gcatctcgag tcacaaagac cccccatag tagcatctcc tcgatggag 300
tgaatgtgga cacactggag caggtggaat ttattgacct tgcggatcag gatggagcag 360
atgtgttctt acctgtgag gattctcttc caactccca gaggtctgga gtggatgacc 420
accagagga gctgagcctg ctggtaccoca cgtcagacag gaccacatcc cggacctcct 480
ccttgtcttc tgaactctcc aacctgocca gtccaaatcc aagtgatggg ggaggagaca 540
ctccctggc acagtctgac gaggaggatg gggacggtgg aggggcagaa cctggacctt 600
gcagctagca gaggccoctt acaaaactgag cgatctggct gttctccatg gagaggagac 660
cttaggtcca ccagagcact ctggagaaga cctgacactt tacttacatc agcaccaaag 720
ggagggaaag atggtggatg gtgtgctga gatttagcct ccccgttta ctgataacgc 780
tgtcctgtcg ccacgcccc acagtgtttt cttctgaggt aggacttcca agtgagactc 840
tcgaaggtga gttgggacaa gatgccactg ttttcttact cccctctgc ccccaaatga 900
tcctgtagtc tccactagt ctcetaagcc agtgtctctg agggaaagt ctgaggagtt 960
ccactttgca gttatcctgc ctctataagt ctttctggg aacaggatat ggtataaata 1020
ataaataata ctgtacca 1038

<210> 5
<211> 486
<212> DNA
<213> rat

<400> 5
atggacccaa atcctcgggc cgccttgag cgcagcagc tccgccttcg ggagcggcaa 60
aaattcttcg aggacatttt acagccagag acagagtttg tcttctctct gtcctactcg 120
catctcgagt cgcagagacc ccccataggt agtatctcat ccatggaagt gaatgtggac 180
acactggagc aagtagaact tattgacctt ggggaccggg atgcagcaga tgtgttcttg 240
ccttgcaag atcctccacc aacccccag tegtctggga tggacaacca tttggaggag 300
ctgagcctgc cgggtgcctac atcagacag accacateta ggcctcctc ctctccttc 360
tcgcactect ccaccaactc gcatagccca aatccaagt atgatggagc agatacgccc 420
ttggcacagt cggatgaaga ggggaaagg ggtgatggag gggcagagcc tggagcctgc 480
agctag 486

<210> 6
<211> 158
<212> PRT
<213> rat

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 4 -

<400> 6
Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
1 5 10 15
Arg Glu Arg Gln Lys Phe Phe Glu Asp Ile Leu Gln Pro Glu Thr Glu
20 25 30
Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
35 40 45
Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
50 55 60
Val Glu Phe Ile Asp Leu Ala Asp Gln Asp Gly Ala Asp Val Phe Leu
65 70 75 80
Pro Cys Glu Asp Ser Pro Pro Thr Pro Gln Arg Ser Gly Val Asp Asp
85 90 95
His Pro Glu Glu Leu Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
100 105 110
Ser Arg Thr Ser Ser Leu Ser Ser Asp Ser Ser Asn Leu Arg Ser Pro
115 120 125
Asn Pro Ser Asp Gly Gly Gly Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser Asp Glu
130 135 140
Glu Asp Gly Asp Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Pro Cys Ser
145 150 155

<210> 7
<211> 1002
<212> DNA
<213> mouse

<400> 7
ggatccaacg ccggcgctgc tegetcccac gcccccgcg ccgcttgctg ggagcgcacc 60
caggagcca gcggggcgcg ggcctgcag ggcctgacat ggacccaaat ccgagagcag 120
ccctggagcg ccaacagctg cggctccggg agaggcagaa gttctttgag gacattttac 180
agccagagac agagtttgtc ttccccctgt cccatctgca cctggagtca caaagacccc 240
ccataggtag catctcgtct atggaagtga atgtggacac actggagcaa gtggagtta 300
ttgatottgc ggatcaggat ggagcagatg tqtctttgcc ttgtgaggag tctcgcag 360
ctccccagat gctcggagtg gatgaccatc cagaggagct gagcctgctg gtacccactg 420
ctgacagac cacatccggg acctcctcct tgtcctctga ctctccaac ctgccagtc 480
caaatccaag tgatggggga ggagacactc ccttgccaca gtctgatgag gaggacgggg 540

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 5 -

```

atgacggagg ggcagagcct ggaccctgca gctagcagtg ggccctctac agactgacca 600
gcccgctgt tctccatgga aaggagacct aggccacga gagcctggag aagacctgac 660
actttcctta cttcagcacc aaagggaggg aaggatggtg gatggtgtgc ctgagagtta 720
gcctcccctg ctttacgta acgtatcct gctgccacgc cccacagtg cttttctct 780
gaggtaggac ttccaagtga gacttgagag gtgaggtggg acaagacga gotgctttct 840
tagtcccctc ctgccccag atgacctgt tgtcttccac agagtctcct aagccagtgt 900
ctctgagggg atgttctgag gagttccact tccagttat cctgacctta taagttcttt 960
tgggaaccag atatggtata aataataaat aataatatac ca 1002

```

<210> 8
 <211> 477
 <212> DNA
 <213> mouse

```

<400> 8
atggacccaa atccgagagc agccctggag cgccaacagc tgggctccg ggagaggcag 60
aagttctttg aggacatttt acagccagag acagagtttg tcttcccct gtcccactgt 120
caccctggagt cacaaagacc ccccataggt agcatctcgt ctatggaagt gaatgtggac 180
acaactggagc aagtggagtt tattgatctt gccgatcagg atggagcaga tgtgttcttg 240
ccttgtgagg agtccctgcc agctcccag atgtctggag tggatgacca tccagaggag 300
ctgagcctgc tggtaaccac gtctgacagg accacatccc ggacctctc cttgtcctct 360
gactctcca acctgcgag tccaaatcca agtgatggg gagggagcac tcccttgcca 420
cagtctgatg aggaggacgg ggatgacgga gggcagagc ctggaccctg cagctag 477

```

<210> 9
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> mouse

```

<400> 9
Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
1          5          10          15

Arg Glu Arg Gln Lys Phe Phe Glu Asp Ile Leu Gln Pro Glu Thr Glu
          20          25          30

Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
          35          40          45

Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
          50          55          60

Val Glu Phe Ile Asp Leu Ala Asp Gln Asp Gly Ala Asp Val Phe Leu
          65          70          75          80

Pro Cys Glu Glu Ser Ser Pro Ala Pro Gln Met Ser Gly Val Asp Asp
          85          90          95

```

WO 03/001212

- 6 -

PCT/EP02/06820

His Pro Glu Glu Leu Ser Leu Leu Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
 100 105 110

Ser Arg Thr Ser Ser Leu Ser Ser Asp Ser Ser Asn Leu Arg Ser Pro
 115 120 125

Asn Pro Ser Asp Gly Gly Gly Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser Asp Glu
 130 135 140

Glu Asp Gly Asp Asp Gly Gly Ala Glu Pro Gly Pro Cys Ser
 145 150 155

<210> 10

<211> 161

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Lys Phe Leu Glu Asp Ile Leu Gln Pro Glu Thr Glu
 20 25 30

Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
 50 55 60

Val Glu Leu Ile Asp Leu Gly Asp Pro Asp Ala Ala Asp Val Phe Leu
 65 70 75 80

Pro Cys Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Gln Ser Ser Gly Val Asp Asn
 85 90 95

His Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
 100 105 110

Ser Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Asn Leu His
 115 120 125

Ser Pro Asn Pro Ser Asp Asp Gly Ala Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser
 130 135 140

Asp Glu Glu Glu Glu Arg Gly Asp Gly Gly Ala Glu Pro Gly Ala Cys
 145 150 155 160

WO 03/001212

PCT/EP02/06820

- 7 -

Ser

<210> 11
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> human

<400> 11

Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Lys Phe Phe Glu Asp Ile Leu Gln Pro Glu Thr Glu
 20 25 30

Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
 50 55 60

Val Glu Leu Ile Asp Leu Gly Asp Pro Asp Ala Ala Asp Val Phe Leu
 65 70 75 80

Pro Cys Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Gln Ser Ser Gly Val Asp Asn
 85 90 95

His Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
 100 105 110

Ser Arg Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ser Asp Ser Ser Thr Asn Leu His
 115 120 125

Ser Pro Asn Pro Ser Asp Asp Gly Ala Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser
 130 135 140

Asp Glu Glu Glu Glu Arg Gly Asp Gly Gly Ala Glu Pro Gly Ala Cys
 145 150 155 160

Ser

<210> 12
 <211> 161
 <212> PRT

WO/03/001212

PCT/EP02/06820

- 8 -

<213> human

<400> 12

Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Lys Phe Phe Glu Asp Ile Leu Gln Pro Gly Thr Glu
 20 25 30

Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
 50 55 60

Val Glu Leu Ile Asp Leu Gly Asp Pro Asp Ala Ala Asp Val Phe Leu
 65 70 75 80

Pro Cys Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Gln Ser Ser Gly Val Asp Asn
 85 90 95

His Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
 100 105 110

Ser Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Asn Leu His
 115 120 125

Ser Pro Asn Pro Ser Asp Asp Gly Ala Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser
 130 135 140

Asp Glu Glu Glu Glu Arg Gly Asp Gly Gly Ala Glu Pro Gly Ala Cys
 145 150 155 160

Ser

<210> 13

<211> 160

<212> PRT

<213> human

<400> 13

Met Asp Pro Asn Pro Arg Ala Ala Leu Glu Arg Gln Gln Leu Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Lys Phe Phe Glu Asp Ile Leu Gln Pro Glu Thr Glu
 20 25 30

WO 03/001212

- 9 -

PCT/EP02/06820

Phe Val Phe Pro Leu Ser His Leu His Leu Glu Ser Gln Arg Pro Pro
 35 40 45
 Ile Gly Ser Ile Ser Ser Met Glu Val Asn Val Asp Thr Leu Glu Gln
 50 55 60
 Val Glu Leu Ile Asp Leu Gly Asp Pro Asp Ala Ala Asp Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Pro Cys Glu Asp Pro Pro Pro Thr Pro Gln Ser Ser Gly Val Asp Asn
 85 90 95
 His Leu Glu Glu Leu Ser Leu Pro Val Pro Thr Ser Asp Arg Thr Thr
 100 105 110
 Ser Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Asn Leu His Ser
 115 120 125
 Pro Asn Pro Ser Asp Asp Gly Ala Asp Thr Pro Leu Ala Gln Ser Asp
 130 135 140
 Glu Glu Glu Glu Arg Gly Asp Gly Gly Ala Glu Pro Gly Ala Cys Ser
 145 150 155 160

【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/001212 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/564, 33/574, C07K 14/47, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/06820
- (22) International Filing Date: 20 June 2002 (20.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/299,765 22 June 2001 (22.06.2001) US
- (71) Applicants and
(72) Inventors: JÄNSEN, Burkhard [AT/AT]; Laudongasse 69/39, A-1080 Wien (AT); LUCAS, Trevor [GB/AT]; Kirchstattnergasse 3/9, A-1160 Wien (AT).
- (74) Agents: SONN, Helmut et al., Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HK, HN, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, SV, TC, TD, TF, TG, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 4 September 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/001212 A3

(54) Title: A METHOD FOR DIAGNOSING A PERSON HAVING MULTIPLE SCLEROSIS

(57) Abstract: Described is a method for diagnosing a person having multiple sclerosis (MS) or being at risk of developing MS, comprising the following steps: - providing a sample of a body fluid or tissue from said person, said sample containing at least one of the wild type SCI-Apoptosis-Response Gene- (wt-SARG-1-) protein and nucleic acids encoding wt-SARG-1, if taken from a person not having MS or a risk of acquiring MS; - detecting the presence of wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 in said sample and diagnosing MS or a risk of acquiring MS, if wt-SARG-1-protein or nucleic acids encoding wt-SARG-1 are not present in said sample.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/06820
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564 G01N33/574 C07K14/47 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, EMBL, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Hypothetical protein, 28 March 2000 (2000-03-28) retrieved from EBI Database accession no. AJ276469, Q9NY07 XP002227576	16,21
Y	abstract	24-28, 32,33
X	--- DATABASE EMBL [Online] Uncharacterized hypothalamus protein HSMNP1, 29 September 2000 (2000-09-29) retrieved from EBI Database accession no. AK026642 XP002227577	16,21
Y	abstract	24-28, 32,33
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"*" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 11 April 2003	Date of mailing of the international search report 23.04.03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Vanmontfort, D	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/06820

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Uncharacterized hypothalamus protein HSMNP1, 4 May 2000 (2000-05-04) retrieved from EBI Database accession no. AF220191, Q9NZ31 XP002227578	16, 21
Y	abstract	24-28, 32, 33
Y	---	24-28, 32, 33
A	US 5 883 227 A (KLINE ELLIS L ET AL) 16 March 1999 (1999-03-16) the whole document	1-8, 34, 35, 38
A	---	9-15, 36-38
A	WO 01 02860 A (GARCIA DEL BARRIO MARTA ; NIETO TOLEDANO MARIA ANGELA (ES); PEREZ M) 11 January 2001 (2001-01-11) the whole document	9-15, 36-38
A	---	9-15, 36-38
A	US 5 158 893 A (HACKETT ADELINE J ET AL) 27 October 1992 (1992-10-27) the whole document	9-15, 36-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP 02/06820
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT, no additional fees are to be refunded.	
1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input checked="" type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02/06620

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-8, 16-35, 38

Methods for diagnosing a person having multiple sclerosis by detection of wt-SARG-1. Nucleic acid molecule encoding for wt-SARG-1 and mutated or deleted SARG-1 and the corresponding proteins, method of making antibodies against said protein, a kit comprising means to detect wt-SARG-1 and a transgenic non-human animal comprising a mutated or deleted SARG-1. Use of SARG-1 binding proteins or SARG-1 to modulate the activity of SARG-1 or SARG-1 binding proteins. Use of SARG-1 binding proteins or SARG-1 to prevent or treat multiple sclerosis.

2. Claims: 9-33, 36-38

Methods for diagnosing a person having cancer by detection of wt-SARG-1. Nucleic acid molecule encoding for wt-SARG-1 and mutated or deleted SARG-1 and the corresponding proteins, method of making antibodies against said protein, a kit comprising means to detect wt-SARG-1 and a transgenic non-human animal comprising a mutated or deleted SARG-1. Use of SARG-1 binding proteins or SARG-1 to modulate the activity of SARG-1 or SARG-1 binding proteins. Use of SARG-1 binding proteins or SARG-1 to prevent or treat acute myeloid leukaemia.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/06820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5883227	A	16-03-1999	US 5645997 A 08-07-1997
			AU 689091 B2 26-03-1998
			AU 5850994 A 19-07-1994
			CA 2151945 A1 07-07-1994
			EP 0674661 A1 04-10-1995
			NZ 259636 A 24-10-1997
			PL 309637 A1 30-10-1995
			RU 2137131 C1 10-09-1999
			WO 9414846 A1 07-07-1994
			WO 0102860
AU 5408300 A 22-01-2001			
EP 1109021 A1 20-06-2001			
WO 0102860 A1 11-01-2001			
ES 2161655 A1 01-12-2001			
US 5158893	A	27-10-1992	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/48	M
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヤンゼン、ブルクハルト

オーストリア共和国、アー - 1 0 8 0 ヴィーン、ラウドンガッセ 6 9 / 3 9

(72) 発明者 ルーカス、トレヴォー

オーストリア共和国、アー - 1 1 6 0 ヴィーン、キルヒシュテットナーガッセ 3 / 9

F ターム(参考) 2G045 AA29 CB01 CB17 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 AA12 BA53 CA04 DA02 EA04 GA03 GA11 HA01
HA15

4B063 QA01 QA12 QA19 QQ02 QQ03 QQ43 QR32 QR55 QR62 QR82
QS25 QS34

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 DA14

4C084 AA02 DC50 NA14 ZA01 ZB261 ZB271

4H045 AA10 AA11 BA10 CA45 DA75 DA76 EA20 EA50 EA51 FA72

专利名称(译)	多发性硬化症的人的诊断方法		
公开(公告)号	JP2005500038A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003507556	申请日	2002-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	杨则恩圣彼得堡霍特 卢卡斯沃州托雷		
申请(专利权)人(译)	Yanzen, 布克哈德 卢卡斯, Torevo		
[标]发明人	ヤンゼンブルクハルト ルーカストレヴォー		
发明人	ヤンゼン、ブルクハルト ルーカス、トレヴォー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K38/17 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/1709 A61P25/00 C07K1/22 C07K14/47 C07K14/4713 C07K16/18 C12Q1/6883 C12Q2600/156 G01N33/564 G01N33/57484 G01N33/6893 G01N33/6896 G01N2800/285		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B G01N37/00.102 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA72		
代理人(译)	秋山文雄		
优先权	60/299765 2001-06-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了具有患多发性硬化 (MS) 或MS风险的人的诊断方法。该方法包括以下步骤: 提供具有患多发性硬化症 (MS) 或MS的风险的人体液或组织样品, 其中MS或MS存在风险的风险包含至少一种野生型SCF凋亡应答基因 - (wt - SARG - 1 -) 蛋白和编码 wt - SARG - 1 的核酸, 取自非性别人类, , 检测编码 wt - SARG - 1 蛋白或 wt - SARG - 1 的核酸的存在, 并检测 wt - SARG - 1 蛋白或编码 wt - SARG - 1 的核酸的存在。 , 确诊存在成为MS或MS的风险。

