

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902047576A1

Publication Date

20131104

Applicant

AVANTEA S.R.L.

Title

NUOVO MODELLO ANIMALE TRANSGENICO DI SCLEROSI LATERALE
AMIOτροφICA

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"Nuovo modello animale transgenico di Sclerosi Laterale Amiotrofica"

Di: Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, di nazionalità italiana, Via Bologna 148, 10154 Torino (TO); Avantea S.r.l., di nazionalità italiana, Via Porcellasco 7/F - 26100 Cremona (CR)

Inventori designati: Cristina CASALONE, Cesare GALLI, Maria Novella CHIEPPA, Cristiano CORONA, Caterina BENDOTTI, Andrea PEROTA, Giovanna LAZZARI, Maria CARAMELLI, Irina LAGUTINA

Depositata il: 4 maggio 2012

* * *

TESTO DELLA DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo animale transgenico come modello di Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).

SFONDO TECNOLOGICO

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è caratterizzata da una degenerazione selettiva e progressiva dei motoneuroni superiori e inferiori, con conseguente debolezza muscolare, atrofia, e che si evolve fino alla completa paralisi. L'impatto della malattia sulla qualità della vita dei pazienti è devastante e la morte avviene in 2 - 5 anni. La SLA può insorgere in due forme: familiare (F-SLA) e sporadica (S-SLA). La F-SLA rappresenta il 5-10% dei casi di SLA ed è correlata ad alcune mutazioni genetiche, il più delle volte ereditabili in modo

dominante. Quasi il 20% delle forme F-SLA sono legate a più di 100 mutazioni nel gene della Cu/Zn superossido dismutasi (SOD1), ognuna delle quali mostra un modello ereditario di tipo dominante.

Un tratto caratteristico della F-SLA, legato a SOD1 mutato, è l'anormale accumulo di ubiquitina - proteina immunoreattiva mal ripiegata nel citoplasma dei motoneuroni degeneranti. E' stato ipotizzato che il mal ripiegamento e l'aggregazione della proteina possa contribuire alla patogenesi della malattia, sebbene un ruolo causativo rimanga controverso ed i meccanismi di patogenesi alla base della SLA rimangono sostanzialmente sconosciuti.

La ricerca sulla SLA si basa principalmente su modelli animali sperimentali come ratti e topi transgenici sovra-esprimenti il SOD1 umano mutante. Oltre ai modelli murini, una varietà di specie animali come lo "zebrafish", il *Caenorhabditis elegans* e la *Drosophila melanogaster* è già stata impiegata per chiarire i meccanismi patogenetici della SLA, anche se la loro distanza filogenetica dalla specie umana ne impedisce l'impiego nella ricerca clinica.

I ratti, invece, certamente rappresentano un'alternativa interessante per mimare le malattie neurodegenerative poiché la loro dimensione maggiore consente alcune procedure sperimentali che non sono facilmente effettuabili in altre specie animali da laboratorio. La mancanza di strumenti efficaci per la loro manipolazione genetica ha però drasticamente limitato l'uso del ratto come modello per malattie umane (Bugos et al., 2009).

Sino ad oggi è stato prodotto un gran numero di modelli murini portatori di una certa varietà di mutazioni a carico del gene SOD1. Attualmente, il modello animale più

utilizzato è un topo transgenico portatore di una sostituzione glicina / alanina al codone 93 (G93A) del gene SOD1. Questi topi riproducono fedelmente la progressione del fenotipo dei pazienti SLA, sviluppando una rapida progressione della degenerazione a carico dei motoneuroni, caratterizzata da debolezza muscolare degli arti che si evolve in paralisi e morte prematura quattro mesi dopo l'insorgenza dei sintomi (Turner e Talbot, 2008), intervallo temporale troppo breve confrontato con la durata della vita del topo rispetto all'insorgere della malattia negli esseri umani. Questi modelli animali hanno sicuramente facilitato le indagini sulla vulnerabilità selettiva con la quale i motoneuroni sono colpiti, tuttavia, recentemente, sono stati sollevati dubbi circa l'idoneità dei roditori nel riprodurre fedelmente la patologia umana (Schnabel, 2008; Scott et al, 2008). I risultati incoraggianti che sono stati ottenuti dalle prove farmacologiche condotte sui roditori, infatti, non sono mai stati tradotti in un reale beneficio per gli esseri umani (Benatar, 2007; Van de Bosch, 2011) e anzi, in alcuni casi, molecole in grado di ritardare la progressione della malattia nei topi transgenici, come la minociclina, hanno portato addirittura ad un effetto aggravante la patologia nei pazienti affetti da SLA (Gordon et al., 2007).

Poiché l'essere umano e i roditori si differenziano per dimensioni, durata della vita, fisiologia, anatomia e biochimica, l'estrapolazione dei dati risulta difficile.

Nella letteratura brevettuale è stata individuata la domanda di brevetto internazionale WO-A-2007/124751, riguardante un maiale transgenico che mostra un fenotipo associabile alla SLA. Tale maiale transgenico è stato realizzato mediante una tecnica conosciuta con il nome di

"Sperm Mediated Gene Transfer" (SMGT). Tale tecnica non è tuttavia efficiente. Infatti, tale tecnica consente l'integrazione del transgene nella cellula ospite, ma non garantisce la sua espressione in quanto il transgene è riarrangiato impedendo, quindi, l'espressione proteica. Gli animali ottenuti con la tecnica SMGT spesso sono "mosaici", cioè, l'integrazione avviene in tempi differenti dopo la fecondazione e, quindi, non tutte le cellule sono transgeniche. Inoltre i dati riguardanti l'espressione del gene endogeno mutato (proteina del gene suino SOD1 mutato) nei tessuti dei suini transgenici sono mancanti.

Sulla base dei precedenti svantaggi, dovrebbe essere creato un modello animale più omologo in un animale evolutivamente più vicino alla specie umana al fine di fornire uno strumento migliore nello studio della malattia.

SCOPO E SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è fornire un nuovo modello animale per la SLA che potrebbe essere usato in studi clinici per l'identificazione di terapie per la specie umana. In accordo con l'invenzione, il precedente scopo è raggiunto grazie alle composizioni specificate nelle rivendicazioni che seguono, che s'intendono essere parte integrante della presente descrizione.

In una forma di attuazione dell'invenzione la presente descrizione fornisce un suino transgenico idoneo a sviluppare la Sclerosi Laterale Amiotrofica, in cui il suino è transgenico poiché esprime un gene esogeno, preferibilmente in cellule neuronali, il gene esogeno essendo un gene umano SOD1 recante una mutazione. Il gene umano SOD1 è preferibilmente mutato in corrispondenza del codone 93, con la conversione di una glicina in alanina.

In un'ulteriore forma di attuazione il suino transgenico è stato ottenuto mediante i) trasfezione in vitro di cellule somatiche, preferibilmente fibroblasti, con il gene esogeno e ii) tecnica di trasferimento nucleare di cellule somatiche (SCNT), che permette l'espressione del gene esogeno in tutte le cellule dell'animale, preferibilmente quelle neuronali, rappresentando così più fedelmente la patologia umana.

Una forma di attuazione preferita della presente descrizione descrive la generazione di suinetti transgenici vivi di razza Yucatan che esprimono la proteina mutata codificata dal gene hSOD1-G93A e quindi adatti a sviluppare i sintomi della SLA.

In un'ulteriore forma di attuazione, la presente descrizione riguarda un procedimento per la generazione di un suino transgenico adatto a sviluppare la Sclerosi Laterale Amiotrofica, in cui il suino è transgenico per l'espressione di un gene esogeno preferibilmente in cellule neuronali, il gene esogeno essendo un gene umano SOD1 recante una mutazione (dove il gene umano SOD1 è preferibilmente mutato in corrispondenza del codone 93, con la conversione di una glicina in alanina).

Il procedimento comprende le seguenti operazioni:

- a. fornire un vettore codificante il gene esogeno;
- b. fornire fibroblasti di suino adulto;
- c. effettuare la nucleofezione del vettore nei fibroblasti, ottenendo fibroblasti transgenici;
- d. fornire almeno un oocita suino enucleato mediante rimozione dei cromosomi metafasici da un oocita intatto;
- e. mettere in contatto almeno un oocita enucleato con almeno un fibroblasto transgenico;
- f. fondere almeno un oocita enucleato con almeno un

fibroblasto transgenico ottenendo un embrione;

g. coltivare l'embrione;

h. impiantare almeno un embrione coltivato, preferibilmente 70, più preferibilmente 120, nell'utero di una scrofa;

i. parto naturale o cesareo di almeno un suinetto transgenico al termine della gravidanza della scrofa.

In ulteriori forme di attuazione, i suini transgenici qui descritti possono essere utilizzati per lo screening di composti farmaceuticamente attivi nel trattamento della SLA umana e/o come modello per lo studio della SLA umana.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

L'invenzione sarà ora descritta, soltanto a titolo di esempio, con riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

- **FIG. 1: rappresentazione grafica della struttura di pMG5'3'MARPuro5171-hSOD1G93A.**

- **FIG. 2: sequenza completa del vettore pMG5'3'MARPuro5171-hSOD1G93A.**

- **FIG. 3: ICC sui cloni di PAF (fibroblasti di maiale adulto) trasfettati con il vettore pMG5'3'MARPuro5171-hSOD1G93A.**

[a] Cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC) usate come controllo positivo, con punteggio = 2 del livello di espressione del transgene; [b] PAF di tipo normale utilizzati come controllo negativo (punteggio = 0), [c] clone PAF 1D2 con punteggio = 1, [d] clone PAF 1A1 con punteggio = 3; [e] clone PAF 2B2 con punteggio = 4 e [f] clone 2A1 con punteggio = 6. DAPI è il filtro usato per evidenziare la colorazione nucleare Hoechst per identificare il nucleo delle cellule. FITCH permette la

rilevazione del fluoroforo coniugato con l'anticorpo secondario anti-coniglio e quindi l'espressione del transgene.

- **FIG. 4: ICC sui PAF ottenuti dalle biopsie auricolari dei 5 maiali transgenici vivi.** L'immagine mostra il segnale FITCH ottenuto con la colorazione dell'anticorpo Millipore 07-403. L'espressione di hSOD1-G93A è stata rilevata in tutti gli animali analizzati.

[A] e [B] mostrano la colorazione nei PAF di tipo normale e nelle cellule HUVEC, usati rispettivamente come controllo negativo e positivo.

[C] Il suino 168 è caratterizzato da una moderata colorazione citoplasmatica e perinucleare.

[D] Il suino 173 mostra un'intensa marcatura citoplasmatica assieme ad un anello perinucleare, evidente in alcune cellule.

[E] e [F] mostrano una marcatura nucleare con debole colorazione citoplasmatica rilevata rispettivamente nei suini 204 e 205. [G] Il suino 174 mostra una debole colorazione citoplasmatica. Anelli perinucleari e debole colorazione dei nuclei possono essere inoltre osservati in alcune cellule. [H] mostra un'intensa marcatura citoplasmatica rilevata nelle cellule del suinetto nato morto 169.

- **FIG. 5: WB sul midollo spinale dei suinetti nati morti.** La corsia [A] visualizza i risultati ottenuti con Genetex GTX 100659 alla diluizione 1:800, mentre la corsia [B] mostra quelli ottenuti, sugli stessi campioni, con Millipore 07-403 alla diluizione 1:1000. Il campione 162 corrisponde al midollo spinale omogeneizzato da un suino non transgenico, utilizzato come controllo negativo. Nella corsia [C] è possibile apprezzare un'analisi WB

condotta con Millipore 07-403 alla diluizione 1:1000 su midollo spinale di altri suinetti e su midollo spinale omogeneizzato da topo hSOD1-G93A, usato come controllo positivo. In tutti i campioni provenienti dai suinetti hSOD1-G93A è possibile apprezzare due linee, corrispondenti alle due isoforme della SOD1: la proteina endogena suina che presenta un peso molecolare inferiore (16 kDa) e quella transgenica umana, con peso molecolare più alto (20 kDa).

- **FIG. 6: Genetex GTX 100659 IHC su campioni di suinetti FFPE.** Nella figura A è possibile apprezzare la colorazione di hSOD1-G93A nell'ileo con gruppi di cellule positive accanto alla *muscularis mucosa*. Le figure B e C mostrano lo schema di deposizione a livello dell'area *Hypothalamica lateralis*. Nella stessa area (figura D), è anche possibile apprezzare cellule isolate mostranti la colorazione di hSOD1-G93A. La figura E illustra un fascio di cellule positive lungo il tratto ottico. La figura F mostra lo schema di deposizione nel midollo spinale: è possibile apprezzare aggregati granulari lungo le fibre.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce un modello animale, che consiste in una linea genetica di suini portatrice del gene umano SOD1 recante la mutazione G93A, responsabile dell'insorgenza della SLA che è utile nello studio di tale patologia e per lo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e di nuovi approcci terapeutici per la specie umana.

Suini transgenici sono stati prodotti mediante differenti tecniche quali la microiniezione pronucleare, il trasferimento genico mediato da sperma e da vettore lentivirale.

Tuttavia, queste tecniche presentano alcuni aspetti

svantaggiosi. La microiniezione pronucleare è, infatti, altamente inefficiente (Clark e Whitelaw, 2003), il trasferimento genico mediato da sperma sembra promettente per via della sua semplicità, ma è negativamente influenzato da grande variabilità e produce animali transgenici con un'espressione del transgene non uniforme (Lavitrano et al, 2002; WO-A-2007/124751) e sebbene il trasferimento lentivirale di transgeni offra un metodo efficiente per la generazione di suini transgenici (Whitelaw et al., 2004.), l'uso di lentivirus (HIV-1; EIAV) pone molte preoccupazioni di sicurezza ed etiche, per via della sua capacità dimostrata di attivare oncogeni così come della possibilità di riacquisire le loro caratteristiche patogene.

Pertanto, la presente invenzione ha utilizzato una tecnica differente rispetto alle tecniche precedenti utilizzate per generare modelli animali ALS: la transfezione in vitro di cellule somatiche coltivate combinata con il trasferimento nucleare in cellule somatiche (SCNT).

Gli inventori hanno costruito un vettore capace di promuovere nelle specie suine, preferibilmente maiali, più preferibilmente nei cosiddetti mini-pig, l'espressione della proteina mutata SOD1, in modo analogo a quanto avviene in un paziente affetto da SLA.

Per raggiungere quest'obiettivo gli inventori sono riusciti ad ottenere una espressione stabile e riproducibile a lungo termine del gene esogeno (hSOD1-G93A) in animali vivi.

Gli inventori, infatti, in uno studio precedente - utilizzando un vettore differente (recante la neomicina come marcatore per la selezione dell'espressione del gene

mutato) - hanno riscontrato che solo il 22% dei cloni positivi ha mostrato un'espressione del transgene elevata ed uniforme 25 giorni dopo la transfezione, mentre i restanti cloni positivi hanno mostrato un'espressione variegata o effetti di silenziamento del transgene.

Nella presente invenzione, utilizzando la puromicina come marcatore per la selezione dell'espressione del gene mutato, gli inventori hanno risolto questo problema. In particolare, grazie alla capacità del farmaco (puromicina) di selezionare in modo più efficace e in minor tempo i cloni transgenici dopo quattro giorni dalla transfezione, gli inventori sono stati in grado di selezionare, durante la coltura in vitro, cloni cellulari transgenici dotati di un adeguato livello di espressione della proteina.

La trasformazione genetica degli animali provoca, in genere, una grande e casuale variabilità nell'espressione del transgene tra diversi individui transgenici. Questa variabilità è stata attribuita all'"effetto di posizionamento" cioè la presenza di diversi siti di integrazione e del numero di copie del transgene.

Poiché l'integrazione del DNA esogeno sembra verificarsi casualmente nel genoma dell'animale ospite, è stato ipotizzato che alcuni transgeni fossero integrati in regioni trascrizionalmente inattive, mentre altri in regioni relativamente attive dal punto di vista trascrizionale (Park et al., 2002).

Per risolvere i problemi legati all'integrazione casuale del transgene nel genoma suino, gli inventori hanno deciso di introdurre nei loro costrutti pCAGGS un elemento (noto come 5'MAR) che si trova a monte del gene del lisozima di pollo e che comprende una regione di circa 3 kb (Phi-Van e Stratling, 1996).

La combinazione della cassetta di selezione recante la puromicina, con uno screening accurato dei cloni cellulari secondo le caratteristiche desiderate in combinazione con la tecnica SCNT si è rivelata di successo e gli inventori sono riusciti a produrre un gran numero di suinetti, di cui cinque sono vivi ed hanno raggiunto l'età adulta. Tutti i suini generati in questo modo esprimono la proteina transgenica umana hSOD1-G93A.

I vettori che sono stati utilizzati per produrre i suinetti transgenici hSOD1-G93A si sono rivelati molto efficaci nell'ottenere un'espressione ubiquitaria nelle cellule somatiche e nei tessuti degli animali generati mediante SCNT.

Gli inventori hanno deciso di utilizzare negli esperimenti di SCNT un pool di cellule donatrici dotate di diversi livelli d'espressione del transgene in modo da minimizzare il rischio di utilizzare cloni cellulari non in grado di generare animali vitali. Infatti, poiché questo è il primo modello suino hSOD1-G93A prodotto finora, non sono disponibili dati circa la tossicità legata al livello di espressione del transgene sia nelle prime fasi dello sviluppo embrionale del suino che dopo il trasferimento degli embrioni nell'utero delle scrofe usate come madri.

Dato che sono state impiegate negli esperimenti di SCNT cellule donatrici di nucleo dotate di diversi livelli di espressione del transgene, i suinetti clonati presentano un'espressione del transgene altrettanto variabile, a seconda della particolare cellula da cui sono stati ottenuti.

Tuttavia, al fine di standardizzare il modello suino hSOD1-G93A, i suini transgenici possono essere ri-clonati con un secondo esperimento di SCNT a partire dalle cellule

crioconservate dopo la nascita, dall'animale con le caratteristiche più desiderabili; oppure possono essere accoppiati con una scrofa per ottenere la generazione F1, che secondo le leggi di Mendel, sarà al 50% portatrice della malattia.

La proteina SOD1 è un enzima con funzione antiossidante, responsabile della riduzione dei livelli dello ione superossido (O_2^-), un radicale libero tossico prodotto durante il metabolismo ossidativo cellulare. Lo ione superossido è in grado di alterare proteine, membrane e DNA. Proprio il coinvolgimento di una proteina mutata nella patogenesi porta ad includere la SLA nella famiglia delle proteinopatie. Studi condotti su roditori transgenici sono stati finalizzati alla comprensione dei meccanismi attraverso i quali il gene SOD1 mutato porta all'insorgenza della SLA. Questi studi hanno escluso, come causa della degenerazione dei neuroni motori, la perdita dell'attività dismutasica propria dell'enzima e hanno permesso di evidenziare la formazione, nei tessuti colpiti, di aggregati di proteine ubiquitinate contenenti, tra le altre, la SOD1 mutata: si presume che queste inclusioni proteiche giochino un ruolo nell'interruzione di alcune funzioni cellulari e nel danneggiamento dei mitocondri, dei proteasomi, dei meccanismi di ripiegamento proteico o di altre proteine.

A differenza dei modelli murini che mostrano un elevatissimo livello di espressione del transgene e un decorso rapido della malattia (Bendotti e Carri, 2004), il presente modello suino possiede un livello di espressione della proteina mutata paragonabile a quello dei pazienti umani, dove la mutazione di un singolo allele risulta in un'acquisizione di funzione tossica.

I suinetti che esprimono hSOD1-G93A esprimono già alla nascita la proteina mutata e potrebbero mostrare una degenerazione completa dei neuroni motori superiori ed inferiori, con conseguente debolezza muscolare, atrofia che si evolve alla paralisi completa, con tempi e modalità simili a quelle che si verificano nei pazienti affetti da SLA. Da un lato questo potrebbe tradursi in una fase pre-clinica più lunga, con conseguente aumento dei costi di mantenimento degli animali, ma d'altra parte questo modello suino hSOD1-G93A fornisce una preziosa occasione per individuare marcatori precoci, essendo più fedele nel mimare la patologia umana, dal momento che la SLA è una patologia che tipicamente insorge in età adulta.

Attualmente, un modello animale in grado di ricapitolare tutti gli aspetti fondamentali della SLA non è ancora stato prodotto.

Tuttavia, siccome stanno emergendo crescenti difficoltà nel tradurre le informazioni raccolte dai modelli murini in trials terapeutici per i pazienti affetti, vi è l'urgente necessità di un modello sperimentale intermedio. Gli inventori ritengono che il modello suino possa fornire questo ponte fondamentale tra le conoscenze acquisite dai modelli murini e la necessità di curare la malattia.

Materiali e Metodi

Sperimentazione animale

Tutte le procedure che coinvolgono gli animali e la loro cura sono condotte in conformità alle normative nazionali e internazionali vigenti (Direttiva del Consiglio CEE 86/609, OJL358, 1, 12 dicembre 1987; Decreto

Legislativo 116/92, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana 10, 18 febbraio 1992; e Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio, US National Research Council, 1996) e dopo l'approvazione del Comitato Etico locale di LTR-Avantea. I fibroblasti (PAF) sono stati ottenuti dalla biopsia auricolare di un suino adulto di sesso maschile di razza Yucatan Black, proveniente da un allevamento italiano. In seguito i PAF sono stati utilizzati in procedure di clonazione volte ad ottenere maiali normali.

Costruzione del vettore

Gli inventori hanno precedentemente sviluppato un vettore ubiquitario per l'espressione della GFP, guidata dal promotore ibrido pCAGGS (enhancer CMV-IE + promotore della beta actina di pollo) (Niwa et al., 1991) che è caratterizzato dal mantenere un elevato livello di espressione nella generazione di suini F1 (Brunetti et al., 2008).

Il Vettore di Destinazione pMGOrfA5'3'MARpuro5171 è stato creato inserendo il "Multisite Gateway system Conversion cassette (OrfA)" (Invitrogen) nel vettore di espressione ubiquitario. Il vettore risultante ha il promotore pCAGGS inserito tra due elementi isolatori (5' MAR del gene del lisozima di pollo) (McKnight et al., 1992) che servono a prevenire vari effetti di silenziamento (posizionale o legato al numero di copie). La struttura è stata inoltre provvista di una cassetta di selezione SV40-Puro floxata, poi amovibile mediante Cre ricombinasi, necessaria a selezionare i cloni transfettati.

Il frammento BamHI/XhoI del cDNA della hSOD1G93A è stato ottenuto mediante restrizione del plasmide pcDNA3.0hSOD1-G93A ed è stato inserito nel vettore

pENTRL1L2OligoSacISalI, ottenendo pENTRL1L2-hSOD1-G93A.

Il frammento SalI-BamHI è stato rimosso dal costrutto e il risultante vettore pENTRL1L2-hSOD1-G93AdelSB è stato utilizzato, dopo sequenziamento, in una reazione di scambio LR con il vettore di destinazione pMGOrfA5'3'MARpuro5171. Questa reazione di scambio, mediata dalla Clonasi LR, è stato utilizzato per trasformare cellule chimicamente competenti di E.coli (One Shot Mach1-Invitrogen). Il vettore risultante pMG5'3'MARPuro5171-hSOD1G93A (Figure 1 e 2 - SEQ ID No.: 1) è stato purificato mediante il Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania), analizzato mediante enzimi di restrizione, confermato mediante sequenziamento (Figura 2) e infine linearizzato mediante ApaLI (Fermentas). Dopo purificazione con fenolo-cloroformio il vettore è stato precipitato e risospeso in tampone TE.

Preparazione e coltura delle linee cellulari

Culture primarie di fibroblasti suini ("pig adult fibroblast" PAF) sono ottenute da biopsia auricolare condotta su un esemplare di maschio adulto. I campioni biotici sono stati tagliati in piccoli pezzi con un bisturi e sono stati distribuiti in piastre rivestite di gelatina contenenti 1,5 ml di terreno DMEM/TCM199 al 20% in siero bovino fetale (FBS). Il terreno di coltura è stato cambiato ogni 3 giorni.

Le cellule sono state lasciate crescere fino a raggiungere il 50% di confluenza. Successivamente i pezzi di tessuto sono stati rimossi e le cellule sono state sub-coltivate fino a confluenza in DMEM/TCM199 col 10% di FBS e di fattori di crescita FBS (bFGF). Le condizioni di crescita erano costituite da una temperatura di 38° C e da un'atmosfera modificata composta al 90% N₂, il 5% di O₂ ed

il 5% di CO₂.

Le colture con crescita esponenziale sono state crioconservate in DMEM/TCM199 col 20% di FBS e col 10% di DMSO e conservate in azoto liquido. Queste cellule sono state usate durante i seguenti esperimenti.

Transfezione del vettore hSOD1-G93A nei fibroblasti adulti

Il giorno prima della transfezione, i PAF al passaggio 3 sono tripsinizzati, contati e piastrati in piastre da 60 mm in modo da ottenere circa 1x10⁶ cellule al 80% di confluenza in 24 ore. Il giorno della transfezione, le cellule sono tripsinizzate, contate e risospese in 100 µl di soluzione di nucleoinfezione (Basic Kit Nucleofector, Prim fibroblasti. Amaxa, Cologne, Germania), miscelate con 5 µg di vettore pMG53MARPuro5171-hSOD1-G93A linearizzato. I PAF ed il vettore linearizzato sono stati quindi trasferiti nella cuvette di nucleofezione e transfettati mediante programma V-24 (Nucleofector Amaxa).

Dopo la nucleofezione, le cellule sono piastrate in Petri da 60 mm contenenti terreno di coltura fresco. Dopo 24 ore è stato aggiunto il farmaco (puromicina: 1 µg/ml) per selezionare le colonie. Dopo 4 giorni, le colonie resistenti alla puromicina sono isolate utilizzando piastre per clonazione con diametro di 5 mm e trasferite in piastre da 24 mm. Le cellule sono poi espanse in DMEM/TCM199 al 10% di FBS con 5 ng/mL di bFGF ad una temperatura di 38,5°C e in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂ e il 5% di O₂. Un'aliquota è stata crioconservata come descritto in precedenza per essere in seguito usata nel trasferimento nucleare mentre le cellule rimanenti sono state espanse per effettuare le analisi di espressione.

Immunocitochimica (ICC)

Le cellule (PAF transgenici hSOD1-G93A e le colture primarie ottenute dalle biopsie auricolari dei suinetti transgenici) sono state fissate in PFA (paraformaldeide) al 4% e quindi conservate in tampone fosfato (PB) fino all'analisi.

Per rilevare l'espressione della proteina SOD1 umana mediante immunocitochimica (ICC) gli inventori hanno utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio (07-403 Millipore, alla concentrazione di 1:200), diretto contro l'intera lunghezza della SOD1 normale più una metionina N-terminale.

Dopo il blocco dei siti di legame aspecifici (con siero di capra al 10%) è condotta l'incubazione con l'anticorpo primario (2h a RT). Dopo 3 lavaggi (PB con 0,2% di BSA e 0,05% di saponina, ciascuno di 3 minuti) è stata eseguita l'incubazione con un anticorpo secondario coniugato FITCH (1h a RT). I nuclei sono stati controcolorati con Hoechst (15', RT). Dopo due lavaggi i vetrini sono stati infine montati con *Mounting Medium* (Citifluor). Sono state usate cellule HUVEC e PAF normali rispettivamente come controllo positivo e negativo. La fluorescenza è stata rilevata esponendo i fibroblasti ad una luce epifluorescente montata su un microscopio invertito (Nikon TE-DH100W) dotato di un filtro FITC (per il verde) e DAPI (per i nuclei) e con un sistema digitale per l'acquisizione di immagini (Nikon DIGITAL SIGHT DS-L1). Una valutazione soggettiva del livello di espressione del transgene è stata basata sul confronto dell'intensità della fluorescenza rilevabile nei cloni PAF con quella dei controlli. Al controllo negativo è stato assegnato un punteggio = 0 e al controllo positivo un punteggio = 2,

com'è mostrato nella Figura 3. Va sottolineato il fatto che i punteggi rappresentano una valutazione soggettiva dell'intensità di fluorescenza rilevata, pertanto i valori presentati in questo studio non sono misurati oggettivamente, né in senso assoluto.

Preparazione delle cellule donatrici di nucleo e SCNT

In base all'uniformità e all'intensità del loro livello di espressione sono stati selezionati, come donatori di nucleo, i seguenti cloni di PAF transgenici hSOD1-G93A: 1A1, 1A2, 1B1, 1C2, 1D1, 1D2, 1E2, 2A2, 2A6, 2B2, 2C1 e 2C3.

Il giorno prima del trasferimento nucleare, le cellule donatrici di nucleo in coltura sono portate nello stato di quiescenza mediante riduzione della concentrazione di siero (0,5% FBS); 30 minuti prima del trasferimento nucleare, le cellule sono state preparate mediante tripsinizzazione, lavate e risospese in SOF (Tervit et al., 1972) contenente 25 mM HEPES (H-SOF). Ovaie con corpo luteo sono state raccolte al macello e trasportate in laboratorio alla temperatura di 31-33°C. Gli oociti sono stati aspirati da follicoli con diametro superiore ai 3 mm, lavati e trasferiti in terreno di maturazione.

DMEM-F12 addizionato con 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS), 110 µg/ml di sodio piruvato, 75 µg/ml di acido ascorbico, 100 µg/ml di glutammina, 5 µg/ml di mioinositolo, 0,4 mM di cistina, 0,6 mM di cisteammina, ITS liquid media supplement (insulina, transferrina, selenite, Sigma, 1 µL/mL), gonadotropine (0,05 IU/ml FSH, 0,05 IU/ml LH; Pergovet 75, Serono), 100 ng/ml IGF1 (analogo ricombinante del fattore di crescita insulinico I), 50

ng/ml di EGF (analogo ricombinante del fattore di crescita epidermico), e 5 ng/ml di bFGF (ricombinante umano) è stato usato come terreno di maturazione.

Gli oociti sono stati coltivati a 38,5°C in un'atmosfera modificata al 5% di CO₂. Dopo 42 ore di maturazione gli oociti sono privati del cumulo ooforo mediante Vortex in presenza di ialuronidasi in H-SOF, quindi sono nuovamente trasferiti in medium di maturazione. Sono stati selezionati solo gli oociti con globulo polare estruso. Gli embrioni NT sono stati ricostruiti seguendo il metodo zona-free (Lagutina et al., 2005, 2006; Oback et al., 2003). La zona pellucida degli oociti con globulo polare estruso è stata digerita con 0,5% di pronasi in PBS. Gli oociti sono stati lavati in H-SOF al 10% di FBS e trasferiti in un terreno di maturazione. Tutte le manipolazioni seguenti sono state condotte in H-SOF al 10% di FCS. Prima di procedere all'enucleazione, gli oociti privati della zona pellucida sono stati esposti per 5 minuti all'azione della citocalasina B (5 µg/ml) e dell'Hoechst (5 µg/ml). I cromosomi in metafase sono stati rimossi mediante una pipetta per enucleazione smussata durante un'esposizione molto breve ai raggi UV.

Dopo enucleazione, i citoplasti zona-free sono stati lavati singolarmente per alcuni secondi in PBS addizionato con 300 µg/ml di fitoemoagglutinina P in PBS e rapidamente lasciati cadere su una singola cellula donatrice (Vajta et al., 2003) precipitata sul fondo di una microgoccia di sospensione diluita di cellule donatrici.

Da quarantasei a quarantotto ore dopo l'inizio della maturazione, le coppie di cellule che si sono formate sono state lavate in una soluzione di Mannitolo 0,3 M (priva di Ca⁺⁺, 100 µM di Mg⁺⁺), fuse mediante un doppio impulso DC di

1,2 kV/cm applicato per 30 μ sec e rimesse nel terreno di maturazione. 2 ore dopo (48-50 ore di maturazione), gli embrioni NT sono stati attivati mediante doppi impulsi DC di 1,2 kV/cm applicati per 30 μ sec in una soluzione di Mannitolo 0,3 M contenente 1mM di Ca^{++} (Cheong et al., 2002) e 100 di μ M di Mg. Dopo l'attivazione, gli embrioni sono stati mantenuti in coltura con terreno di maturazione con 5 μ g/ml di citocalasina B per 4 ore.

Gli embrioni NT sono stati coltivati in SOF integrato con amminoacidi essenziali e non essenziali e con 4 mg/mL di BSA (SOFaa) secondo una modifica al sistema Well-of-the-Well (WOW) (Vajta et al., 2000). Durante il periodo di coltura degli embrioni metà del terreno è sostituito con SOFaa fresco al terzo (D+3) e al quinto (D+5) giorno.

Sincronizzazione delle scrofe, trasferimento chirurgico degli embrioni, diagnosi di gravidanza e parto

L'estro è stato sincronizzato alimentando ciascuna scrofa per 15 giorni con 12 mg di altrenogest (Regumate, Intervet, Peschiera Borromeo, Italia), con un'iniezione di 0,15 mg di PgF2a (Dalmazin, Fatro, Ozzano Emilia, Italia) al 15° giorno di trattamento con regumate e un'iniezione di 1000 UI di hCG (Chorulon, Intervet) 96 ore dopo l'ultima somministrazione altrenogest.

Gli embrioni SCNT sono stati trapiantati nell'utero delle scrofe al 5° giorno (D+5) di sviluppo. Il trapianto degli embrioni è stato eseguito 4 giorni dopo l'ovulazione mediante laparotomia medio-ventrale e la gravidanza è stata esaminata al 29°, 36°, 50°, e 62° giorno di gestazione mediante ecografia. Il parto cesareo è effettuato al 114° giorno di gestazione.

Banche di tessuti

Una biopsia auricolare è stata eseguita su tutti i suinetti, al fine di ottenere colture cellulari primarie di fibroblasti (PAF) che sono state successivamente criopreservate per costituire una banca cellulare da conservare in azoto liquido. Da animali nati morti o sottoposti a eutanasia sono stati prelevati cervello, midollo spinale, nervi periferici, muscoli e organi. I campioni di tessuto sono stati fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) oppure fissati in paraformaldeide.

Dopo 24 ore, i campioni in paraformaldeide sono lavati 2 volte in PBS ed esposti a concentrazioni crescenti di saccarosio al fine di ottenere la criopreservazione. Infine, questi campioni sono conservati per 30 minuti in una soluzione 1:1 di saccarosio al 30% e OCT, infine inclusi in OCT e congelati in isopentano a -80°C.

Inoltre una parte di ogni tessuto è congelata istantaneamente in isopentano a -80°C.

Western Blot (WB)

Le cellule (i PAF transgenici hSOD1-G93A e le colture primarie ottenute dalle biopsie auricolari dei suinetti transgenici nati) sono lisate utilizzando Laemmli buffer 1X contenente β -mercaptoetanololo (5%) e bollite per 10 minuti. Le proteine totali sono quantificate con fluorimetro Qubit (Invitrogen) usando il kit di quantificazione QuantIT Protein (Invitrogen).

I tessuti ottenuti da suinetti nati morti sono omogeneizzati (1:5 mg/ml) in tampone di lisi (50 mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA pH8, 1,5mM MgCl₂, 10%

glicerolo anidro, 1% Triton, 100µg/ml (= 0,57 mM) PMSF). La quantificazione delle proteine è eseguita con il BCA Protein Assay Kit (Pierce).

Tredici µg di ciascun campione sono caricati su un gel Glicine-SDS-PAGE (4-12%) e separati elettroforeticamente per 45 minuti a 200V utilizzando la camera MiniproteanII (Biorad). Il blot su membrana Immuno-Blot PVDF (Biorad) è stato ottenuto con un voltaggio di 100V per 1h utilizzando il MiniproteanII electroblotter (Biorad) secondo il protocollo del produttore. Successivamente le membrane PVDF sono trattate seguendo le istruzioni del Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit Mouse/Rabbit (Roche). La rivelazione della proteina transgenica è condotta con l'anticorpo policlonale 07-403 (1:1000 Millipore) oppure con l'anticorpo policlonale GTX 100659 (1:800 Genetex), specificamente diretto contro una regione della proteina hSOD1 compresa fra gli amminoacidi 75 e 138, che è differente nelle isoforme umana e suina. L'espressione della β -actina di suino è rilevata con l'anticorpo monoclonale ab6276 (1:5000 Abcam). Le membrane trattate sono infine esposte, sviluppate e fissate.

Immunoistochimica (IHC)

Tutti i tessuti FFPE sono analizzati in IHC. Dopo lo smascheramento antigenico (95°C a bagnomaria per 20 minuti), le sezioni sono trattate con perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 10 minuti, per bloccare le perossidasi endogene. Le sezioni sono quindi incubate in siero normale di capra per 20 minuti e poi con l'anticorpo primario (GTX 100659; 1:250 in PBS) per tutta la notte a 4°C.

Successivamente, le sezioni sono lavate 3 volte in PBS

e incubate con l'anticorpo secondario (1:200) per 1 ora. Dopo ulteriori 3 lavaggi in PBS, le sezioni sono incubate con il complesso avidina/biotina per 30 minuti. La DAB è stata usata come rivelatore. Le sezioni sono controcolorate con ematossilina.

La rivelazione di complessi proteici positivi per la presenza di ubiquitina è condotta, con analogo protocollo senza lo smascheramento, con un anticorpo policlonale di coniglio (Dako Z0458, 1:100).

Risultati

Transfezione dei vettori hSOD1-G93A nei fibroblasti e relative analisi.

Gli esperimenti di transfezione condotti con il vettore pMG5'3'MARPuro-hSOD1-G93A hanno portato all'isolamento di 26 cloni PAF, che sono stati analizzati mediante WB e ICC. Tutti i cloni, elencati in Tabella 1, hanno mostrato diversi livelli di espressione del transgene, a cui è stato assegnato un punteggio. Quattro cloni hanno mostrato un livello di espressione del transgene inferiore a quello assegnato al controllo positivo (punteggio= 2), tre cloni hanno un punteggio d'espressione pari a quello del controllo. I rimanenti 19 cloni hanno manifestato un livello d'espressione più alto (con punteggio da 3 a 6).

Tabella 1

Clone	Punteggio
1A1	3
1A2	6
1A4	1
1A5	5
1B1	3
1B3	4
1B6	6
1C1	1

Clone	Punteggio
1C2	2
1C6	4
1D1	5
1D2	1
1D5	4
1D6	5
1E1	6
1E2	4
2A1	6
2A2	6
2A3	5
2A4	1
2A5	4
2A6	4
2B2	4
2C1	5
2C2	5
2C3	4

Trasferimento nucleare di cellule somatiche (SCNT)

Sono stati condotti sei esperimenti SCNT. Nel primo e nel secondo esperimento è stato utilizzato come donatore di nucleo un pool costituito dai cloni (1A1, 1C2, 1D2 e 1E2). Nel terzo e nel quarto esperimento è stato impiegato un pool composto dai cloni 1B1, 1D1, 2C1 e 2B2, mentre un pool composto dai cloni 1A2, 2A2, 2A6 e 2C è stato impiegato nel quinto e nel sesto esperimento. Tutti gli esperimenti di SCNT condotti sono elencati nella Tabella 2 dove vengono riportati i valori percentuali degli embrioni vitali ottenuti (che variano dal 35,38% al 50,50%). La tabella 2 contiene le seguenti informazioni: la colonna "ID cloni" riporta i nomi dei cloni PAF hSOD1-G93A che compongono il pool usato come donatore di nucleo. Nella colonna "N° SCNT" è annotato il numero relativo all'esperimento di SCNT. Nella colonna "punt medio" sono indicati i livelli medi dell'espressione del transgene dei pool di cloni PAF usati per il SCNT. "N" è il numero di coppie citoplasti/PAF che si sono formate dopo la fusione. "Cl" è il numero di embrioni segmentati, il cui valore viene confrontato con la

percentuale totale di embrioni ricostruiti. "Mc/Bl" indica il numero di morule compatte e blastocisti al sesto giorno di coltura in vitro. "Tot embrio" indica il numero di embrioni vitali e il relativo valore percentuale ottenuto dal confronto con il numero di oociti manipolati inizialmente. "Suinetti" indica l'esito della gravidanza, con il numero di suinetti vitali e nati morti.

Tabella 2

<i>ID cloni</i>	N° SCNT	punt medio	N	Cl	%	Mc/Bl D6	TOT embr io	Suinetti vitali/ nati morti
A1,E2,C2,D2	1	2	195	181	94,66	8 mc, 61 bl	69 35,38	No gravid
A1,E2,C2,D2	2	2	204	185	92,82	11 mc, 63 bl	74 36,27	No gravid
B1, 2B2, 2C1,D1	3	3	200	172	86,00	21 mc, 54 bl	75 37,50	6/4
B1, 2B2, 2C1,D1	4	3	209	151	72,25	31 mc, 47 bl	78 37,32	5/2
1A2,2A6,2A2, 2C3	5	5	205	179	87,32	96 bl	96 46,83	3/1
1A2,2A6,2A2, 2C3	6	5	202	178	88,12	102 bl	102 50,50	2/7

Sviluppo di embrioni derivati da SCNT di fibroblasti hSOD1-G93A.

Il trasferimento di 494 embrioni in sei scrofe riceventi ha dato origine a quattro gravidanze. Le 4 scrofe gravide hanno ricevuto 75, 78, 96, 109 embrioni ottenuti rispettivamente dal terzo, quarto, quinto e sesto esperimento di SCNT. Le gravidanze sono state portate a termine e sono nati rispettivamente 10, 7, 4 e 9 suinetti con un'efficienza media relativa allo sviluppo delle blastocisti del 8,78%. Tra i suinetti prodotti 16 sono vitali e 12 sono nati morti. Cinque maialini sono sopravvissuti, grazie ad uno svezzamento artificiale, e si sono sviluppati normalmente. I restanti 11 suinetti sono morti entro 48-96 ore dalla nascita a causa di eventi comunemente riportati negli allevamenti commerciali (alcuni

maialini non sono riusciti ad alimentarsi artificialmente, altri hanno sviluppato diarrea, polmonite, ecc).

Rilevazione dell'espressione della proteina hSOD1-G93A nei suinetti vitali e nei tessuti di quelli nati morti

I fibroblasti ottenuti dalle biopsie auricolari dei suinetti vitali e di quelli nati morti, sono analizzati mediante ICC con cui è stata evidenziata un'espressione del transgene paragonabile a quella dei PAF usati come donatori di nucleo (Figura 4).

Inoltre, sono condotte analisi mediante IHC e WB sui tessuti prelevati dai suinetti nati morti. Campioni di midollo spinale sono omogeneizzati ed analizzati mediante WB. La presenza della proteina transgenica è stata messa in evidenza utilizzando due anticorpi (07-403 Millipore e GTX 100659 Genetex). In figura 5 è possibile apprezzare due linee, corrispondenti alle due isoforme della proteina SOD1: quella endogena suina, contraddistinta da un peso molecolare inferiore (16 KDa) e quella transgenica umana con peso molecolare più alto (20 KDa).

L'immunoistochimica (Figura 6) è stata eseguita su sezioni coronariche di tutti i campioni FFPE. L'analisi condotta con l'anticorpo GTX 100659 ha permesso di rivelare aggregati granulari della proteina transgenica nei neuriti e nel pericario a livello encefalico (dalla zona ipotalamica laterale al terzo ventricolo), nel midollo spinale (soprattutto a livello toracico), nei nervi periferici (plesso brachiale e nervo sciatico) e nel Sistema Nervoso Enterico.

Le stesse aree cerebrali hanno anche mostrato immunoreattività per l'ubiquitina, caratterizzata da aggregati intracitoplasmatici.

Naturalmente, fermo restando che il principio dell'invenzione rimane lo stesso, i particolari della costruzione e le forme di attuazione dell'invenzione potranno ampiamente variare rispetto a quanto è stato descritto ed illustrato a titolo di esempio, senza per questo uscire dall'ambito della presente invenzione.

BIBLIOGRAFIA

- Benatar M. Neurobiol Dis. 2007 Apr;26(1):1-13.
- Bendotti C, Carri MT. Trends Mol Med, 2004. 10(8):393-400.
- Brunetti et al. Cloning Stem Cells. 2008 Dec;10(4):409-19.
- Bugos et al. Cell Mol Neurobiol. 2009 Sep;29(6-7):859-69.
- Cheong et al. Mol Reprod Dev. 2002 Apr;61(4):488-92.
- Clark and Whitelaw. Nat Rev Genet. 2003 Oct;4(10):825-33.
- Gordon et al. Lancet Neurol. 2007 Dec;6(12):1045-53.
- Lagutina et al. Reproduction. 2005 Oct;130(4):559-67.
- Lagutina et al. Cloning Stem Cells 2006 Winter;8(4):283-93.
- Lavitrano et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 29;99(22):14230-5.
- McKnight et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):6943-7.
- Niwa et al. Gene 1991 Dec 15;108(2):193-199
- Oback et al. Cloning Stem Cells 2003;5(1):3-12.
- Park et al. Biol Reprod. 2002 Apr;66(4):1001-5.
- Phi-Van and Stratling. Biochemistry. 1996 Aug 20;35(33):10735-42.
- Schnabel J. Nature. 2008 Aug 7;454(7205):682-5.
- Scott et al. Amyotroph Lateral Scler. 2008;9(1):4-15
- Tervit et al. J Reprod Fertil. 1972 Sep;30(3):493-7.
- Turner and Talbot. Prog Neurobiol. 2008 May;85(1):94-134.
- Vajta et al. Mol Reprod Dev. 2000 Mar;55(3):256-64.
- Vajta et al. Biol Reprod. 2003 Feb;68(2):571-8.
- Van de Bosch L. J Biomed Biotechnol. 2011:348765.
- Whitelaw et al. FEBS Lett. 2004 Jul 30;571(1-3):233-6.

RIVENDICAZIONI

1. Suino transgenico idoneo a sviluppare la Sclerosi Laterale Amiotrofica, essendo transgenico per l'espressione di un gene esogeno in tutte le cellule, preferibilmente nelle cellule neuronali, in cui il gene esogeno è un gene umano SOD1 recante una mutazione.

2. Suino transgenico secondo la rivendicazione 1, in cui il suino transgenico sovra-esprime il gene esogeno.

3. Suino transgenico secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui il gene umano SOD1 è mutato al codone 93, in cui è eseguita una conversione di una glicina in un'alanina.

4. Suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il suino transgenico reca il gene esogeno in un singolo allele.

5. Suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il suino transgenico esprime il gene esogeno in forma di aggregati granulari mutanti di SOD1 nel cervello, nel midollo spinale, nei nervi periferici e nel sistema nervoso enterico.

6. Suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il suino transgenico esprime aggregati intracitoplasmatici di ubiquitina nel cervello.

7. Suino transgenico secondo una qualsiasi delle

rivendicazioni precedenti, in cui il suino transgenico è un maiale, preferibilmente un mini-pig.

8. Suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il suino transgenico è ottenuto mediante i) transfezione in vitro di cellule somatiche, preferibilmente fibroblasti, con il gene esogeno e ii) tecnica di trasferimento nucleare di cellule somatiche.

9. Procedimento per generare un suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente le seguenti operazioni:

- a. fornire un vettore codificante il gene esogeno;
- b. fornire fibroblasti di suino adulto;
- c. eseguire la nucleofezione del vettore nei fibroblasti, ottenendo fibroblasti transgenici;
- d. fornire almeno un oocita suino enucleato mediante rimozione dei cromosomi metafasici da un oocita intatto;
- e. mettere in contatto almeno un oocita enucleato con almeno un fibroblasto transgenico;
- f. fondere almeno un oocita enucleato con almeno un fibroblasto transgenico ottenendo un embrione;
- g. coltivare l'embrione;
- h. impiantare almeno un embrione coltivato, preferibilmente 70, più preferibilmente 120, nell'utero di una scrofa;
- i. parto naturale o cesareo di almeno un suinetto transgenico al termine della gravidanza della scrofa.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui prima della fase e. viene allestito un pool composto da più

di due fibroblasti transgenici, e la fase e. viene effettuata facendo entrare in contatto almeno un oocita enucleato con il pool di più di due fibroblasti transgenici.

11. Procedimento secondo la rivendicazione 9 o la rivendicazione 10, in cui dopo la fase c. è eseguita l'analisi di espressione del vettore nei fibroblasti transgenici per selezionare fibroblasti transgenici aventi un'espressione intensa ed uniforme del vettore, ed in cui la fase e. è eseguita utilizzando i fibroblasti transgenici selezionati.

12. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 11, in cui il vettore codificante il gene esogeno reca come marcatore di selezione la puromicina.

13. Uso del suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8 per lo screening di composti farmaceuticamente attivi nel trattamento della SLA.

14. Uso del suino transgenico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8 come modello per lo studio della SLA.

CLAIMS

1. Transgenic swine suitable to develop Amyotrophic Lateral Sclerosis, being transgenic for expressing an exogenous gene in all cells, preferably in neuronal cells, wherein the exogenous gene is a human SOD1 gene carrying a mutation.

2. Transgenic swine according to claim 1, wherein the transgenic swine over-expresses the exogenous gene.

3. Transgenic swine according to claim 1 or claim 2, wherein the human SOD1 gene is mutated at 93rd codon, wherein a glycine to alanine conversion is performed.

4. Transgenic swine according to any one of the preceding claims, wherein the transgenic swine carries the exogenous gene in a single allele.

5. Transgenic swine according to any one of the preceding claims, wherein the transgenic swine express the exogenous gene in form of granular mutant SOD1 aggregates in brain, spinal cord, peripheral nerves and enteric nervous system.

6. Transgenic swine according to any one of the preceding claims, wherein the transgenic swine express ubiquitine intracytoplasmatic aggregates in brain.

7. Transgenic swine according to any one of the preceding claims, wherein the transgenic swine is a pig, preferably a mini-pig.

8. Transgenic swine according to any one of the preceding claims, wherein the transgenic swine is obtained by means of i) *in vitro* transfection of somatic cells, preferably fibroblasts, with the exogenous gene and ii) somatic cell nuclear transfer technique.

9. A process for generating a transgenic swine according to any one of the previous claims comprising the steps of:

- a. providing a vector encoding the exogenous gene;
- b. providing adult swine fibroblasts;
- c. nucleofecting the vector into the fibroblasts, obtaining transgenic fibroblasts;
- d. providing at least one enucleated swine oocyte by means of metaphase chromosomes removal from an intact oocyte;
- e. contacting the at least one enucleated oocyte with at least one transgenic fibroblast;
- f. fusing the at least one enucleated oocyte with at least one transgenic fibroblast obtaining an embryo;
- g. cultivating the embryo;
- h. implanting at least one cultivated embryo, preferably 70, more preferably 120, to a sow uterus;
- i. natural birth or cesarean section delivering of at least one newborn transgenic swine at the end of sow pregnancy.

10. Process according to claim 10, wherein before step e. a pooling of more than two transgenic fibroblasts is carried out, and step e. is carried out by contacting the at least one enucleated oocyte with the pool of more

than two transgenic fibroblasts.

11. Process according to claim 10 or claim 11, wherein after step c. analysis of vector expression in transgenic fibroblasts is carried out for selecting transgenic fibroblasts having uniform and intensive expression of the vector, and wherein step e. is carried out using the selected transgenic fibroblasts.

12. Process according to any one of claims 10 to 12, wherein the vector encoding the exogenous gene is carrying the selectable marker Puromycin.

13. Use of the transgenic swine according to any of claims 1 to 9 for screening compounds pharmaceutically active in the treatment of ALS.

14. Use of the transgenic swine according to any of claims 1 to 9 as a model for the study of ALS.

Vettore pMG5'3'MARPuro5171-CXhSOD1G93A

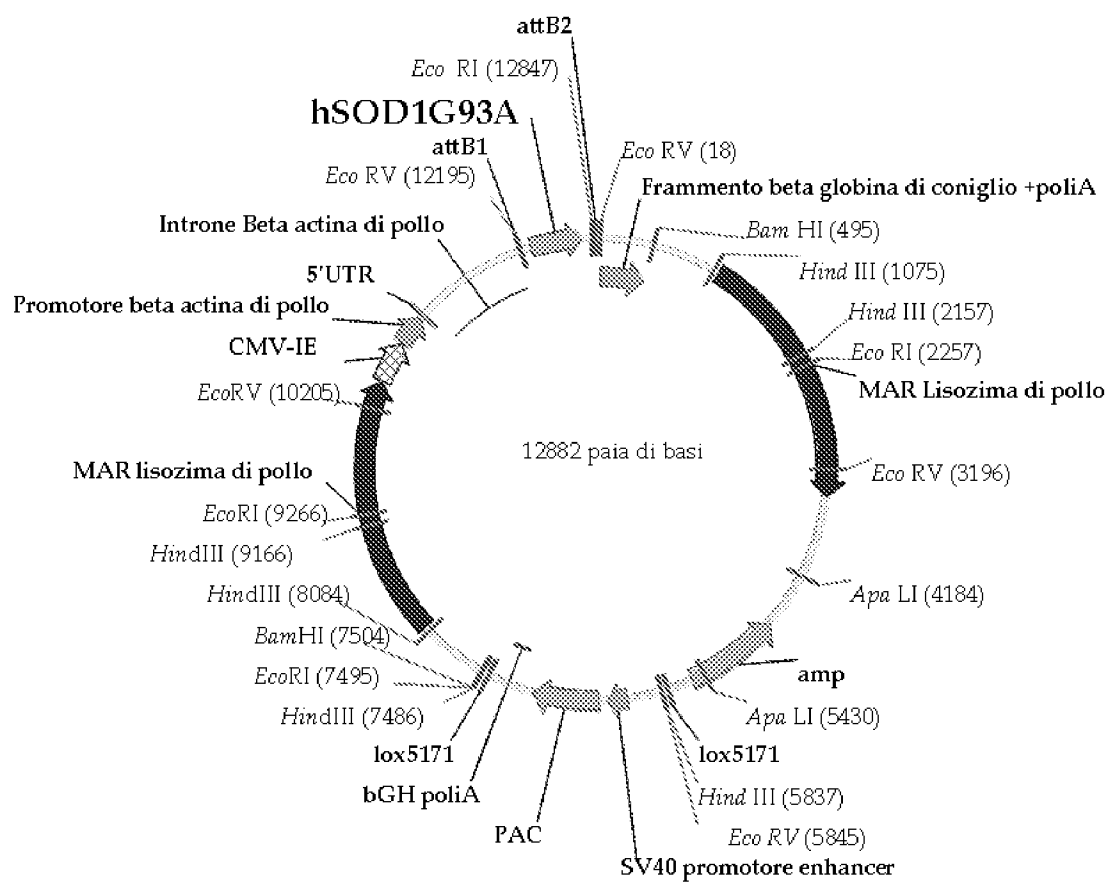


Figura 1

Sequenza pmG5'3'MARPuro5171-hSOD1G93A: 12882 paia di basi

1 ttgtacaaa gggtgatate ctgagtgat ctttttcoot ctgocaaaa ttatggggac atcatgaagc cocttgagca tgcacttct ggctaataa ggaatttat ttatctgca atagtgtgtt ggaattttt ggtctctca
 151 ctoggaaagga catatggagg ggcaaatcat ttaaaacatc agaatgagta ttgtgttag agtttggcaa catatgcoot atgtgtgctg coatgaacaa aggtggctat aaagaggtca tcatgatatg aaacagcooc ctgctgtoca
 301 ttcoctatc catagaaaag cocttgactg aggttagatt tttttatat ttgttttgt gttattttt totttaacat coctaaaaat ttcoctacat gtittactag coagattttt coctctctoc tgactactoc cagtoatage
 451 tgtcoctctt ctottatgaa gatcoctoga coctgagcoo gggggatcca taatataact gtacacaggt ttgttttatt acatgtgact gaoggttcc tatgoytct cagaaaaogg cagttgggca ctgactgoc oggtgatggt
 601 gocaoggtgg coctgcoogc cttctttgat attactctg ttgtatttca tctctgttg coagtgaaag gatataacag tctctgagga aatacttggt atttctctg atcagoytt ttataagtaa tgttgaatat tggataagge
 751 tgtgtgtcoct ttgtctggg agacaaagoc cacagcaggt ggtgttggg ttgtggcagc tcatgtacag gaagagtttt ttgtcoctgt tttttgttg tttttttt ttaagtaagg tgtttttt tottagtaa atttctactg
 901 tgtgtgtcoct ttgtctggg agacaaagoc cacagcaggt ggtgttggg ttgtggcagc tcatgtacag gaagagtttt ttgtcoctgt tttttgttg tttttttt ttaagtaagg tgtttttt tottagtaa atttctactg
 1051 tttttatta tagtggctg tgaagcttg gatagctgtt gttacatgag ataactatt agtttaagoc agcttgatgc ttattttt ttcocttgaa gtatgtagoy ttctctggtt ttttcoctt gaaactggoy aggttagat
 1201 ttttctaagt ggtattttta coctgatc tagttgata coctaatgt tgaatagtt ttcoctagta acatgttgat aacttoggat ttacatgttg tatatactg tcatctgtgt ttctaagtaa aatatagge attatagaa
 1351 ataoytaatt coctattcc tttttttt atctctatgc tctgtgtgta caggtcaaac agacttcoct octattttta ttatagaat ttatatgca gtcytoytt ggttctgtg ttgtaaggat acagoytaa atttctaga
 1501 gogatyctca gtaaggggg ttgtcacatg gtttcaaatg taaaagggc aoytttctg cocttctcc agatccagga cactaaactg cttctgcaac tgaggtataa atoycttca atocccagaa gtytagatoc aoytcatat
 1651 tottaagaa gaatgaatac ttctaaaaat atgttggcat aggaagcaag ctgcatggt ttatttggga cttaaatat ttgttaayg gactgcatag gttttaaaca cagttgacg atgtaacga gtcacagcat ttatgacaa
 1801 gtgtgtctg ttgcagctgt ttacogcoct gcoctcaggt gacatgca gataggggtg ggtgtcttg ttgtgtgttg gtaacogctg coacacagoc acoctocgaa catatctca ctgtgggtta ctttcaaac catctagca
 1951 gtatgatag agttactatg aaacagagaa gttcoctagt tggatactct catggaggtt ctttttccc atgttgggca aagtatgata aagcatctct attgtaaat tatgacttg ttattctg aatcocttct atagcaccac
 2101 ttattgacg aggtgtagge tctgtgtg coctgtctg tcttcaate tttaagctt ctttggaaat acacoyacti gattgaagtc tottgaagat agtaaacagt acttaocttt gatccoaag aaatogagca ttocagttgt
 2251 aaaagaattc oycoatttca taocatytaa tgaattttta cccccaggt gctgacacti tgaatatat tcaagtaata gacttggoc tcoctctt gtgtactgta tttgttaata gaaatattt taaactgtgc atatgattat
 2401 tacattatga aagagacatt ctgtgatct tcaaatgtaa gaaatgag agtyoytctg cttttataa tacaagtgat tgcacattag tgcaggtgc cttaaaaaa aaaaaagta atataaaaa gaccaggtgt ttacaagtg
 2551 aaatacttc ctatttggaa aacagttaca tttttatga gattaccagc gcttctgac ttctaaaca taaggctgta ttgtcttct gtaccattgc atttcoctat toccaattg cacaagatg tctgggttaa ctattcaaga
 2701 aatgtcttg aaatacagca tgggagctg totgatgag aatgcagagt tgcactgcaa aatgtcagga aatgtatgc tctcaaatg coctactca aaggtattat atgtgtatat agtaacaggt ttcoctgac cagcagggca
 2851 aagagtctg tgaatttgc gttgcogag acoctattt ctaacaaggt taagatgta tctagcaac tgggatttt aatacatitt cagcagaggt acttagttaa totctaoct tagggatoyt ttcatcatt ttatgtgta
 3001 tacttgaat actgcatac tttagcttt catgggttcc ttttttgc cocttaggag actgttaagc aatttctgt ccaactttg ttgtgtctt aaactgcaat agtagttac ctgtattga agaataaag accattttta
 3151 tattaaaaa taactttgtc tgttctcatt ttgacttgc tgatatctt gcatgtctca ttatgtcagt totgtcagat attcacacat caaaacttaa oytgactca gtggagttac agctggoytt ttgatctgt tattattct
 3301 gaaactagaa atgatgttg cttcatctgc tcatcaaca cttcoctgag cagtttaagg ctatgtgagaa atgcatacat ttattgatac ttttttaag tcaactttt atcagattt ttttctatt ggaatatat tgtttctag
 3451 agogggcooc accogoytg agctccagct ttgttcoot ttatgaggg ttaattgoc gcttgogta atcagtgca tagctgttc ctgttgaaa ttgtatoc coacactc cacaacat aoyagocgga agcataaagt
 3601 gtaagctg ggtgcoctaa tgagtgaact aactcaact aattgcttg oyctcactgc coyctttca gtogggaac ctgtctgoc agctgcaat atgaatggc caacogoyg ggaagoygg ttgtgtatt ggyoyctct
 3751 coycttctc gctactgac togtgoyct oygtgttgoy gctgogoga goggtatcag ctactcaaa goggttaata oygttatca cagaatcag ggataaogca ggaagaaca tgtgagcaaa agocagcaa aagocagga
 3901 acoytaaaa ggyoygttg ctgoytttt tcataggt coycoctct gacagcatc acaaaaoyt acoycaagt cagaggtgoc gaaaocoyac agactataa agataocag oytttccc tgaagctoc coygtgoyt
 4051 ctoctgttcc gaoctgoy cttacoygat acoctgoc ctttcoct togggaagoy tggoycttc tcatagctca oyctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttogtca agctggoytg tgtgacgaa cccoycttc
 4201 agocoyaooy ctgoyctta tcoygttaet atoytctga gtoacaoy gtaagacoy acttatgoc actggcagca gcoactggtta acaggttag cagagoyaggt tatgtagoy gtgtacagca gttcttgaag tggtygcoct
 4351 actaoygta cactagaag acagtattg gtatctgoc tctgtgaag coagttaoct toggaaaaag agttgttagc tottgatoc gcaacaaac cacyctggt agoygtgtt tttttgttg caagcagcag attacoygca
 4501 gaaaaaaag atctcaagaa gatcocttga ttttttca ggggtctgac gctcagtgga aogaaaaact aoyttaaggt attttgtca tgagattc aaaaaggtc ttcoctaga tcttttaaa ttaaaaatga agttttaat
 4651 caatcaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtt caatgctta atcagtgag cactatctc aogatctgt ctatttgyt catcoatgt tcoctgact cooytctgt agataactac gataogggag gcttaocat
 4801 ctggocoyag tctgtcaatg atacoygag acoacoyctc acoyctca gatttatc caataaaca gcoagoyga agggoyagc gcaagagtg tctgcaact ttatcoyct coactcagc tattaattgt tggoygaag
 4951 ctagagtaag tagttogca gttaatagtt tggocaoyt tgttccatt gctacagga tctgtgtgc aoyctoyt ttgttatg cttcattcag ctooygttcc caacogcaaa gogaggtac atgatcccc atgtgtgca
 5101 aaaaagoyt tagctcttc ggtcoctga txytttgca agtaagtyt gcoyagtyt tatcoctat gtttatgca gcoctgata atttcttca tctcatgca tcoytaagt cttttctgt gactgtgag tactcaaca
 5251 agtcattctg agaatagtyt atgoygoyac oyagttgctc ttgocoyg coaataggt ataataoyc gccacatagc agaaetttaa aagtgtcat cattgaaaa oyttttogy gogaaaaact ctaaggtac ttacoygtg

Figura 2

5401 tggatocag ttogatgtaa cccactoytg caccocaactg atettocaga totittactt toccacoggt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgcgcgaaaa aagggaataa gggcgacacg gaattgttga atactcatc
 5701 tcttctttt toaatattaa cgttacaat ttccattgc cattcaggtt ggcgaactgt tgggaaggcg gatoggtgog ggcctcttgg ctattacgoc agctggogaa agggggatgt gctgcaggc gattaagtgt ggtaacogca
 5551 gggttttccc agtcacagcg ttgtaaaaog acggccagtg agogogtga atacagctca ctatagggg aattgggtac cataacttgg tatagtacac attatacga gttatgtoga tocgagttat cgaatacgtt gatatacgt
 5851 tgttgttgtt aactgtttta ttgcagetta taatgtttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaat gcaattetagt tgtgttttgt ccaaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatctogog
 6001 cgcacggctg tggaaatgtgt gtcagttagg tgttgcaaaag tocccaggct cccacagcgg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaaagcat
 6151 gcatctcaat tagtcacgaa ccatagtcoc gcccctaact cgcgcacatc cgcocctaac tocgccaggt tocgcccatc ctccgcacca tggctgacta atttttttta ttatgtcaga ggcggaggcc gctcgggct ctgagctatt
 6301 ccagaagtag tgaagaggtt tttttggagg cgttgcggcg ccaagacogcg tgcgcaccc atccctcagc ccaagccctc gaacctcac aaggagaaga cttccatga ccagagtaaa gcccacgggt cgcctgcga cccgcagca
 6451 cgtccccggc gcgtacgca cctcgcgcgc cgtgttgcgc gactacctg caacacgca tacatgtgac cctgacgcgc acatogagcg ggtcacogcg ctgcaagaac tcttctcac gcggttgggg ctgcacatcg gcaaggtgtg
 6601 ggtcggggac gaogcgogcg cgttgcgggt ctggaacogc ccggagagcg togaagcggg ggcgtgttgc gcagagatcg gcccgcat ggcggagttg agcggttccc ggttcgogcg gcagcaacag atggaagccc tctgtgcgc
 6751 gcaacggccc aaggagcgcg cgtgttctt ggccacogtc ggcctctgc cgaaccacca gggcaaggtt ctgggcagcg cgtgtgtgt cccggagtg gaggcgogcg agogcgogcg ggtgcgcgc tctgtgaga ctcogcgcc
 6901 ccgcaactc ccttctag agogctcg cttcacogtc acgcgcagc toagtgccc gaagacgcgc gcagctgtgt gcatgacogc caagccggt gctgaogcc cgcgcacga cgcgcagcg cgaagcaaa ggagcgacog
 7051 accccatgc tocgacgaa gccacgggg gcggccgcgc cgaacgcga cccgcgcgc aggcacacog actctagagc togtgatca gctcagctg tgcctttta gttgcagcc atctgttgt tgcocctccc cgtgccttc
 7201 cttgacctg gaagtgcca ctcactgt cttttctaa taaatgagc aaattgcac gcaattgtct agtagtgtc attctattt ggggggtggg gtcgggcagc acagcaaggc ggagattgg gaagacaata cgaagcatgc
 7351 tggggatcg gtcggctcta tgcctctga gcgggaaga accagctggc gctcagatc cactagtct agtataact cgtatagac acattatac aagttatcg gcgcctag aagtacttc gagaagctt tgaattctt
 7501 tggatcata atataactgt accagtttt gttttattac atgtgactga cgttctcta tgcgtctca gaaaacgca gttgggcaat gcactgcgc gtaggtgtgc caoggtggt cgtgcgcct tcttgatat tcaactgtt
 7651 gtatttcat tctgttgc gatgaagga tataacagtc tctgagaa taactgttat ttctctgat caggttttt ataagtaag ttgaatttg gataagctg tgtgtcttt gttctggag acaaaagcca cagcaggtg
 7801 tggttgggtg gtcgcagtc agtgacagga gaagttttt tgcctgttt ttttttgtt tttttttt aagtaagtg ttcttttct ttagtataa ttctactga ctgtatttt tgacagtc gaaacattc ttcaaaagaa
 7951 gaaotittg gaaactgac agoccttct tttcattccc tttttgtt ctgtgcacat gctttgtt ctgattcat tatgaaaa gttgatoga acttgaggt tttattata gttgtgcttg aaagcttga tagctgtgt
 8101 tacatgagat accttattaa gtttaggca gcttgatgt ttatttttt tctttgaag tagtgaggt ttctctgtt ttttccttg aaactggga ggttagatt ttctaatgg gatttttct ctgatgatc agtgcatc
 8251 ccaatgctt gtaagtgtt tctagttaa catgttgata acttggatt tacatgtgt atatactgt catctgtgt tctagtaaa atatatgca ttatagaaa taogtaattc ctgatttct tttttttta tctctatgt
 8401 ctgtgtgac aggtcaaaa gactcactc ctattttat ttatagaatt ttatagcag tctgtgttg gttctgtgt tgaagata cagcttaaa ttctactag cgtgtcag taaggoggt tgcacatg gttcaaatg
 8551 aaaaogggca cgtttgtgc tgccttcca gatccaggc actaaaactg ttctgcaat gaggataaa togttccga toccaggaag tgtagatca cgtcatatt cttaaagaag aatgaatact ttctaaata tgttgcata
 8701 ggaagcaagc tgcattgatt tatttggagc ttaaattatt ttgttaacg agtgcatagc ttttaaac agtgacgca tgcataagc toacagcat tatgcagaag tcatgctgt tgcagctgt taogcactg cctgcagtg
 8851 agcattgagc atagggtgg ggtgtttgt gtcgtttgg gacacogtc cacacagca ctcocgaac atctctcac tctgggtac ttttcaaac atcttagcag tagtagatga gttactatga aacagagaag ttctcagtt
 9001 ggtattctc atgggagtc tttttcca tgttgccaa agtatgata agcatctcta ttgttaatt atgcactgt tagtctcga atccttcta tagcaccat tattgcaga cgtgtaggct ctggtgtgc ctgtctgt
 9151 gcttcaatc ttaagcttc ttggaata cccagcttg attgaagct cttgaagata gtaaacagta ctaccttg atccaatga aatagcat ttacgttga aaagaattcc gctattcat accatgtat gtaatttct
 9301 accccagtg ctgacactt ggaatatatt caagtaatag actttgct cccctctg tctactgtat ttgtatag aaaaatttt aaactgtca tatgattatt acattatga agagaattc tctgtatt caaatgaag
 9451 aaaatgagga gtcgtgtgc tttataaat acaagtgatt gcaattagt gcaggtgccc ttaaaaaaa aaaaagtaa tataaaaagc accaggtgt ttacaagtga aatacattcc tatttgaaa acagttatc tttatgaag
 9601 attacagcg cttgtgact ttctaaacat aaggctgtat tgtctctg tacattgca ttctcatt ccaatttgc acaagatgt ctgggtaac tattcaagaa atgcttga aatacagcat gggagctgt ctgagttga
 9751 atgcagagtt gcactgaaa atgtcaggaa atgagctct ctcagaatgc ccaactcaa aggtattata tgttatata gtaagcagtt tctgattcc agcaggccaa agagctgtct gaatgtgog ttgcggaga cctgtattc
 9901 toacaaggt aagatgtat ctagcaact gcggatttta atacttttc agcagaagta cttagttat ctctacttt agggatgtt toatcttt tagatgtat acttgaata ctgcataact tttagcttc atgggttct
 10051 tttttcagc ctttaggaga ctgttaagca attgtgtc caactttgt gttgtctta aactgcaata gtagttacc ttgtattga gaaataaga cacttttat attaaaaaat actttgtct gttctcatt tgaactgtct
 10201 gatactctg cagtgctcat tatgtcagtt ctgcagata ttccacatc aaaaactaac gtagcagcag tggagttaca gcogoggtt tgaactgtt attattctg aaactagaa tgaactgtc ttcatgtct catcaaacac
 10351 ttcagcagc agtttaagc tagtgagaaa tgcatacatt tattgatac tttttaagc caactttta toagatttt ttttcattg gaaatatatt gttttcaga gtcagactg attattgact agttattaat agtaacat
 10501 taoggggta ttagttcta gccatatat ggagttcgc gttacatac ttaogttaa tggcgcgc gctgacgc ccaacgaacc cgcgcactg acgtcaataa tgaactgtt toccataga acgcacatg gcaattcca
 10651 ttgaogtaa tgggtgact atttaogta aactgcac ttggcagta atcaagta tcatagca agtaogccc ctattgaogt caatgaogt aaatgcgc cctgcatta tgcagtae atgaactat ggaacttcc

Figura 2/cont.

10801 taattggcaag taactctacg tattagtcat cgtattacc atgggtogag gtgagoccca cgttctgctt caetctccc atctccccc cctccccc cccaatttg tatttatta tittttaatt attttgtca gogatgggg
 10951 cgggggggg ggggggggc gccaggggg ggggggggg ggggggggg ggggggggg agggggagag gtggggggc agccaatcag agggggggc tcgaaagt ttctttatg gggaggggc ggggggggg ggcctataaa
 11101 aagcgaagc cgggggggc gggagtcgt cgttgcttt cgcctgtgc cggctcggc gggcctgcg gcggggggc cggctctga ctgacgggt tactccaca ggtgagggg cgggaaggc ctctctcc gggctgtaat
 11251 tagcgttgg tttaatgag cgtgtttt tttctgtgc tggtgaaag cctaaaggc ctcggggag gcccttttg cggggggag cggctgggg ggtgggtgg tgtgtgtg cgtggggc gccggtgg gccgcgtg
 11401 cggggggct gtgagtcgt cgggggggc gggggcttt gtggctcgg cgtgtggcg aggggagcg gccgggggc ggtgcgggc ggtggggg ggtggagag ggaacaaag ctggtggcg ggtgtgtcg tgggggggtg
 11551 agcagggggt gtggggggc cggtcggct gtaaccccc cctgacccc cctcccgag ttgtgagca cggccggct taggtggcg ggtccggc gggcgtgc gggcgtgc gggggctcg cgtgcggcg cgggggtg agccaggtg
 11701 ggtgcggcg cgggggggc cggctggcg cggggggg ctcggggag gggggggcg gcccgggc gcggggct gtgagggc gggagcgg agccattgc tttatgta atgtcgag agggggcag gacttcttt
 11851 gtccaaate tggcgggac gaaatctgg agggggggc gcccccctc tagggggc gggggaagc gtgggggc gccaggagc aaatggggc ggaggcctt cgtgtgtgc cggcgccg tcccttct catctccag
 12001 ctcgggctg ccggggggc aggtctgct tagggggga cggggcagg cggggttgg ctctggcgt gtgacggcg gctctagag ctctgtae catgttcag ccttcttt tttctacag ctcctggga aogtgcgtt
 12151 tgtgtgtg tctcatct ttggcaaga attgcaatt gatatacaa gttgtacaa aaaagcagg tagctcctc attaggcac cgtcgagc ctgcagtc cggaaacag acctcggcg ggcctagga gttatggga
 12301 cgaaggcgt gtggtgtg aaggggagc gccagtgca gggcatcct aatttcgag agagggaag taatgacca gtgaagtggt ggggaagcat taaagcag actgaaggc tgcagtaatt ccatgttcat gagtttgag
 12451 ataatacag aggtgtacc agtcaggtc ctactttta tctctatcc agaaaacag gtgggcaaa ggtatgaag aggcattgt gagacttgg caatgtgact gctgacaa atgcagtg cgtgtgtct attgaagatt
 12601 ctgtgtct cctctcagg gacattgca tcaattggc cacactgtg gtcctgaa aagcagatg ctgggcaaa ggtggaagt aagaaagta aagacagga aacgtggaa gtgtttgc ttgtgtgt attgggatg
 12751 ccaataaac attccttgg atgtagtct aggcacctt actcatctg tctctggc cgtctgag gtcaggtae cggggcgcg tggagatt cggggcttt tttatgag accagcttt cc

Figura 2/cont.

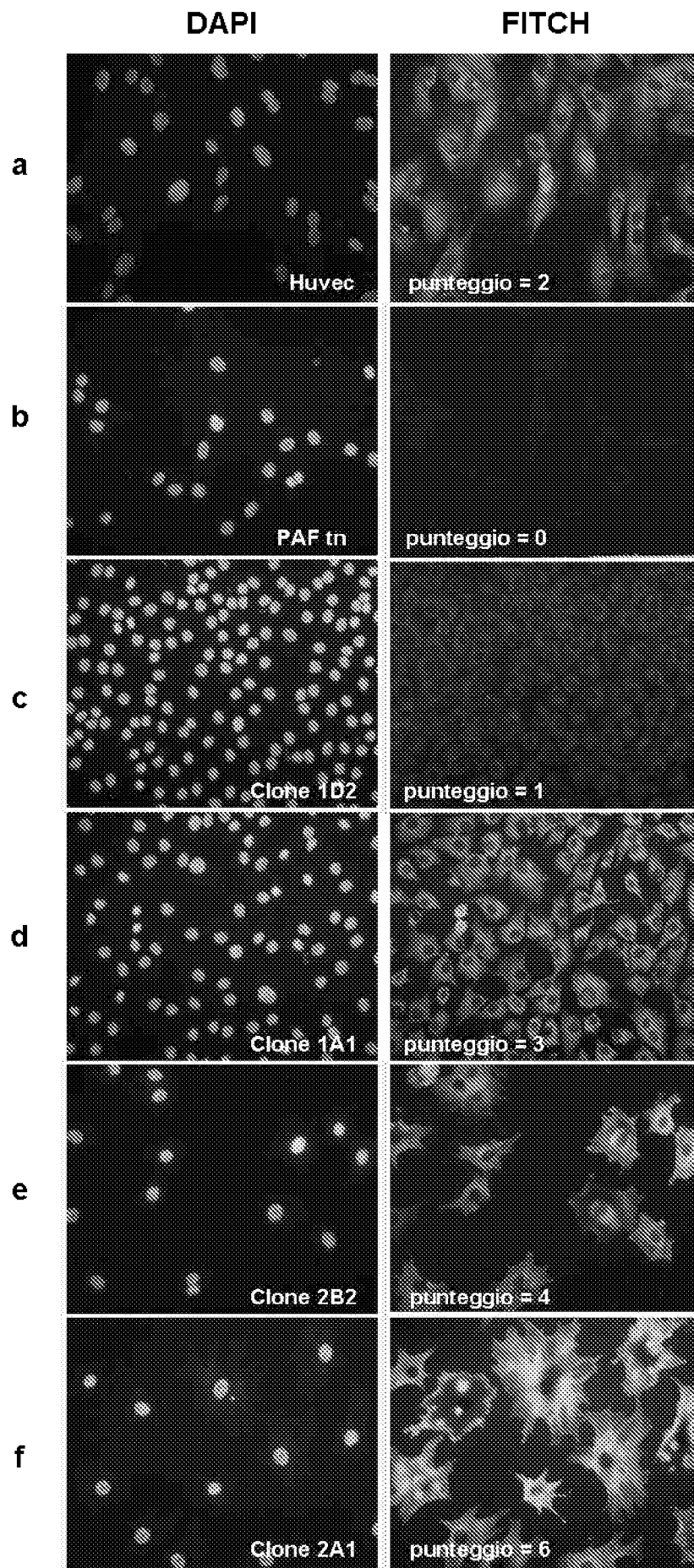


Figura 3

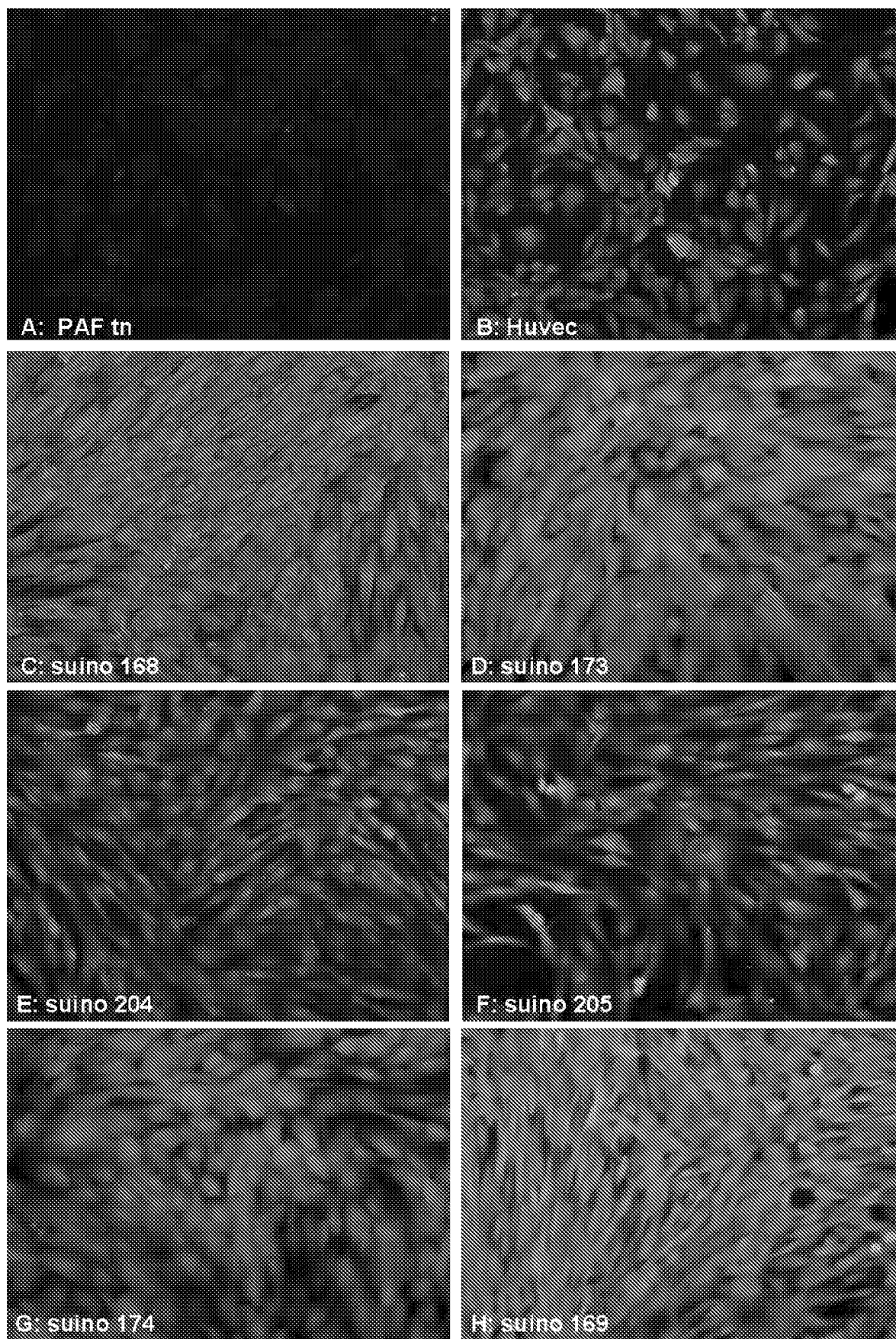


Figura 4

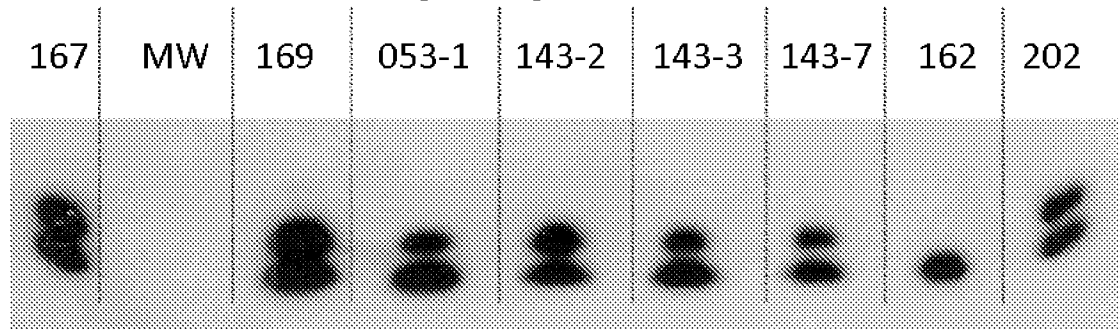
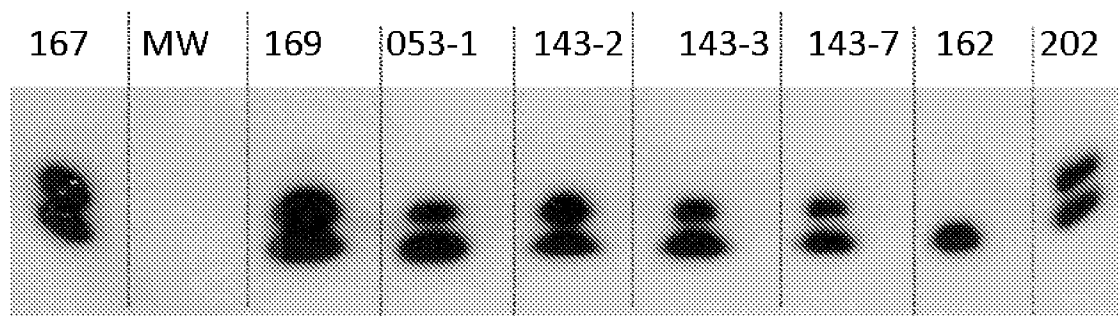
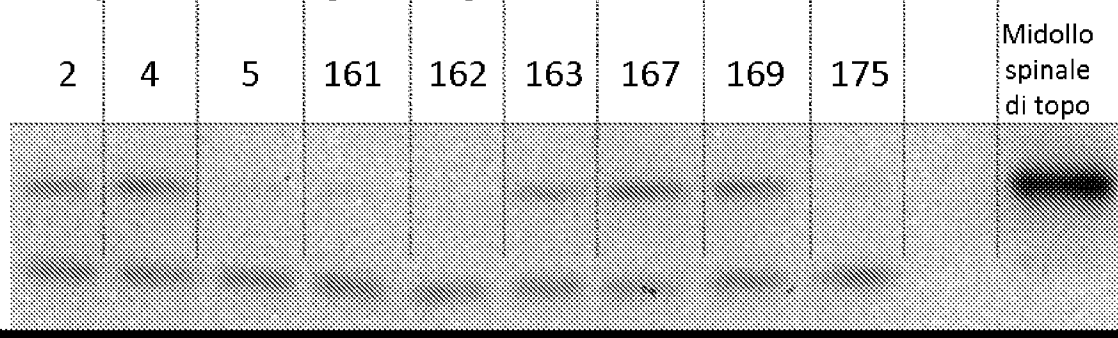
A Genetex GTX 100659 [1:800]**B** Millipore 07-403 [1:1000]**C** Millipore 07-403 [1:1000]

Figura 5

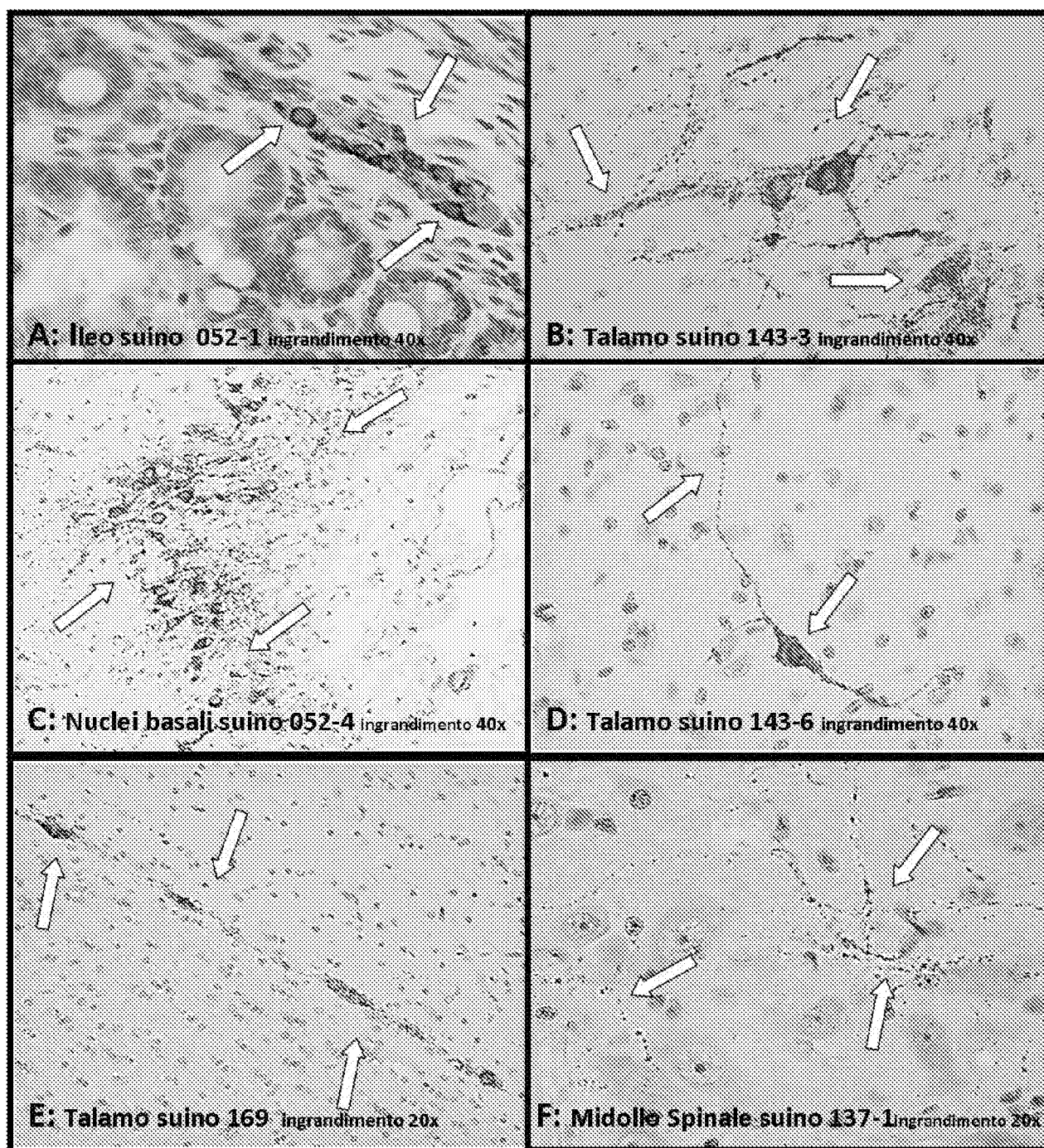


Figura 6