



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 316 209**

② Número de solicitud: 200503002

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **02.12.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑱ Inventor/es: **Valdivieso Ámate, Fernando;
Montoliu José, Lluís y
Pozueta Larios, Julio**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Modelo animal de enfermedad de Alzheimer, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Modelo animal de enfermedad de alzheimer, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

El animal no-humano transgénico útil como modelo animal no-humano para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza porque contiene insertado en su genoma, un polinucleótido heterólogo (transgén) que comprende la secuencia de nucleótidos del gen APP humano completo junto con sus secuencias reguladoras, y presenta un patrón de expresión endógeno similar al patrón de expresión endógeno del gen hAPP en humanos. De aplicación en el estudio de la EA y en el screening de compuestos potencialmente útiles para la prevención y/o tratamiento de la EA.

ES 2 316 209 A1

DESCRIPCIÓN

Modelo animal de enfermedad de Alzheimer, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en los sectores biotecnológico y farmacéutico; en concreto, la invención se relaciona con el desarrollo de animales no-humanos transgénicos para su empleo como animal no-humano modelo de la Enfermedad de Alzheimer y sus aplicaciones.

10

Antecedentes de la invención

Alois Alzheimer describió, por primera vez, en 1907, un síndrome neuropatológico, caracterizado por una demencia y un deterioro progresivo de las habilidades cognitivas. Asimismo, fue el primero en demostrar la relación entre las pérdidas en la memoria cognitiva, las lesiones neuropatológicas observadas en la autopsia y el historial médico del paciente. Las características clínicas de la Enfermedad de Alzheimer (EA) son una pérdida progresiva de la memoria, el lenguaje (afasia), las habilidades motoras (apraxia) y la percepción (agnosia), acompañada de alucinaciones, depresión, desorientación y comportamientos agresivos.

15

20

Dos de las observaciones neurológicas realizadas por Alzheimer son utilizadas actualmente para describir la EA: (i) los ovillos neurofibrilares, una madeja densa y fibrilar, que se encuentra en el interior de neuronas amorfas, cuya principal subunidad es la proteína asociada a microtúbulos Tau, y (ii) las placas seniles, unas placas extracelulares cuyo componente mayoritario es un péptido denominado β -amiloide ($A\beta$) que proviene de una proteína precursora llamada proteína precursora del péptido β -amiloide (APP).

25

30

El gen APP humano se encuentra localizado en el cromosoma 21 en la región 21q21.3. Está compuesto por 18 exones, distribuidos a lo largo de 300 kilobases (kb). Su expresión no se limita a un tejido específico sino que se expresa en muchos tipos celulares y tejidos, incluido el endotelio, la glía y neuronas del cerebro. El ARN mensajero (ARNm) puede madurar sufriendo un procesamiento alternativo para producir tres isoformas mayoritarias, que son nombradas en función del número de aminoácidos que las componen (APP₇₇₀, APP₇₅₁ y APP₆₉₅). La isoforma más larga es APP₇₇₀, que contiene la secuencia completa del gen; la isoforma APP₇₅₁ es la que se expresa de forma más abundante y ubicua de todas; y la isoforma APP₆₉₅ es la mayoritaria en el cerebro, siendo la relación entre los 3 ARNm en la corteza APP₇₇₀:APP₇₅₁:APP₆₉₅, 1:10:20, por lo que la isoforma APP₆₉₅ ha sido la más estudiada en relación con la EA.

35

Entre los años 1990 y 1992 se descubrieron distintas mutaciones en el gen APP que eran responsables del desarrollo de la EA, pudiéndose comprobar que la transmisión era autosómica dominante con casi un 100% de penetrancia. En el año 1995, otros dos genes fueron descubiertos relacionados con la EA, los genes denominados presenilina 1 (PS1) y presenilina 2 (PS2).

40

La EA, en base a su origen, se puede dividir en dos tipos:

45

(i) Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), ligada a mutaciones en los genes APP, PS1 y PS2, que tiene una edad de inicio muy temprana y es la responsable de aproximadamente el 1% de los enfermos de Alzheimer;

50

(ii) Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE), de aparición tardía (normalmente, pasados los 60 años de edad) y origen incierto (parece ser que la predisposición para sufrir la enfermedad viene determinada por una serie de genes de susceptibilidad y de factores ambientales, lo que la convierte en una enfermedad compleja o multifactorial, siendo los principales factores de riesgo, la edad avanzada y la existencia de antecedentes familiares); la EAF es responsable de aproximadamente el 99% de los enfermos de Alzheimer.

55

Ambas enfermedades (EAF y EAE) son indistinguibles en los síntomas clínicos y en la neuropatología.

Como es conocido, el desarrollo de modelos experimentales de enfermedades neurológicas es de gran importancia para la investigación biomédica. El desarrollo de modelos que se aproximan a las características de las enfermedades neurodegenerativas en seres humanos ha supuesto un gran avance metodológico. En el caso de la EA el principal avance ha venido asociado al identificar las proteínas implicadas en la EAF.

60

65

A principios de la década de 1990 se descubrieron varias mutaciones ligadas a la EAF en el gen APP que, junto a los avances obtenidos en la tecnología de transgénesis, revolucionaron las posibilidades de desarrollar modelos para el estudio de la EA. Mediante la transgénesis, se han podido expresar las formas patogénicas del gen APP, de forma reproducible y de manera más adecuada, en las distintas regiones del cerebro, generando de este modo una gran variedad de ratones transgénicos que expresan el APP salvaje, fragmentos del APP, la proteína APP mutada y otros genes relacionados con la EA.

ES 2 316 209 A1

Entre los modelos desarrollados en ratón para la EA se encuentran los siguientes:

NSEAPP: para la generación de este ratón, se preparó una construcción con el promotor de la enolasa específica de neuronas (NSE) y el cDNA de la isoforma 751 del gen APP. La sobreexpresión de esta construcción llevó a la aparición de placas difusas de A β , a la edad de 22 meses. Sólo en un 5% de los ratones, estas placas tenían un aspecto más maduro, que recordaba a las encontradas en los enfermos de Alzheimer, y se teñían positivamente para las tinciones de Bielschowsky y thioflavin-S.

APP YAC: la utilización de cromosomas artificiales de levaduras (YAC), como vehículo para la generación de transgénicos, en los que se podía insertar grandes cantidades de ADN, llevó a tres grupos a publicar casi de forma simultánea, la generación de un ratón transgénico con un YAC (B142F9 Washington University YAC library) de 650 kb, que incluía toda la región codificante del gen APP y grandes regiones tanto en 3' como en 5' de dicho gen. En esos ratones, se consiguió una expresión del gen humano, similar al endógeno de ratón, sin observarse la formación de placas u ovillos neurofibrilares. La secuenciación del genoma humano reveló que el YAC utilizado para la generación de estos ratones, además del gen APP, contenía el gen codificante para el factor de transcripción GABPA, lo que podía generar un fenotipo indeseado.

PDAPP: este ratón transgénico, descrito en 1995, fue el primero que desarrollaba una gran variedad de las neuropatologías de la EA, y se obtuvo usando una construcción con la que se sobreexpresaba el cDNA del gen APP, que contenía la mutación V717F "Indiana"; en el cerebro de los ratones, se podían observar placas neuríticas, rodeadas de neuritis distróficas, astrocitosis, microglia y pérdida sináptica, pero nunca se vieron ovillos neurofibrilares. La presencia de placas llegaba a ocupar el 50% en las regiones del área cortical, porcentaje muy alto si se compara con el de los enfermos de Alzheimer, que tienden a estar entre el 6% y el 12%. A pesar de esa gran carga de placas en el cerebro, no se ha podido demostrar neurodegeneración en estos ratones.

Tg2576: este ratón, descrito en 1996, es, posiblemente, el modelo que más se ha utilizado para el estudio de la EA; el trasgén está compuesto por el promotor de la proteína del prión, lo que garantiza una alta expresión en el cerebro, y con el ADNc de la isoforma APP₆₉₅, que contiene la mutación K670N/M671L "Sueca", sobre un fondo genético C57BL/6J/SJL. Los ratones Tg2576 tienen unos niveles de expresión del APP humano (hAPP) de 5,6 veces los endógenos de ratón en el cerebro. A la edad de 9-12 meses, ya presentaban placas neuríticas en la región entorrinal, extendiéndose después al hipocampo y corteza.

APP23: en 1997 se generó este nuevo modelo murino para el estudio de la EA usando el promotor del Thy1 y sobreexpresando el ADNc de hAPP₇₅₁ con la mutación K670N/M671L "Sueca", con lo que se lograba una expresión de más de 7 veces la endógena, lo que provocaba la aparición de placas a la edad de 6 meses. La característica más importante de estos ratones es que, por fin, se describía muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo a la edad de 14-18 meses. Otra característica importante de este modelo es el desarrollo de una angiopatía amiloide cerebral, por lo que se ha convertido en un buen modelo para el estudio de la EA. Los análisis conductuales de estos ratones han puesto de manifiesto que existe una amplia variabilidad en los resultados con diferencias significativas en el aprendizaje a partir de los 18 meses de edad.

Los modelos animales generados hasta la fecha han sido incapaces de generar todas las patologías de la EA. La generación de estos modelos se ha basado en la sobreexpresión de la proteína APP, salvaje o con mutaciones ligadas a la EAF, lo que los limita al estudio de la EAF, puesto que parten de una situación que no se da en los pacientes de la EAE. En estos modelos se ha descrito la aparición de placas amiloidogénicas en los cerebros de los ratones, ocupando del 20 al 50% de las regiones del cerebro, mientras que en los enfermos humanos la presencia de placas no supera el 12%.

En el modelo presentado en esta memoria, human APP YAC mice "hAPPy", se ha conseguido una expresión del gen APP muy similar a la endógena de ratón, tal y como se había descrito en los trabajos anteriores realizados con el YAC de APP (Buxbaum, J. D., et al. (1993). "Expression of APP in brains of transgenic mice containing the entire human APP gene". *Biochem Biophys Res Commun* 197(2): 639-45; Lamb, B. T., et al. (1993). "Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]". *Nat Genet* 5(1): 22-30; Pearson, B. E. and T. K. Choi (1993). "Expression of the human beta-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10578-82), con la diferencia de que en el ratón "hAPPy" se ha eliminado la presencia del gen GABPA que, antes, se encontraba en el YAC (Lamb, B. T., et al. (1997). "Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice". *Hum Mol Genet* 6(9): 1535-41.). La expresión adecuada del gen APP y las posibles respuestas en su expresión debidas a estímulos externos son fundamentales para la generación de un modelo de la EA.

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha y de haber logrado generar muchas de las neuropatologías relacionadas con la EA, e incluso comprender algo más la EAF, los modelos obtenidos son tan alejados de la realidad, que resulta difícil usarlos para comprender las causas de la EAE o el desarrollo de la misma. Por este motivo, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un modelo animal de EA que supere los inconvenientes de los modelos existentes.

ES 2 316 209 A1

La expresión de la proteína APP humana y en consecuencia el péptido A β humano, hacen posible, que en este modelo se puedan formar placas amiloides, debido a que la proteína murina es incapaz de formarlas por las diferencias en su secuencia. De esta forma la aplicación de los distintos factores ambientales o patógenos a “hAPPy” van a permitir una correcta respuesta del gen APP y va a permitir que se puedan formar placas amiloides. La posibilidad de aplicar estos factores ambientales al modelo, considerados responsables en gran medida de la enfermedad, hacen de él una herramienta muy importante para el estudio de la EAE.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la localización del gen APP en el cromosoma 21 humano (NCBI build 35). La zona SecB excluye toda la zona codificante del gen GABPA pero comienza dentro de su región 3' UTR.

La Figura 2 muestra la localización cromosómica del gen APP; A. Situación del gen APP humano en el cromosoma 21, junto a los genes colindantes anotados en ENSEMBL. B. Situación del gen APP murino en el cromosoma 16, junto a los genes colindantes anotados en ENSEMBL.

La Figura 3 representa una matriz de homología de las secuencias del gen APP humano y murino. Comparación de una megabase de secuencia del cromosoma 21 humano que incluye al gen APP humano, con una mega base del cromosoma 16, donde se incluye también el gen APP murino.

La Figura 4 muestra un esquema de las PCRs del entorno del gen APP. Situación de las PCRs utilizadas para delimitar el tamaño del YAC b142f9, tanto en 5' como en 3' del gen, con su distancia aproximada a la región codificante del gen mas cercana.

La Figura 5 muestra un esquema donde se señala la delimitación de la extensión YAC b142f9 mediante PCR. Gel de agarosa al 1%, con las PCRs de las secuencias A, B, 1 y 2. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Para cada secuencia el control negativo, el YAC y el control positivo respectivamente. B. Gel al 1%, con las PCRs de las secuencias 3, 4, 5 y 6. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Para cada secuencia se muestra el control positivo, el YAC y el control negativo respectivamente.

La Figura 6 muestra un esquema de las etapas seguidas en la generación y linearización del plásmido de recombinación pB1R Sec 2.

La Figura 7 muestra un esquema de las etapas seguidas en la generación y linealización de los plásmidos de recombinación pYAC4 3'Sec A y pYAC4 3'Sec B.

La Figura 8 muestra la PCR de los Exones 6 y 11 así como de la secuencia 2'. PCRs del exon 6, exon 11 del gen APP y la secuencia 2' de varios clones de levaduras analizados. M, marcador de peso molecular; G, ADN genómico; c+, control positivo y c-, control negativo.

La Figura 9 muestra la separación de los cromosomas de levaduras mediante PFGE e hibridación con el ADNc del gen APP. A, PFGE teñido con bromuro de etidio. B, Membrana hibridada contra el ADNc del gen APP. carriles: M Marcador de peso molecular, YAC b142f9, AB1380 (levadura sin YAC), clon 13, clon 14, clon B7.

La Figura 10 muestra un *Southern Blot* de la región 5' del YAC b142f9 y del clon 14. Diferencias en el patrón de las bandas del *Southern blot* entre el clon original b142f9 (APP) y el clon 14.

La Figura 11 muestra un *Southern Blot* comparativo del YAC b142f9 y del clon 14. Tanto el ADN del clon B142F9 como el del clon 14 se digirió con el enzima *Bam HI*. Separados en un gel de agarosa e hibridados con el ADNc del gen APP. M, marcador de peso molecular; APP, clon B142F9; 14, clon 14. A la derecha, B. Patrón de bandas que se obtiene tras digerir las 300 kb del gen APP con *Bam HI*, sombreados aparecen marcados los fragmentos que contienen alguna región codificante del gen.

La Figura 12 muestra el esquema previsto para la fragmentación del YAC b142f9, mediante dos rondas sucesivas de recombinación homóloga en levaduras.

La Figura 13 muestra el análisis mediante PCR doble del clon b106. PCR realizada a diferentes clones, tanto de la SecA como de la SecB. La primera PCR se realizó sobre el exon6 del gen APP, mientras que la segunda sobre el gen GABPA. Los clones positivos para la primera PCR y negativos para la segunda, se indican con un asterisco. C+, control positivo; C-, control negativo.

La Figura 14 muestra el análisis mediante PCR del entorno de recombinación. Esquema de las PCRs, la marca sombreada indica el lugar de la SecB. B. PCRs del gen GABPA, exon 11, exon 6 del gen APP, Sec A' y Sec A. Cada PCR tiene tres carriles, correspondientes al control positivo, clon b106 y control negativo.

La Figura 15 muestra la hibridación del PFGE frente al ADNc del gen APP y del gen GABPA. A. Gel de PFGE teñido con bromuro de etidio. 1. Marcador. 2 y 5 b142f9. 3 y 6 clon 14. 4 y 7 clon b 106. B. Hibridación de los carriles 1-4 con el ADNc del gen APP. Hibridación de los carriles 5-7 con el ADNc del gen GABPA.

ES 2 316 209 A1

La Figura 16 muestra el esquema y el gel del *Southern blot* de la recombinación en 3'. A. Esquema del *Southern blot* de la recombinación en 3', en la zona superior el YAC original, en la zona baja el YAC recombinado. El cuadrado sombreado delante de Reco B representa la localización de la sonda utilizada. B. *Southern blot* de las digestiones con *Eco RI* y *Sca I* de los tres YACs, b 142f9(APP), clon 14 y clon b106.

5

La Figura 17 muestra un *Southern blot* comparativo de los clones b142f9, 14 y b106. *Southern blot* comparativo de los YACs b142f9(APP), clon 14 y clon b106, digerido con *Bam HI* e hibridado con una sonda del ADNc del gen APP. El patrón de bandas se conserva entre los tres YACs. M, marcador.

10

La Figura 18 muestra el PFGE de la extracción del YAC b106. Extracción de la banda correspondiente al YAC b106. Los laterales se tiñeron primero, para determinar la posición del YAC en el gel. En la zona central, falta el trozo de agarosa correspondiente al YAC b106.

15

La Figura 19 muestra un esquema de las PCR utilizadas para el análisis de los ratones fundadores.

La Figura 20 muestra las PCR representativas de los ratones fundadores. Muestra de las 23 PCR realizadas a los ratones transgénicos, se muestran las realizadas a los ratones 2, 12, 35, 37, 41 y 46, c- control negativo, c+ control positivo.

20

La Figura 21 representa una PCR ilustrativa de varias crías del ratón 35 y la transmisión del gen APP a la línea germinal. Imagen de las 4 PCR realizadas a las siete primeras crías del ratón 35. Se realizaron las PCR de *TRP 1*, exon 6, exon 11 y *LYS 2*. Se puede observar como las crías 1, 4, 5 y 7 han heredado el transgen.

25

La Figura 22 muestra un *Southern blot* comparativo de la F1 de los ratones fundadores. *Fingerprint* de los ratones 35 y 64, comparados con sus hermanos de carnada no transgénicos. Se puede observar un patrón de bandas igual que el obtenido para el YAC b106.

30

La Figura 23 representa un gráfico de barras que muestra la expresión del gen APP humano. Representación logarítmica en unidades relativas de la expresión del gen APP humano en la línea 35. Intervalo de confianza de 97%. Se detecta una alta expresión en tejido nervioso central y periférico. Niveles más bajos en testículos, sangre, corazón y riñón.

35

La Figura 24 representa un gráfico de barras que muestra la expresión del gen APP murino. Representación en unidades relativas, de la expresión del gen APP murino en los ratones. La gráfica se ha normalizado frente a la expresión en bazo (la más baja), usándose un intervalo de confianza del 95%. En la leyenda se indica el tejido al que corresponde cada barra.

40

La Figura 25 muestra la expresión y valoración de la proteína APP. A. Geles representativos del análisis mediante western blot para la proteína APP y actina. Tejidos: 1 corteza, 2 ventrículos, 3 cerebelo, 4 mesencéfalo, 5 médula espinal, 6 hígado, 7 pulmón, 8 páncreas, 9 bazo, 10 intestino delgado, 11 músculo, 12 testículos, 13 corazón y 14 riñón. B. Representación gráfica de los niveles de APP. Barra azul los ratones salvajes y roja los transgénicos. Tejidos: 1 Corteza, 2 Ventrículos, 3 Mesencéfalo, 4 Cerebelo y 5 Médula espinal.

45

La Figura 26 muestra el análisis histológico de ratones transgénicos de la línea 35. Tinción con rojo congo de cerebros de ratones. A Corteza de ratones salvajes. B Hipocampo de ratones salvajes. C Corteza de la línea 35. D Hipocampo de la línea 35. E Hipocampo de un ratón Tg2576 con un año de edad, donde se aprecian placas amiloidogénicas.

50

La Figura 27 muestra el análisis histológico de ratones transgénicos de la línea 64. Tinción con rojo congo de cerebros de ratones. A Corteza de ratones salvajes. B Hipocampo de ratones salvajes. C Corteza de la línea 64. D Hipocampo de la línea 64. E Hipocampo de un ratón Tg2576 con un año de edad, donde se aprecian placas amiloidogénicas.

55

Descripción detallada de la invención

55

La presente invención se relaciona, en general, con un animal no-humano transgénico útil como modelo animal no-humano para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Dicho animal transgénico se caracteriza porque contiene, insertado en su genoma, un polinucleótido heterólogo (transgén) que comprende la secuencia de nucleótidos del gen APP humano (hAPP) completo junto con sus secuencias reguladoras, careciendo dicho transgén de otros genes presentes en el entorno natural del gen hAPP, tales como los genes GABPA, ATPJ y CYR1, y porque la expresión de dicho transgén presenta un patrón de expresión endógeno en el animal transgénico similar al patrón de expresión endógeno de ese mismo gen hAPP en humanos. Tal como aquí se utiliza, la expresión "patrón de expresión endógeno del transgén hAPP en el animal transgénico similar al patrón de expresión endógeno del gen hAPP en humanos" o similares se refiere a que el animal transgénico que contiene dicho transgén hAPP expresa el gen hAPP en los mismos tejidos que se expresa el gen hAPP en humanos y en sustancialmente la misma proporción.

65

El hecho de que el animal no-humano transgénico proporcionado por esta invención contenga un transgén que contiene únicamente el gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras, sin interferencia de otros genes

ES 2 316 209 A1

presentes en el entorno natural del gen hAPP (e.g., los genes GABPA, ATPJ y CYYR1) que pudieran interferir con su expresión, permite una expresión de dicho transgén en el animal transgénico con un patrón de expresión endógeno similar al patrón de expresión endógeno del gen hAPP en humanos (es decir, reproduce con bastante fidelidad la situación en humanos), por lo que dicho animal transgénico puede emplearse como modelo animal no-humano para el estudio de la EA, su evolución y desarrollo, así como para estudiar los factores y estímulos que la producen y para identificar compuestos potencialmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de dicha enfermedad.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido aislado, en adelante polinucleótido de la invención, constituido por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.642.665 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26642665:1) [SEC ID N°: 74] o un fragmento de dicho polinucleótido que comprende el gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras. Dicho polinucleótido contiene la secuencia de nucleótidos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras, y, flanqueando los extremos de dicha secuencia de nucleótidos del gen hAPP, sendas regiones colindantes que comprenden secuencias únicas de recombinación, las cuales pueden ser empleadas en el aislamiento de la secuencia de nucleótidos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras.

En una realización particular, el gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras está comprendido entre el nucleótido 26.174.733 y el nucleótido 26.464.809 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26174733:26464809:1) [SEC ID N°: 75].

En otra realización particular, el polinucleótido de la invención está constituido por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.573.344 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26573344:1) [SEC ID N°: 76]. Dicho polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras flanqueado por regiones que contienen, al menos, una secuencia única de recombinación.

Por tanto, en otra realización particular, tal como se muestra en la Figura 1, dicho gen hAPP está flanqueado en su extremo 5' (en relación al origen y la dirección de la transcripción del gen APP) por una primera secuencia de nucleótidos y en su extremo 3' (en relación al final y la dirección de la transcripción del gen APP) por una segunda secuencia de nucleótidos, en donde:

- dicha primera secuencia de nucleótidos está constituida por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.464.810 y el nucleótido 26.642.665 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26464810:26642665:1) [SEC ID N°: 77], o un fragmento de la misma que comprende, al menos, una secuencia única, y
- dicha segunda secuencia de nucleótidos está constituida por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.174.732 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26174732:1) [SEC ID N°: 78], o un fragmento de la misma que comprende, al menos, una secuencia única.

En una realización concreta, dicha primera secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.464.810 y el nucleótido 26.573.344 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26464810:26573344:1) [SEC ID N°: 79], o un fragmento de la misma que comprende, al menos, una secuencia única, y dicha segunda secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.174.732 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26174732:1) [SEC ID N°: 78], o un fragmento de la misma que comprende, al menos, una secuencia única.

Las secuencias únicas (no repetidas) comprendidas en la primera y segunda secuencias de nucleótidos anteriormente citadas, pueden utilizarse para aislar de su entorno el gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras mediante recombinación homóloga, tal como se describe en los ejemplos que acompañan a esta descripción. Dichas secuencias únicas pueden identificarse siguiendo procedimientos descritos en el estado de la técnica y conocidos por los expertos en la materia. A modo ilustrativo, dichos procedimientos incluyen, en general, recursos bioinformáticos públicos tales como el programa RepeatMaster [<http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/>]; Chenna Ramu *et al.*, (2000) *cgi-model: CGI Programming Made Easy with Python*. LINUX Journal, July, 142-149; Smit, AFA and Green, P. RepeatMasker at http://repeatmasker.genome.washington.edu/cgi-bin/RM2_req.pl); Jurka, J. 2000 Replibase Update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trend in Genetics* 16(9): 418-420].

En una realización particular, dicha primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia única comprendida entre el nucleótido 26.571.876 y el nucleótido 26.573.344 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26571876:26573344:1) [SEC ID N°: 80], denominada en la presente invención como Sec 2.

En otra realización particular, dicha segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia única comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.067.221 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26067221:1) [SEC ID N°: 81], denominada en la presente invención como SecB.

El experto en la materia entiende que cualquier secuencia única comprendida dentro de dichas primera y segunda secuencias de nucleótidos que flanquean los extremos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras puede emplearse con la misma finalidad (aislar el gen hAPP completo y sus secuencias reguladoras de su entorno).

ES 2 316 209 A1

Por tanto, la presente invención no se limita únicamente a aquellas secuencias únicas aquí descritas (que constituyen una realización particular de la presente invención) sino que incluyen también a todas aquellas secuencias únicas, comprendidas dentro de dichas primera y segunda secuencias de nucleótidos, que pueden ser localizadas mediante las herramientas bioinformáticas conocidas por el experto en la materia y que forman parte del estado de la técnica.

5 El polinucleótido de la invención puede estar contenido dentro de un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, en adelante vector de la invención, que comprende un polinucleótido de la invención. Dicho vector contiene, por tanto, la secuencia de nucleótidos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras, flanqueada por secuencias únicas tal como se ha descrito en la presente invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector en el que se introduce dicho polinucleótido puede ser un cromosoma artificial de levadura [YAC (yeast artificial chromosome)], un cromosoma artificial de bacteria [BAC (bacterial artificial chromosome)] o un cromosoma artificial derivado de P1 [PAC (P1-derived artificial chromosome)]. Por tanto, en una realización particular, el vector de la invención se selecciona del grupo formado por un YAC, un BAC o un PAC dependiendo de la célula huésped que vaya a transformarse.

10 En una realización particular, cuando la célula en la que va a introducirse el vector de la invención es una levadura, el vector de elección será un YAC, que contendrá todos los elementos estructurales adecuados para realizar su función, tales como un telómero, un centrómero, una secuencia de replicación autónoma y un marcador de selección auxotrófica en cada brazo. En los Ejemplos que acompañan a esta descripción se describe la obtención de un YAC que presenta los elementos estructurales anteriormente citados que se utiliza para transformar células de levadura.

15 En otra realización particular, cuando la célula en la que va a introducirse el vector de la invención es una bacteria, entonces el vector de elección será un BAC, donde los elementos mínimos necesarios serán un origen de replicación y genes que controlan el número de copias y la partición del BAC.

20 Las características de los YAC, BAC y PAC son conocidas por el experto en la materia. Información detallada sobre dichos tipos de vectores ha sido proporcionada, por ejemplo, por Giraldo y Montoliú [Giraldo, P. & Montoliú L., 2001 Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals, *Transgenic Research* 10(2): 83-110].

30 Por tanto, en una realización particular, la invención se relaciona con un vector útil para transformar levaduras que comprende un polinucleótido de la invención flanqueado en uno de sus extremos por una tercera secuencia de nucleótidos y en el otro extremo (extremo opuesto) por una cuarta secuencia de nucleótidos, en donde:

- 35 - dicha tercera secuencia de nucleótidos comprende (i) un telómero funcional en células de levadura y, al menos, (ii) un marcador de selección por auxotrofia, y
- 40 - dicha cuarta secuencia de nucleótidos comprende (i) un centrómero funcional en células de levadura, un telómero funcional en células de levadura y, al menos, un marcador de selección por auxotrofia.

Prácticamente cualquier telómero y centrómero funcional en levaduras puede ser utilizado en la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos telómeros y centrómeros funcionales en levaduras incluyen los descritos en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

45 Asimismo, prácticamente cualquier marcador de selección por auxotrofia puede ser utilizado en la presente invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos marcadores de selección por auxotrofia incluyen *TRP1*, *LEU2*, *LYS2*, *HIS3*, *HIS5*, *TRP1* y *URA3*.

50 El vector de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989 "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1-3].

55 El vector de la invención puede ser utilizado para transformar células eucariotas, tales como células de levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, o células procariotas, tales como bacterias, por ejemplo, *Escherichia coli*.

60 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula, en adelante célula de la invención, que comprende un polinucleótido de la invención, o un vector de la invención. Las células pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989 "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1-3].

Los polinucleótidos, los vectores o las células descritos de la invención pueden emplearse para obtener un animal no-humano transgénico que presenta, insertada en su genoma, la secuencia de nucleótidos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras.

65 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un animal no-humano transgénico, en adelante animal no-humano transgénico de la invención, que contiene, insertado en su genoma, un polinucleótido de la invención. Como consecuencia, el animal no-humano transgénico de la invención presenta un patrón de expresión endógeno del gen hAPP similar al patrón de expresión que ese mismo gen hAPP tiene en humanos. Aunque no se desea estar vinculado

a ninguna teoría, se cree que ello es debido, principalmente, a que se encuentra regulado por sus propias secuencias reguladoras. Esto permite que la expresión del gen hAPP en el animal no-humano transgénico de la invención sea susceptible de ser inducida por los mismos factores que inducen su expresión en humanos, convirtiéndolo en un modelo animal que reproduce fielmente los fenómenos y características de la EA que se dan en humanos.

5

En una realización particular de la invención, el animal no-humano transgénico de la invención es un mamífero, preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón o una rata.

10

El animal no-humano transgénico de la invención puede presentar cualquier fondo genético de los conocidos en el estado de la técnica por el experto en la materia, es decir, dicho animal no-humano transgénico puede proceder de un animal tipo salvaje (wt) o bien de un animal no-humano con un fondo genético que incorpore algún marcador molecular relacionado, directa o indirectamente, con la EA. Por tanto, en una realización particular, el animal no-humano transgénico de la invención puede expresar, además del gen hAPP, uno o más genes relacionados, directa o indirectamente, con el desarrollo de la EA. Prácticamente cualquier marcador molecular relacionado directa o indirectamente con el desarrollo de la EA puede utilizarse. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos genes reconocidos como marcadores moleculares de EA, incluyen el gen de la presenilina 1 (PS1), el gen de la presenilina 2 (PS2) y el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E (APOE).

15

20

Por tanto, en una realización particular, el genoma del animal no-humano transgénico de la invención contiene, además de un polinucleótido de la invención, uno o más marcadores moleculares de EA. A modo ilustrativos, no limitativo, dicho marcador molecular de EA se seleccionan del grupo formado por los genes PS1, PS2, y el alelo epsilon4 ($\epsilon 4$) del gen APOE.

25

Otros factores genéticos relacionados con la predisposición a desarrollar EA incluyen el gen de la α_2 -macroglobulina, el gen del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad, el gen de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas LRP, de la proteína Tau, de la butilcolinesterasa K, de la catepsina D, de la interleuquina y de la colina acetiltransferasa.

30

Adicionalmente, el fondo genético de los ratones no-humanos de la presente invención puede comprender variantes alélicas, mutaciones y polimorfismos de dichos marcadores moleculares de la EA.

35

La presencia en el genoma del animal no-humano transgénico de la invención de la secuencia de nucleótidos del gen APP humano (hAPP) completo junto con sus secuencias reguladoras permite que dicho gen se exprese con un patrón de expresión endógeno similar al patrón de expresión que ese mismo gen tiene en humanos, por lo que dicho animal transgénico puede emplearse como modelo animal no-humano transgénico para el estudio de la EA. Asimismo, tal como se ha indicado anteriormente, el animal no-humano transgénico de la invención puede presentar, si se desea, marcadores moleculares de la EA adicionales. Todo ello permite el estudio no sólo de la EA en general, sino de las diferentes variantes de la enfermedad de Alzheimer, tales como, EAF y EAE.

40

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del animal no-humano transgénico de la invención en el estudio de la EA. En una realización particular, la EA se selecciona entre EAF y EAE.

45

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un animal no-humano transgénico de la invención, como modelo de la EA para el estudio de la etiología de la enfermedad, las causas, los factores desencadenantes, las agresiones o insultos medioambientales y/o fisiopatológicos que conducen al establecimiento de la enfermedad.

50

Ejemplos ilustrativos de los mismos, no limitativos, incluyen la edad, el traumatismo craneal, el sexo femenino, la acción de patógenos como virus y bacterias, tipo herpes (HSV1), bacterias, e.g., *Chlamydia pneumoniae*, etc., la acumulación de metales en el cerebro, tipo aluminio, zinc, etc.

55

En otro aspecto, la invención va dirigida al empleo de un animal no-humano transgénico de la invención, para la búsqueda, descubrimiento, identificación, evaluación y validación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA. Dichos compuestos pueden ser compuestos de cualquier naturaleza, por ejemplo, un compuesto químico, biológico, microbiológico, etc., aislado o mezclado con uno o más compuestos diferentes, e incluye compuestos de composición y estructura conocida o desconocida, productos farmacéuticos con alguna aplicación terapéutica conocida, productos biológicos, productos microbiológicos, etc., por ejemplo, compuestos químicos orgánicos o inorgánicos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, extractos, etc.

60

Adicionalmente, el animal no-humano transgénico de la invención, e.g., un ratón, puede emplearse, mediante cruce con otros animales no-humanos de la misma especie, para obtener animales no-humanos que presenten las características genotípicas y fenotípicas de sus progenitores. Ejemplos de animales no-humanos susceptibles de cruzarse con el animal no-humano de la invención incluyen:

65

- animales no-humanos knock-out para el gen APP, u otros genes relacionados directa o indirectamente con la EA;
- animales no-humanos que expresen variaciones alélicas, polimorfismos o mutaciones en genes implicados en la EA, u

ES 2 316 209 A1

- otros animales no-humanos útiles como modelos de la EA.

En una realización particular, los genes relacionados directa o indirectamente con la EA se seleccionan del grupo formado por los genes PS1, PS2, y el alelo epsilon4 (64) del gen APOE, u otros factores genéticos de predisposición relacionados con la enfermedad, como son el gen de la α_2 -macroglobulina, el gen del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad, el gen de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas LRP, de la proteína Tau, de la butilcolinesterasa K, de la catepsina D, de la interleuquina y de la colina acetiltransferasa.

En otra realización particular, el ratón no-humano transgénico de la invención puede cruzarse con un ratón knock-out para el gen APP murino (mAPP), de forma que, tras varios cruces, puede obtenerse un ratón que expresa únicamente el transgén hAPP.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un animal no-humano transgénico según la invención, para la obtención de un animal no-humano transgénico que sólo expresa el transgén hAPP y no el gen mAPP.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para identificar un compuesto potencialmente útil para el tratamiento y/o prevención de la EA que comprende:

- a) administrar a un animal no-humano transgénico de la invención un compuesto candidato;
- b) determinar el patrón de expresión del gen hAPP y/o la producción de la proteína hAPP y/o la producción del péptido (β -amiloide ($A\beta$ en dicho animal no-humano transgénico de la etapa (a), y
- c) seleccionar el compuesto candidato que produce (i) una disminución en los niveles de expresión del gen hAPP en tejido nervioso, (ii) una disminución de la producción y/o acúmulo de la proteína hAPP y/o (iii) una disminución en la producción y/o acúmulo del péptido $A\beta$ en dicho animal no-humano transgénico.

Los niveles de expresión del gen hAPP, de producción y/o acúmulo de la proteína hAPP así como de producción y/o acúmulo del péptido $A\beta$ en tejido nervioso pueden medirse mediante técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, como RT-PCT cuantitativa, Northern blot, Western blot, etc. Pueden encontrarse intervalos preferidos de los niveles de expresión del gen hAPP o de acúmulo de la proteína hAPP en las Figuras 24 y 26 respectivamente.

En una realización particular, se selecciona el compuesto candidato que produce una disminución en los niveles de expresión del gen hAPP, o una disminución en los niveles de producción y/o acúmulo de la proteína hAPP o una disminución en la producción y/o acúmulo del péptido $A\beta$ en comparación con los niveles control. Dicho compuesto puede ser cualquiera de los compuestos que se han citado anteriormente.

Los animales no-humanos transgénicos de la invención pueden obtenerse por cualquier método de transgénesis conocido por el experto en la materia, tales como microinyección, electroporación, bombardeo de partículas, transformación celular seguida de clonación (los núcleos de las células transformadas con éxito se transfieren a óvulos enucleados y se implantan en hembras receptoras), transformación de gametos (introducir genes en oocitos o espermatozoides y utilizar los gametos transformados para la fecundación, generando un animal completo) y/o microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

En una realización particular, tal como se describe en los Ejemplos que acompañan a esta descripción, el método de transgénesis utilizado se basa en la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides. Dicha técnica se encuentra ampliamente descrita en la solicitud de patente internacional WO 2005/098010.

Los animales obtenidos por el método de transgénesis anteriormente descrito poseen el genotipo y el fenotipo característico del animal no-humano transgénico de la invención, contienen insertado en su genoma la secuencia de nucleótidos del gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras y dicho gen hAPP presenta un patrón de expresión endógeno similar al patrón de expresión que ese mismo gen tiene en humanos.

Asimismo, igual que el animal no-humano transgénico de la invención, los animales no-humanos transgénicos obtenidos por el método de transgénesis descrito previamente pueden cruzarse con otros animales no-humanos de la misma especie para obtener animales no-humanos transgénicos que presenten las características genotípicas y fenotípicas de sus progenitores, dando lugar a diferentes animales no humanos que pueden emplearse como modelo para el estudio de la EA.

Por otro lado, los descendientes de los animales no-humanos transgénicos obtenidos por el método de transgénesis descrito en la presente invención, pueden presentar un patrón de expresión endógeno del gen hAPP similar al patrón de dicha proteína en humanos.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona, por lo tanto, con la progeñe de un animal no-humano transgénico, obtenible según el método de transgénesis descrito en la invención, que expresa de forma endógena el gen APP humano con un patrón de expresión similar o equivalente al patrón de expresión de dicho gen en humanos.

ES 2 316 209 A1

El siguiente Ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo

- 5 *Obtención de un animal transgénico no-humano que expresa de forma endógena el gen APP humano completo con un patrón de expresión equivalente al patrón de expresión de dicho gen en humanos*

Material y métodos

10 1. Generación de plásmidos

1.1 Clonajes generales

15 Para la generación de los vectores necesarios para este trabajo, se utilizaron las técnicas habituales de biología molecular (Sambroock, J., 1989, citado anteriormente; Ausubel FM, B. R., Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl, K. (1999). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and sons.) y técnicas puestas a punto en el laboratorio de los inventores (Montoliu, 1997 Lab protocols. Generation of a transgenic mouse).

20 1.2 Electroforesis de ADN

La separación, identificación y cuantificación de los diversos fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Se utilizó la agarosa Ultra Pure Agarose (GIBCO-BRL) a concentraciones comprendidas entre 0,5 y 2%, pudiendo separar un rango de moléculas desde 100 pb hasta 12 kb. Se utilizaron cubetas horizontales de Ecogen (6,5 x 8 cm y de 11 x 15 cm) donde se aplicó una corriente de 5 V/cm con una fuente eléctrica de Segainvex. 25 Los geles se realizaron en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) 2 mM pH 8 (Merck)) y con bromuro de etidio (Roche) a 0,5 µg/ml.

1.3 Cuantificación de ADN

30 La cuantificación de ADN se realizó mediante distintos métodos, dependiendo de la precisión necesaria y la concentración esperada. La estimación de la concentración de ADN en muestras cuyo rango de concentración esperado oscilaba entre 0,05 y 2 µg/µl se llevó a cabo en el espectrofotómetro modelo UV-1601 de SHIMADZU, basado en la medida espectrofotométrica de la absorbancia del ADN a longitud de onda de 260 nm. Las medidas se realizaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial y teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a longitud de onda de 260 nm (OD₂₆₀) corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena, se calculó la concentración de ADN según la equivalencia:

$$40 \quad \begin{array}{l} \text{Concentración de ADN de} \\ \text{doble cadena en } \mu\text{g/ml} \end{array} = OD_{260} \times \frac{50 \mu\text{g/ml} \times \text{Factor de dilución}}{1 OD_{260}}$$

45 Para la estimación de muestras cuya concentración se estimaba entre 0,01 y 0,05 µg/µl se utilizó el fluorímetro Hoefer DyNA Quant 200 Fluorometer (Amersham farmacia biotech). Este método mide la fluorescencia de la bis-benzamida (Hoeschst 33258), molécula que tiene la capacidad de unirse al ADN de doble cadena, que emite una fluorescencia capaz de ser captada por el fluorímetro cuando es excitada mediante luz UV a 365 nm. Este método es de gran utilidad para medir en rangos pequeños de concentración, puesto que se evita el fondo debido a nucleótidos sueltos o ARN. Todas estas medidas fueron comprobadas mediante nanodrop (NanoDrop, ND-1000 spectrophotometer).

50 1.4 Reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR)

55 La obtención de fragmentos específicos de ADN para clonaje y las amplificaciones de regiones concretas del YAC, tanto para el análisis de las recombinaciones como para comprobar la integración del mismo en los ratones transgénicos, se realizaron mediante PCR.

60 La PCR requiere condiciones específicas para cada fragmento amplificado. Las concentraciones de la reacción de mezcla, como las temperaturas, tiempos de amplificación y ciclos, varían para las distintas reacciones. Las condiciones estándares de las que partíamos para todas las reacciones eran las siguientes: MgCl₂ 1,5 mM (Biotools), deoxinucleótidos [dATP, dCTP, dTTP y dGTP (Roche)] 200 µM, pareja de oligonucleótidos específico a 1 µM (Isogen), buffer de reacción 1 x (Biotools) y 1 unidad de Taq polimerasa (Biotools) todo ello en un volumen de 25 µl. La reacción se llevo a cabo en tubos de 0,2 ml (MJ Research) en el termociclador modelo PCT-100 de MJ Research. Los programas utilizados variaron dependiendo del fragmento a amplificar. Por lo general, constaban de una primera desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos, después un ciclo de 3 temperaturas que se repetía 35 veces, 30 segundos a 95°C, 30 segundos entre 55-65°C dependiendo de la temperatura de hibridación del oligonucleótido y 1 minuto a 72°C. Por 65 último se sometían a 10 minutos a 72°C para la completa amplificación de los fragmentos.

ES 2 316 209 A1

1.4.1 PCR de colonias de levaduras

El análisis de colonias de levaduras se realizó para estudiar las distintas recombinaciones homólogas. Para poder realizar una PCR directa de la colonia, evitando crecerlas y extraer el ADN de las mismas, se transfirió la colonia a un tubo de PCR (0,2 ml) donde se resuspendió en 50 μ l de Zymolyasa (20 U/ml), incubándose 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 5.000 r.p.m. en una centrífuga de mesa eppendorf 5417c, se eliminaron los sobrenadantes y se calentaron las células durante 5 minutos a 95°C. Se resuspendió el precipitado en 15 μ l de agua y se usaron 5 μ l para realizar la PCR.

1.5 Extracción y purificación de ADN de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN inferiores a 10 kb se realizó mediante geles de agarosa en buffer TAE. Tras separar los fragmentos en el gel, se identificaron mediante una lámpara UV (Upland). Después se procedió a recortar las bandas con una cuchilla estéril y se introdujeron en un tubo eppendorf. La extracción de ADN del gel se llevó a cabo mediante el kit Qiaquick gel extraction kit de QIAagen, siguiendo las instrucciones descritas en el protocolo del mismo.

1.6 Células procariotas

1.6.1 Cepas bacterianas y cultivo

La amplificación de los plásmidos recombinantes se realizó en cepas de *E. coli* comerciales. Los plásmidos cuyo tamaño rondaba las 5 kb fueron amplificados y transformados en las células DH5 α (Gibco), mientras que los plásmidos que tenían un tamaño próximo a las 10 kb se amplificaron y transformaron en las células TOP10F' (Stratagen).

El crecimiento bacteriano, para la amplificación de los distintos plásmidos se realizó en medio líquido LB (Luria-Bertani), a 37°C durante al menos 8 horas en agitación (250 r.p.m.) y en presencia de ampicilina (Sigma), a una concentración final de 50 μ g/ml. La selección de colonias se realizó tras crecer las transformaciones en placas *Petri* con agar y medio LB, en presencia de ampicilina y en los casos en los que se podía realizar selección por color con X-gal e IPTG.

1.6.2 Preparación y transformación de bacterias competentes

La preparación de células competentes DH5 α se realizó mediante el método del cloruro de calcio y se transformaron mediante el método de choque térmico.

La transformación de los plásmidos de gran tamaño se llevó a cabo utilizando las cepas comerciales TOP10F' (Stratagen). La electroporación se llevó a cabo en cubetas de electroporación de 2 mm de diámetro (Bio Rad) previamente enfriadas en hielo, y dando un pulso en condiciones de 25 μ F, 2,5 KV y 200 Ω utilizando el Gene Pulser de Bio-Rad según las indicaciones de la casa comercial.

1.6.3 Purificación de ADN plasmídico

Las purificaciones de ADN plasmídico en pequeña escala se llevaron a cabo inoculando la colonia en cuestión en 2 ml de medio LB y antibiótico. Estos cultivos se crecieron durante al menos 8 horas a 37°C y agitación (250 r.p.m.). La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina. La preparación de ADN plasmídico en mayor concentración y cantidad, se realizó mediante el cultivo de grandes cantidades bacterianas (100-500 ml) utilizando para su purificación los kits comerciales *Quiagen maxi kit* (Quiagen) y el *Flexiprep Kit* (Amersham Pharmacia) siguiendo los protocolos específicos de cada kit.

ES 2 316 209 A1

2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para delimitar las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen de APP en el YAC, y su distancia, hasta la región del gen codificante mas cercana, han sido:

| | | | |
|----|-----------|--|----------------|
| 5 | | | |
| | APP3'-B-U | 5'-atcctaagaggaaggatcttaagg-3' | [SEC ID N° 1] |
| 10 | APP3'-B-L | 5'-gggagaacaaacatacctcactagc-3' | [SEC ID N° 2] |
| | APP3'-A-U | 5'-ccagcatgttttccaaagtatgag-3' | [SEC ID N° 3] |
| | APP3'-A-L | 5'-tgaaatgtccccacactgatcactg-3' | [SEC ID N° 4] |
| 15 | APP3'-1-U | 5'-gtatagtagtgatggatggttcaaacagagccta-3' | [SEC ID N° 5] |
| | APP3'-1-L | 5'-aaggtaaagctctagaatctatcagtgcct-3' | [SEC ID N° 6] |
| | APP3'-2-U | 5'-tttagaagagctcagtaagaatccacattt-3' | [SEC ID N° 7] |
| 20 | APP3'-2-L | 5'-cattttgtogttactagtaccattggtttc-3' | [SEC ID N° 8] |
| | APP5'-1-U | 5'-ctcaaaaacagcaacacagatgtgc-3' | [SEC ID N° 9] |
| | APP5'-1-L | 5'-gagcttaaacaccttctctgc-3' | [SEC ID N° 10] |
| 25 | APP5'-2-U | 5'-tggggagaggaatggaatttgagc-3' | [SEC ID N° 11] |
| | APP5'-2-L | 5'-gtcatttccagaaaaagcccactgc-3' | [SEC ID N° 12] |
| | APP5'-3-U | 5'-tcaaggacatggagattgggcaggc-3' | [SEC ID N° 13] |
| 30 | APP5'-3-L | 5'-ggggtaacaggttgccggtcatatg-3' | [SEC ID N° 14] |
| | APP5'-4-U | 5'-caccagaccatgatgtctcagtagc-3' | [SEC ID N° 15] |
| | APP5'-4-L | 5'-ctgcaaaaacagccctcatattctgc-3' | [SEC ID N° 16] |
| 35 | APP5'-5-U | 5'-tagcatcctttgctaagccagttgc-3' | [SEC ID N° 17] |
| | APP5'-5-L | 5'-gcttgttattggaggttccagcacg-3' | [SEC ID N° 18] |
| | APP5'-6-U | 5'-tccaacgggggagtgagtgaaaggc-3' | [SEC ID N° 19] |
| 40 | APP5'-6-L | 5'-gcctcactcctgcaaacgtgcccaa-3' | [SEC ID N° 20] |
| | APP5'-7-U | 5'-tctttcttccacottggtatcctgc-3' | [SEC ID N° 21] |
| | APP5'-7-L | 5'-caggatgtctctggatttttactcg-3' | [SEC ID N° 22] |
| 45 | | | |
| | | | |
| 50 | | | |
| | | | |
| 55 | | | |
| | | | |
| 60 | | | |
| | | | |
| 65 | | | |

ES 2 316 209 A1

Los oligonucleótidos usados para comprobar los exones del gen de APP, así como la presencia del gen GABPA han sido los siguientes:

| | | |
|----|--------------|--|
| 5 | APP Ex1-U | 5'-agtttcctcggcagcggtagg-3' [SEC ID N° 23] |
| | APP Ex1-L | 5'-ccagcaggagcagtgccaaac-3' [SEC ID N° 24] |
| | APP-EX2-U | 5'-aagaccgggctgattcctaa-3' [SEC ID N° 25] |
| 10 | APP-EX2-L | 5'-tccaacgtgaattgctagcc-3' [SEC ID N° 26] |
| | APP-EX3-U | 5'-cccaagcattttggataagg-3' [SEC ID N° 27] |
| | APP-EX3-L | 5'-cctctttttcttcctcaag-3' [SEC ID N° 28] |
| 15 | APP-EX4-U | 5'-ttgattgggttgcttaggca-3' [SEC ID N° 29] |
| | APP-EX4-L | 5'-tgttgccctcaaaataccct-3' [SEC ID N° 30] |
| | APP-EX5-U | 5'-ctaccaactcactgttttctc-3' [SEC ID N° 31] |
| 20 | APP-EX5-L | 5'-gcagagaccttttcagtgat-3' [SEC ID N° 32] |
| | APP-EX6-U | 5'-tgccaaaattccatatggacg-3' [SEC ID N° 33] |
| | APP-EX6-L | 5'-gggatttgccaagcagcatat-3' [SEC ID N° 34] |
| 25 | APP-EX7-U | 5'-ccactgggaggattaaaaga-3' [SEC ID N° 35] |
| | APP-EX7-L | 5'-gagaagtggacagaaatgtg-3' [SEC ID N° 36] |
| | APP-EX8-U | 5'-tgtcagtggactcgtgcatt-3' [SEC ID N° 37] |
| 30 | APP-EX8-L | 5'-catctcaagctgtctggcaa-3' [SEC ID N° 38] |
| | APP-EX9-U | 5'-catgtottcagcaccaactg-3' [SEC ID N° 39] |
| | APP-EX9-L | 5'-caaactgtgcccacacagta-3' [SEC ID N° 40] |
| 35 | APP-Ex10-U | 5'-cagataggaaggggtatgta-3' [SEC ID N° 41] |
| | APP-Ex10-L | 5'-ggagcaaatataaggcagga-3' [SEC ID N° 42] |
| | APP-EX11-U | 5'-tgatgaggggttgagagtgca-3' [SEC ID N° 43] |
| 40 | APP-EX11-L | 5'-caagatggaatggacaggggt-3' [SEC ID N° 44] |
| | APPEx12-13-U | 5'-cctcgtcacgtgttcaatat-3' [SEC ID N° 45] |
| | APPEx12-13-L | 5'-caacttcactcgaatctcc-3' [SEC ID N° 46] |
| 45 | APPEx14-U | 5'-cacgtgaaagcagttgaagt-3' [SEC ID N° 47] |
| | APPEx14-L | 5'-ttgccacctatacaatggag-3' [SEC ID N° 48] |
| | APPEx15-U | 5'-ctggcacatcaatagcgata-3' [SEC ID N° 49] |
| 50 | APPEx15-L | 5'-actcggaacttgggaaatga-3' [SEC ID N° 50] |
| | APPEx16-U | 5'-taaaggcagcagaagcctta-3' [SEC ID N° 51] |
| | APPEx16-L | 5'-gctcagcctagcctatttat-3' [SEC ID N° 52] |
| 55 | APPEx17-U | 5'-accagttgggcagagaatat-3' [SEC ID N° 53] |
| | APPEx17-L | 5'-cttgagcagaatattcaccgg-3' [SEC ID N° 54] |
| | APPEx18-U | 5'-cttggttaattgaagaccagc-3' [SEC ID N° 55] |
| 60 | APPEx18-L | 5'-cttttgacagctgtgctgta-3' [SEC ID N° 56] |
| | GABPA-EX-U | 5'-tattattacgatggggacat-3' [SEC ID N° 57] |
| 65 | GABPA-EX-L | 5'-gtaaagcaacatctaaagca-3' [SEC ID N° 58] |

ES 2 316 209 A1

Los oligonucleótidos usados para la secuenciación de los distintos vectores de clonaje usados para la recombinación, han sido:

5 **SV40A-2** 5´-gtgaaggaaccttacttctgtggtg-3´ [SEC ID N° 59]
 Sp6 Promoter 5´-athtaggtgacactata-3´ [SEC ID N° 60]
 T7 Promoter 5´-taatacgactcactataggg-3´ [SEC ID N° 61]

10

Los oligonucleótidos usados para el clonaje del gen URA de levaduras, han sido:

URA3-U 5´-gcccagttattcttaacccaaactgca-3´ [SEC ID N° 62]
15 **URA3-L** 5´-cttccacccatgtctctttgagcaa-3´ [SEC ID N° 63]

Los oligonucleótidos utilizados para la detección de las secuencias auxotróficas del YAC, han sido:

20 **TRP1** 5´-gcccfaatagaaagagaacaattgacc-3´ [SEC ID N° 64]
 TRP2 5´-acacctccgcttacatcaacacc-3´ [SEC ID N° 65]
 LYS1 5´-accaagccagcatctgtatcacc-3´ [SEC ID N° 66]
25 **LYS2** 5´-gcccfaatccatccacttctcacc-3´ [SEC ID N° 67]

Los oligonucleótidos utilizados para generar las sondas para el análisis por Southern blot, han sido:

30

SondaAPP-sec2-U 5´-tgaatcttggcatttggggcc-3´ [SEC ID N° 68]
 SondaAPP-sec2-L 5´-cctgtaacttgccctcatag-3´ [SEC ID N° 69]
35 **SondaAPP-secA-U** 5´-gaaacgagttgaaaggcacag-3´ [SEC ID N° 70]
 SondaAPP-secA-L 5´-tttaccccttccatgaagtccc-3´ [SEC ID N° 71]
 SondaAPP-secB-U 5´-ggcttgtaaattaaactctgaagc-3´ [SEC ID N° 72]
40 **SondaAPP-secB-L** 5´-cctcagtggctgttttgagagcat-3´ [SEC ID N° 73]

3. Modificaciones de cromosomas artificiales de levadura

45 3.1 Células eucariotas

 Todos los experimentos realizados en levaduras se llevaron a cabo en la cepa de *S. cerevisiae* AB1380 cuyas características metabólicas son: *Mata*, *ura3-52*, *trp1*, *ade2-1*, *lys2-1*, *his5* y *can1-100*. El clon original utilizado fue adquirido en la *Washington University, Human Yeast Artificial Chromosome Clone*, que contenía el YAC B142F9 (YAC de 650 Kb que contiene el gen APP humano completo).

 Las levaduras portadoras del YAC fueron crecidas en medio líquido y sólido con selectores autotróficos para evitar la eliminación esporádica del YAC. Los cultivos líquidos se crecieron durante 2-3 días a 30°C y en agitación (200 r.p.m.), mientras que para la obtención de colonias en placas se crecieron las levaduras durante 4-5 días a 30°C.

55 Los medios selectivos se prepararon con D+Glucosa (Merck), YNB (*Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids*) (Difco) y los aminoácidos correspondientes (Serva).

3.2 Recombinación homóloga en levaduras

60

 La transformación de las células de levaduras se llevó a cabo por dos métodos, cada uno de ellos con resultados muy distintos: el método de Acetato de Litio (AcLi) (Markie, D. (1995). *YAC Protocols*; Alison, A. G., D; Kaiser, C; Stearns, T (1997). *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.) y la electroporación de células de levaduras (Becker, D. M. y L. Guarente (1991). "*High-efficiency transformation of yeast by electroporation*." *Methods Enzymol* 194: 182-7).

65

ES 2 316 209 A1

3.3 Análisis mediante hibridación ADN-ADN (Southern Blot)

El análisis de los clones positivos se realizó mediante la técnica de Southern blot. Se digirieron entre 2-4 μg ADN genómico con 40-60 U de la enzima correspondiente [*Eco* RV, *Sca* I, *Bgl* II, *Bam* HI, *Hind* III, *Sal* I y *Eco* RI] en tampón de digestión 1x con espermidina 4 mM. La digestión se incubó a la temperatura de corte del enzima durante 12-14 horas. Los productos de las digestiones se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa 0,8%, en cubetas horizontales Horizon (20 x 25 cm) (Life Technologies).

El ADN se transfirió a una membrana de nylon HybondTM-N (Amersham) mediante capilaridad. Para ello, se necesitaron de 14-16 horas en tampón de transferencia SSC 20X [NaCl 3 M, Citrato Sódico 0,3 M]. Previamente, el gel se trató con un lavado en HCl 0,25 N para la despurinización del ADN y dos lavados de 15 minutos en NaOH 0,4 M para la neutralización y desnaturalización del ADN.

Una vez transferido el ADN a la membrana, éste se fijó por irradiación UV con el CL-1000 *Ultraviolet Crosslinker* (UVP-Stratagen), dando dos pulsos de 70.000 mJ/cm².

La sonda de copia única se obtuvo por restricción enzimática o mediante PCR, y se marcó con radioactividad utilizando 50 ng de ADN, 25 μCi de α -³²P-dCTP (Amersham) y el *kit High Prime* (Roche) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para la eliminación de nucleótidos libres de las sondas marcadas, se purificaron éstas a través de columnas Probe Quant G50 (Amersham). La actividad de las sondas se cuantificó en el contador de centelleo W 1414 (Beckmann), obteniéndose una actividad de aproximadamente de 1×10^6 cpm/ μl .

La hibridación se llevó a cabo incubando la membrana con la sonda correspondiente (SEC ID N° 68, SEC ID N° 69, SEC ID N° 72 y SEC ID N° 73) durante 14-16 horas, a 65°C.

Los filtros hibridados se expusieron en cassettes de exposición con pantallas intensificadoras (Amersham) y películas fotográficas (X-Omat, Kodak) durante varios días a -80°C. Alternativamente, se expusieron los filtros en cassettes *PhosphorImager* (Molecular Dynamics) durante 1-2 días a temperatura ambiente y la señal se analizó mediante el programa IQMac v 1.2 (Molecular Dynamics).

3.4 Preparación de bloques de agarosa con células de levaduras a pequeña escala

Para poder analizar las modificaciones del YAC, se prepararon bloques de agarosa que contenían las células enteras, consiguiendo de esta forma que los cromosomas se mantuvieran intactos, y pueda comprobarse mediante electroforesis en campo pulsado las variaciones en el tamaño que ha sufrido un cromosoma. El protocolo seguido fue el siguiente:

Se inoculan 10 ml de medio selectivo con el clon de levaduras que se quiere analizar, dejándolo crecer hasta saturación a 30°C y en agitación (200 r.p.m.). Se centrifuga el cultivo a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente descartándose el sobrenadante, y se resuspende el precipitado en 10 ml de EDTA 50 mM pH 8 y se vuelve a centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. Esta vez el precipitado se resuspende en 300 μl de Solución I (sorbitol 1 M, EDTA 20 mM pH 8, β -mercaptoethanol 14 mM y 2 mg/ml de zimoliasa 20T), se transfiriere a tubos de polipropileno de 10 ml y se atempera a 40°C. Una vez atemperado se añaden 50 μl de una solución de zimoliasa 20T a 10 mg/ml, añadiendo a continuación 500 μl de Solución II (Solución I con 2% de agarosa, Sea Plaque) atemperada también a 40°C. Se mezcla usando una pipeta de punta azul cortada en el extremo y se distribuye en los moldes usando una pipeta de 200 μl con una punta amarilla también cortada en el extremo. Se añaden 80 μl por molde. Se incuban en hielo durante 10 minutos para que la agarosa se solidifique y, una vez solidificada, los daditos se transfirieren de nuevo a un tubo de 10 ml con 4 ml de Solución III (sorbitol 1 M, EDTA 20 mM pH 8, Tris 10 mM pH 7,5, (β -mercaptoethanol 14 mM y 2 mg/ml de zimoliasa 20T) incubándolo a 37°C de 1 a 3 horas, en agitación suave. A continuación, se cambia la Solución III por 5 ml de Solución IV (laurel sulfato 1%, EDTA 100 mM pH 8, Tris 10 mM pH 8) y se incuba de nuevo 1 hora a 37°C. Posteriormente, se reemplaza la Solución IV por solución nueva y se incuba a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se lavan los daditos con 5 ml de NDS al 20% (EDTA 0,5 M, Trizma base 1 mM, N-lauril sarcosina 34 mM, pH 9) durante 2 horas a temperatura ambiente, se cambian por solución nueva y se pueden almacenar a 4°C.

3.5 Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Todos los geles se prepararon al 1% de agarosa LMP Sea Plaque en tampón TBE 0,5x (Tris-Borato 100 mM, EDTA 1 mM pH 8,3). El sistema de electroforesis en campo pulsado fue de Gene Navigator System (Amersham). Como marcadores de peso molecular se usaron los marcadores de levaduras PFGE marker II (Roche), que corresponden a daditos de agarosa de *S. cerevisiae* YPH 755 (cromosomas 90, 220, 280, 360, 450, 560, 610, 700, 770, 810, 850, 920, 960, 1.010, 1.100, 1.600 y 2.200 kb).

Originalmente, el YAC de partida tenía un tamaño de aproximado de 650 kb, y el tamaño final tras las modificaciones fue de 520 kb, por lo que para todas las electroforesis en campo pulsado que se realizaron, se usó un programa en el que se separaba de forma óptima los cromosomas de ese tamaño. El programa duró 26 horas, a 200 V: las primeras 12 horas con pulsos de 50 segundos y las 14 restantes con pulsos de 100 segundos. Una vez terminado de correr el gel, se tiñó durante 30 minutos en 1-2 litros de tampón de electroforesis con bromuro de etidio (BrEt) (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

ES 2 316 209 A1

Con la finalidad de analizar el YAC obtenido, los cromosomas se transfirieron a una membrana de nylon Hybond™-N (Amersham) para poder ser analizados. La transferencia se realizó de forma similar a la transferencia ya descrita para Southern blot, salvo unas pequeñas diferencias: Previamente a la transferencia, el gel es sometido a un tratamiento de 5 minutos a luz UV (254 nm) para romper las grandes moléculas de ADN. Posteriormente, se incubó dos veces durante 20 minutos cada una con HCL 0,25 N, y después, una de 30 minutos con NaOH 0,4 M. La transferencia por capilaridad se deja por lo menos 48 horas. Tanto la fijación como la hibridación se hicieron como ya se ha descrito en el apartado (3.3).

4. Preparación del YAC para la microinyección

4.1 Preparación de bloques de agarosa con células de levaduras a gran escala

Se prepararon daditos de agarosa con una alta densidad celular para poder aislar suficiente cantidad de ADN y generar el ratón transgénico de la invención. Para ello, se siguió el siguiente procedimiento:

Se crecen 200 ml de medio selectivo con la levadura que contiene el YAC hasta saturación. Se centrifuga durante 5 minutos a 600 g eliminando el medio sobrante. Se resuspende en 40 ml de EDTA 50 mM (pH 8) por cada 100 ml de cultivo original y se vuelve a centrifugar desechándose el sobrenadante. Se pesa el precipitado de levaduras, asumiendo una densidad de 1, se llevan las levaduras a un 50% del volumen con Solución I y la mezcla se atempera a 37°C. Una vez atemperado (unos 30 segundos), se añade el mismo volumen de Solución II, se mezcla con suavidad y se reparten 80 µl en los moldes, que están enfriándose a 4°C. Se deja gelificar durante 10 minutos. Se cambian los daditos a un tubo con 8 ml de Solución III por cada mililitro de daditos y se incuban 2 horas a 37°C agitando. Se reemplaza la Solución III por la misma cantidad de Solución IV y se incuban 1 hora a 37°C. Posteriormente, debe reemplazarse con solución nueva y se deja a 37°C toda la noche. Al día siguiente se lavan los daditos a temperatura ambiente durante 2 horas, con 8 ml de NDS al 20% por cada mililitro de daditos. Se repite el lavado y están listos para cargarlos.

4.2 Purificación del YAC mediante campo pulsado

La preparación del campo pulsado para la purificación del YAC requirió una serie de consideraciones, ya que el producto de esta purificación se iba a utilizar directamente para generar los ratones transgénicos. Se trabajó bajo condiciones altas de esterilidad, usando material estéril y desechable en todo momento; se evitó que la región del gel del que se va a extraer el ADN entrara en contacto con el BrEt puesto que tiene un alto poder mutagénico, y el pipeteo de cualquier solución que contenga nuestro YAC se realizó con puntas estériles y cortadas en la punta para evitar roturas en las moléculas de ADN.

Se preparó un pocillo grande uniendo siete pocillos normales del campo pulsado de forma que entren 9 daditos. En los pocillos contiguos, se cargaron fracciones de daditos de 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 y el Marker II. Se corrió el gel usando el programa elegido para la separación en ese rango de tamaño (26 horas, a 200 Voltios; primeras 12 horas con pulsos de 50 s y las restantes con pulsos de 100 s). Una vez corrido, se cortó el gel en tres trozos con un bisturí estéril en la dirección de la corrida del gel, generando de este modo un trozo central que contenía todo nuestro pocillo grande, y dos trozos laterales que contenían las fracciones y los marcadores. Estos dos trozos se tiñeron con BrEt (0,5 µg/ml), mientras que el trozo central se mantuvo en buffer de carrera. Los trozos teñidos se utilizaron para localizar el YAC modificado en el fragmento que no se había teñido. Una vez localizado el YAC, el bloque de agarosa que lo contiene se cortó y se equilibró en 50 ml del buffer de equilibrado (Bis-Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, NaCl 100 mM, Spermine 0,03 mM y Spermidine 0,07 mM) a 4°C durante al menos 16 horas. A continuación, el bloque de agarosa que contenía el YAC modificado se dividió en cuatro trozos, que se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se licuaron calentando durante 10 minutos a 70°C, atemperándose posteriormente a 45°C para añadir la agarosa (GELasa™ Epicentre), 5 unidades por cada 100 mg de agarosa y se incubó a 45°C durante tres horas. A continuación, se transfirió la agarosa disuelta a una columna Millipore de ultracentrifugación (Ultrafree-®MC Millipore), donde mediante centrifugaciones seriadas de 2 minutos a 6.000 r.p.m., se concentró todo el ADN en la columna. Esta operación se repitió hasta obtener un volumen final de 100 µl y se dejó la columna toda la noche a 4°C para que se resuspendiera el ADN. Posteriormente, en una placa petri con 40 ml de buffer de microinyección (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM pH 8, NaCl 100 mM, Spermine 0,03 mM, Spermidine 0,07 mM y agua estéril), se colocó un filtro de diálisis (Millipore) y se dejó dializar durante 2 o 3 horas. Tras este tiempo se recogió la gota que contenía el YAC modificado.

5. Generación de un ratón transgénico mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) incubados con ADN de YACs

La generación de un ratón transgénico que comprende el YAC modificado se llevó a cabo siguiendo los protocolos ampliamente descritos en la solicitud de patente WO2005/098010 y en Moreira, 2003 (Moreira, P.N., *et al.*, 2003, "Mouse ICSI with frozen-thawed sperm: the impact of sperm freezing procedure and sperm donor strain", *Mol Reprod Dev.* 66(1): 98-103) y Moreira, 2004 (Moreira, P.N., *et al.*, 2004, "Efficient generation of transgenic mice with yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection", *Biol Reprod.* 71(6): 1943-7).

6. Análisis de los ratones fundadores y sus descendientes

6.1 Análisis de los ratones fundadores mediante PCR

Para realizar el análisis del transgén, se eligió la técnica de la PCR debido a que esta técnica es altamente específica y la más rápida para la identificación del transgén. Se diseñaron diecisiete PCRs de los distintos exones del gen de APP, dos de los brazos del YAC y otras cuatro de regiones no codificantes del gen para el estudio de los ratones. Se realizaron las veintitrés PCRs de todos los ratones nacidos siguiendo el protocolo descrito anteriormente (1.3) y, solo aquellos positivos para todas las PCRs, fueron considerados como ratones portadores de todo el transgén.

6.2 Transmisión a la línea germinal

Los ratones considerados portadores del transgén se cruzaron con ratones C57BL/6J y se analizó su progenie. El análisis de la transmisión se realizó mediante la PCR de los dos brazos del YAC (LYS2 y TRP1) y de dos exones del gen APP (Exones 6 y 11).

7. Caracterización de proteínas

7.1 Medida de la concentración de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford utilizando como patrón albúmina de suero bovina (BSA).

7.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Se utilizaron geles concentradores al 3% y geles separadores de poliacrilamida de porcentaje variable (7,5, 8, 10 ó 15%) en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Como tampón de muestra se utilizó Tris-HCl 25 mM pH 6,3, glicerol 10%, SDS 2%, (β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,01%.

Como patrones de peso molecular se emplearon los patrones de peso molecular coloreados Rainbow™ de Amersham Pharmacia de alto peso molecular (220, 97,4, 66, 46, 30, 21,5 y 14,3 kDa).

7.3 Western blot

Brevemente, las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida-SDS tal y como se describe en el apartado anterior, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Bio-Rad) con un tamaño de poro de 0,45 μ m durante 90 minutos con una corriente de 1,3 mA/cm² mediante el método de transferencia electroforética semi-seca.

Después de visualizar las proteínas transferidas mediante la tinción con rojo Ponceau S, se saturó la membrana durante toda la noche a 4°C en PBS con BSA al 3% y Tween-20 al 0,2%, con objeto de bloquear uniones inespecíficas.

Las membranas se incubaron entonces durante 2 horas a temperatura ambiente con los distintos anticuerpos específicos diluidos en PBS con Tween-20 al 0,05% (PBST) y BSA al 1%. Las membranas se lavaron tres veces en PBST y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con segundos anticuerpos unidos a peroxidasa diluidos 1:50.000 en PBST con BSA al 1%. Finalmente, se empleó un método quimioluminiscente para el revelado, en el cual la peroxidasa cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de H₂O₂ ("ECL" de Amersham).

La cuantificación de las bandas se realizó mediante densitometría (densitómetro GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio-Rad).

7.4 Anticuerpos

6E10. 6E10 es un anticuerpo monoclonal purificado de ratón (Signet) que reconoce los residuos 1-17 de la secuencia de A β humano. Se ha utilizado para inmunomarcado después de electroforesis a una concentración final de 5 μ g/ml.

Anti- α -tubulina: Anti- α -tubulina (clon B-5-1-2) es un anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma) que reconoce un epítipo C-terminal de la isoforma α de la tubulina. Se utilizó para inmunomarcado después de electroforesis a una concentración final de 1:10.000.

Anti-ratón acoplado a biotina. Anticuerpo purificado, generado en caballo; se obtuvo de Vector Laboratories.

8. Análisis de la expresión del transgén en los distintos tejidos

8.1 Aislamiento del ARN total

Las muestras de los distintos tejidos de los ratones se homogenizaron mediante ruptura mecánica y se extrajo el ARN total con el kit comercial "High Pure RNA isolation" (Roche diagnostic 1 828 665) siguiendo el protocolo

ES 2 316 209 A1

indicado por el fabricante. La valoración de la cantidad de ARN obtenida se realizó en el aparato Nanodrop (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer).

8.2 Paso de ARN a ADN por retrotranscripción

La retrotranscripción se llevó a cabo con el kit “High Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystem), para cada muestra de 1 μ g de ARN se usaron 4 unidades de la transcriptasa reversa “MultiScribe Reverse Transcriptasa”, deoxynucleótidos (dNTP), tampón específico y, como indicadores, se usaron hexámeros al azar, en las condiciones indicadas por el fabricante, en un volumen final de 100 μ l. Los tubos con la mezcla de reacción se sometieron a los siguientes ciclos de temperatura en el termociclador GeneAmp PCR system 2400 o 9600 (Perkin-Elmer):

- Preincubación a 25°C durante 10 minutos
- Incubación a 37°C durante 120 minutos.

8.3 PCR cuantitativa en placas de 384 pocillos

La realización de la PCR cuantitativa se llevo a cabo para todas las muestras de tejido preparadas, las cuales, se ensayaron todas por triplicado, para lo cual se usaron 5 μ l del ADNc, equivalente a 50 ng de ARN original, utilizando las condiciones universales descritas por *Applied Biosystem* utilizando la *Taqman Universal PCR Master Mix, no. AmpErase Ung* (Applied Biosystem). Las sondas utilizadas fueron: el gen APP humano, ensayo onDemand hAPP Hs00169098m_1; el gen APP murino, ensayo onDemand mAPP Mn00431827_ml; y el gen de control interno (*houseKeeping*) *gapdh*, ensayo onDemand Mn99999915_g1.

Las placas con la muestra y la mezcla de reacción se sometieron a los ciclos de temperaturas especificados por el fabricante, con el sistema ABI PRISM 7900HT Sequence Detectio System (Applied Biosystem) que nos permitió analizar a tiempo real las muestras. Los datos obtenidos se analizaron con el programa SDS 2.1 ABI PRISM (Applied Biosystem).

9. Observación a microscopía óptica: Detección de placas amiloides

Antes de la obtención de las muestras para estudios histológicos, a los ratones se les sometió una perfusión y, posteriormente se produjo la disección del animal y la extracción del encéfalo.

La tinción de Rojo Congo se realizó con el kit Kit Accustain amyloid satin (Congo Red, Sigma diagnostic) usando el protocolo recomendado por el fabricante. Se puede observar la tinción de amiloide en color rojo o rojo rosado, los núcleos en azul y las fibras elásticas en rojo más claro. Cuando las muestras se examinan con birrefringencia verde-amarillo.

Resultados

La generación de un ratón transgénico, que exprese de forma endógena el gen APP humano, se ha desarrollado a través de las siguientes etapas: en primer lugar, realizando un estudio informático del YAC b142f9 y sus regiones colindantes, después, procediendo a la eliminación de las secuencias desconocidas o correspondientes a otros genes, presentes en el YAC obteniendo un YAC modificado y, posteriormente, realizando una transgénesis para conseguir integrar toda la construcción del YAC modificado, asegurándose que aquel se transmite a las siguientes generaciones y, por último, comprobando la expresión del transgén en los tejidos de los ratones y sus niveles.

1. Análisis informático del gen APP y su entorno

El gen de APP humano se encuentra localizado en el cromosoma 21, en la región 21q21.3, flanqueado por el gen CYYR1, en 5', y los genes GABPA y ATP5J, en 3' (Figura 2). La secuencia de toda esta región se obtuvo de la base de datos de ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>), donde, además de las secuencias humanas se encuentran disponibles las de distintos organismos, incluida la del *mus musculus*. La región ortóloga en *mus musculus* del gen APP se encuentra en el cromosoma 16c3.3, flanqueada por los mismos genes que en las humanas (Figura 2), lo que hace suponer, que las secuencias se encuentran bastante conservadas.

Se ha comparado la secuencia del gen APP humana y su entorno, con la del gen murino, mediante una matriz de homología (Figura 3). Al comparar 1 Mb de secuencia de ADN entre ambas especies, utilizando el programa MacVector 7.1 (Accelrys, Burlington, MA, USA), se observa cómo la región que codifica para la zona codificante, al igual que la zona promotora del gen de APP, tiene un alto grado de homología. En cuanto a las regiones colindantes, en la zona 5' del gen de APP se aprecia menor conservación que en la región codificante, pero se mantiene la estructura del genoma, mientras que, en la región 3' del gen, a unas 60 kb del mismo, aparecen una serie de reordenamientos en la murina en relación a la humana. Esta particular estructura del genoma resulta idónea para definir las regiones que se van a utilizar para la modificación del YAC, delimitándolo en 5' hasta una región que corresponde a la secuencia Sec2, y en 3' hasta el comienzo de las regiones codificantes del gen GABPA [Figura 1].

2. Elección de las secuencias de homología para la recombinación y clonaje en los distintos vectores

2.1 Estudio de las regiones repetidas

5 Dos condiciones se consideran importantes a la hora de elegir las secuencias que se utilizan en la recombinación homóloga en levaduras: por una parte, el tamaño, por otra, su condición de única. En lo referente al tamaño de la secuencia a elegir, normalmente se considera conveniente que esté entre 1 y 2 kb. En cuanto a su condición de única, su conveniencia deriva del hecho de que la recombinación se produzca en el lugar deseado. Para localizar las secuencias repetitivas y evitarlas, se utilizó el programa RepeatMasker (A.F.A. Smith & P. Green, no publicado; 10 <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker/>), analizándose una mega base del entorno del gen APP. Sobre esta secuencia, de la que se habían eliminado las secuencias repetitivas, se eligieron regiones de 1 a 2 kb, tanto a 3' como a 5' del gen, para ser donadas mediante PCR y utilizarse para la recombinación homóloga en levaduras (Figura 4).

2.2 Clonaje de las secuencias de recombinación

15 Usando los oligonucleótidos descritos en la sección 2, se realizaron las distintas PCRs del YAC que contiene el gen APP (b142f9) (Figura 4). Mediante estas PCRs se comprobó la extensión del YAC, que se encontraba localizado entre las secuencias 2 y 3, en la región 5' del gen APP y, las secuencias A y B localizadas antes del gen GABPA en la región 3' del gen. Se usó la secuencia 2 para la recombinación homóloga en 5', por ser ésta la secuencia más alejada en 5' del gen APP, localizada en el YAC, que se encuentra a 128.354 kb del lugar de inicio de la transcripción del gen. En la 20 región en 3', se clonó, tanto la secuencia A como la B, al encontrarse a 100 y 80 kb de distancia, respectivamente, del final del gen APP y situarse antes del comienzo del gen GABPA. Para la donación, se realizó la PCR de las secuencias 2, A y B (Figura 5), se purificaron las bandas correspondientes a las secuencias seleccionadas y se donaron en el vector de clonaje PCRII (Invitrogen) para obtener pCRII-Sec2, pCRII-SecA y pCRII-SecB.

2.3 Generación del vector de recombinación pB1R-Sec2

25 Tal como se muestra, esquemáticamente, en la Figura 6, para la generación del plásmido pB1R-Sec2, se partió del plásmido PCRII-Sec2 y de una variante del plásmido pB1R (Lewis, B. C., N. P. Shah, B. S. Braun and C. T. Denny (1992). "Creation of a yeast artificial chromosome fragmentation vector based on lysine-2." *Genet Anal Tech Appl* 9 (3): 86-90). Al plásmido pB1R original se le añadió el gen de selección para Neomicina de forma que este YAC, una vez modificado, pudiese ser utilizado en otros tipos de cultivos si hiciese falta. Mediante la digestión con el enzima *EcoRI*, se extrajo la secuencia 2 del vector de clonaje, el PCRII-Sec2. Usando el enzima Klenow, se enromaron los extremos de este fragmento para su posterior clonaje. El vector pB1R-Neo se linealizó mediante digestión con la 35 enzima *SacI*. Usando la Ligasa T4, se ligó el fragmento Sec2 al vector pB1R-Neo, comprobándose posteriormente mediante digestión enzimática, la correcta orientación de la secuencia en el vector. Dicho vector se linealizó mediante la digestión con los enzimas *Sall* y *SacI*, de forma que pudiese ser utilizado para la 1ª recombinación homóloga en levaduras (Figura 6).

2.4. Generación de los vectores de recombinación pYAC4 3'-SecA y pYAC4 3'-secB

40 La generación de estos dos vectores de recombinación se encuentra esquematizada en la Figura 7 (el clonaje se realizó en paralelo para las dos secuencias). Las secuencias de recombinación se obtuvieron de los plásmidos pCRII-SecA y pCRII-secB. Para la extracción, primero, se digirieron con el enzima *XhoI*, enromando el extremo con el enzima Klenow y, posteriormente, se digirió con *BamHI*, de forma que las secuencias quedaron con un extremo romo y otro cohesivo. El plásmido pYAC4 3' es un derivado del pYAC4 (Burke, D. T., G. F. Carle y M. V. Olson (1992). "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. 1987." *Biotechnology* 24: 172-8, y Burke, D. T. and M. V. Olson (1991). "Preparation of clone libraries in yeast artificial-chromosome vectors." *Methods Enzymol* 194: 251-70), generado en el laboratorio para el estudio de secuencias reguladoras del gen de la Tirosinasa. Mediante digestión, primero con *EcoRI*, enromando de nuevo los extremos y digiriendo, después, con *BamHI*, se eliminó una región que no interesaba y se linealizó el vector, de manera que se le pudieron ligar las 50 secuencias A y B de forma orientada para generar los vectores pYAC4 3'-SecA y pYAC4 3'-SecB.

Sin embargo, para que estos vectores se pudieran utilizar en la segunda recombinación homóloga, era necesaria la presencia de un nuevo marcador auxotrófico. Para ello, se clonó el marcador URA3 del plásmido YDp-U (Alani, E., L. Cao y N. Kleckner (1987). "A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains". *Genetics* 116(4): 541-5), linealizando, primero, los vectores pYAC4 3'-SecA y pYAC4 3'-SecB mediante digestión con *NotI* (usando de nuevo el enzima Klenow para enromar los extremos) y, posteriormente, se obtuvo el gen URA3 del plásmido YDp-U mediante digestión con *BamHI*, enromándose también 60 sus extremos para el correcto clonaje. Usando la Ligasa T4, se clonó el fragmento en el vector. La linealización de los vectores pYAC4 3'-SecA URA3 y pYAC4 3'-SecB URA3 para su conector uso en la 2ª recombinación del YAC se realizó mediante digestión enzimática con *BamHI* y *SpeI* (Figura 7).

3. Recombinación homóloga en la región 5' del YAC

65 El proceso de fragmentación cromosómica se ha utilizado en esta invención para modificar las regiones 5' y 3', que consiste en eliminar dos regiones en los extremos del YAC original, siendo una de ellas, la que contiene el gen GABPA en 3'.

ES 2 316 209 A1

3.1 Recombinación homóloga en el YAC b142f9 en la región 5' del gen APP

Mediante la transformación de las levaduras con el método AcLi, se obtuvieron un total de 40 colonias usando cantidades de ADN que variaban entre 100 y 1.000 ng. Estas 40 colonias fueron analizadas mediante PCR, obteniéndose tres clones como posibles positivos.

Por su parte, la electroporación de levaduras dio como resultado un total de 96 colonias, que también se analizaron mediante la técnica de PCR. De éstas, ninguna mostró un patrón correcto, como posible clon positivo.

3.2 Análisis de los clones resultantes de la recombinación homóloga mediante PCR

El análisis de los clones obtenidos mediante la recombinación homóloga se llevó a cabo mediante el diseño una PCR híbrida caracterizada porque, de los dos oligonucleótidos utilizados, uno se encuentra situado en el plásmido de recombinación (en una región que no se encuentra en el YAC), mientras que el otro oligonucleótido se encuentra localizado en una región adyacente a la región de recombinación del YAC. De esta forma, la PCR sólo pudo amplificar el fragmento cuando la recombinación tuviera lugar en el sitio esperado. Como control positivo, se generó otro vector que contenía ambas regiones. Sólo tres colonias, de las 136 analizadas, las numeradas 13, 14 y b7, resultaron positivas para esta PCR.

El análisis mediante de estos clones se completó mediante el uso de otras tres PCRs, que podían aportar más información sobre los mismos. Las dos primeras PCRs realizadas para comprobar si los clones mantenían parte del gen APP fueron las de los exones 6 y 11, del mismo (Figura 8). La tercera PCR utilizada fue la de una secuencia que se encuentra a 5' de la región de recombinación, que debería salir negativa si la recombinación homóloga ha sido correcta (Figura 8). Los tres clones analizados salieron positivos para las PCRs de los exones 6 y 11 y negativos para la región 5', tal como se muestra en la Figura 8.

3.3 Determinación de la fragmentación del YAC mediante el uso de la electroforesis en campo pulsado

La correcta recombinación homóloga en el YAC debe suponer una disminución en su tamaño, que se puede visualizar comprobando su movilidad electroforética. El genoma de la levadura se puede separar en un gel, usando la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE). Siguiendo esta técnica, se corrieron los tres clones analizados junto al clon original, un clon de la misma cepa de levaduras (que no contiene ningún YAC) y un marcador de pesos moleculares. En la Figura 9, puede verse el gel tras la carrera, teñido con BrEt. Entre los marcadores de 680 y 580 kb puede observarse que en el YAC original, aparece una banda que no se encuentra en el clon de levaduras sin YAC. Esta banda parece mantenerse en los clones 13 y B7, mientras que parece desaparecer en el clon 14.

Posteriormente, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar una hibridación ADN-ADN con una sonda del ADNc del gen APP, y así comprobar con mayor seguridad el cambio en la movilidad electroforética. En la Figura 9, se observa cómo el clon 14 ha sufrido una variación de unas 50 kb en el tamaño del YAC, variación que es la esperada tras una correcta recombinación.

3.4 Análisis de la región de recombinación, mediante la técnica de *Southern blot*

La fragmentación del YAC mediante la recombinación homóloga provoca una serie de modificaciones en la secuencia del ADN en la región de recombinación. Las variaciones, entre la secuencia del clon recombinante y la del clon original, se pueden analizar mediante la técnica *Southern blot*. El patrón de digestión para *BamHI*, *ScaI*, *EcoRV*, *BglIII* y *HindIII* resultó diferente en los dos clones.

Por otra parte, en el *Southern Blot* realizado para el clon original del gen APP y para el clon 14 se obtiene una variación en los tamaños de las bandas (Figura 10), lo que demuestra que la recombinación ha tenido lugar en el sitio exacto de homología y, junto a los resultados obtenidos, tanto en los análisis por PCR como en la electroforesis en campo pulsado, prueban una recombinación exitosa en la región 5' del gen APP y permiten poder usar el clon 14 como base para la siguiente recombinación.

3.5 Análisis de la región codificante del clon 14

Se realizó un *Southern blot* comparativo para asegurarse de que el clon 14 no había sufrido deleciones en la región codificante del gen APP. Con este fin, se digirió el YAC original y el modificado con la enzima de restricción *BamHI*, hibridando posteriormente contra el ADNc del gen APP. Esta hibridación produce una escalera de bandas que corresponden a las distintas regiones codificantes del gen y que debe ser igual tanto para el clon original como para el clon 14. Para obtener el patrón de digestión para el encima *BamHI* de las 300 kb del gen APP, se utilizó el programa MacVector. Después, se procedió a identificar los fragmentos que contenían alguna de las regiones codificantes del gen. En la Figura 11 puede observarse el patrón teórico de este *Southern blot* y su coincidencia con la escalera de bandas obtenida para el clon original b142f9 y el clon recombinante 14. La conservación del patrón de bandas obtenida para el clon original b142f9 y el clon recombinante 14 indica que la región codificante no ha sufrido grandes modificaciones ni reordenamientos tras la recombinación.

4. Recombinación homóloga en la región 3' del YAC

4.1 Recombinación homóloga en YAC del clon 14. Eliminación del gen GABPA

5 La recombinación homóloga en la región 3' del gen APP se realizó sobre el YAC modificado tras la primera recombinación, lo que exigió que se usara el clon 14 para la preparación de las levaduras competentes a utilizar en la transformación. Para esa recombinación se utilizaron dos vectores distintos, el pYAC4 3'-SecA URA3 y el pYAC4 3'-SecB URA3 (Figura 7) que difieren sólo en las secuencias de recombinación. Dichas secuencias se encuentran separadas entre sí por 20 kb y distan del final del gen en más de 80 kb (Figura 4). Mediante el uso de estas secuencias de recombinación se eliminaron de 40 a 60 kb del YAC, incluyendo el gen GABPA (Figura 12).

15 Dada la diferente eficiencia en la transformación de los métodos AcLi y de electroporación, claramente a favor del primero (ver sección 3.1 del apartado anterior), se decidió usar éste para realizar la segunda transformación. A diferencia de la primera recombinación, para ésta fue necesario analizar 2.317 colonias mediante una doble PCR, una primera, realizada sobre el exon 6 del gen APP que debería dar un resultado positivo y, una segunda, realizada sobre el gen GABPA que debería dar un resultado negativo, lo que indicaría que se había eliminado la secuencia correspondiente a dicho gen.

20 De las 2.317 colonias analizadas, 1.720 correspondían a la secuencia A y 597 a la secuencia B. Tras el análisis mediante PCR de las distintas colonias, 90 de las 1720 y, sólo 5 de las 597, pasaron a ser analizadas por PFGE y Southern blot. El estudio de estos clones mediante PFGE y Southern blot reveló que la recombinación homóloga llevada a cabo con la secuencia A, ocurría probablemente en distintas regiones, lo que producía patrones de recombinación extraños y que, en varios casos, los YACs recombinantes habían sufrido procesos de reordenaciones y fragmentaciones muy superiores a los previstos, generando patrones muy difíciles de explicar.

25 Los cinco clones analizados de la recombinación homóloga usando la secuencia B depararon un clon que cumplía los requisitos necesarios para poder ser utilizado en la generación del ratón transgénico. Las diferentes comprobaciones que se realizaron sobre este clon se describen a continuación.

30 4.2 Análisis mediante la técnica de PCR, de los clones resultantes de la recombinación en 3'

El análisis de las distintas colonias obtenidas por la transformación de las levaduras se realizó mediante una PCR doble. En la Figura 13 se puede observar la PCR doble realizada sobre varios clones, tanto de la recombinación con la secuencia A como los cinco positivos para la secuencia B. Como puede comprobarse los clones b106, b108, b109, b111 y b113 se comportan como candidatos para su estudio posterior. En todos ellos, la PCR del exon 6 del gen APP resultó positiva, lo que indica que los clones mantienen el YAC con el gen APP y, por el contrario, la PCR del gen GABPA resultó negativa, lo que sugiere que estos clones han podido perder las secuencias del gen GABPA. De estos cinco clones, como se demostrara más adelante, sólo el clon b106 demostró un patrón correcto en la recombinación homóloga.

40 Para completar el estudio del clon b106 mediante PCR, se realizaron PCRs de dos regiones que se encontraban entre la secuencia B y el gen GABPA: las secuencias A y A'. En este estudio se repitieron las PCR del gen GABPA y el exon 6 y se incluyó también la del exon 11 del gen APP. Como se puede ver en la Figura 14, ninguna de las PCRs que se encuentran en una localización 3' con respecto a la región de recombinación resultó positiva, indicando la ausencia de esas secuencias en el clon b106. Las PCRs de los dos exones no se muestran tan nítidas como en el caso del control positivo, pero se han repetido en varias ocasiones obteniéndose siempre el mismo resultado positivo.

4.3 Determinación del cambio en la movilidad electroforética del YAC mediante PFGE

50 Al igual que ocurrió tras la primera recombinación homóloga, tras ésta segunda recombinación, la movilidad electroforética del YAC va a cambiarse también, teniendo el YAC resultante un tamaño final de 520 kb, es decir, 40 kb menos que el YAC que contiene el clon 14. En la Figura 15 se puede observar el gel de agarosa al 1%, en el que se han corrido los distintos clones: el marcador de peso molecular, el clon b142f9 original, el clon 14 y el clon b106. Dicho gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, y se hibridó con el ADNc del gen APP, consiguiendo visualizar el YAC en los distintos carriles y apreciándose sin ninguna dificultad la variación del tamaño del YAC en el clon b106, con referencia al YAC original y al clon 14.

4.4 Hibridación del YAC del clon b106 contra el ADNc del gen GABPA

60 La hibridación del YAC b106 contra el ADNc del gen GABPA sirvió para comprobar que en dicho YAC se había eliminado la región codificante del gen GABPA.

En la Figura 15 se presenta el gel de agarosa de campo pulsante utilizado en la sección anterior al que se han añadido otros carriles en los que se han cargado las mismas muestras que en los anteriores. Esta vez, se hibridó la mitad del gel, con una sonda del ADNc del gen APP y, la otra con la sonda del ADNc del gen GABPA. Como se puede apreciar en dicha figura, el YAC que contiene al gen APP del clon b106, no hibrida para las secuencias del gen GABPA, mientras que los YACs de la levadura original, y el del clon 14, poseen en el mismo YAC ambos genes.

ES 2 316 209 A1

4.5 Análisis de la región de recombinación en 3', mediante la técnica de *Southern blot*

La correcta integración del vector de recombinación en el YAC se comprobó mediante la técnica de *Southern blot*. Este patrón, que se esquematiza en la Figura 16, lo compartían el YAC original y el clon 14, mientras que el clon b106 presentaba un patrón de bandas distinto pero acorde con el esquema esperado. En la hibridación del gel se puede ver como la banda correspondiente al YAC b106 es de diferente tamaño a las de los clones anteriores, lo que muestra claramente las diferencias existentes en la secuencia entre los distintos clones en la región donde híbrida la sonda, que se encuentra localizada en las inmediaciones de la secuencia de recombinación pero a 5' de ésta (Figura 16).

4.6 Análisis de la región codificante del clon b106

Como última prueba para poder validar el clon b 106, se realizó un *Southern blot* comparativo. Si el YAC del clon b106 sólo hubiera sufrido modificaciones en la región 3' del YAC pero no en la región codificante, los tres YACs (el original, el del clon 14 y el del clon b106) deberían presentar la misma escalera de bandas que se describió en la Figura 11. Si se observa la Figura 17, que muestra el *Southern blot* realizado, se puede apreciar que, efectivamente, el patrón de bandas de los tres clones es idéntico y que es, aparentemente, diferente del mostrado en Figura 11. Sin embargo, en realidad, estas diferencias son debidas simplemente a que, en el último gel se obtuvo una mejor resolución, mediante la utilización de un ADN más limpio y a una concentración mayor. Si se observa el patrón de bandas del gel de la Figura 17 se aprecian mejor algunas bandas dobles y triples del esquema.

Lo que interesaba del clon b106 era, no obstante, el YAC que contiene el gen APP. Para nombrar a este YAC, se ha utilizado la misma nomenclatura que para el clon, denominándolo YAC b106.

5. Purificación del YAC B106

En este proceso se realizaron tres extracciones consecutivas de ADN. Tal como puede verse en la Figura 18, que muestra una de las tres purificaciones realizadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2 de Material y Métodos, se utilizaron los bordes del gel, teñidos con BrEt, para determinar la localización del YAC b106, y se extrajo éste del trozo de gel que no se había teñido. Tiñendo el resto del gel después de la extracción, se pudo comprobar que se había cogido toda la banda del YAC b 106 (Figura 18).

Las tres extracciones de ADN se midieron mediante tres técnicas distintas. En primer lugar mediante valoración en un gel de agarosa y la comparación con cantidades conocidas de un YAC de referencia. Seguidamente, los resultados obtenidos se corroboraron mediante el uso del fluorímetro y del nanodrop. Así, las concentraciones que se obtuvieron, para las extracciones I, II y III fueron 4, 7,1 y 10 ng/μl, respectivamente.

6. Transgénesis mediada por la inyección intracitoplasmática de espermatozoides incubados con el YAC b106

Para la realización de la transgénesis, se realizaron diferentes sesiones de microinyección obteniéndose un total de 102 animales nacidos tras finalizar el proceso. La cepa de ratón donante de los oocitos utilizados en la transgénesis fue una cepa mixta, entre CD1 y C57BL/6J, con la que se obtienen mayores eficiencias que usando cepas puras. Los espermatozoides utilizados provienen de la cepa C57BL/6J de forma que los ratones fundadores al nacer van a tener un 75% de fondo genético C57BL/6J.

7. Análisis de los ratones fundadores

El análisis de los 102 ratones obtenidos tras la inyección citoplasmática se realizó usando la técnica de PCR. Como una de las posibles formas de comprobar de forma fehaciente la inserción de las 520 Kb del trasgén, se procedió a hacer un barrido por todas las regiones del YAC. A este efecto se diseñaron las siguientes PCRs: diecisiete de los exones del gen APP, una de ellas conteniendo tanto el exon 12 como el 13, dos de los dos brazos del YAC, (tanto para el gen de selección del gen *LYS2* como el de *TRP1*), y otras cuatro de secuencias que se encuentran entre las regiones codificantes y los brazos del YAC (Figura 19).

Se realizaron las 23 PCRs de los 102 ratones obtenidos (Figura 20). En 17 de ellos, se obtuvo cierto grado de transgénesis, lo que implica que han integrado total o parcialmente ADN exógeno del YAC. Esta integración de ADN podía ser parcial, como ocurrió en quince de los casos, pero resultó total en dos de ellos, el ratón 35 y la ratona 64, que se constituyeron en los primeros ratones transgénicos obtenidos en esta investigación con el YAC b106, cumpliendo con ello uno de sus principales objetivos.

8. Transmisión del trasgén en la Primera Generación Filiar (F1)

Contrastada mediante PCR la generación de dos ratones transgénicos fundadores, el "35" y la "64", se procedió a cruzarlos con ratones C57BL/6J, para comprobar la transmisión del trasgén a sus descendientes y analizar la expresión del mismo en ellos. Para el estudio de la transmisión del YAC b106, se realizaron cuatro PCRs a los descendientes, las dos de los brazos del YAC, a saber, genes *LYS2* y *TRP1*, y las de los exones 6 y 11 del gen APP. De esta forma se pudo comprobar que se transmitía el YAC completo y que no se había producido, por tanto, una integración fraccionada del YAC. Para los descendientes del ratón 35 se han analizado hasta la redacción de esta memoria 41 ratones de la F1; identificándose 18 ratones transgénicos, lo que implica una transmisión al 44% de las crías. En el caso de la ratona

64 se analizaron 32 crías de la F1, obteniéndose 18 ratones transgénicos en sus descendientes, lo que implica una transmisión del 56%. En definitiva, en los dos casos, el índice de transmisión del transgén a la primera generación de descendientes de los fundadores se sitúa en torno al 50%, acorde con lo esperado siguiendo los patrones mendelianos. En la Figura 21 se representa una PCR ilustrativa de varias crías del ratón 35.

5

9. Conservación de la estructura del YAC b106 en los ratones transgénicos

Se completó el estudio genómico de los ratones transgénicos obtenidos por cruzamiento de los fundadores, mediante la verificación de la estructura de la región codificante del gen APP en el YAC b106, para lo cual se realizó un *Southern blot* comparativo de los descendientes de los dos ratones fundadores.

10

La Figura 22 muestra el patrón de bandas obtenido en la F1, o primera generación de descendientes de los ratones fundadores 35 y 64, correspondientes a dos hermanos de camada para cada fundador, uno de ellos transgénico y, el otro, no. Se puede observar cómo el patrón es el mismo que se obtenía en la Figura 11, lo que indica la conservación de la estructura del transgén en el genoma de ratón.

15

10. Análisis de la expresión del gen APP humano en las líneas de ratones transgénicos

Una vez comprobada la transmisión del gen APP humano en las líneas transgénicas 35 y 64, fue necesario caracterizar los niveles de expresión, tanto de ARN como de proteína en los distintos tejidos del ratón. Para este análisis se usaron ratones correspondientes a la primera generación de la línea 35, utilizando un total de cuatro ratones machos con una edad de dos meses, comparándolos con sus hermanos de camada. El estudio se centró, fundamentalmente, en el sistema nervioso, central y periférico, al ser en estos los tejidos donde se produce una mayor expresión de la proteína APP. También se estudió la expresión en diferentes órganos del cuerpo del ratón, analizándose en conjunto los siguientes: cerebro, subdividido en cuatro regiones que se denominaron corteza, ventrículos, cerebelo y mesencéfalo (que correspondían enteramente a sus contenidos anatómicos); médula espinal; hígado; pulmón; páncreas; bazo; intestino delgado; músculo; testículos; sangre; corazón y riñón.

25

10.1. Análisis de la expresión del ARN mensajero del gen APP

30

El primer paso para la comprobación de la correcta expresión del gen APP humano en la línea transgénica 35 consistió en la constatación, mediante RT-PCR, de la transcripción del gen APP humano en los distintos tejidos del ratón. Para ello se extrajo el ARN mensajero de los distintos tejidos del ratón y se midió el nivel de transcripción del ARN, mediante RT-PCR a tiempo real, usando una sonda *Taqman* dirigida al gen APP humano. Como control interno de este experimento, se utilizó el gen GAPDH murino. Para completar el estudio se midieron, también, los niveles de ARN del gen APP murino, de forma que se pueden comparar los niveles de expresión de ambos genes entre los diferentes tejidos una vez normalizados con el GAPDH.

35

En la Figura 23 se representan los niveles de expresión del ARN mensajero del gen APP humano obtenidos en los distintos tejidos analizados. La representación de los niveles de expresión se da en unidades relativas logarítmicas, habiéndose normalizado los datos para el gen *GAPDH*. Se puede observar cómo la detección de la expresión en este gen se da, mayoritariamente, en los tejidos nerviosos; siendo los valores en todos ellos muy similares, excepto en el cerebelo, donde se encuentran algo disminuidos. En cuanto al resto de tejidos estudiados, sólo se alcanzan niveles detectables de expresión en testículos, sangre, corazón y riñón, aunque, en cualquier caso, se encuentran un orden de magnitud por debajo de los detectados en el sistema nervioso.

45

En la Figura 24 se representa la expresión de ARN mensajero del gen APP, tanto del gen humano como del murino, para los ratones transgénicos, y para sus hermanos de camada. Al igual que en la gráfica anterior, los datos se normalizaron con el gen *GAPDH* murino. Los resultados que se muestran denotan un mayor nivel de expresión del gen en el tejido nervioso, reduciéndose en el cerebelo. En cuanto al resto de órganos analizados, demuestran expresión en tejidos como pulmón, testículos, sangre, corazón y riñón, mientras que en tejidos como hígado, páncreas, intestino, bazo y músculo los niveles son mucho más bajos y con una variación muy importante.

50

10.2 Análisis del nivel de proteína

55

La expresión de la proteína APP humana en el ratón supone la constatación de la correcta transcripción y traducción del YAC b106 en el ratón. El estudio de los niveles de proteína se llevó a cabo mediante la técnica de inmunomarcado después de electroforesis en geles de poliacrilamida (*Western blot*). Para este estudio, se utilizó un anticuerpo que reconoce la proteína APP, pero que no es capaz de distinguir entre la forma humana y murina, [Lamb, B. T., *et al.* (1997). "Altered metabolism of familial Alzheimer's disease-linked amyloid precursor protein variants in yeast artificial chromosome transgenic mice". *Hum Mol Genet* 6(9): 1535-41.; Lehman, E. J., *et al.* (2003). "Genetic background regulates beta-amyloid precursor protein processing and beta-amyloid deposition in the mouse". *Hum Mol Genet* 12(22): 2949-56] por lo que se deben normalizar los resultados con actina para así poder comparar los niveles de expresión.

65

Los distintos tejidos del sistema nervioso presentan falta de inmunoreactividad, demostrando los bajos niveles de expresión del gen APP. En la Figura 25, se puede observar un gel representativo tanto para la línea 35 como para un ratón salvaje, la valoración de la expresión, normalizada con actina, se muestra en la gráfica inferior, donde se

ve con claridad como la línea 35 tiene por lo menos dos veces mas cantidad de proteína que los ratones salvajes. Esta proporción, sufre pequeñas variaciones entre las distintas regiones del cerebro analizadas en este estudio pero manteniendo esos niveles.

5 10.3 Estudio histológico de los cerebros de los ratones

Una de las características que debe poseer el ratón de esta invención es una correcta expresión y procesamiento de la proteína APP, mientras que una evidencia de una expresión incorrecta o de un procesamiento erróneo, produciría la acumulación del péptido derivado de esta proteína (el péptido A β) en el cerebro. Para completar el estudio, se procedió a realizar cortes de cerebro de las dos líneas de ratones, con una edad de dos meses. Estos cortes se tiñeron con rojo congo para la detección de amiloide. En ninguna de las dos líneas, al igual que en su hermanos de camada, se detectan acumulaciones de ningún derivado de la proteína APP (Figuras 26 y 27), aunque sí es posible detectar las en ratones transgénicos (Tg 2576) control de un año de edad.

15 *Discusión*

1. Construcción del YAC b106 mediante recombinación homóloga de levaduras

En el diseño del ratón transgénico que permite la investigación de la enfermedad de Alzheimer y que ha sido desarrollado en esta investigación, sólo se disponía del YAC b142f9, un cromosoma artificial con más de 600 kb de tamaño, del que se sabía que contenía el gen APP pero del que se ignoraba si contenía además otros genes, que pudieran, en su caso, introducir perturbaciones en su utilización posterior. La publicación de la secuencia del genoma humano y la de otros estudios específicos realizados sobre el YAC b142f9 permitieron evidenciar, que el gen APP no se encontraba sólo en el citado YAC, sino que estaba acompañado por el gen GABPA. De ahí surge la necesidad de modificar el YAC b142f9 en sus regiones 5' y 3', eliminando el referido gen GABPA pero respetando, todas las regiones codificantes y reguladoras del gen APP descritas hasta la fecha. Esto se convirtió en el primer objetivo de esta investigación de cara a poder utilizar el YAC así modificado en la generación de un ratón transgénico susceptible de servir de modelo a investigaciones sobre la enfermedad de Alzheimer.

La recombinación homóloga realizada en 5' supuso la eliminación de 40 kb del YAC (Figura 12 y Figura 9). No obstante, después de esta eliminación, se conservaban todavía 120 kb en la región 5' del gen APP, lo que debería ser suficiente para permitir una correcta expresión del mismo de acuerdo con el estado actual de las investigaciones. En efecto, aunque hasta la fecha, sólo se han descrito elementos reguladores del gen APP, en el promotor proximal del gen, la existencia de otros elementos reguladores más alejados se considera indudable. De ahí que, para conseguir una correcta expresión espacio temporal del gen, la recombinación se haya llevado a cabo permitiendo la presencia de los elementos evolutivamente conservados [tras el análisis de la secuencia mediante genómica comparativa con la del gen de ratón (Figura 3)]. Por esta razón en la presente investigación se ha conservado suficiente espacio en sus bordes para garantizarlo.

Tras delimitar, mediante recombinación homóloga en el YAC, la región 5', se procedió a realizar la segunda ronda de recombinación, en la que mediante la fragmentación cromosómica, se trataba de proceder a la eliminación directa del gen GABPA. Su eliminación es fundamental, si se pretende usar este YAC en la generación de un modelo animal, ya que el gen GABPA codifica para un factor de transcripción cuya expresión en el ratón transgénico podría influir de una forma todavía desconocida en el correcto desarrollo del ratón, que puede interferir en el estudio del fenotipo del transgénico, haciendo imposible asegurar cual de los genes es el responsable de dicho fenotipo.

La recombinación homóloga en la región 3' del gen APP resultó mucho más complicada que la realizada en 5' debido posiblemente a la presencia de estructuras secundarias del ADN en la región 3' que hayan hecho el acceso mas complicado a las secuencias de recombinación.

Al igual que en el caso de la primera recombinación, se diseñaron una serie de experimentos para comprobar, de forma fehaciente, la correcta recombinación homóloga y la eliminación del gen GABPA. La primera selección de colonias se realizó mediante una PCR doble. Este método permitió discriminar entre los cientos de colonias obtenidas y reducir en un orden de magnitud este número. Aunque, aparentemente, las colonias que no presentaban el gen GABPA pero sí el exon 6 deberían considerarse adecuadas, análisis posteriores, mediante PFGE, demostraban que esto no era siempre así.

En este sentido, el análisis mediante PFGE y la posterior hibridación de los filtros con el ADNc del gen APP y el del gen GABPA resultó ser el análisis más contundente y fiable de todos. Porque, efectivamente, el cambio en la movilidad electroforética del YAC b106 sólo podía ser debido a una fragmentación del YAC del clon 14. Además, la hibridación con el ADNc del gen GABPA permitió reconocer todas las regiones codificantes del gen, mientras que la PCR sólo estaba dirigida a uno de los exones. La comprobación mediante la hibridación de la desaparición de las secuencias codificantes para el gen GABPA del YAC b106 suponían, junto al cambio de movilidad electroforética esperado, la confirmación de que esa colonia había sufrido la recombinación planificada. No obstante, la comprobación mediante **Southern blot** y diferentes PCRs sirvieron para completar el estudio y, de esta forma, poder pasar al proceso de generación del ratón transgénico.

2. Generación de ratones transgénicos mediante ICSI

La obtención de ratones transgénicos con el YAC b106 de 520 kb se realizó mediante ICSI, siguiendo procedimientos descritos en la solicitud de patente WO2005/098010 y en Moreira, 2003 y 2004 (citado *supra*). De 102 ratones nacidos analizados se obtuvieron un total de 17 ratones transgénicos, es decir, portadores de algún fragmento de ADN del YAC b106.

La comprobación de la integración completa de la construcción de 520 kb requirió un análisis meticuloso a lo largo de toda la secuencia, para lo cual se realizaron 23 PCRs a cada ratón a lo largo de todo el YAC. La batería de PCRs diseñada para la comprobación de la integración completa del YAC (Figura 19) resultó positiva sólo para los ratones 35 y 64, lo que identificaba a estos ratones como los dos posibles fundadores del nuevo modelo animal.

La presencia del transgén en los ratones fundadores no garantiza, sin embargo, su presencia en la línea germinal, condición imprescindible para su utilización posterior, por lo que debía comprobarse su transmisión a las siguientes generaciones. Para comprobarlo se cruzaron los clones con ratones C57BL/6J y se analizaron mediante PCR todas las camadas producidas por las dos líneas de transgénicos (Figura 21), obteniéndose una transmisión en la primera generación o F1 del 50%, aproximadamente (sección 8 de los Resultados). La comprobación de la transmisión del transgén en la línea germinal (Figura 21) así como la expresión del mismo (Figura 23) demostraron que la batería de PCRs diseñada para la comprobación de la integración del YAC había sido una estrategia adecuada.

3. Expresión del gen APP humano en el ratón

El primer paso para la caracterización de la expresión del gen APP humano en el ratón se realizó mediante el análisis de la expresión de ARN del gen. Para ello se utilizó una técnica de PCR cuantitativa en placa para poder comparar los niveles entre los distintos tejidos. De acuerdo con las referencias existentes, la expresión de este gen se da en numerosos tejidos pero es en cerebro donde estos niveles son mayores. Y, en efecto, como puede comprobarse en la Figura 23, los niveles de expresión de la línea 35 muestran los valores más altos en el cerebro en las distintas regiones que se han analizado. Es de destacar el alto índice de expresión del gen, que se registra en la médula espinal, dato que no debe sorprender ya que está compuesta por tejidos nerviosos, lugar donde se encuentran las líneas celulares productoras de esta proteína. Los resultados de esta investigación en lo referente a la expresión del gen APP humano en ratones son, por tanto, plenamente concordantes con los descritos anteriormente para ratones similares, en los que es en el cerebro, donde encuentran los mayores niveles de expresión del ARN.

La expresión en los distintos órganos del gen APP humano resulta en gran medida similar a la del gen APP murino (Figura 24), conservándose el patrón de expresión en los tejidos nerviosos, así como en corazón, sangre, testículos y riñón. Sin embargo, se detecta la expresión del gen APP murino en hígado, pulmón, páncreas, intestino y músculo, aunque con valores muy inferiores a los otros órganos (un orden de magnitud más bajo), salvo en el caso de pulmón donde aparece una expresión similar a la de corazón, sangre, testículos y riñón, algo que no ocurría con el gen APP humano, cuya expresión no se detectaba en esos órganos, tal como ya se ha puesto de relieve.

Una vez comprobada la expresión del gen en los distintos tejidos del ratón, había que confirmar la traducción de dicho ARN a proteína. Para ese estudio, se realizó un análisis, mediante *western blot*, de la cantidad de proteína presente en los distintos tejidos que habían sido analizados mediante la RT-PCR. En un principio, se abordó el estudio utilizando el anticuerpo 6E10, específico de la proteína humana, pero dicha especificidad no se logró reproducir en los experimentos de esta investigación, por lo que se optó por usar el anticuerpo 22C11, que reconoce ambas proteínas, la humana y la murina y así poder valorar la cantidad total de proteína.

La alta expresión de la proteína en los tejidos nerviosos hizo que su identificación y valoración en ellos resultase posible, mientras que, en los demás tejidos, con registros de niveles de proteína muy bajos, fuera imposible su valoración (Figura 25). Tras la valoración de los niveles de proteína en los tejidos nerviosos y su normalización con los valores de actina, se comparó el nivel de proteína entre los ratones transgénicos y sus hermanos no transgénicos de carnada, obteniéndose que en los primeros, se encontraban valores elevados entre dos y dos veces y media con relación a los de la proteína endógena, dependiendo del tejido concreto. Así, en corteza, ventrículos y médula espinal, los valores de proteína se situaban un poco por encima de dos veces respecto de la endógena, mientras que en mesencéfalo y cerebelo la proporción aumentaba, llegando a las dos veces y media. Hay que tener en cuenta que en los ratones transgénicos se está detectando tanto la proteína humana como la murina, por lo que una expresión de dos veces de proteína APP total supone que se está expresando la misma cantidad de la proteína humana y la murina. Estas diferencias de expresión entre los dos genes es ligeramente superior a descripciones anteriores, que registran niveles de expresión entre 1,7 y 2 veces la del gen endógeno, medidos solamente en la región de corteza, diferencia que puede ser debida a las cepa de ratón utilizada, cuya genética puede influir, tanto en los niveles como en el procesamiento la misma.

Finalmente, se realizó un estudio preliminar de los cerebros de los ratones, tratando de detectar alguna de las neuropatologías típicas de la enfermedad. Por el momento, en estos estudios preliminares, en ratones de dos meses de edad, no se ha encontrado señal de depósitos del péptido amiloide, lo que concuerda con estudios previos en ratones con estas características.

ES 2 316 209 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Un polinucleótido aislado constituido por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.642.665 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26067221:1) [SEC ID N°: 74], o un fragmento de dicho polinucleótido que comprende el gen APP humano (hAPP) completo junto con sus secuencias reguladoras.

10 2. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que dicho gen hAPP completo junto con sus secuencias reguladoras está comprendido entre el nucleótido 26.174.733 y el nucleótido 26.464.809 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26174733:26464809:1) [SEC ID N°: 75].

15 3. Polinucleótido según la reivindicación 1, constituido por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.573.344 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21: 26064934:26573344:1) [SEC ID N°: 76].

20 4. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que dicho gen APPh está flanqueado en su extremo 5' (en relación al origen y la dirección de la transcripción del gen APP) por una primera secuencia de nucleótidos y en su extremo 3' (en relación al final y la dirección de la transcripción del gen APP) por una segunda secuencia de nucleótidos, en donde:

- dicha primera secuencia de nucleótidos está constituida por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.464.810 y el nucleótido 26.642.665 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26464810:26642665:1) [SEC ID N°: 77], o un fragmento de la misma que comprende, al menos, una secuencia única, y
- dicha segunda secuencia de nucleótidos está constituida por la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.174.732 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26174732:1) [SEC ID N°: 78], o un fragmento de la misma que comprende, al menos, una secuencia única.

30 5. Polinucleótido según la reivindicación 4, en donde:

- dicha primera secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.464.810 y el nucleótido 26.573.344 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26464810:26573344:1) [SEC ID N°: 79], o un fragmento del mismo que comprende, al menos, una secuencia única, y
- dicha segunda secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.174.732 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26174732:1) [SEC ID N°: 78], o un fragmento del mismo que comprende, al menos, una secuencia única.

40 6. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en donde dicha primera secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.571.876 y el nucleótido 26.573.344 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26571876:26573344:1) [SEC ID N°: 80].

45 7. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en donde dicha segunda secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre el nucleótido 26.064.934 y el nucleótido 26.067.221 del cromosoma 21 humano (NCBI35:21:26064934:26067221:1) [SEC ID N°: 81].

8. Un vector que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

50 9. Vector según la reivindicación 8, seleccionado del grupo formado por un YAC (yeast artificial chromosome), un BAC (bacterial artificial chromosome) o un PAC (PI-derived artificial chromosome).

10. Vector según la reivindicación 8, en el que dicho polinucleótido está flanqueado en uno de sus extremos por una tercera secuencia de nucleótidos y en el otro extremo opuesto por una cuarta secuencia de nucleótidos, en donde:

- dicha tercera secuencia de nucleótidos comprende (i) un telómero funcional en células de levadura y, al menos, (ii) un marcador de selección por auxotrofia, y
- dicha cuarta secuencia de nucleótidos comprende (i) un centrómero funcional en células de levadura, un telómero funcional en células de levadura y, al menos, un marcador de selección por auxotrofia.

60 11. Vector según la reivindicación 10, en donde dicho marcador de selección por auxotrofia se selecciona del grupo comprendido entre *TRP1*, *LEU2*, *LYS2*, *HIS3*, *HIS5*, *TRP1*, *URA3*.

65 12. Una célula que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un vector según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

ES 2 316 209 A1

13. Un animal no-humano transgénico que contiene, insertado en su genoma, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

5 14. Animal transgénico según la reivindicación 13, donde dicho animal es un mamífero, preferiblemente, un roedor, más preferiblemente un ratón o una rata.

15. Animal transgénico según la reivindicación 13 ó 14, cuyo genoma contiene, además, uno o más marcadores moleculares de la enfermedad de Alzheimer.

10 16. Animal transgénico según la reivindicación 15, donde dichos marcadores moleculares de la enfermedad de Alzheimer se seleccionan del grupo comprendido entre los genes *PS1*, *PS2*, y el alelo epsilon4 ($\epsilon 4$) del gen *APOE*.

15 17. Empleo de un animal no-humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, como modelo animal para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer, tanto la Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE) como la Enfermedad de Alzheimer familiar (EAF).

20 18. Empleo de un animal no-humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, como modelo de la enfermedad de Alzheimer para el estudio de la etiología de la enfermedad, las causas, los factores desencadenantes, las agresiones o insultos medioambientales y/o fisiopatológicos que conducen al establecimiento de la enfermedad.

19. Empleo de un animal no-humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, para la búsqueda, descubrimiento, identificación, evaluación y validación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

25 20. Empleo de un animal no-humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, para la obtención de un animal no-humano transgénico que sólo expresa el gen hAPP.

30 21. Un procedimiento para identificar un compuesto potencialmente útil para el tratamiento y/o prevención de la Enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de:

a) administrar a un animal no-humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 un compuesto candidato;

35 b) determinar el patrón de expresión del gen hAPP y/o la producción de la proteína hAPP y/o la producción del péptido (β -amiloide ($A\beta$) en dicho animal no-humano transgénico de la etapa (a), y

40 c) seleccionar el compuesto candidato que produce (i) una disminución en los niveles de expresión del gen hAPP en tejido nervioso, (ii) una disminución de la producción y/o acúmulo de la proteína hAPP y/o (iii) una disminución en la producción y/o acúmulo del péptido $A\beta$ en dicho animal no-humano transgénico.

22. La progenie de un animal no-humano transgénico que expresa de forma endógena el gen APP humano con un patrón de expresión similar o equivalente al patrón de expresión de dicho gen en humanos.

45

50

55

60

65

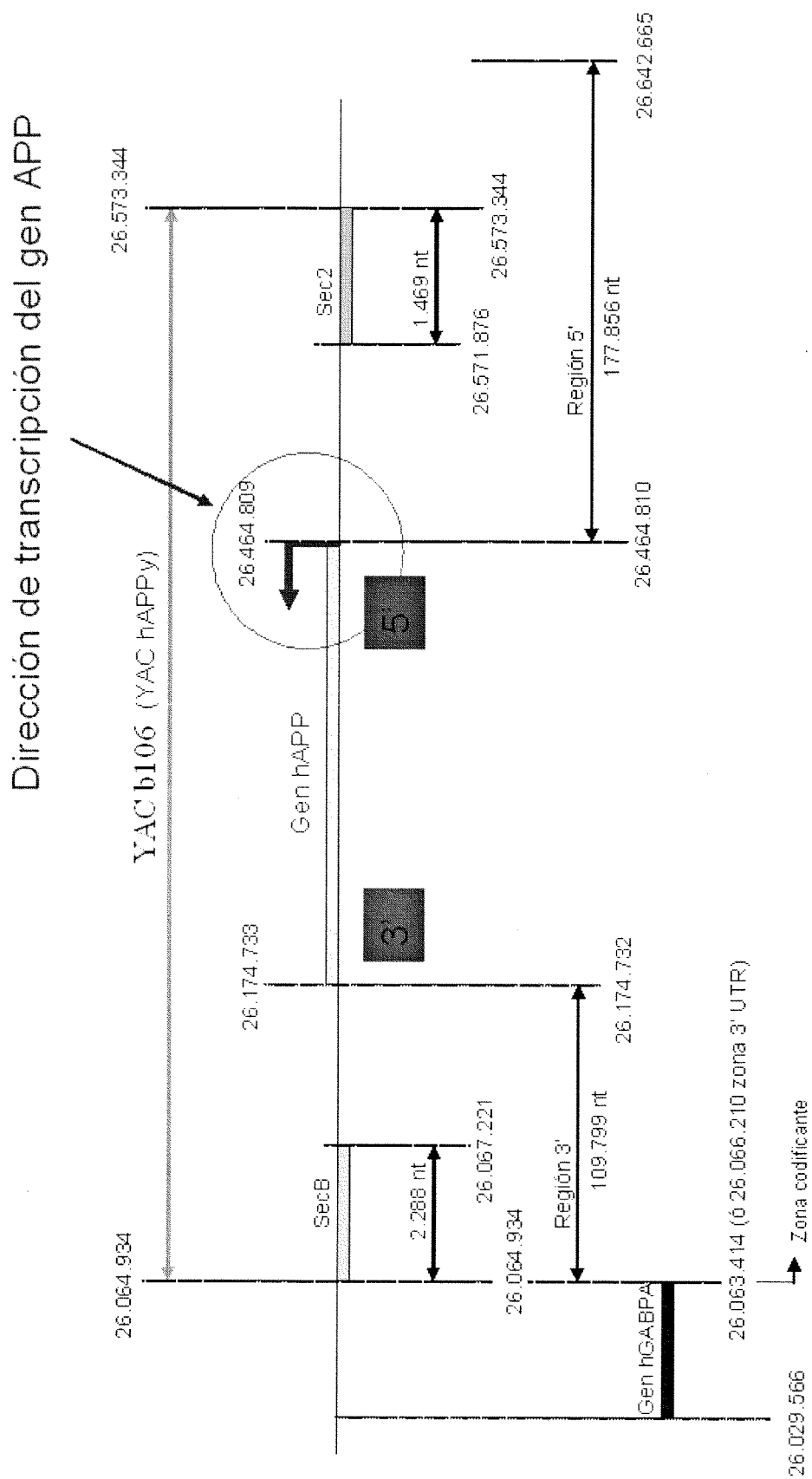


FIGURA I

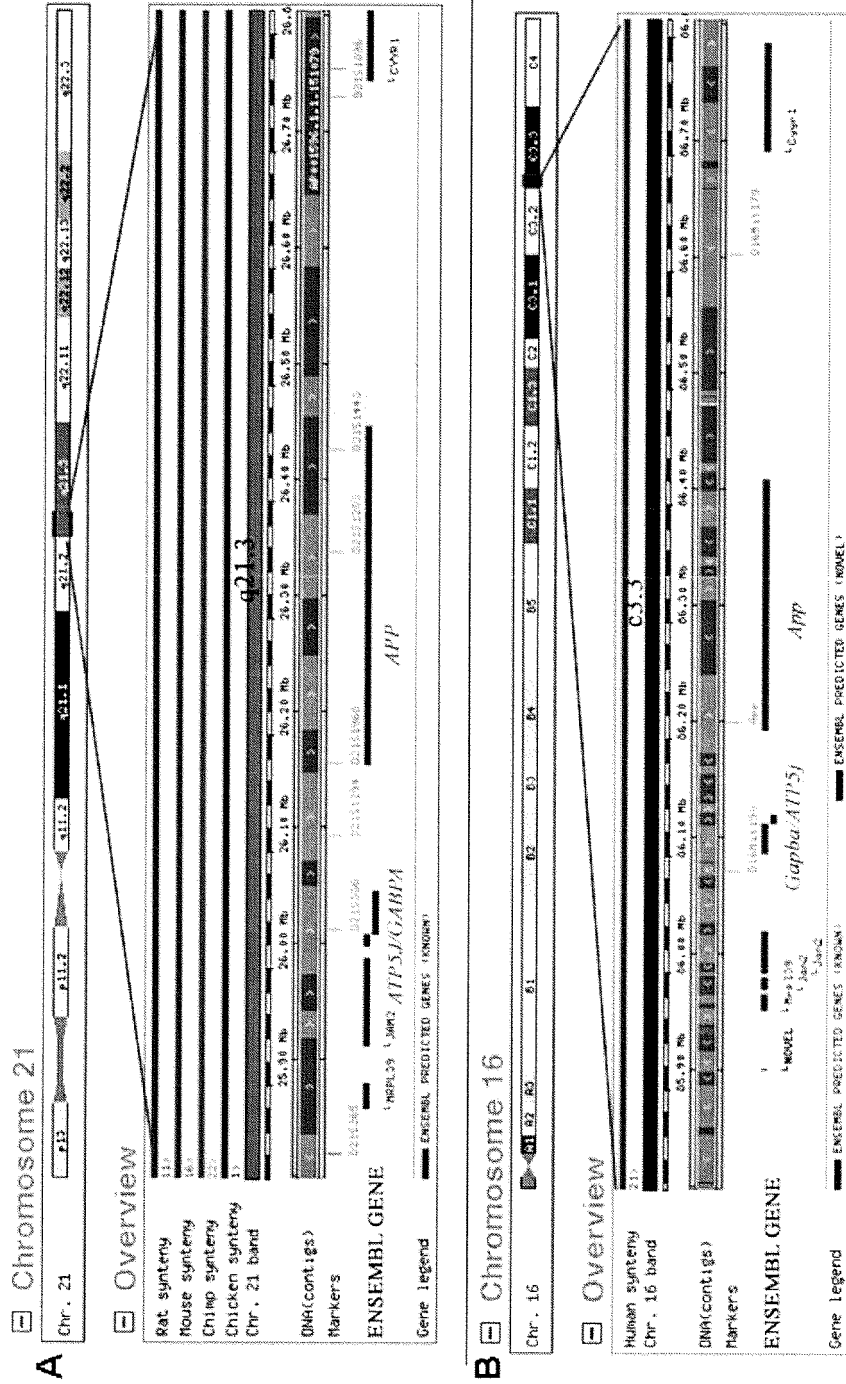


FIGURA 2

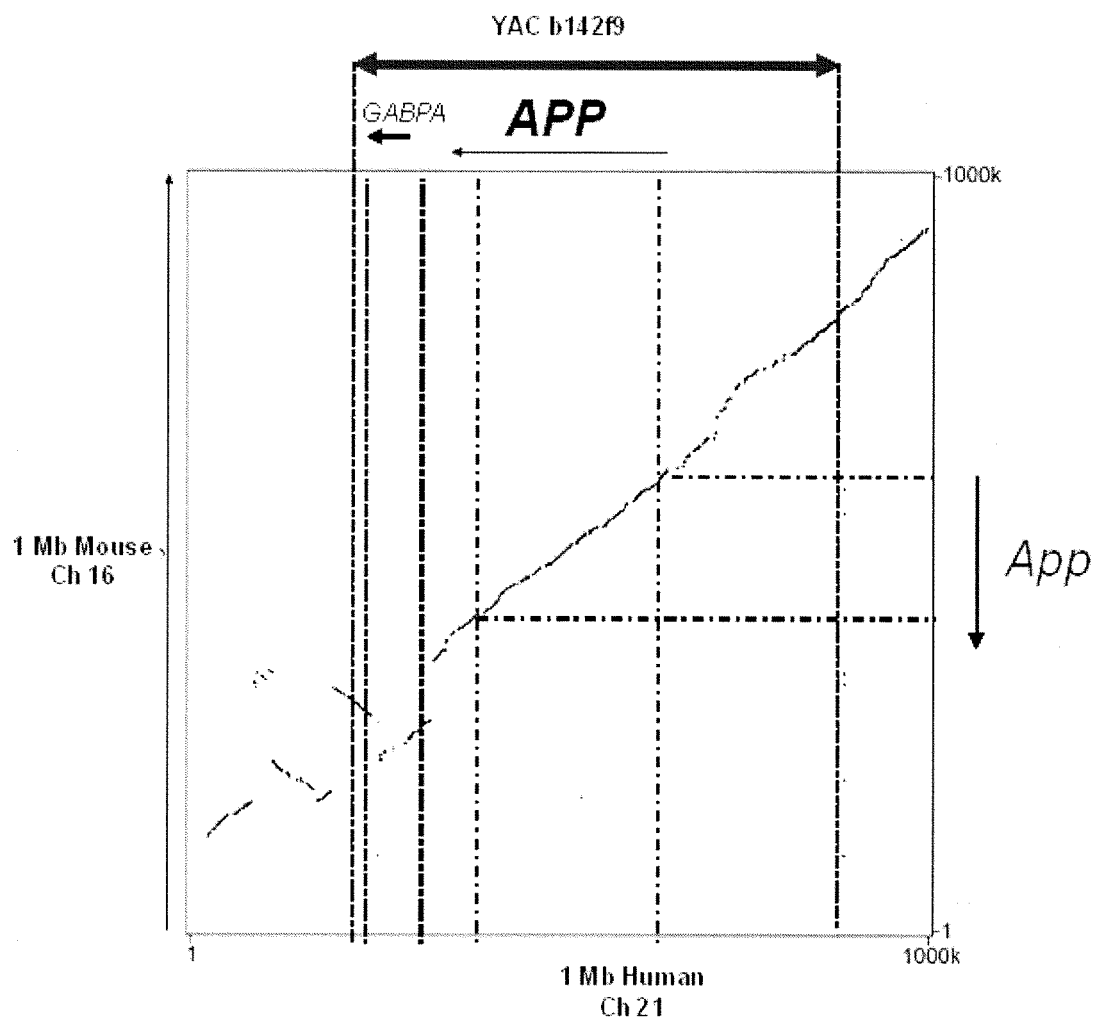


FIGURA 3

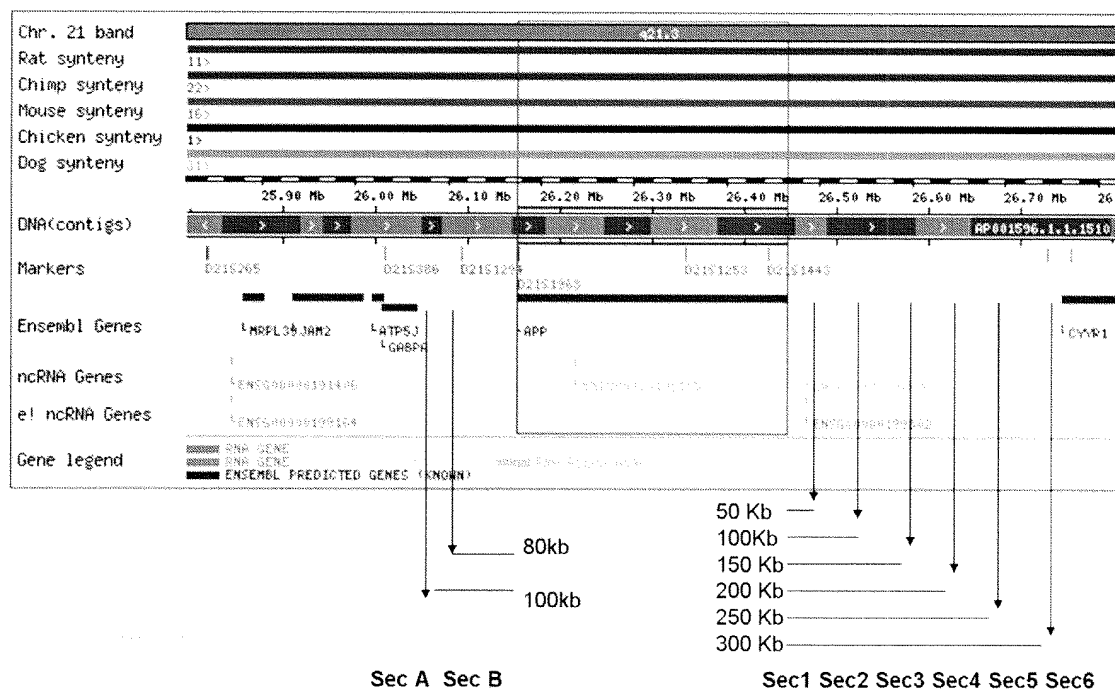


FIGURA 4

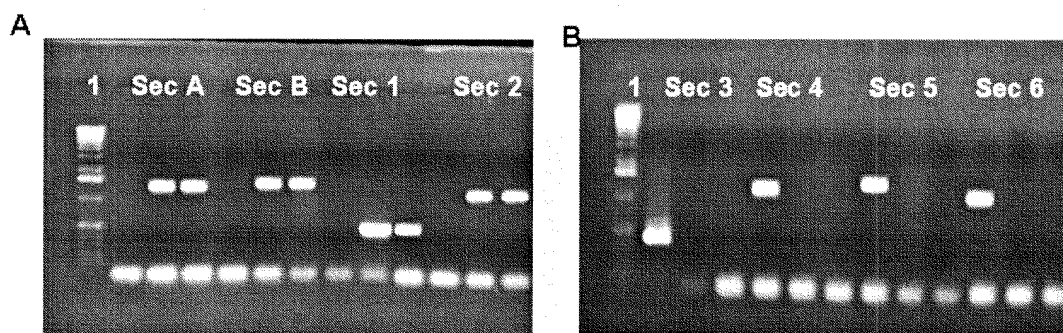


FIGURA 5

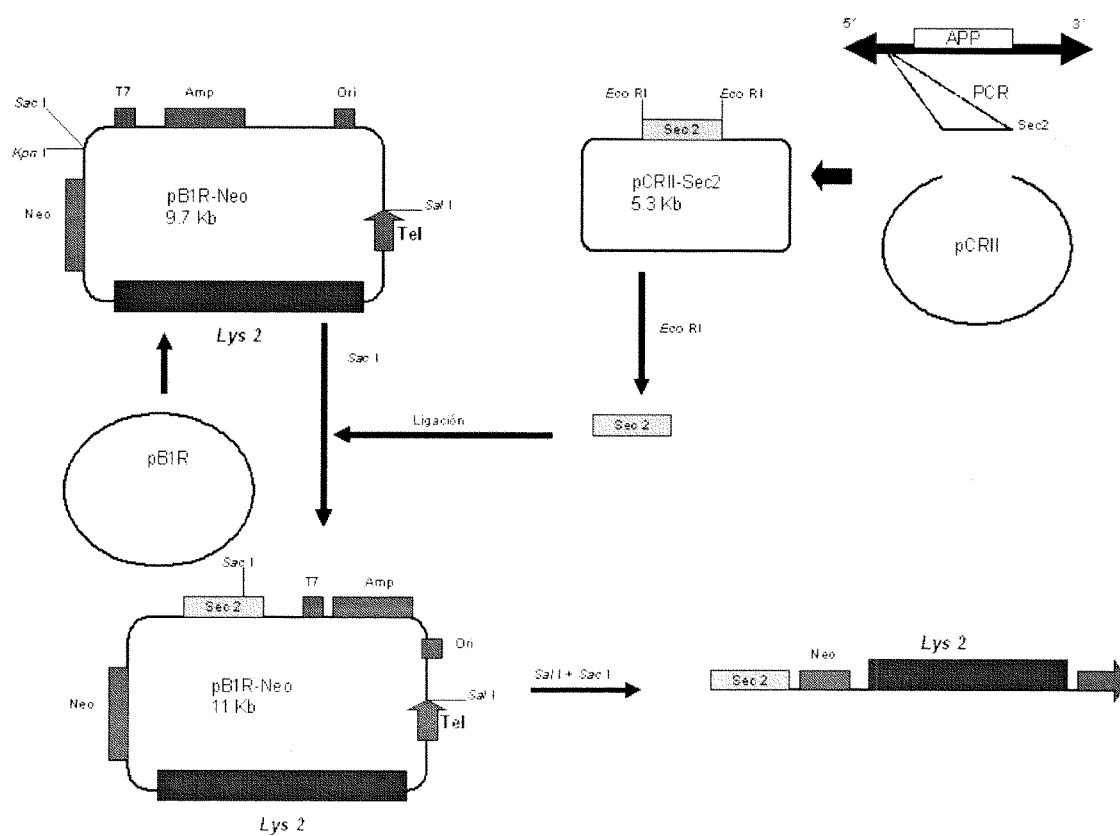


FIGURA 6

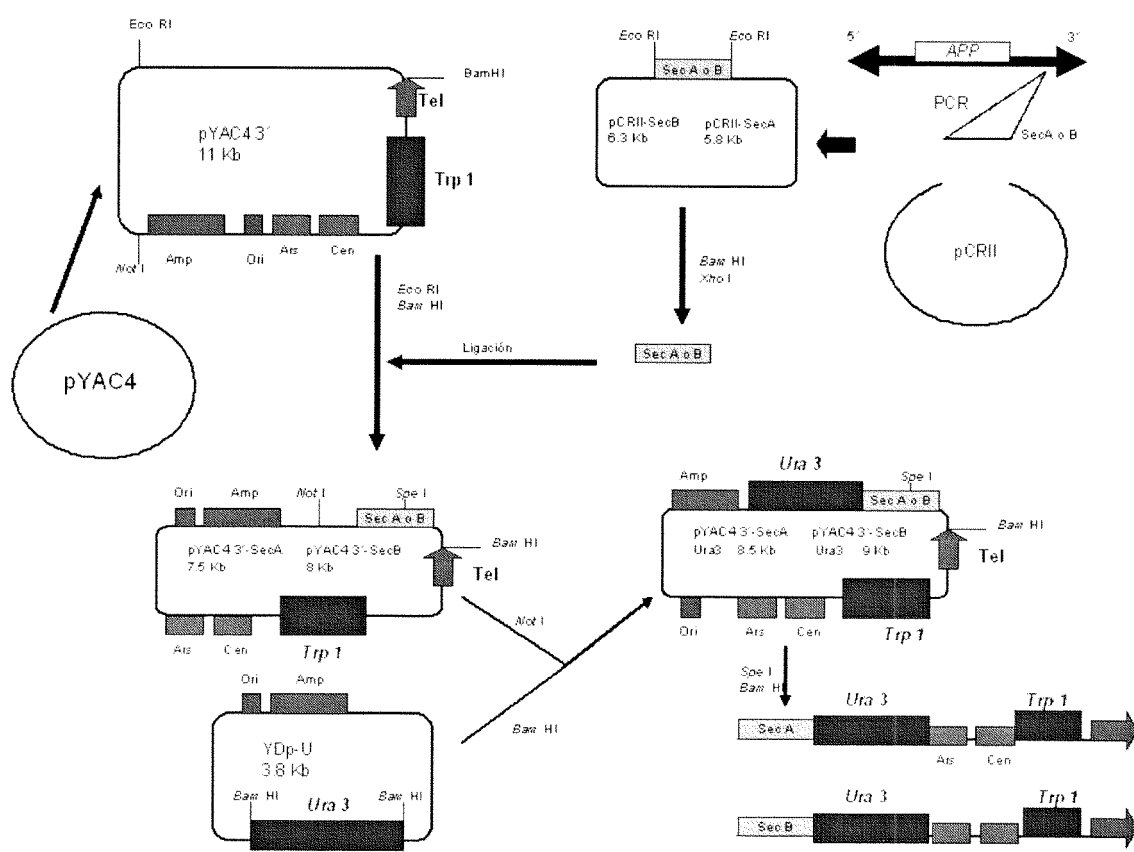


FIGURA 7

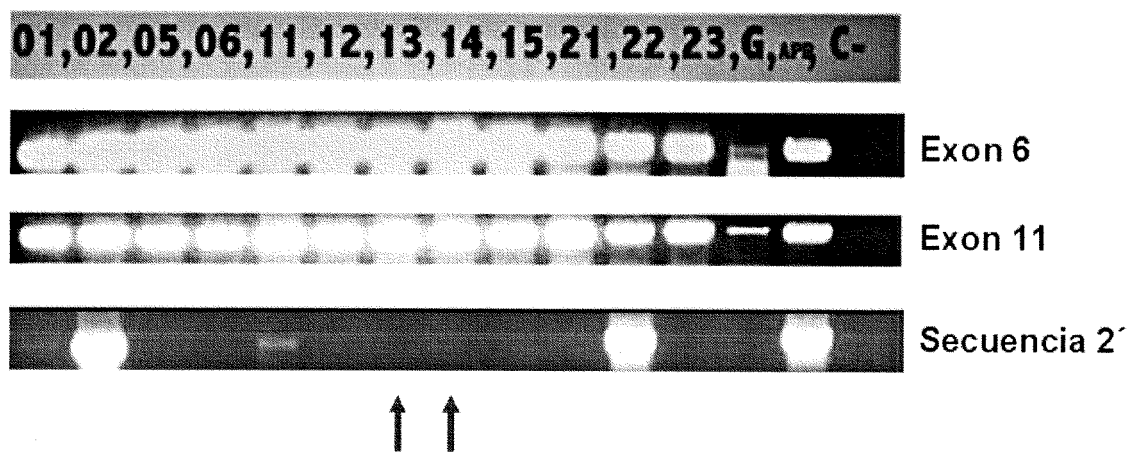


FIGURA 8

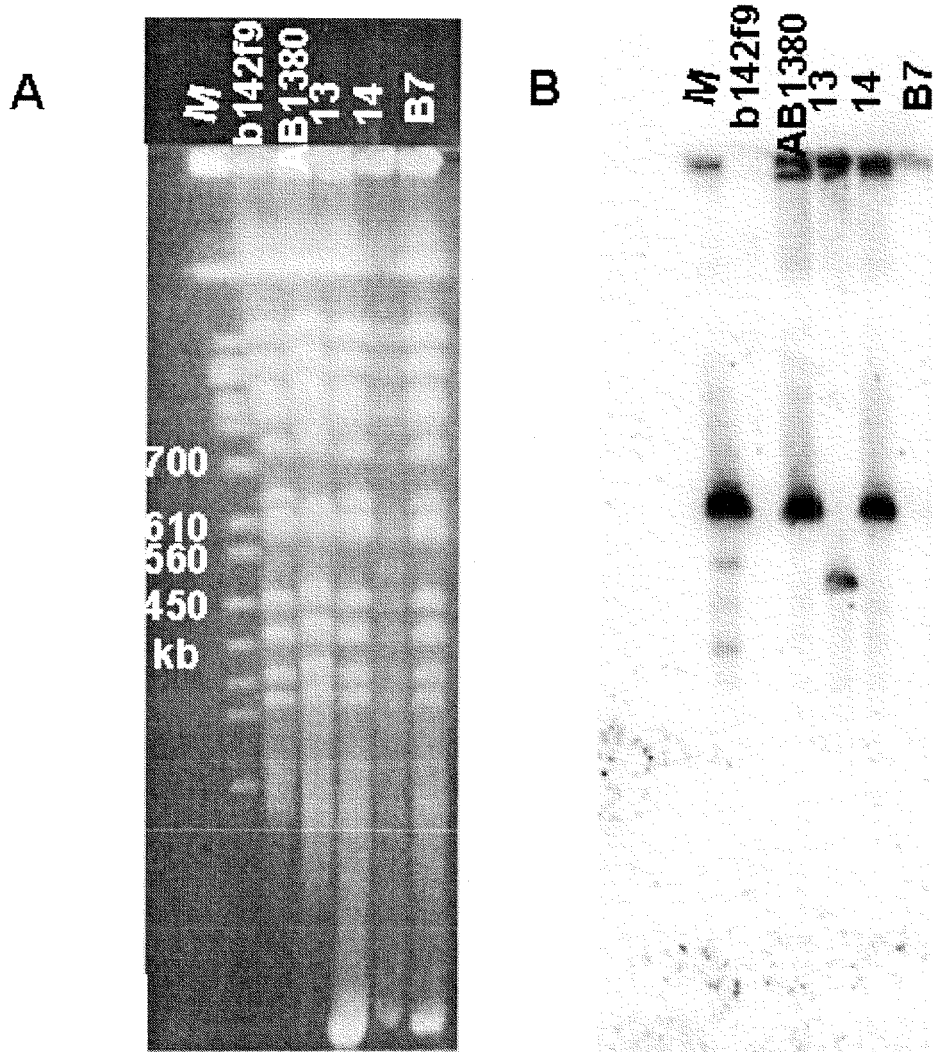


FIGURA 9

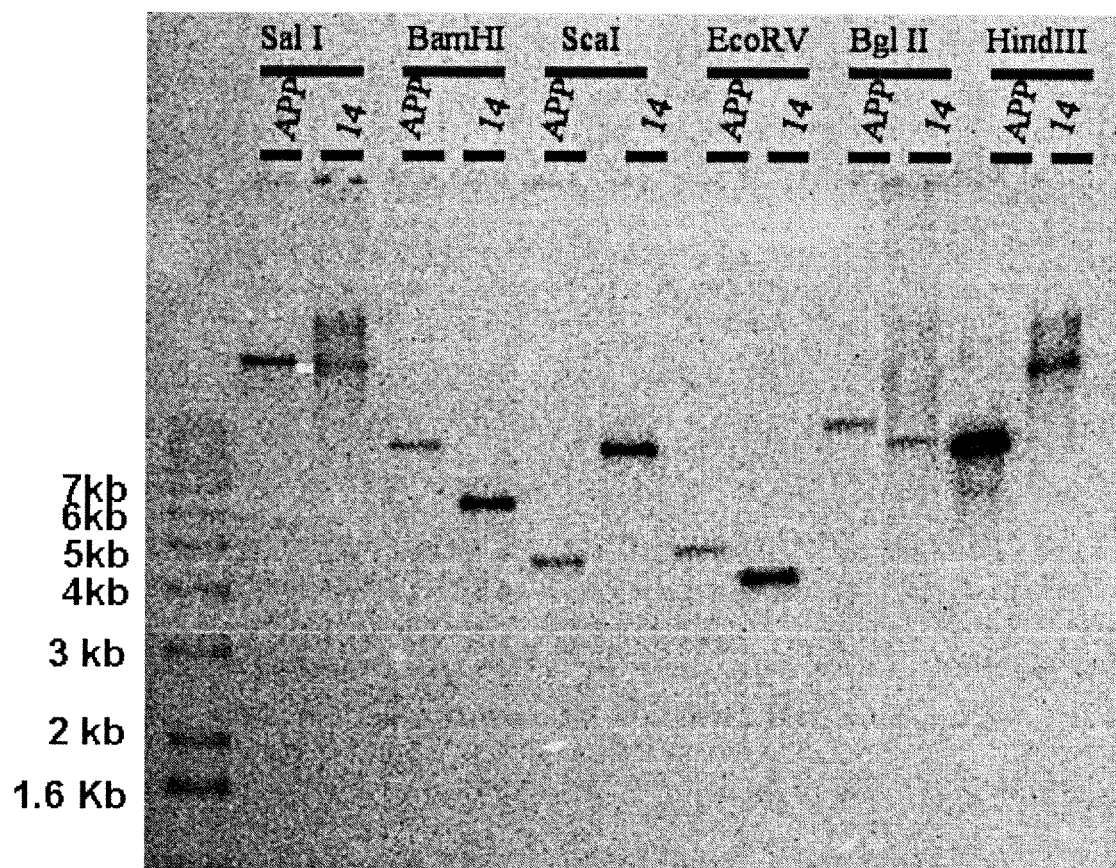


FIGURA 10

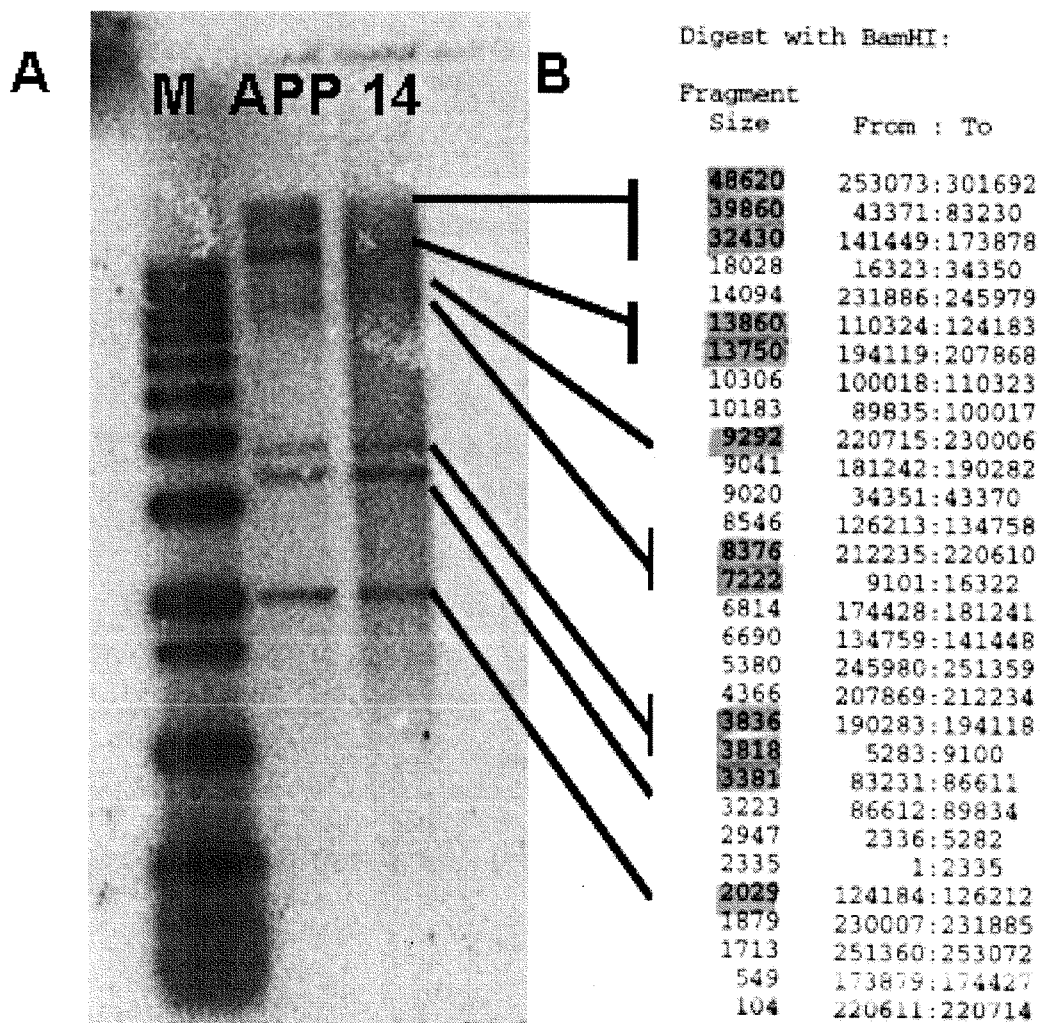


FIGURA 11

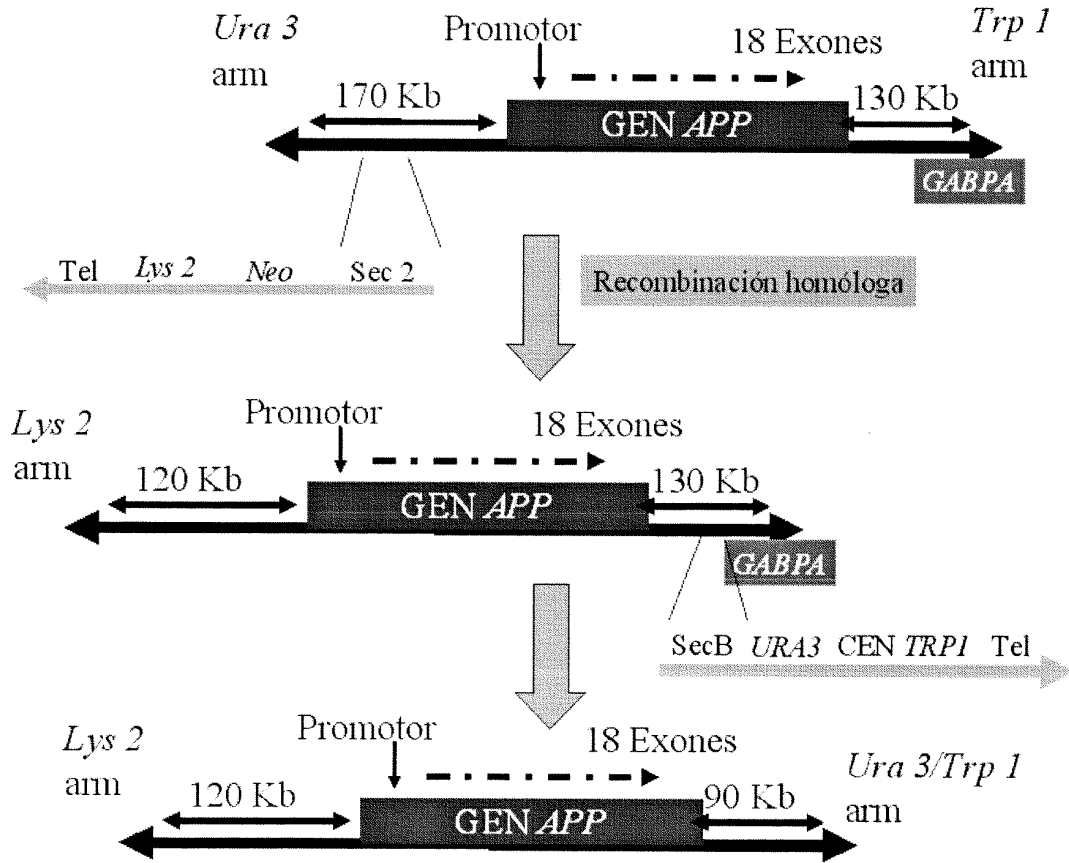


FIGURA 12

ES 2 316 209 A1

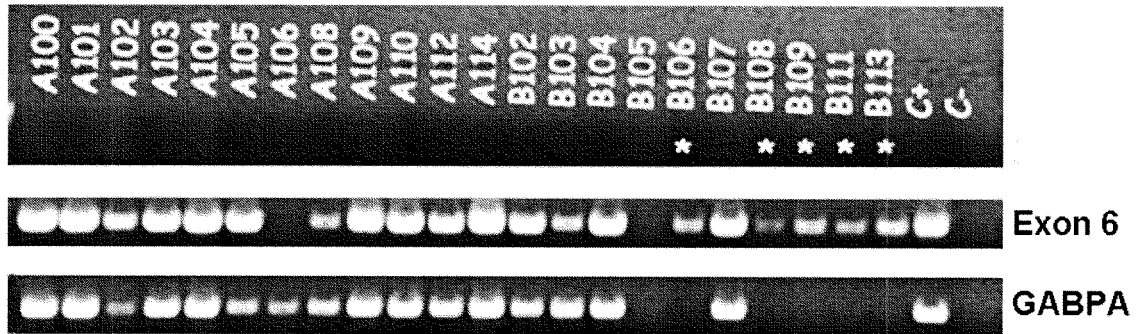


FIGURA 13

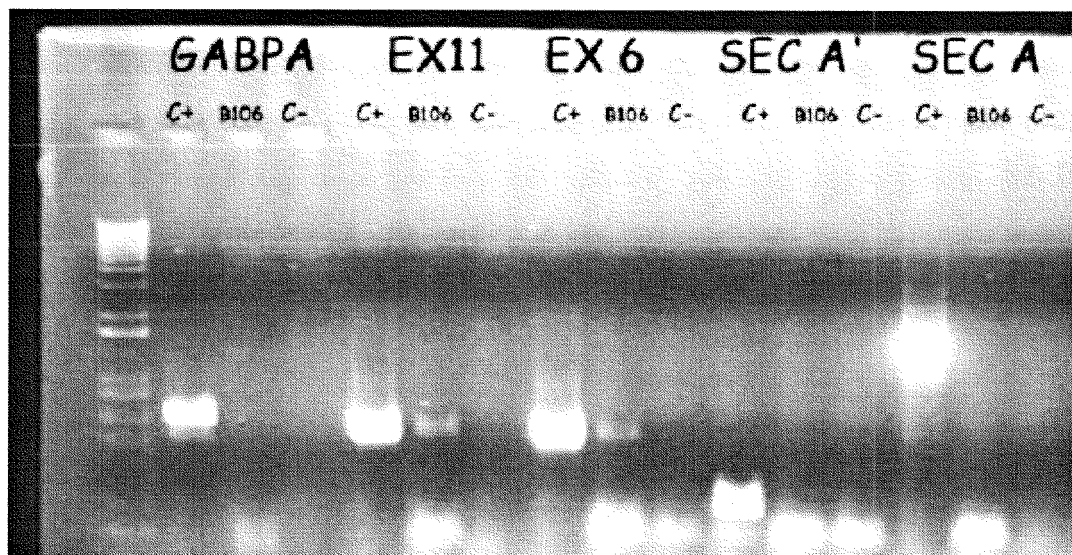
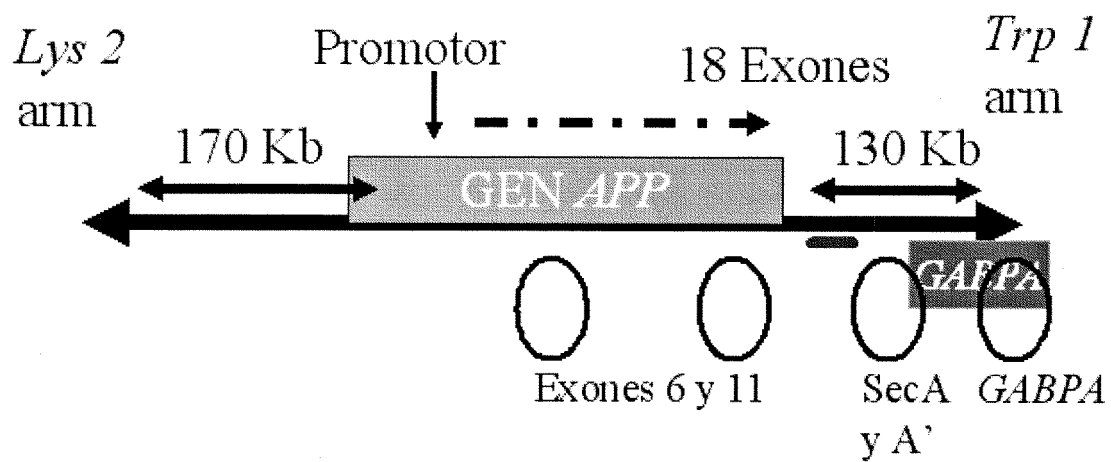


FIGURA 14

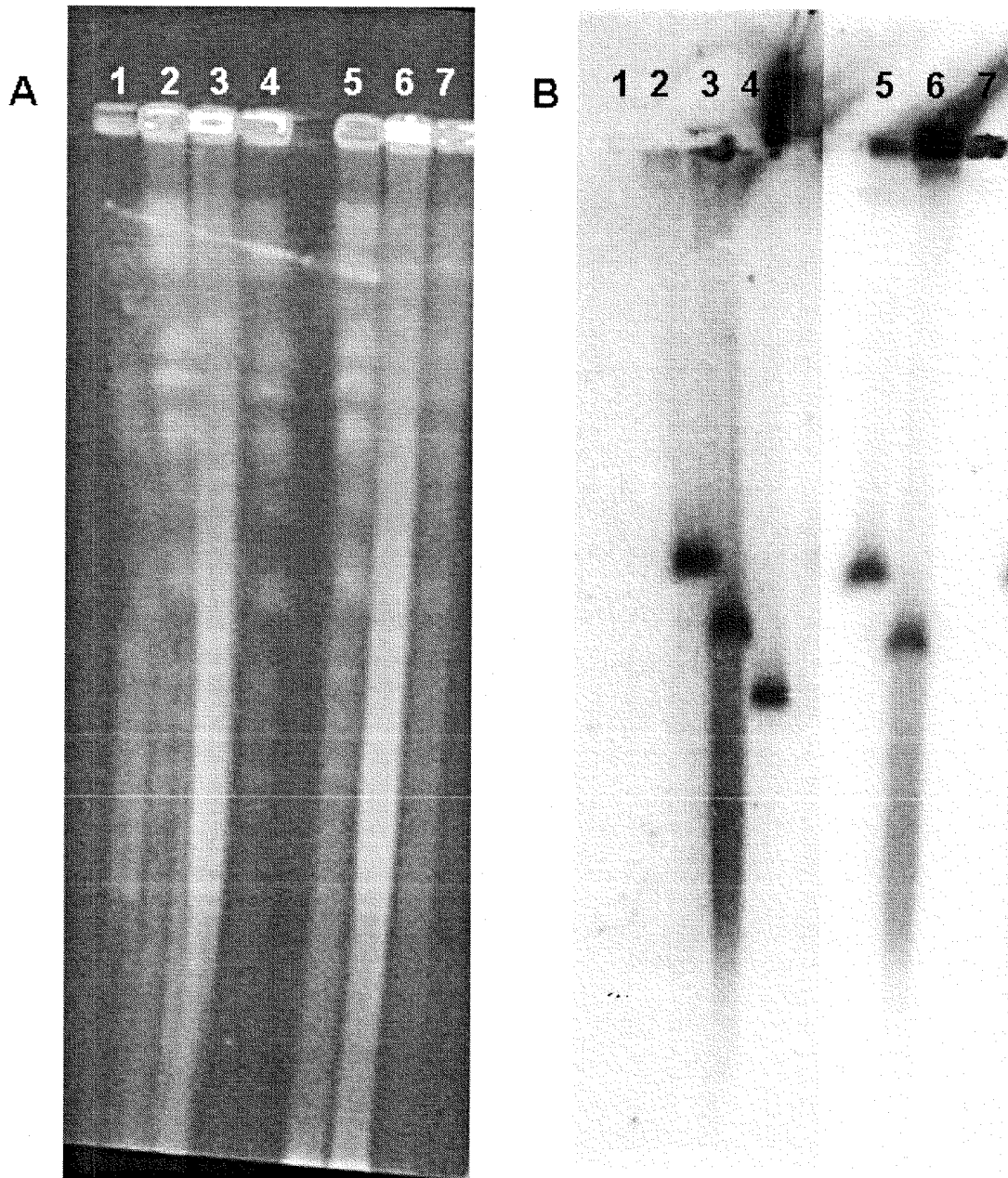


FIGURA 15

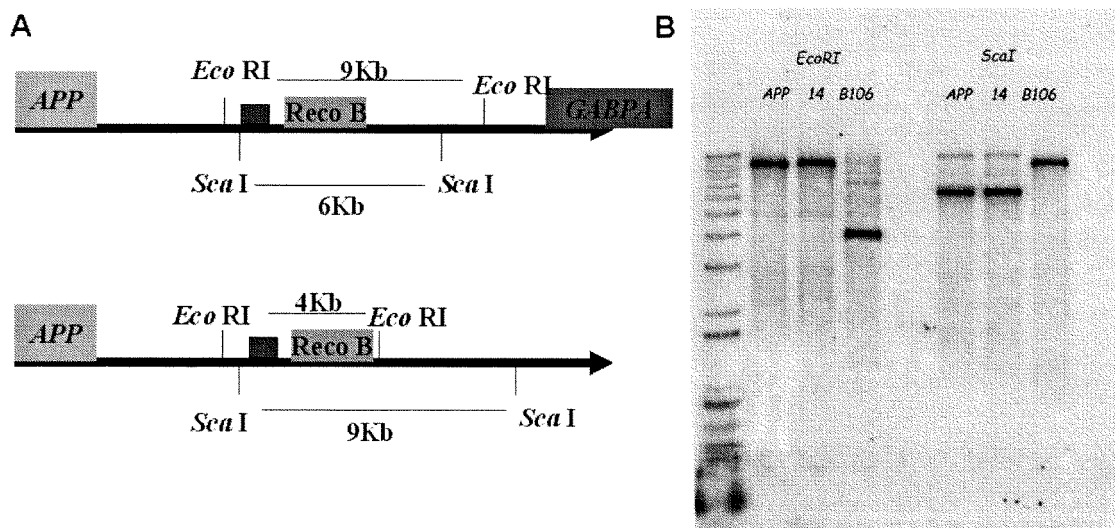


FIGURA 16

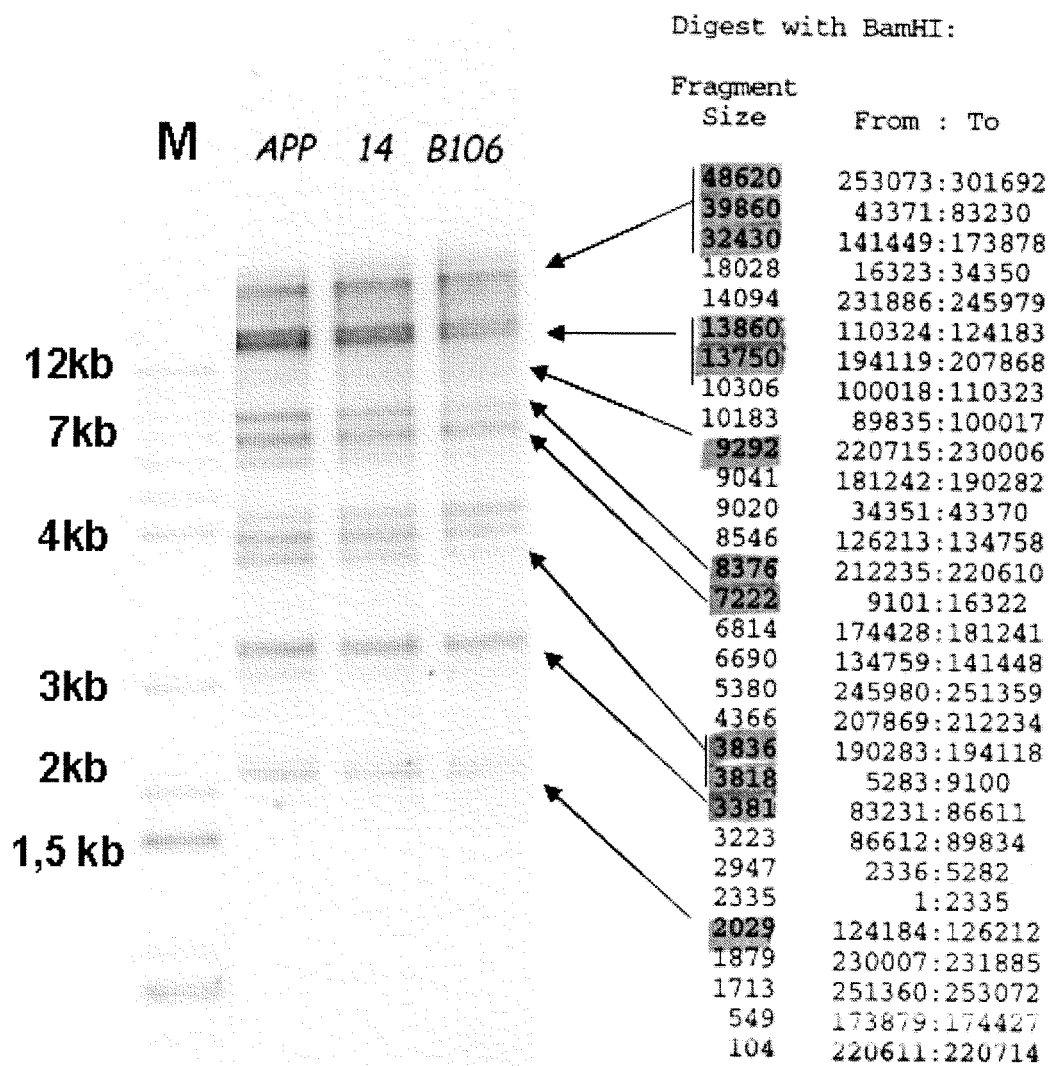


FIGURA 17

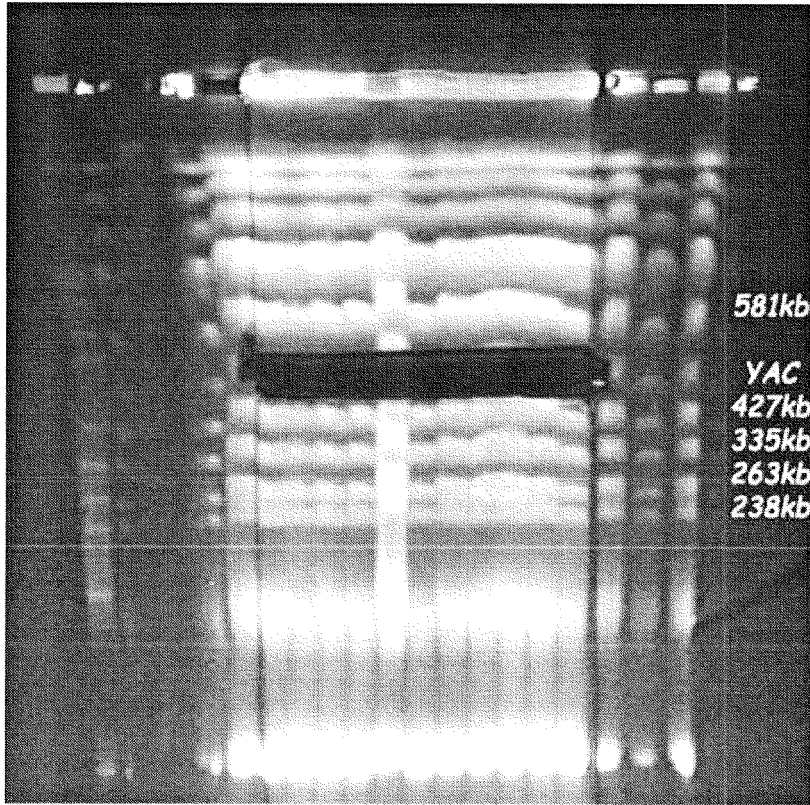


FIGURA 18



- Brazo LYS 2
- Sec2 a 120kb del promotor
- Sec1 a 60kb del promotor
- 17 PCR de exones, el Ex12 y 13 están en la misma PCR
- SecB' a 60kb del exón 18
- SecB a 80kb del exón 18
- Brazo TRP 1

FIGURA 19

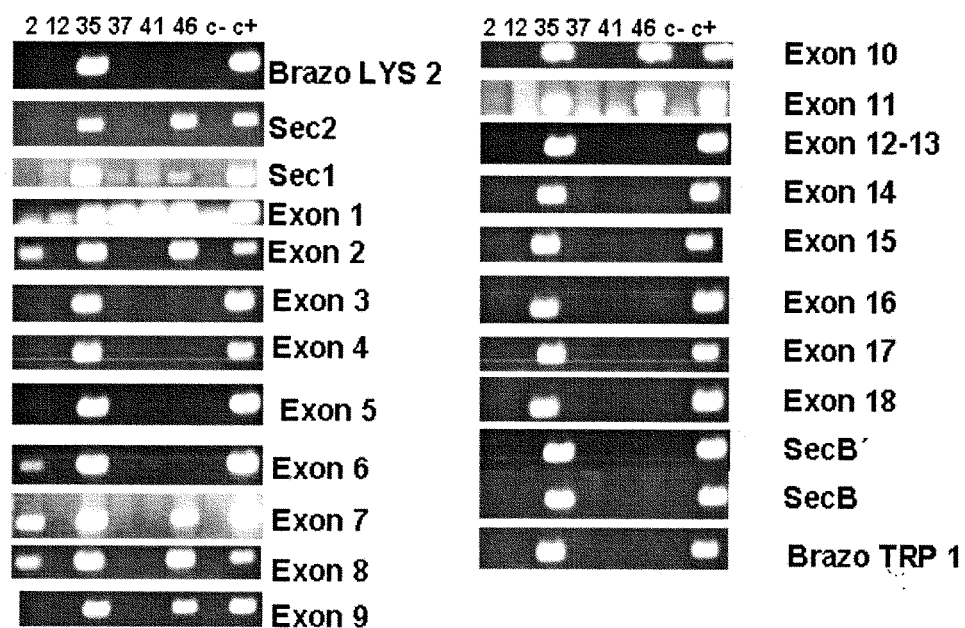


FIGURA 20

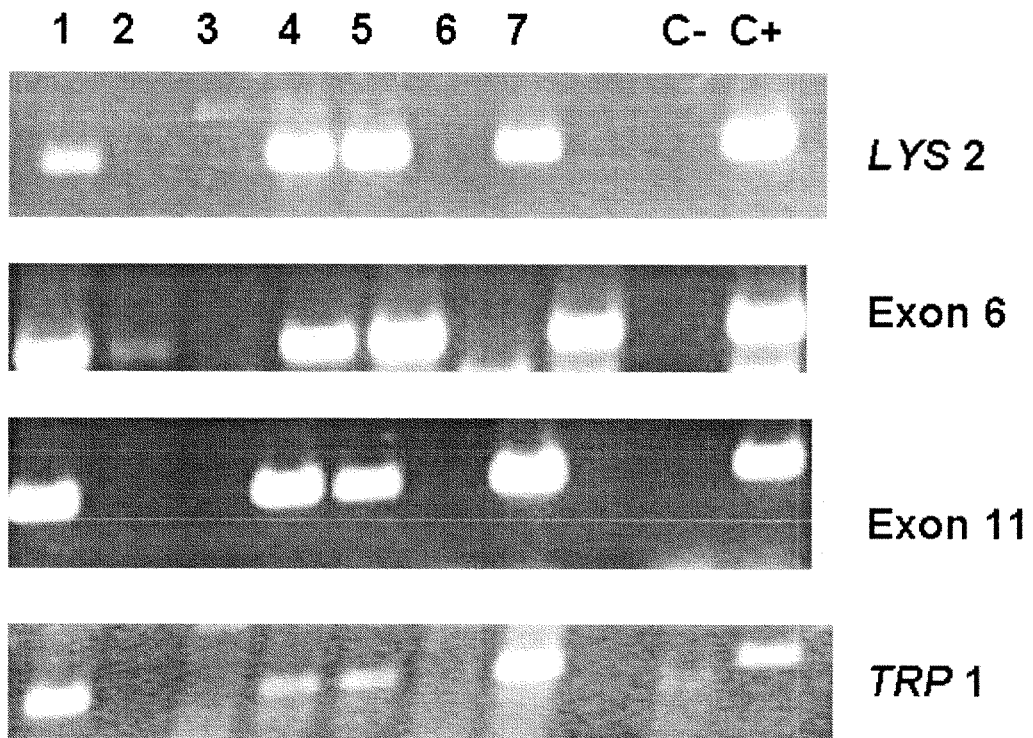


FIGURA 21

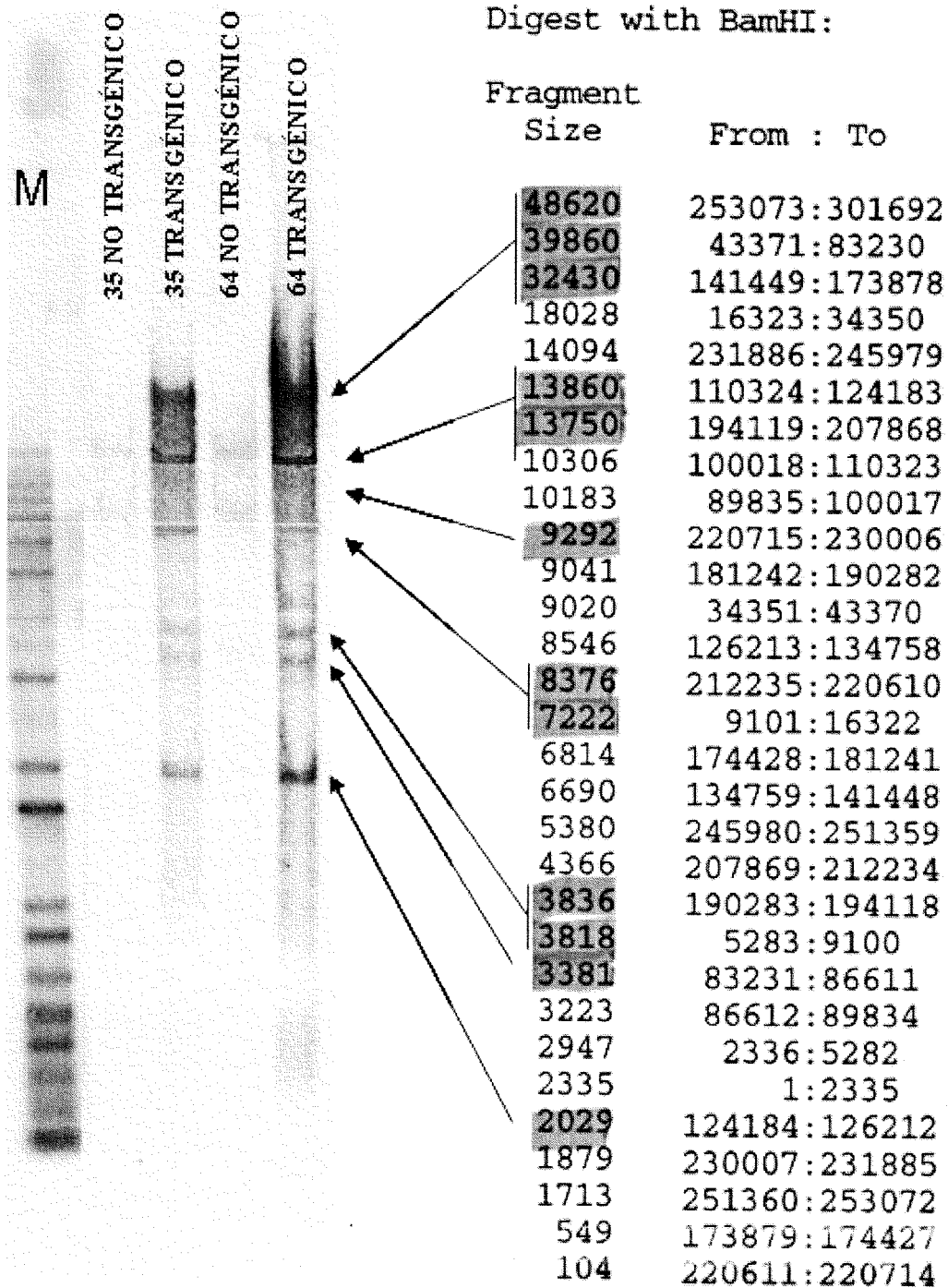


FIGURA 22

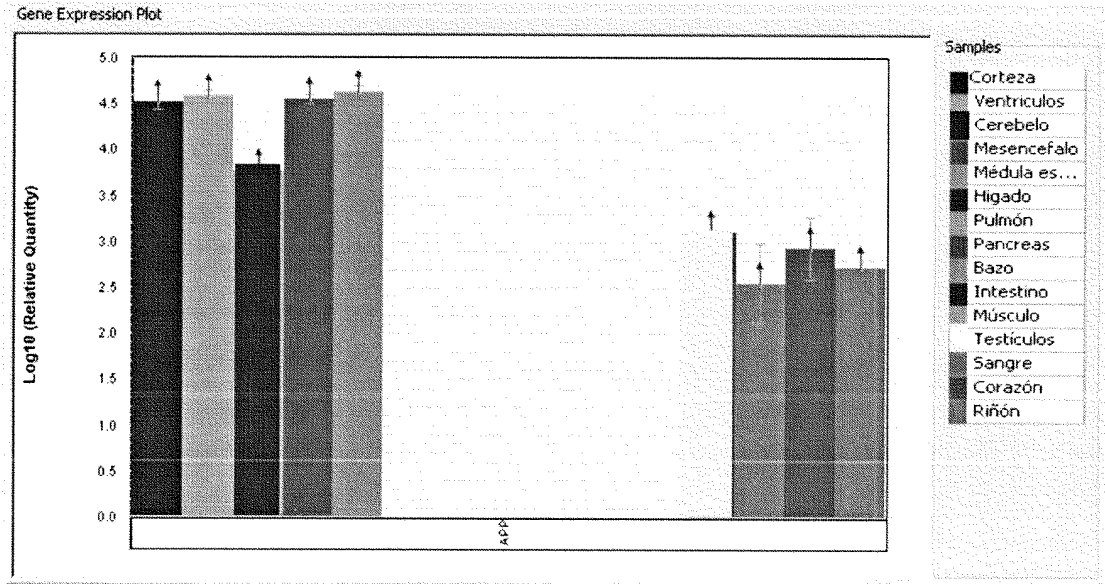


FIGURA 23

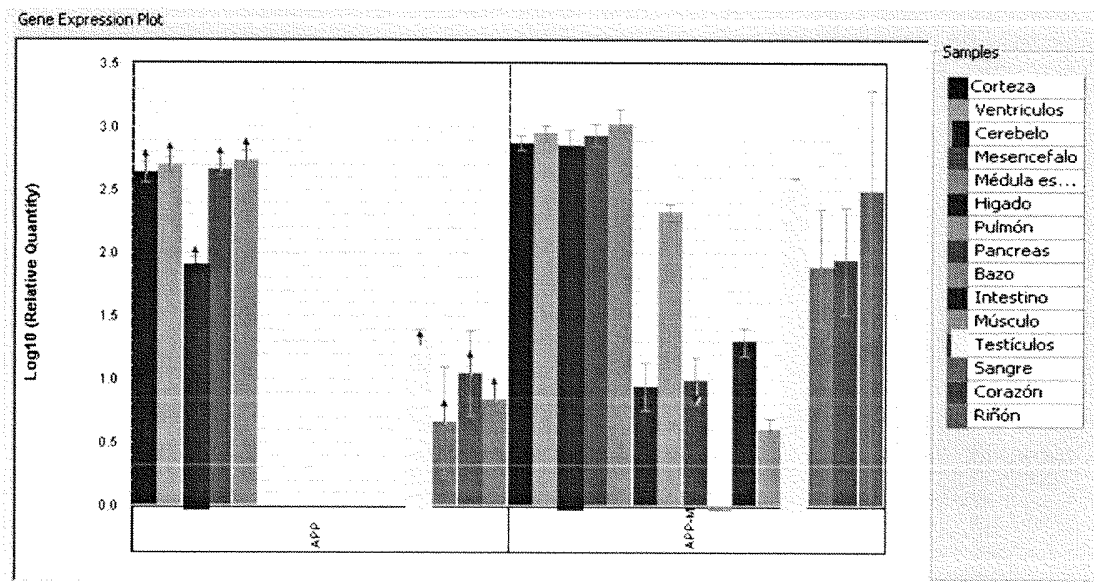


FIGURA 24

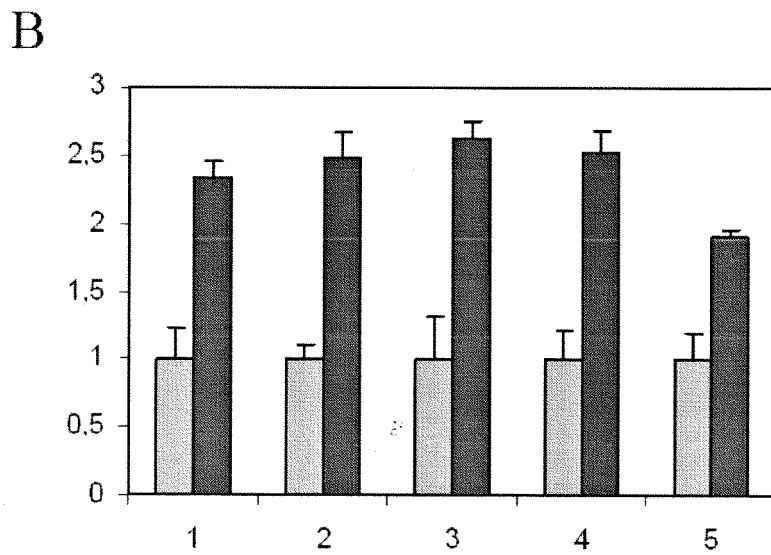
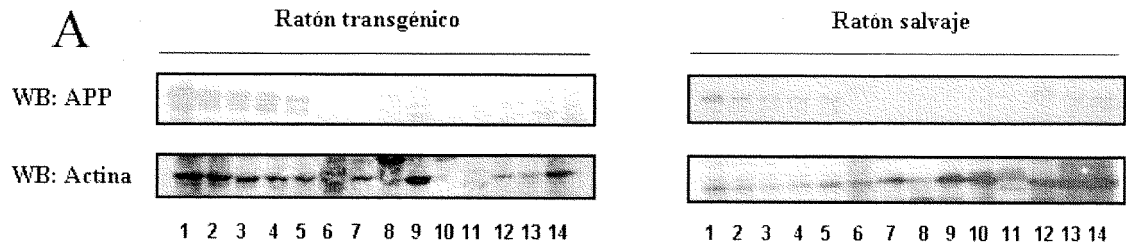


FIGURA 25

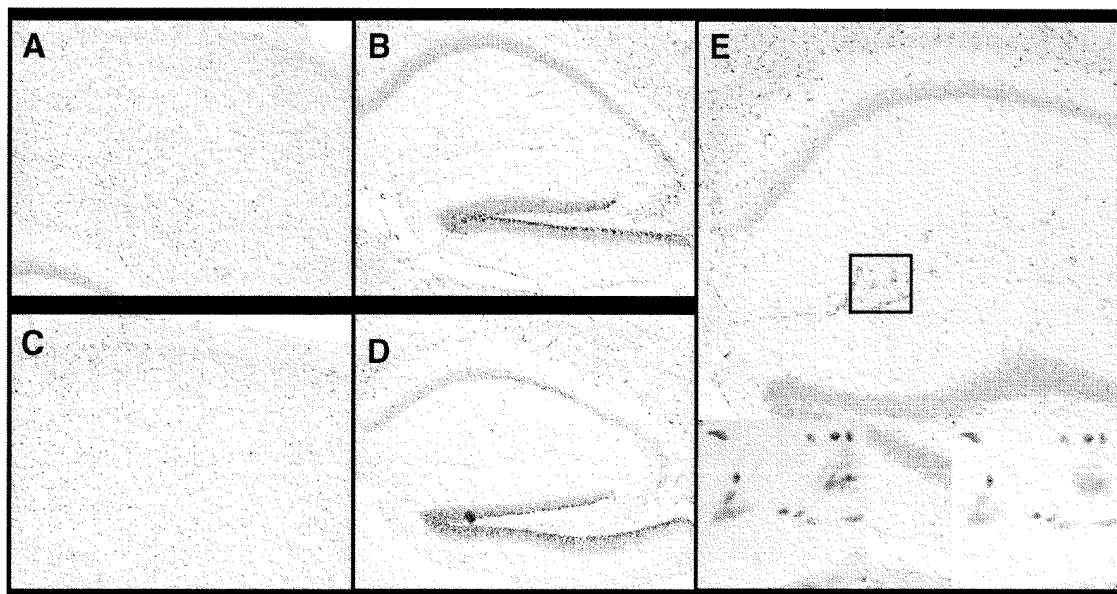


FIGURA 26

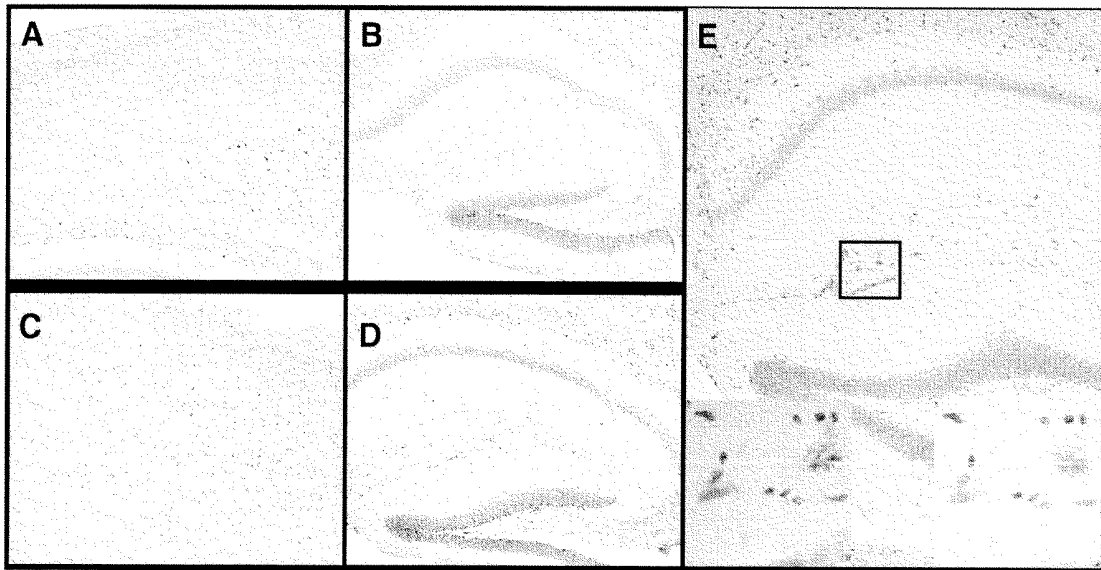


FIGURA 27



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 316 209

② Nº de solicitud: 200503002

③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | HATTORI M. et al., "A novel method for making nested deletions and its application for sequencing of a 300 kb region of human APP locus". Nucleic Acids Research, (1997), vol. 25, no. 9, páginas 1802-1808. | 1-22 |
| X | DATABASE EMBL 15 Febrero de 2005 LIVINGSTON R.J. et al.: "Homo sapiens amyloid beta precursor protein-293960 BP" Recuperado de EBI. Nº Acceso: AY919674. | 1-22 |
| X | US 5981175 A (LORING et al.) 09.11.1999 | 1-22 |
| X | PEARSON B. et al., "Expression of the human beta-amyloid presursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice" PNAS (1993), vol. 99, páginas 10578-10582. | 1-22 |
| X | ROOKE K. et al., "A physical map of the human APP gene in YACs" Mammalian Genome (1993) Nov; 4(11), páginas 662-9. | 1-22 |
| X | WO 9423049 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS) 13.10.1994 | 1-22 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

06.03.2009

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)