



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 17 860 T2** 2004.09.09

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 027 433 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 17 860.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/03686**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 932 168.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/058060**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.06.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.09.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/12**

**C12N 15/00, C07K 14/47, A01K 67/027,
C12N 5/10**

(30) Unionspriorität:

9712849 18.06.1997 GB

(73) Patentinhaber:

**SmithKline Beecham Pharma GmbH & Co. KG,
80993 München, DE; SmithKline Beecham
(Australia) Pty Ltd., Boronia, Victoria, AU;
SmithKline Beecham plc, Brentford, Middlesex,
GB**

(74) Vertreter:

HOFFMANN · EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL

(72) Erfinder:

**LICHTENTHALER, Stefan, D-69120 Heidelberg,
DE; BEYREUTHER, Konrad, D-69120 Heidelberg,
DE; MASTERS, Louis, Colin, Parkville, AU;
BROWN, Frank, Harlow, Essex CM19 5AW, GB;
ALLSOP, David, Harlow, Essex CM19 5AW, GB**

(54) Bezeichnung: **FÜR DIE I45F-MUTATION KODIERENDE HUMAN APP ODER A4CT SEQUENZEN**

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

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

Beschreibung

Verbindungen

[0001] Diese Erfindung betrifft modifizierte Amyloid-Vorläuferproteine und ihre Verwendung in der Erzeugung transgener Tiere.

[0002] Die Haupt-Proteinkomponente der Amyloid-Plaques, die im Gehirn von Patienten mit Alzheimer-Krankheit ("Alzheimer's disease", AD) gefunden werden, ist $\beta A4$, ein 4 kDa-Peptid, das aus hauptsächlich 40 und 42 Resten ($\beta A4_{1-40}$, $\beta A4_{1-42}$) besteht und aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) stammt. APP kann in multiplen Formen existieren, die durch alternative mRNA-Spleißung erzeugt werden. Die erste Form von APP, die durch J. Kang et al. (Lit. 37) aus einer cDNA-Bibliothek aus fötalem Gehirn identifiziert wurde, enthielt 695 Aminosäuren (sogenanntes APP695). Dies schließt eine Signalpeptidsequenz mit 17 Resten zum Transport des Proteins in das endoplasmatische Retikulum ein. Anschließend wurde eine Anzahl geringfügig längerer cDNA-Klone durch andere Forscher isoliert. Die von P. Ponte et al. (Lit. 38) beschriebene APP-Sequenz mit 751 Aminosäuren (APP751) enthielt ein zusätzliches Insert mit 57 Aminosäuren, das einen Serin-Proteinase-Inhibitor vom Kunitz-Typ (KPI) codiert. N. Kitaguchi et al. (Lit. 39) identifizierten einen anderen Vorläufer mit 770 Aminosäuren (APP770) mit sowohl der KPI-Sequenz als auch einem zusätzlichen Insert mit 19 Aminosäuren. Diese Isoformen von APP entstehen als Ergebnis der alternativen Spleißung der Exons 7 und 8 während der Transkription des APP-Gens. Zusätzliche, durch alternatives Spleißen von Exon 15 erzeugte Isoformen wurden ebenfalls nachgewiesen (Lit. 40).

[0003] APP kann am N-Terminus von $\beta A4$ durch ein β -Sekretase genanntes Enzym gespalten werden, um lösliches APP und das C-terminale Fragment A4CT (C99) zu erzeugen. Dieses 99 Reste lange Membranprotein A4CT (Lit. 1), das der direkte Vorläufer für $\beta A4$ ist, enthält die gesamte $\beta A4$ -Domäne, die Membrandomäne und den cytoplasmatischen Schwanz von APP. Alternative Reifung von APP in einem Post-Golgi-Kompartiment durch eine α -Sekretase genannte Protease führt zur Spaltung von APP innerhalb der $\beta A4$ -Domäne, was sekretorisches APP und das Transmembranfragment p3CT liefert, das der direkte Vorläufer für p3 ist.

Humanes APP bezeichnet hier alle Isoformen, einschließlich der 695-Form.

[0004] Beide C-terminalen Fragmente von APP, A4CT und p3CT, werden innerhalb der Membrandomäne durch eine γ -Spaltungsaktivität gespalten, wodurch $\beta A4$ und p3 in das Medium freigesetzt werden (Lit. 2, 3). In Zellen, die APP vom Wildtyp exprimieren, ist der Ort der γ -Spaltung hauptsächlich die Peptidbindung Val(40)-Ile(41) von A4CT und in einem geringen Ausmaß die Bindung Ala(42)-Thr(43). In Zellen, die APP mit den Familien-AD-gebundenen Mutationen bei Val717 exprimieren (bezogen auf APP₇₇₀, Val46 von A4CT), erfolgt eine erhöhte γ -Spaltung hinter Val(42), wodurch größere Mengen von $\beta A4_{1-42}$ erzeugt werden (Lit. 4).

[0005] Transgene Mäuse, die A4CT exprimieren, wurden unter Verwendung des humanen APP-Promotors (Lit. 5), des humanen Thy-1-Promotors (Lit. 6) und des viralen JC-Promotors der frühen Region (Lit. 7) erzeugt. Transgene Mäuse wurden ebenfalls erzeugt, die die Aminosäuren 591–695 von APP695 (Cterminale 105 Aminosäuren von APP) unter der Kontrolle der humanen Neurofilament NF-L transkriptionalen regulatorischen Sequenzen (Lit. 41) exprimieren. Zahlreiche Promotoren wurden in Verbindung mit APP-cDNA voller Länge verwendet (Lit. 12, 13, 41, 42, 43, 46). Die Erzeugung transgener Säugetiere, die aus APP stammende DNA-Sequenzen tragen, wird ebenfalls beschrieben in WO 93/14200 (TSI Corporation), WO 91/19810 (California Biotechnology Inc.), WO 93/02189 (University of California), WO 89/00689, WO 92/06187 (The Upjohn Company), EP 0451700 (Miles Inc.), WO 92/13069 (Imperial College of Science Technology and Medicine) und WO 89/06689 (McClellan Hospital Corporation). In einigen Fällen wurden transgene Mäuse, die ein humanes mutiertes APP tragen, mit Präsenilin-1-transgenen Tieren gekreuzt, um "doppelt mutierte" Mäuse zu erzeugen (Lit. 44, 45).

[0006] Die erhaltenen Ergebnisse hängen von der Quelle des Promotors und der verwendeten Protein-codierenden Sequenz ab. Jedoch ähnelte in allen bis heute beschriebenen Fällen die Natur der APP-immunoreaktiven Ablagerungen nicht der klinischen Situation, und mit Ausnahme des in den Literaturstellen 13, 42, 44 und 45 beschriebenen Modells wurde nicht gefunden, daß solche transgenen Tiere zuverlässige Modellsysteme für die Alzheimer-Krankheit sind.

[0007] WO 98/03643 (veröffentlicht am 29. Januar 1998) und Literaturstellen 36 und 47 offenbaren Konstrukte, die mutierte humane APP- oder A4CT-DNA-Sequenzen umfassen.

[0008] Das $\beta A4_{1-42}$ -Peptid ist die Hauptuntereinheit von amorphen und neuritischen Plaques bei der Alzheimer-Krankheit.

[0009] Die Anmelder haben gefunden, daß rekombinante Zellen, die A4CT exprimieren, das gewisse Mutationen in der A4CT-Aminosäuresequenz trägt, zu einem höheren Verhältnis von $\beta A4_{1-42}/\beta A4_{1-40}$ als im Wildtyp führen und solche mutierten Proteine und codierende DNA daher nützlich in der Erzeugung transgener Tiere sind, die Amyloid-Plaques als Modell der Alzheimer-Krankheit entwickeln. Es ist selbstverständlich, daß hier

- Verweise auf A4CT, β A4₁₋₄₂ und β A4₁₋₄₀ alle N-terminalen Varianten einschließen, die durch alternative Spaltung während der Reifung erzeugt werden.
- [0010] Erfindungsgemäß wird ein nicht-humane transgenes Säugetier bereitgestellt, dessen Zellen ein Konstrukt enthalten, das eine humane APP- oder A4CT-DNA-Sequenz umfaßt, die die Mutation I45F codiert (Numerierung relativ zu A4CT).
- [0011] In einem bevorzugten Aspekt ist die DNA-Sequenz funktionsfähig mit einer Promotor-Sequenz verknüpft.
- [0012] In einem weiteren Aspekt codiert das Konstrukt ferner eine Insertion in der Transmembrandomäne (Reste 43 bis 52) einer Sequenz von 1 bis 10 Aminosäureresten (Numerierung relativ zu A4CT), die funktionsfähig mit einer Promotor-Sequenz verknüpft ist.
- [0013] Die Insertion befindet sich bevorzugt zwischen den Resten 42 und 53, besonders bevorzugt zwischen 46 und 53. In einer bevorzugten Ausführungsform befindet sich die Insertion zwischen T48 und L49. Die Reste zur Insertion werden bevorzugt aus F, I, G, Y, L, A, P, W, M, S, T, N und Q ausgewählt. Die Insertion ist bevorzugt 2 bis 6 Reste lang. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Insertion L V.
- [0014] In einem weiteren bevorzugten Aspekt codiert das Konstrukt zusätzlich eine aus V46F, V46I, V46G, V46Y, V46L, V46A, V46P, V46W, V46M, V46S, V46T, V46N oder V46Q ausgewählte Mutation. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die zusätzliche Mutation V46F.
- [0015] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Konstrukt eine A4CT-DNA-Sequenz und codiert ferner die APP-Signalsequenz (APP-Reste 1 bis 17) unmittelbar stromaufwärts der A4CT-DNA-Sequenz. Hydrophobe Reste als Inserte wie Leu, Glu oder Met sind erforderlich zur Reifung von A4CT zu β A4 und sollten bevorzugt zwischen den codierenden Regionen von Signalpeptid und A4CT eingeschlossen werden und werden am gereiften A4CT gebunden bleiben.
- [0016] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das APP APP695 voller Länge.
- [0017] Die Erfindung betrifft ebenfalls Säugetierzellen, die das Konstrukt exprimieren, und das DNA-Konstrukt selbst und es enthaltende Vektoren.
- [0018] Die Erzeugung transgener, nicht-humaner Säugetiere der Erfindung kann herkömmlich durchgeführt werden, z. B. wie beschrieben in WO 93/14200, WO 91/19810, WO 93/02189, WO 89/00689, WO 92/06187, EP 0451700, WO 92/13069 und WO 89/06689.
- [0019] Die APP- oder A4CT-codierende DNA wird durch Sondieren einer humanen cDNA-Bibliothek erhalten. Mutationen können durch ortsgerichtete Mutagenese oder während der Konstruktion der codierenden DNA aus geeigneten Fragmenten eingeführt werden.
- [0020] Geeignete Promotoren zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließen ein: humanes APP (Lit. 5); neuronenspezifische Enolase der Ratte (Neuronen)(Lit. 18); humanes β -Actin (Lit. 19); humanes PDGF β (Lit. 20); Maus-Thy 1 (Lit. 21); Prionprotein-Promotor (PrP) der Maus (Lit. 14); Prionprotein-Promotor des syrischen Hamsters (Lit. 35); Ratten-Synapsin 1 (Gehirn)(Lit. 22); humanes FMR1 (Gehirn) (Lit. 23); humanes Neurofilament low (Lit. 24), middle (Gehirn)(Lit. 25); NEX-1 (Gehirn)(Lit. 26); Maus-APLP2 (Gehirn)(Lit. 27); Ratten-alpha-Tubulin (Lit. 28); Maus-Transferrin (Lit. 29); Maus-HMGCR (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Co-enzym A-Reduktase, Oligodendrozyten)(Lit. 30) und basisches Maus-Myelin-Protein (Lit. 31).
- [0021] Ein Tetracyclin-induzierbares System kann ebenfalls verwendet werden, das den Vorteil der Regulierung der Gen-Expression (Induktion/Repression) hat (Lit. 33, 32). Dieses System verwendet zwei Konstrukte: einen an sieben tetracyclische Operatorsequenzen und die betreffende cDNA fusionierten Minimalpromotor (PhCMV*-1); und ein Transgen, das die Tetracyclin-gesteuerte trans-Aktivator-Protein(tTA)codierende Sequenz unter der Kontrolle eines Promotors enthält, z. B. aus der obigen Liste entnommen. Jedes Konstrukt wird zur Erzeugung einer transgenen Maus verwendet. Die Kreuzung der zwei homozygoten Mäuse erzeugt eine doppelt transgene Linie, die das tTA gemäß dem gewählten Promotor exprimiert. Dieses tTA induziert die Expression der cDNA durch Aktivierung des PhCMV*-1, aber nur in Abwesenheit von Tetracyclin. In Gegenwart von Tetracyclin existiert nur eine Basisexpression.
- [0022] Ein bevorzugter Promotor ist der Maus-Prion-Protein-Promotor (Lit. 14) oder Hamster-Prion-Protein-Promotor (Lit. 35).
- [0023] Das Konstrukt wird durch herkömmliche rekombinante DNA-Techniken hergestellt (Lit. 10).
- [0024] Das transgene nicht-humane Säugetier wird durch herkömmliche Techniken erzeugt (Lit. 8, 15, 16, 17).
- [0025] In einem Aspekt wird das transgene nicht-humane Säugetier durch Einführen des Konstrukts in einen Embryo, Einpflanzen des Embryos in eine Leihmutter und Entwickeln des Embryos mit gewöhnlicher Schwangerschaft erzeugt.
- [0026] Das Konstrukt wird vorbereitet zur Übertragung auf das Wirtstier durch Spaltung des Vektors, der das Konstrukt enthält, und Reinigung der DNA (Lit. 8).
- [0027] Die Übertragung wird herkömmlich durchgeführt, bevorzugt unter Verwendung von Mikroinjektion, wie ausführlich in Literaturstelle 8 beschrieben.
- [0028] In einem alternativen Aspekt wird das transgene nicht-humane Säugetier durch Einführung des Kon-

strukts in embryonale Stammzellen durch herkömmliche Verfahren erzeugt, wie durch Calciumphosphat/DNA-Ausfällung, Direktinjektion oder Elektroporation (Lit. 9), gefolgt von Injektion der transformierten Zellen in Blastozysten und Einpflanzen des resultierenden Embryos in eine Leihmutter wie oben beschrieben.

[0029] Transgene nicht-humane Tiere werden durch DNA-Analyse unter Verwendung von Southern-Blotting und PCR identifiziert, um Gründertiere nachzuweisen.

[0030] Das transgene nicht-humane Säugetier ist bevorzugt ein Nagetier, wie eine Ratte oder Maus, besonders bevorzugt eine Maus.

[0031] Säugetierzellen, die das Konstrukt exprimieren, können durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden.

[0032] Wirtszellen werden genetisch mit den Vektoren dieser Erfindung, die z. B. ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor sein können, konstruiert (transduziert oder transformiert oder transfiziert). Der Vektor kann z. B. in Form eines Plasmids, eines viralen Partikels, eines Phagen etc. sein. Die konstruierten Wirtszellen können in herkömmlichen Nährmittelmedien kultiviert werden, die nach Bedarf zur Aktivierung von Promotoren, Selektion von Transformanten oder Amplifizierung der humanen Gene modifiziert werden. Die Kulturbedingungen wie Temperatur, pH und dgl. werden für den Durchschnittsfachmann ersichtlich sein.

[0033] Verschiedene Säugetierzellkultursysteme können eingesetzt werden, um rekombinantes Protein zu exprimieren. Beispiele für Säugetierexpressionssysteme schließe die COS-7-Linien von Affen-Nierenfibroblasten, beschrieben von Gluzmann, Cell, 23: 175 (1981), und andere Zelllinien ein, die einen kompatiblen Vektor exprimieren können, z. B. die SH-SY5Y-, CHO- und HeLa-Zelllinien.

[0034] Die Selektion eines geeigneten Wirtes wird als im Rahmen der Fachleute aus den hier vorgegebenen Lehren erachtet.

[0035] Säugetier-Expressionsvektoren werden einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Verstärker umfassen und ebenfalls alle erforderlichen Ribosom-Bindungsstellen, Polyadenylierungsstellen, Spleiß-Donor- und Akzeptorstellen, Transkriptionsterminations-Sequenzen und 5'-flankierende nicht-transkribierte Sequenzen. Aus der SV40-Spleißstelle stammende DNA-Sequenzen und Polyadenylierungsstellen können verwendet werden, um die erforderlichen nicht-transkribierten genetischen Elemente bereitzustellen.

[0036] Zusätzlich enthalten die Expressionsvektoren bevorzugt ein oder mehrere selektierbare Markergene, um ein phänotypisches Merkmal zur Selektion der transformierten Wirtszellen bereitzustellen, wie die Hygromycin- oder Neomycin-Resistenz für die eukaryotische Zellkultur.

[0037] Die entsprechende DNA-Sequenz kann in den Vektor durch eine Vielzahl von Verfahren inseriert werden. Allgemein wird die DNA-Sequenz in (eine) geeignete Restriktionsendonukleasestelle(n) durch fachbekannte Verfahren inseriert. Solche Verfahren und andere werden als im Bereich der Fachleute betrachtet.

[0038] Die DNA-Sequenz im Expressionsvektor ist funktionsfähig mit (einer) geeigneten Expressionskontrollsequenz(en)(Promotor) verknüpft, um die mRNA-Synthese auszurichten. Beispiele für solche Promotoren schließen den CMV-Promotor, pCEP4 (Invitrogen) und andere Promotoren ein, die zur Steuerung der Expression von Genen in eukaryotischen Zellen oder deren Viren bekannt und im Wirt replikationsfähig und lebensfähig sind.

[0039] Die Einführung des Konstrukts in die Wirtszelle kann durch Calciumphosphat-Transfektion, Lipfectin-vermittelte Transfektion oder Elektroporation bewirkt werden (L. Davis, M. Digner, I. Battey, Basic Methods in Molecular Biology (1986)).

[0040] Das transgene Säugetier oder Zellen der Erfindung können zur Durchmusterung auf Arzneistoffe verwendet werden, die die Ablagerung von β A4 hemmen, indem ein Testarzneistoff an das Säugetier oder das Zellkulturmedium verabreicht und Veränderungen in der APP-Expression und -Reifung, Histopathologie und/oder Verhaltensveränderungen beobachtet werden. Die Erfindung erstreckt sich auf ein solches Durchmusterungsverfahren.

[0041] Geeignete Techniken zur Durchführung solcher Beobachtungen werden in WO 93/14200 beschrieben.

Beispiele

SPA4CT I45F (SEQ ID NOs 1 und 2)

SPA4CT V46F (FAD-Mutation)

[0042] Die obigen Konstrukte mit den in Tabelle 2 angegebenen Sequenzen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese von wtSPA4CT (Lit. 1) hergestellt:

wtSPA4CT besteht aus dem 17 Aminosäure langen Signalpeptid von APP gefolgt von zwei zusätzlichen Aminosäuren von APP 695 (Leu und Glu) und setzt sich fort mit der β A4-Sequenz und der gesamten C-terminalen Domäne, und die Mutagenese wurde im Vektor pSP65/SPA4CT (Lit. 11) für die V46F-Mutation und pBS/SPA4CT rev für die I45F-Mutation durchgeführt. pBS/SPA4CT rev wurde durch Klonieren des KpnI/Nhe-Fragments von pCEP/SPA4CT (Lit. 2) in den pBS/SPC99-Vektor (Lit. 34), der mit KpnI/XbaI verdaut wurde, erhalten.

[0043] Die Konstrukte wurden in den pCEP-Vektor (Lit. 2) inseriert und stabil in COS7-Zellen transfiziert.

APP695 I45F (SEQ ID NOS: 3 und 4)

[0044] Das obige Konstrukt mit den in Tabelle 2 angegebenen Sequenzen wurde durch ortsgerichtete Mutagenese von Wildtyp APP695 voller Länge gefolgt von Insertion in die Sall-Stelle von Cosmid cosSHa. Tet (Lit. 35) hergestellt, so daß das Tetracyclin-Resistenzgen im Cosmid durch die I45F-Mutantenform von APP695 stromabwärts des Hamster-Prion-Promotors ersetzt wurde.

Biologische Aktivität

Messung von β A4 im konditionierten Medium

[0045] Stabil transfizierte COS7-Zellen wurden metabolisch über Nacht mit methioninfreiem MEM-Medium markiert, das 10% FCS und 133 μ Ci/ml 35 S-Methionin enthielt. β A4 und A4CT wurden immungefällt, an einem 10% Tris-Tricin-Gel getrennt und durch Phosphorimaging quantifiziert. Die folgenden Antikörper wurden verwendet:

G2-10 (monoklonal) gegen synthetisches Peptid β A4 33-40 für die Immunfällung von β A4_{n-40}

G2-11 (monoklonal) gegen synthetisches Peptid β A4 35-42 für die Immunfällung von β A4_{n-42}

692 (polyklonales Kaninchenserum) gegen synthetisches Peptid β A4 1-40 für die Immunfällung von β A4.

[0046] n-40 und n-42 stehen für Peptide mit einem definierten C-Terminus (d. h. Rest 40 bzw. 42 von β A4), die aber eine mögliche N-terminale Homogenität erlauben. Die β A4-Formen voller Länge, die durch die besonderen, hier beschriebenen Konstrukte erzeugt wurden, enthalten Leu, Glu an den Position -2, -1.

Nachweis von A4CT im Zell-Lysat

[0047] Die stabil transfizierten COS7-Zellen wurden metabolisch für 10 min in methioninfreiem MEM-Medium, das 133 μ Ci/ml 35 S-Methionin enthielt, markiert. Im Zell-Lysat wurde A4CT mit polyklonalem Antikörper gegen A4CT immungefällt (Lit. 2), an einem 10% Tris-Tricin-Gel getrennt und durch Phosphorimaging quantifiziert.

Ergebnisse

Expression von A4CT

[0048] Alle Konstrukte (wt SPA4CT und mutiertes SPA4CT) wurden in ähnlichen Stärken exprimiert. Das Signalpeptid von SPA4CT war vollständig entfernt, was zu Leu-Glu-A4CT führte.

Freisetzung von β A4

[0049] Alle A4CT-Konstrukte wurden zu β A4 gereift und erzeugen ähnliche Mengen von β A4.

Erzeugung von β A4₁₋₄₂ und β A4₁₋₄₀

[0050] Für alle Konstrukte wurden beide β A4-Typen β A4₁₋₄₂ und β A4₁₋₄₀ freigesetzt. Das Verhältnis β A4₁₋₄₂/ β A4₁₋₄₀ wurde bestimmt, und die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

SPA4CT	β A4 ₁₋₄₂ / β A4 ₁₋₄₀	Zunahme von β A4 ₁₋₄₂ / β A4 ₁₋₄₀ relativ zu wt SPA4CT um den Faktor	Signifikanz p (Student-t- Test)
Wildtyp	4,7 $\pm$ 1,3	1,0	–
V46F	17,1 $\pm$ 4,8	3,6	<0,001
I45F	161,9 $\pm$ 5,7	33,9	<0,001

Schlußfolgerungen

- [0051] Die FAD-gebundene Mutation Val(717)Phe (Val(46)Phe von A4CT) ist dafür bekannt, zu einem höheren Verhältnis von $\beta A4_{1-42}/\beta A4_{1-40}$ für sowohl SPA4CT als auch APP im Vergleich zu den Proteinen vom Wildtyp zu führen.
- [0052] Die obigen Ergebnisse zeigen, daß SPA4CT-exprimierende Zellen (COS7) die gleichen $\beta A4$ -Typen ($\beta A4_{1-40}$ und $\beta A4_{1-42}$) wie APP-exprimierenden Zellen erzeugen. Dies läßt vermuten, daß der Mechanismus der $\beta A4$ -Erzeugung der gleiche in APP- und SPA4CT-exprimierenden Zellen ist.
- [0053] Die Mutationen nahe am C-Terminus von $\beta A4$ können die γ -Spaltungsstelle beeinflussen, wohingegen die Gesamtmenge von erzeugtem $\beta A4$ sowie das Verhältnis von $\beta A4/p3$ unverändert bleiben.
- [0054] Die Mutante I45F hat ein erhöhtes Verhältnis $\beta A4_{1-42}/\beta A4_{1-40}$ relativ zum Wildtyp.

Erzeugung von transgenen Mäusen, die mutiertes SPA4CT oder APP695 exprimieren

- [0055] Die oben beschriebenen Konstrukte, die eine gesteigerte Produktion von $\beta A4_{1-42}$ relativ zu $\beta A4_{1-40}$ erzeugen, sind nützlich zur Erzeugung transgener Mäuse, die Amyloid-Plaques entwickeln.

Beispiel 1

- [0056] Das durch den Maus-Prionprotein-Promotor (Lit. 14) getriebene mutierte SPA4CT-Konstrukt wurde zur Transformierung einer Maus durch das folgende Verfahren verwendet:
- [0057] Das Konstrukt wird hergestellt und gereinigt.
- [0058] Weibliche Mäuse werden zur Superovulation induziert und die Embryos gewonnen.
- [0059] DNA wird in den Pronukleus von Embryos mikroinjiziert.
- [0060] Embryos werden in scheinschwangere Mäuse injiziert (weibliche Mäuse, die zuvor mit vasktomierten Männchen gepaart wurden).
- [0061] Embryos werden entwickelt und Mäuse geboren.
- [0062] Gründermäuse werden durch Southern Blotting und PCR identifiziert und weitergezüchtet.
- [0063] Die Mäuselinien waren wie folgt:
Donormäuse (Embryos für die Pronukleusinjektion): DBA2
Akzeptormäuse: NMRI
Mäuse zur weiteren Züchtung: C57B1/6

Beispiel 2

- [0064] Das humane APP695-Gen voller Länge, das die I45F-Mutation trägt, die vom Hamster-Prionpromotor getrieben wird (Lit. 35), wurde zur Erzeugung einer Maus ebenfalls durch die Verfahren von Beispiel 1 verwendet.
- [0065] Die Mäuselinien waren wie folgt:
Donormäuse: C57B1/6 Inzuchtmäuse
Empfängermäuse: [C57B1/6 × CBA]F1
Mäuse zur weiteren Züchtung: C57B1/6
- [0066] Eine Modifikation wurde an den herkömmlichen Techniken zur Erzeugung transgener Tiere durch Mikroinjektion vorgenommen. Diese Modifikation war die Verwendung einer besonders geformten Mikroinjektionsnadel. Die Nadel ist aus Standard-Borosilicatglas hergestellt, aber mit einer größeren Spitzengröße und einer stärker zersplitterten Form, als sie allgemein verwendet wird. Dies erfolgte, um die etwas höhere Größe des Mikroinjektionsfragments auszugleichen, das zur Erzeugung der transgenen Mäuse verwendet wurde (ca. 40 Kilobasen gegenüber den standardmäßigen 1–10 Kilobasen).
- [0067] Der Hybrid-[C57B1/6 × CBA]-Stamm kann alternativ anstelle von C57B116 verwendet werden.

Durchmusterung von Arzneistoffen unter Verwendung transgener Mäuse

- [0068] Die oben beschriebenen transgenen Mäuse können zur Durchmusterung auf potentielle Aktivität von Testarzneistoffen in der Behandlung der Alzheimer-Krankheit verwendet werden.
- [0069] APP-Expression und -Reifung können unter Detektion von mRNA durch Northern-Blots und Detektion von Polypeptiden unter Verwendung polyklonaler und monoklonaler Antikörper, die spezifisch für die terminalen Regionen der Zielpeptide sind, untersucht werden.
- [0070] Histopathologische Beobachtungen können unter Verwendung immunohistologischer Techniken vorgenommen werden, um die Identifizierung von Amyloid-Plaques zu erlauben, und in-situ-Hybridisierung unter Verwendung markierter Sonden auf ZielmRNA.

[0071] Die Beobachtung von Verhaltensänderungen kann herkömmliche Untersuchungen einsetzen, die zur Beurteilung von Lern- und Gedächtnismängeln verwendet werden.

Literaturstellen

1. Dyrks T., Weidemann A., Mulhaupt G., Salbaum J. M., Lemaire H. -G., Kang J., Müller-Hill B., Masters C. L., Beyreuther K. (1988), EMBO J. 7, 949–957.
2. Dyrks T., Dyrks E., Mönning U., Urmoneit B., Turner J., Beyreuther K. (1993), FEBS Letters 335, 89–93.
3. Haass C., Hung A. Y., Schlossmacher M. G., Teplow D. B., Selkoe D. J. (1993), JBC 268, 3021–3024.
4. Suzuki N., Cheung T. T., Cai X. D., Odaka A., Otvos L. Jr., Eckman C., Golde T. E., Younkin S. G. (1994), Science 264, 1336–1340.
5. Wirak D. O. et al (1991), Science 253, 323–325.
6. Kawabata S. (1991), Nature 354, 476–478.
7. Sandhu F. A. (1991), JBC 266, 21331–21334.
8. Hogan et al., "Manipulating the mouse embryo", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1994).
9. "Teratocarcinomas and embryonic stem cells, a practical approach" Hrsg. E. J. Robertson, IRL Press, 1987.
10. Maniatis et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1989).
11. Dyrks T., Dyrks E., Masters C., Beyreuther K. (1992), FEBS Letters 309, 20–24.
12. Greenberg B. D. et al., Neurobiology of Aging (1996) 17(2) 153–171.
13. Games et al., Nature (1995) 373, 523–527.
14. M. Fischer et al., EMBO J. (1996), 15(6), 1255–64.
15. "Transgenic animal technology", a Laboratory Handbook, Hrsg. C. A. Pinkert (Academic Press Inc. 1994).
16. "Transgenesis Techniques" Principles and Protocols, Hrsg. D. Murphy and D. A. Carter (Humana Press, Totowa, New Jersey 1993).
17. "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells", a Practical Approach, Hrsg. E. J. Robertson (IRL Press 1987).
18. Forss-Petter et al., (1990) Neuron 5, 197.
19. Ray et al., Genes and Development 5, 2265–2273 (1991).
20. Sasahara et al., Cell 64; 217–227 (1991).
21. Ingraham et al., Mol. Cell. Biol. 6(8) 2923–31 (1986).
22. Howland et al., Neurobiol. Aging 16(4), 685–99 (1995).
23. Hergersberg et al., Hum. Mol. Genet. 4(3), 359–66 (1995).
24. Thomas et al., J. Virol. 68(11), 7099–107 (1994).
25. Tu et al., J. Cell Biol. 129(6), 1629–40 (1995).
26. Bartholoma et al., Mech. Dev. 48(3), 217–8 (1994).
27. Kock et al., J. Biol. Chem. 270(43), 25475–80 (1995).
28. Gloster et al., J. Neurosci. 14(12), 7319–30 (1994).
29. Thiesen et al., Mol. Cell. Biol. 13(12), 7666–76 (1993).
30. Duhamel-Clerin et al., Glia 11(1) 35–46 (1994).
31. Readhead et al., Cell 48, 703–712 (1987).
32. Baron et al., Nucl. Acids Res. 23(17), 3605–6 (1995).
33. Furth et al., PNAS USA 91, 9302–9306 (1994).
34. Tienari et al., EMBO J. 15, 5218–5229 (1996).
35. Scott et al., Prot. Sci. 1, 986–997 (1992).
36. Lichtenthaler et al., Neurobiology of Aging 17(4) Supp., s130–s131, Abstract 524.
37. Kang et al., Nature (1987) 325: 733–736.
38. Ponte et al., Nature (1998), 331: 525–527.
39. Kitaguchi et al., Nature (1988), 331: 530–532.
40. Sandbrink et al., J. Biol. Chem. (1994), 269: 1510–1517.
41. Nalbantoglu et al., Nature (1997) 387: 500–505.
42. Hsiao et al., Science (1996) 274, 99–103.
43. Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 13287–13292.
44. Borchelt et al., Neuron (1997) 19: 939–945.
45. Holcomb et al., Nature Med. (1998) 4: 97–100.
46. Duff, Trend Neurosci. (1997) 20: 279–80.
47. Lichtenthaler et al., Biochemistry (1997) 36: 15396– 15403.

Tabelle 2: Sequenzprotokolle

SPA4CT I45F

Protein

SEQ ID NO: 1

MLPGLALLLLAAWTARALEDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVVATV~~F~~VITLVMLK
KKQYTSIHGCVVEVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN

DNA

SEQ ID NO: 2

ATGCTGCCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGCGCCGCTGGACGGCTCGGGCGCTGGAGGATGCAGAATTCCGA
CATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTGTTCCTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAAGGT
GCAATCATTGGACTCATGGTGGCGGCTGTTGTCATAGCGACAGT~~CTTC~~GTCATCACCTTGGTGATGCTGAAG
AAGAAACAGTACACATCCATTTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGTCACCCAGAGGAGCGCCAC
CTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCCTTTGAGCAGATGCAGAAC

APP695 I45F

Protein

SEQ ID NO: 3

MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGRLLNMHMNVQNGKWSDPSGKTCTIDTKEGILQY
CQEVYPELQITNVVEANQPVTIQNWCKRGRKQCKTHPHFVIPIRCLVGEFVSDALLVPDKCKFLHQERMDVC
ETHLHWHTVAKETCSEKSTNLHDYGMLLPCGIDKFRGVEFVCCPLAEESDNVDSADAEEDSDVWGGADTD
YADGSEDKVVEVAEEEEVAEVEEEEADDEDEDGDEVEEEAEPEYEEATERTTSIATTTTTTTTESVEEVVR
EVCSEQAETGPCRAMISRWFYDVTGKCAPFFYGGCCGNRRNNRNFDTEEYCMVCGSAIPTTAASTPDAVD
KYLETPGDENEHAHFQKAKERLEAKHRERMSQVMREWEAEERQAKNLPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAAAN
ERQQLVETHMARVEAMLNDRRRRLALENYITALQAVPPRRHVFNMLKKYVRAEQKDRQHTLKHFEHVRMVDP
KKAQIRSQVMTHLRVIYERMNQSLSLLYNVPAVAEEIQDEVDELLQKEQNYSDDLANMISEPRISYGNDAN
LMPSLTETKTTVELLPVNGEFSLLDLQPWHSFGADSVPAANTENEVEPVDARPAADRGLTTRPGSGLTNIKTE
EISEVKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVVATV~~F~~VITLVMLKKKQYTSIHGCVV
EVDAAVTPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFEQMQN

DNA

SEQ ID NO: 4

ATGCTGCCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGCGCCGCTGGACGGCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACTGATGGT
AATGCTGGCCTGCTGGCTGAACCCAGATTGCCATGTTCTGTGGCAGACTGAACATGCACATGAATGTCCAG
AATGGGAAGTGGGATTTCAGATCCATCAGGACCAAAACCTGCATTGATACCAAGGAAGGCATCCTGCAGTAT
TGCCAAGAAGTCTACCTGAAGTGCAGATCACCAGTGTGGTAGAAGCCAACCAACAGTGACCATCCAGAAC
TGCTGCAAGCGGGGCCGCAAGCAGTGCAAGACCCATCCCCACTTTGTGATTCCCTACCGCTGCTTAGTTGGT
GAGTTTGTAAGTGATGCCCTTCTCGTTCTGACAAGTGCAAATCTTACACCAGGAGAGGATGGATGTTTGC
GAAACTCATCTTCACTGGCACACCGTCCGCAAAGAGACATGCAGTGAGAAGAGTACCAACTGCATGACTAC

GGCATGTTGCTGCCCTGCCGAATTGACAAGTTCCGAGGGGTAGAGTTTGTGTGTTGCCCACTGGCTGAAGAA
 AGTGACAATGTGGATTCTGCTGATGCCGAGGAGGATGACTCCGATGTCTGGTGGGGCGGAGCAGACACAGAC
 TATGCAGATGGGAGTGAAGACAAAGTAGTAGAAGTAGCAGAGGAGGAAGAAGTGGCTGAGCTGGAAGAAGAA
 GAAGCCGATGATGACGAGGACGATGAGGATGGTGTAGAGTAGAGGAAGAGGCTGAGGAACCCCTACGAAGAA
 GCCACAGAGAGAACCACCAGCATTGCCACCACCACCACCACCACCACAGAGTCTGTGGAAGAGGTGGTTTGA
 GAGGTGTGCTCTGAACAAGCCGAGACGGGGCCGTGCCGAGCAATGATCTCCCGCTGGTACTTTGATGTGACT
 GAAGGGAAGTGTGCCCCATTCTTTTACGGCGGATGTGGCGGAACCGGAACAACCGGAACAACCTTTGACACA
 GAAGAGTACTGCATGGCCGTGTGTGGCAGCGCCATTCTACAACAGCAGCCAGTACCCCTGATGCCGTTGAC
 AAGTATCTCGAGACACCTGGGGATGAGAATGAACATGCCCATTTCCAGAAAAGCCAAAGAGAGGCTTGAGGCC
 AAGCACCGAGAGAGAATGTCCAGGTCATGAGAGAATGGGAAGAGGCAGAACGTCAAGCAAAGAAGTGGCT
 AAAGCTGATAAGAAGGCAGTTATCCAGCATTTCCAGGAGAAAGTGAATCTTTGGAACAGGAAGCAGCCAAC
 GAGAGACAGCAGCTGGTGGAGACACATGGCCAGAGTGGGAAGCCATGCTCAATGACCGCCGCCGCTGGCC
 CTGGAGAACTACATCACCGCTCTGCAGGCTGTTCCTCCTCGGCTCGTCACGTGTTCAATATGCTAAAGAAG
 TATGTCCGCGCAGAACAGAAGGACAGACAGCACACCCTAAAGCATTTTCGAGCATGTCCGCATGGTGGATCCC
 AAGAAAGCCGCTCAGATCCCGTCCCAGGTTATGACACACCTCCGTGTGATTTATGAGCGCATGAATCACTCT
 CTCTCCCTGCTCTACAACGTGCCCTGCACTGCCCGAGGAGATTGAGGATGAAGTTGATGAGCTGCTTCAGAAA
 GAGCAAACTATTTCAGATGACGCTTGGCCAACATGATTAGTGAACCAAGGATCAGTTACGGAACGATGCT
 CTCATGCCATCTTTGACCGAAACGAAAACACCGTGGAGCTCCTTCCCGTGAATGGAGAGTTCAGCCTGGAC
 GATCTCCAGCCGTTGGCATTCTTTTGGGGCTGACTCTGTGCCAGCCAACACAGAAAACGAAGTTGAGCCTGTT
 GATGCCCCGCTGCTGCCGACCGAGGACTGACCACTCGACCAGGTTCTGGGTTGACAAATATCAAGACGGAG
 GAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTG
 GTGTTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTCAAACAAAGGTGAATCATTGGACTCATGGTGGCGGTGTTGTCATA
 GCGACAGTCTTCGTGTCATCACCTTGGTGTGCTGAACAAGAAACAGTACACATCCATTTCATCATGCTGTGGTG
 GAGGTTGACGCCGCTGTACCCAGAGGAGCGCCACCTGTCCAAGATGCACGAGAACGGCTACGAAAATCCA
 ACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGCAGAACTAG

Patentansprüche

1. Konstrukt, das eine DNA-Sequenz umfasst, die entweder humanes Amyloid-Vorläuferprotein (APP) oder A4CT codiert, worin die DNA-Sequenz die Mutation I45F codiert (Numerierung relativ zu A4CT).
2. Konstrukt gemäss Anspruch 1, worin die DNA-Sequenz funktionsfähig mit einer Promotor-Sequenz verknüpft ist.
3. Konstrukt gemäss Anspruch 1, worin das Konstrukt ferner eine Insertion in der Transmembrandomäne einer Sequenz von 1 bis 10 Aminosäureresten codiert.
4. Konstrukt gemäss Anspruch 3, worin die Insertion sich zwischen T48 und L49 befindet.
5. Konstrukt gemäss Anspruch 3 oder 4, worin die Reste zur Insertion ausgewählt sind aus F, I, G, Y, L, A, P, W, M, S, T, N und Q.
6. Konstrukt gemäss einem der Ansprüche 3 bis 5, worin die Insertion 2 bis 6 Reste lang ist.
7. Konstrukt gemäss Anspruch 6, worin die Insertion LV ist.
8. Konstrukt gemäss jedem vorhergehenden Anspruch, worin das Konstrukt zusätzlich eine aus V46F, V46I, V46G, V46Y, V46L, V46A, V46P, V46W, V46M, V46S, V46T, V46N oder V46Q ausgewählte Mutation codiert.
9. Konstrukt gemäss jedem vorhergehenden Anspruch, worin das Konstrukt eine A4CT-DNA-Sequenz umfasst und ferner die Amyloid-Vorläuferprotein-Signalsequenz (APP-Reste 1 bis 17) unmittelbar stromaufwärts

der A4CT-DNA-Sequenz zusammen mit Inserten von hydrophoben Resten zwischen codierenden Regionen für das Signalpeptid und A4CT codiert.

10. Konstrukt gemäss jedem vorhergehenden Anspruch, das einen Säugetier-Promotor umfasst, ausgewählt aus humanem APP (Amyloid-Vorläuferprotein); neuronenspezifischer Enolase der Ratte; humanem β -Actin; humanem PDGF β (aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor β); Maus-Thy 1; Prionprotein-Promotor der Maus; Prionprotein-Promotor des syrischen Hamsters; Ratten-Synapsin 1; humanem FMR1 (fragile x-mentale Retardierung 1); humanem Neurofilament low, middle; NEX-1; Maus-APLP2 (β -Amyloidvorläuferartiges Protein 2); Ratten- α -Tubulin; Maus-Transferin; Maus-HMGCR (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase) und basischem Maus-Myelinprotein.

11. Konstrukt gemäss Anspruch 1, das die Sequenz SPA4CT I45F (SEQ ID NO: 2) umfasst.

12. Konstrukt gemäss Anspruch 11, worin die DNA-Sequenz funktionsfähig mit Maus-Prion-Proteinpromotor verknüpft ist.

13. Konstrukt gemäss Anspruch 1, das die Sequenz APP695 I45F (SEQ ID NO: 4) umfasst.

14. Konstrukt gemäss Anspruch 13, worin die DNA-Sequenz funktionsfähig an syrischer Hamster-Prionprotein-Promotor geknüpft ist.

15. Nicht-humanes transgenes Säugetier, dessen Zellen ein Konstrukt gemäss jedem vorhergehenden Anspruch enthalten.

16. Transgenes Säugetier gemäss Anspruch 15, das ein Nagetier ist.

17. Transgenes Säugetier gemäss Anspruch 16, das eine Maus ist.

18. Säugetier-Wirtszelle, die das Konstrukt gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14 exprimiert.

19. Vektor, der das Konstrukt gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.

20. Verfahren zur Durchmusterung auf Arzneistoffe, die die Ablagerung von β A4 hemmen, durch Verabreichung eines Testarzneistoffs an das transgene Säugetier von Anspruch 15, 16 oder 17 oder ein Zellkulturmedium, das die Säugetier-Wirtszelle von Anspruch 18 enthält, und Beobachten von Veränderungen in der APP-Expression und -Reifung, Histopathologie und/oder Verhaltensänderungen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen