



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 18 913 T2 2007.01.25

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 292 187 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 18 913.2

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA01/00900

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 949 132.3

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2001/097607

(86) PCT-Anmeldetag: 19.06.2001

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 27.12.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 19.03.2003

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 19.04.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 25.01.2007

(51) Int Cl.⁸: A01K 67/027 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

212534 P 20.06.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

The Governing Council of the University of
Toronto, Toronto, Ontario, CA

(72) Erfinder:

ST. GEORGE-HYSLOP, H., Peter, Toronto, Ontario
M5P 3G3, CA; FRASER, E., Paul, Toronto, Ontario
M6S 3L9, CA; WESTAWAY, David, Etobicoke,
Ontario M9B 5K3, CA

(74) Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

(54) Bezeichnung: TRANSGENES TIERMODELL FÜR NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN

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

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

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf transgene nicht-menschliche Tiermodelle neurodegenerativer Störungen, einschließlich Alzheimerscher Erkrankung. Genauer ist die vorliegende Erfindung auf ein Mausmodell gerichtet, welches die Charakterisierung der pathogenen Mechanismen der Alzheimerschen Erkrankung und die Entwicklung von Diagnostik, Therapien und therapeutischen Verbindungen erleichtert.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Bei der folgenden Beschreibung werden Bezugnahmen auf gewisse Literaturzitate, die am Ende der Beschreibung aufgelistet sind, gemacht und sind alle hierin durch Bezugnahme eingeschlossen.

[0003] Alzheimersche Krankheit (AD), die häufigste Ursache von Demenz, hat eine komplexe Ätiologie, welche am wahrscheinlichsten genetische und Umgebungs determinanten involviert. Sie ist gekennzeichnet durch zerebrale, aus dem Amyloid-beta-Peptid (A β) gebildete Amyloidablagerungen, Neuronenverlust und intrazelluläre Ablagerungen, die bekannt sind als neurofibrilläre Plaques (NFT), zusammengesetzt aus hyperphosphorylierten Formen des Mikrotubuli-assozierten Proteins tau (tau).

[0004] Genetische Analyse diverser Verwandter mit familiärer Alzheimerscher Erkrankung (FAD; engl.: familial Alzheimer's Disease) zeigt, dass Biosynthese des Amyloid-beta-Peptids (A β) ein gemeinsamer Nenner bei der Erkrankungspathogenese ist. In dem Falle von mit dem Chromosom 21 im Zusammenhang stehenden Verwandten, flankieren Mutationen die Endoproteasestellen, wo A β aus dem Alzheimer-Amyloidvorläuferprotein (APP) ausgeschnitten wird, wohingegen von Mutationen bei den Presenilinen 1 und 2 gedacht wird, dass sie die Spaltung von APP an der C-terminalen Grenze von A β , die sogenannte γ -Sekretasestelle, erhöhen. Obgleich das tau-Gen auf dem Chromosom 17 bei AD nicht mutiert ist, sind Fehlsinnsubstitutionen und Splicestellenmutationen bei Zuständen mit gewissen pathologischen Ähnlichkeiten zu AD, wie zum Beispiel frontotemporaler Demenz, vorhanden.

[0005] Die genetischen Daten zeigen, dass die A β -Biogenese stromaufwärts in einem pathogenen Weg liegt, der in der Erzeugung von NFTs gipfelt. Während frühere Debatten sich darauf konzentrierten, ob A β -Amyloid oder NFTs Neuronenverlust und Dysfunktion verursachen, scheint es nun wahrscheinlich, dass beide Proteinaggregatstypen toxisch sind und zu dem klinischen Phänotyp von AD beitragen.

[0006] Obwohl es keine natürlich vorkommenden Tierformen von AD gibt, haben transgene Tiermodelle der Erkrankung das Potential, die pathogenen Schlüsselereignisse bei der menschlichen Erkrankung zu klären und zu ordnen. Trotz intensiver Anstrengung existieren jedoch nur wenige zufriedenstellende Modelle.

[0007] Das US-Patent Nr. 5,877,399 bezieht sich auf transgene Mäuse, die menschliches oder Maus-APP₆₉₅ exprimieren, entweder die Wildtypform oder die „schwedische“ (engl. „Swedish“) Mutation tragend, und eine progressive neurologische Störung allgemein innerhalb eines Jahres von der Geburt an entwickeln. Das US-Patent Nr. 6,037,521 bezieht sich auf ein Tiermodell der Alzheimerschen Erkrankung mit einem Transgen, welches einen 99 bis 103 Aminosäuren langen Carboxyterminusteil von menschlichem APP kodiert. Das US-Patent 5,894,078 bezieht sich auf eine transgene Maus, deren Genom eine DNA-Sequenz umfasst, welche die carboxyterminalen 100 Aminosäuren von menschlichem β APP kodiert, inseriert in das Exon I des Neurofilamentgens. Das US-Patent 5,850,003 bezieht sich auf transgene Mäuse, die ein Transgen beherbergen, das menschliches APP₇₅₁ mit der schwedischen Mutation kodiert.

[0008] Das US-Patent Nr. 5,898,094 bezieht sich auf ein transgenes Tiermodell von AD, worin das Tier sowohl ein mutiertes Presenilin-1-Transgen als auch ein die schwedische Mutation tragendes APP₆₉₅-Transgen trägt und exprimiert.

[0009] Die WO 96/40895 bezieht sich auf ein transgenes Tiermodell der Alzheimerschen Erkrankung und auf seine Verwendung für das Identifizieren von Therapeutika der Alzheimerschen Erkrankung, wobei das transgene Tier ein Transgen hat, das alle drei menschlichen Haupt-APP-Formen (APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀) exprimiert und das sowohl die Hardy- als auch die schwedischen Mutationen enthält.

[0010] Etliche dieser Modelle vermögen es nicht, APP und/oder seine Metaboliten durch physiologisch geeignete Wege zu produzieren, und in Fällen, wo dieser Vorbehalt nicht zutrifft, können die transgenen Tiere nur

gewisse Facetten des AD-Phänotypen zeigen. Im Hinblick auf Neuropathologie mag es Amyloidablagerungen geben, die sehr stark jenen in AD gesehenen ähneln, selektiven Neuronenverlust (in einem Fall) und Hyperphosphorylierung von tau, aber keine Ablagerungen von NFTs. Zusätzlich mögen diese neuropathologischen Anormalitäten nicht bis zum Alter von 8-9 Monaten oder bis zum Alter von 6 Monaten in dem Fall von bigenen oder homozygoten Tieren auftreten. Andere in die Schaffung dieser Modelle verwickelten Komplikationen schließen neonatale Letalität, die der Überexpression von APP zugeschrieben wird, die Verwendung von komplexen genetischen Hintergründen und allgemein kein deutliches Anzeichen von progressiver kognitiver Dysfunktion ein.

[0011] Es besteht deshalb ein Bedarf für ein transgenes Tiermodell von AD, welches leicht die wichtigen Facetten des humanen AD-Phänotypen zeigt, so dass Tiere nicht für verlängerte Zeitdauern gehalten werden müssen und Diagnostik und therapeutische Verbindungen viel schneller und kosteneffektiver entwickelt und gescreent werden können.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Tiermodell von AD, umfassend eine transgene Maus. Offenbart hierin ist die TgCRND8 genannte transgene Maus, welche hohe Spiegel von A β -Synthese und Amyloidablagerung in dem ZNS im Alter von 3 Monaten zeigt. Weiterhin zeigen TgCRND8-Mäuse kognitive Änderung innerhalb des Zeitraumes, in welchem Amyloidablagerung beginnt. Ebenfalls beschrieben sind Verfahren für die Produktion des transgenen TgCRND8-Tiermodells der Alzheimerschen Erkrankung.

[0013] Mit der Entwicklung des transgenen TgCRND8-Mausmodells für die Alzheimersche Erkrankung kann die Ätiologie der Erkrankung besser verstanden werden und mögliche Behandlungen, einschließlich effektiver Arzneimitteltherapien, können entwickelt und getestet werden.

[0014] Das transgene TgCRND8-Mausmodell ist gekennzeichnet durch eine große Ähnlichkeit mit dem Phänotyp der natürlich vorkommenden Alzheimerschen Erkrankung, basierend auf der Expression von A β -Amyloidprotein in dem ZNS, ebenso wie auf der histologischen Analyse, Neurologie und Verhaltensdefiziten.

[0015] Das APP-Gen macht alternatives Splicing durch, um drei häufige Isoformen zu erzeugen. Die längste Isoform, enthaltend 770 Aminosäuren (APP₇₇₀), und die zweitlängste Isoform, enthaltend 751 Aminosäuren (APP₇₅₁), werden in den meisten Geweben exprimiert. Das dritte Transkript, welches 695 Aminosäuren (APP₆₉₅) enthält, wird überwiegend in dem Gehirn exprimiert. Durch Übereinkunft wird die Codonnummerierung der längsten Isoform, APP₇₇₀, verwendet, sogar wenn Bezug genommen wird auf Codonpositionen der kürzeren Isoformen.

[0016] Die transgene TgCRND8-Maus enthält ein Transgen, das eine mutierte Form der gehirnspezifischen APP₆₉₅-Isoform exprimiert; dieses Transgen trägt sowohl die „schwedische“ als auch die „Indiana-“APP-Mutationen.

[0017] Es wurde eine APP₆₉₅-cDNA erzeugt, enthaltend (unter Verwendung der Codonnummerierung von APP₆₉₅) die Mutationen K595N/M596L (die schwedische Mutation) und V642F (die Indiana-Mutation). Auf diese und andere APP-Mutationen wird allgemein hierin, einschließlich Ansprüche, Bezug genommen werden durch das üblichere APP₇₇₀-Codonnummerierungssystem, d. h. für diese beiden Mutationen K670N/M671L (die schwedische Mutation) und V717F (die Indiana-Mutation).

[0018] Die doppelt mutierte APP₆₉₅-cDNA-Kassette wurde in den Cosmidexpressionsvektor cosTet inseriert, welcher den Promoter des syrischen Hamsterprionproteingens enthält. Der Vektor wurde dann in eine Mauszytome mikroinjiziert, um eine transgene Linie zu schaffen, genannt TgCRND8. Diese Mäuse zeigen mehrfache diffuse Amyloidablagerungen im Alter von drei Monaten, zu welcher Zeit Defizite im räumlichen Lernen ersichtlich werden.

[0019] In Übereinstimmung mit einem Aspekt der Erfindung wurden TgCRND8-Mäuse mit zahlreichen anderen transgenen Mäusen gekreuzt, die eine AD-verwandte Mutation tragen, um bitransgene Mäuse zu produzieren, welche eine weiter gesteigerte AD-verwandte Neuropathologie zeigen.

[0020] Demgemäß bezieht sich die Erfindung auf eine transgene Maus, dessen Genom ein Transgen umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die an einen Promoter operabel gekoppelt ist, und kodierend ein heterologes Amyloidvorläuferprotein 695 (APP₆₉₅) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Aspa-

ragin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und worin das Transgen exprimiert wird.

[0021] In Übereinstimmung mit der Erfindung ist das heterologe APP₆₉₅ menschliches APP₆₉₅ Folglich stellt die Erfindung eine transgene Maus bereit, die herstellbar ist durch:

- (a) Kreuzen einer ersten transgenen Maus, deren Genom ein Transgen umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist, und kodierend ein menschliches Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und worin das Transgen exprimiert wird, mit einer zweiten transgenen Maus, die ein Genom hat, umfassend ein Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend humanes Presenilin-2-Polypeptid, worin der Methioninrest an Position 239 durch Valin substituiert ist, um Nachfahren der ersten Generation zu erzeugen und
- (b) Selektieren aus den Nachfahren der ersten Generation einer transgenen Maus mit einem Genom, umfassend wenigstens ein erstes Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend ein humanes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und wenigstens ein zweites Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend ein humanes Presenilin-2-Polypeptid, worin der Methionenrest bei Position 239 durch Valin substituiert ist, und die beide dieser ersten und zweiten Transgene exprimiert.

[0022] In Übereinstimmung mit einer weiteren Ausführung stellt die Erfindung eine transgene Maus bereit, die herstellbar ist durch:

- (a) Kreuzen einer ersten transgenen Maus, deren Genom ein Transgen umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend humanes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und worin das Transgen exprimiert wird, mit einer zweiten transgenen Maus mit einem Genom, umfassend ein Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend humanes Presenilin-1-Polypeptid, worin der Leucinrest bei Position 286 durch Valin substituiert ist, um Nachfahren der ersten Generation zu produzieren; und
- (b) Selektieren von den Nachfahren der ersten Generation einer transgenen Maus mit einem Genom, umfassend wenigstens ein erstes Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend humanes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und wenigstens ein zweites Gen, umfassend eine Nukleotidsequenz, operabel gekoppelt an einen Promoter und kodierend ein humanes Presenilin-1-Polypeptid, worin der Leucinrest bei Position 286 durch Valin substituiert ist, und die beide dieser ersten und zweiten Transgene exprimiert.

[0023] In Übereinstimmung mit einem weiteren Aspekt dieser Erfindung wird eine transgene Maus bereitgestellt, herstellbar durch:

- (a) Kreuzen einer ersten transgenen Maus, deren Genom ein Transgen umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und ein humanes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid kodiert, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und worin das Transgen exprimiert wird, mit einer zweiten transgenen Maus mit einem Genom, umfassend ein Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend ein humanes Presenilin-1-Polypeptid, worin der Methionenrest bei Position 146 durch Leucin substituiert ist und der Leucinrest bei Position 286 durch Valin substituiert ist, um Nachfahren der ersten Generation zu erzeugen; und
- (b) Selektieren aus den Nachfahren der ersten Generation eine transgene Maus mit einem Genom, umfassend wenigstens ein erstes Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend ein humanes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und wenigstens ein zweites Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und kodierend ein humanes Presenilin-1-Polypeptid, worin der Methioninrest bei Position 146 durch Leucin substituiert ist und der Leucinrest bei Position 286 durch Valin substituiert ist, und exprimierend beide dieser

ersten und zweiten Transgene.

[0024] In Übereinstimmung mit den zuvor genannten Ausführungen der Erfindung wird ein Verfahren beschrieben für das Screening einer Kandidatenverbindung für ihre Wirksamkeit beim Verhindern oder Verzögern der Entwicklung von AD, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Verabreichen der Kandidatenverbindung an eine erste wie hierin beschriebene transgene Maus vor dem Erscheinen eines ausgewählten, mit AD im Zusammenhang stehenden Phänotypmerkmals in dieser Maus; und
- (b) Vergleichen des Alters bei welchem dieses ausgewählte, mit AD im Zusammenhang stehende verwandte Phänotypmerkmal in dieser Maus erscheint, mit dem Alter, bei welchem dieses Merkmal in einer zweiten transgenen Maus desselben Typs erscheint, welcher die Verbindung nicht verabreicht worden ist; worin ein erhöhtes Erscheinungsalter des Merkmals in der ersten Maus im Vergleich mit jenem in der zweiten Maus Wirksamkeit der Verbindung anzeigt.

[0025] Es wird auch ein Verfahren beschrieben für das Screening einer Kandidatenverbindung für ihre Wirksamkeit beim Verbessern der Symptome der Alzheimerschen Erkrankung, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Verabreichen der Kandidatenverbindung an eine erste, wie hierin beschriebene transgene Maus;
- (b) Bestimmen der Leistung dieser Maus in einem Gedächtnis- oder Lerntest; und
- (c) Vergleichen der Leistung dieser Maus mit der Leistung einer zweiten transgenen Maus desselben Typs, welcher die Verbindung nicht verabreicht worden ist; worin eine verbesserte Leistung der ersten Maus im Vergleich mit jener der zweiten Maus Wirksamkeit der Verbindung anzeigt.

[0026] In Übereinstimmung mit den zuvor genannten Ausführungen wird ein Verfahren beschrieben für das Produzieren eines transgenen nicht-menschlichen Säugers, der anormale Aβ-Ablagerung in seinem zentralen Nervensystem zeigt, umfassend:

- (a) Einführen eines Transgens, umfassend eine Nukleotidsequenz, operabel an einen Promoter gekoppelt und kodierend ein heterologes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, in eine befruchtete Oocyte dieses Säugers;
- (b) Transplantieren dieser befruchteten Oocyte in einen pseudoschwangeren Säuger;
- (c) Ermöglichen dieser befruchteten Oocyte, sich in einen lebend geborenen Nachfahren zu entwickeln; und
- (d) Selektieren eines Nachfahren, dessen Genom ein Transgen umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, operabel an einen Promoter gekoppelt und kodierend ein heterologes Amyloidvorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-) Polypeptid, worin der Lysinrest bei Position 670 durch Asparagin substituiert ist, der Methioninrest bei Position 671 durch Leucin substituiert ist und der Valinrest bei Position 717 durch Phenylalanin substituiert ist, und worin das Transgen exprimiert wird.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0027] Gewisse Ausführungen der Erfindung werden beschrieben, wobei Bezug genommen wird auf die begleitenden Zeichnungen, worin

[0028] **Fig. 1** zeigt die Leistung im Wasserirrgarten von im Alter von 11 Wochen getesteten TgCRND8-Mäusen. Die TgCRND8-Mäuse (n = 5) hatten signifikant längere Fluchtlatenzen ([Abb. A](#)) und Suchwege ([Abb. B](#)) als ihre Nicht-Tg-Wurfgefährten (n = 8), ($F(1,10) = 28,8, p < 0,001$ bzw. $F(1,10) = 22,0, p < 0,01$) und verweilten folglich signifikant weniger ($F(1,10) = 14,9, p < 0,01$) in dem Zielquadrant (TQ), enthaltend eine verborgene Plattform ([Abb. C](#)). Die lokomotorischen Fähigkeiten, beurteilt durch die Schwimmgeschwindigkeit ([Abb. D](#)) zwischen Tg- und Nicht-Tg-Mäusen waren vergleichbar ($F(1,10) = 0,48, p > 0,05$).

[0029] Die TgCRND8-Mäuse zeigten ein beeinträchtigtes räumliches Gedächtnis für die Plattformposition, wie gemessen durch ihre Suchmuster während 60 Sekunden Schwimmens in dem Sondierungsversuch, wenn die verborgene Plattform aus dem Pool entfernt wurde. Sie zeigten eine Tendenz, den TQ weniger zu suchen ([Abb. E](#)) und kreuzten den exakten ringförmigen Raum der Plattformposition signifikant weniger häufig ($t(10) = 2,1, p = 0,06$) als Nicht-Tg-Mäuse ([Abb. F](#)).

[0030] **Fig. 2** zeigt die Leistung im Wasserirrgarten von bitransgenen TgCRND8 x TgPS2(M239V)1379-Mäusen. Wenn sie im Alter von 2 Monaten getestet wurden, hatten die bitransgenen Mäuse (n = 5) signifikant län-

gere ($F(1,11) = 8,1$, $p < 0,05$, mit der Effektgröße aufgrund des Genotyps ($\eta^2 = 42\%$) Fluchtdistanzenzeiten ([Abb. A](#)) und Suchweg ($F(1,11) = 8,46$, $p < 0,05$, $\eta^2 = 43\%$), ([Abb. B](#)) als die Einzel-TgPS2(M239V)1379-Wurfgefährten ($n = 8$). Während dem unmittelbar darauffolgenden Lernumkehrtest, wenn die verborgene Plattform in den zu dem ursprünglichen TQ entgegengesetzten Quadranten bewegt wurde, zeigten die bitransgenen Mäuse eine Tendenz zu längeren Fluchtdistanzenzeiten ($F(1,11) = 3,28$, $p = 0,1$, $\eta^2 = 23\%$, [Abb. C](#)), aber ihre Suchwege ([Abb. D](#)) unterschieden sich nicht signifikant von den Einzel-TgPS2(M239V)1379-Mäusen ($F(1,11) = 2,46$, $p > 0,05$, $\eta^2 = 18\%$). Die Schwimmgeschwindigkeit der Mäuse in beiden transgenen Gruppen war während der Tests vergleichbar.

[0031] Wenn sie im Alter von 5 Monaten erneut getestet wurden, zeigten die bitransgenen Mäuse signifikant längere ($F(1,10) = 16,6$, $p < 0,01$, $\eta^2 = 62\%$, (1 bitransgene Maus starb)) Fluchtdistanzenzeiten ([Abb. E](#)) und signifikant längere Suchwege ($F(1,10) = 20,3$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 66\%$, [Abb. F](#)) als die Einzel-TgPS2(M239V)1379-Wurfgefährten. Diese signifikante Beeinträchtigung lag an der anfänglich schlechten Leistung der bitransgenen Mäuse in den Tests (Gruppe x Tag-Wechselwirkungen: $F(2,40) = 3,32$, $p < 0,05$ für Latenzzeit und $F(2,40) = 2,85$, $p = 0,07$ für Weg). Diese Verschlechterung bei dem Erwerb von Lernen dauerte in den Umkehrtests an, wenn die bitransgenen Mäuse immer noch signifikant längere Latenzzeiten ($F(1,10) = 28,58$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 74\%$, [Abb. G](#)) und längere Suchwege ($F(1,10) = 27,43$, $p < 0,001$, $\eta^2 = 73\%$, [Abb. H](#)) als die Einzel-Tg-Wurfgefährten zeigten. Obwohl die Mäuse schließlich ihre Leistung an dem Ende des Lernumkehrtrainings verbesserten, erreichten die Gruppe x Tag-Wechselwirkungen für beide Messungen mit $\alpha = 0,05$ nicht Signifikanz.

[0032] **Fig. 3** zeigt die Leistung im Wasserirrgarten von TgCRND8-Mäusen (Tg(APP)8); $n = 12$) und nicht-transgenen Wurfgefährten (nicht-Tg; $n = 20$), immunisiert mit A β_{42} , und TgCRND8-Mäusen (Tg(APP)8; $n = 9$) und nicht-transgenen Wurfgefährten (nicht-Tg; $n = 19$), immunisiert mit IAPP-Peptid. Die Immunisierung mit dem A β_{42} -Peptid reduzierte signifikant kognitives Defizit in TgCRND8-Mäusen, wie gemessen durch ihre Fluchtdistanzenzeit und den Suchweg, im Vergleich mit Nicht-Tg-Wurfgefährten. Obwohl die A β_{42} -immunisierten TgCRND8-Mäuse insgesamt längere Fluchtdistanzenzeiten ([Abb. A](#)) und Suchwege ([Abb. C](#)), ($F(1,30) = 9,71$, $p < 0,01$; $F(1,30) = 10,9$, $p = 0,01$ für Latenz bzw. Weg) als Nicht-Tg-Mäuse zeigten, lag der Unterschied an ihrem anfänglich längeren Suchen (Gruppe x Tag-Wechselwirkungen: $F(4,120) = 2,83$, $p < 0,05$ – Latenz; $F(3,120) = 4,73$, $p < 0,01$ – Weg). Die Vergleiche ihrer Leistung während der letzten drei Trainingstage enthielten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($F(1,30) = 0,64$, $p > 0,05$ – Latenz; $F(1,30) = 1,24$, $p > 0,05$ – Weg). Die A β_{42} -immunisierten Tg-Mäuse zeigten eine leichte Tendenz, den TQ weniger zu suchen ($F(1,30) = 3,71$, $p = 0,06$, [Abb. E](#)), aber ihre Schwimmgeschwindigkeit unterschied sich nicht signifikant von den Nicht-Tg-Mäusen ($F(1,30) = 1,33$, $p > 0,05$) ([Abb. G](#)).

[0033] Die IAPP-immunisierten TgCRND8-Mäuse zeigten signifikant längere Fluchtdistanzenzeiten ([Abb. B](#)) und Suchwege ([Abb. D](#)) als ihre Nicht-Tg-Wurfgefährten ($F(1,26) = 39,9$, $p < 0,001$ – Latenz); $F(1,26) = 43,9$, $p < 0,001$ – Weg). Obwohl sie sich nicht in ihrer anfänglichen Suche von Nicht-Tg-Mäusen unterschieden, verbesserten sie ihre Leistung während des Trainings nicht (Gruppe x Tag-Wechselwirkungen: $F(4,104) = 6,31$, $p < 0,001$ – Latenz; $F(4,104) = 5,69$, $p < 0,001$ – Weg). Sie verwendeten auch signifikant weniger Zeit darauf, den Zielquadranten zu suchen ($F(1,26) = 7,39$, $p < 0,05$, [Abb. F](#)), aber ihre Schwimmgeschwindigkeit wurde durch die Immunisierung nicht beeinflusst ($F(1,26) = 1,73$, $p > 0,05$, [Abb. H](#)).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0034] Die Erfindung stellt eine transgene Maus bereit, welche eine anormale A β -Ablagerung zeigt, ähnlich wie jene, die in einer Anzahl von menschlichen Störungen wie Alzheimersche Erkrankung (AD), die Variante der Alzheimerschen Erkrankung mit Lewy-Körperchen und gewisse Arten von Creutzfeld-Jacob-Erkrankung (CJD), welche Demenz erzeugen, und hereditäre zerebrale Angiopathie mit Amyloidose vom holländischen Typ (HCA WA-D) und senile Amyloidangiopathie, welche zerebrale Hämorrhagie verursachen.

[0035] Die transgene Maus der Erfindung zeigt sowohl histologische als auch Verhaltensdefizite als ein Ergebnis der anormalen A β -Ablagerung. Genauer zeigt die transgene Maus der Erfindung ein beschleunigtes Erscheinen verschiedener Facetten menschlicher, mit AD im Zusammenhang stehender Pathologie und stellt ein verbessertes Tiermodell von AD bereit.

[0036] Demgemäß bezieht sich die Erfindung auf einen nicht-menschlichen Säuger, der in seinem Genom ein Transgen hat, welches ein heterologes APP₆₉₅-Polypeptid, vorzugsweise ein menschliches APP₆₉₅-Polypeptid, kodiert, das sowohl die „schwedische“ Mutation als auch die „Indiana“-Mutation von Alzheimeramyloidvorläuferprotein (APP) trägt. Beide dieser Mutationen stehen bei Menschen mit familiärer Alzheimerscher Erkrankung.

kung (FAD) im Zusammenhang.

[0037] Hierin offenbart ist die Produktion einer transgenen Maus, genannt TgCRND8, welche ein APP₆₉₅-Transgen hat, welches sowohl die „schwedische“ Mutation als auch die „Indiana“APP-Mutationen trägt.

[0038] Transgenkonstrukte wurden auf einer cDNA-Kassette basiert, die die Haupt-APP-Isoform im menschlichen Gehirn, APP₆₉₅, kodiert. Diese Kassette wurde so modifiziert, dass zwei FAD-Mutationen eingeschlossen wurden (die „schwedische“ Mutation (K670N, M671L) ebenso wie die „Indiana“-Mutation (V717F), die benachbart den N- und C-terminalen Grenzen der APP-A β -Domäne liegen. Die Kassette wurde in cosTet eingeführt, ein Prionpromoterexpressionsvektor, der positionsunabhängig Transgenexpression in ZNS-Neuronen und zu einem geringeren Ausmaß in Astrocyten lenkt. Mikroinjektionen wurden durchgeführt in Oozyten mit einem genetischen Hybridhintergrund, einschließlich C3H- und C57BL6-Stämme. Die resultierende transgene Mauslinie wurde TgCRND8 genannt.

[0039] Wie von Durchschnittsfachleuten verstanden werden wird, kann jeder Promoter verwendet werden, der die Zentralnervensystem- oder neuronale Expression des Transgens lenkt. Diese schließen den neuronenspezifischen Enolasegenpromoter (37), den Promoter der Untereinheit B des menschlichen thrombozytären Wachstumsfaktors (38), den Thy-1-Promoter (19) und den Neurofilamentpromoter (41) ein.

[0040] Die Expressionskassette schließt vorzugsweise Promoter- und Genortkontrollregionsequenzen eines Gens ein, welches in dem Gehirn exprimiert wird, und vorzugsweise, welches in einem Niveau relativ zu der Anzahl der Transgenkopien, die in das Genom eingebaut sind, exprimiert wird.

[0041] Die Verwendung einer doppel-cis-mutierten APP₆₉₅-Transgenkassette wurde zuvor nicht berichtet; andere AD-Modelle verwendeten APP₇₅₁-Transgene (KM670/671NL + V717I)(19) oder APP₇₇₀-Transgene (KM670/671NL + V717F)(27).

[0042] TgCRND8-Mäuse zeigten reichlich ZNS-Amyloidablagerung in der Form von sphärischen Plaques, die für A β -Peptid immunreaktiv sind, so früh wie 90 Tage nach der Geburt; solche Plaques sind charakteristisch für menschliche AD. Isolierte Plaqueablagerungen sind in TgCRND8-Mäusen so früh wie 66 Tage nach der Geburt sichtbar. Das Erscheinen von Amyloidablagerungen in TgCRND8-Mäusen geschieht früher als in jedem zuvor berichteten Tiermodell von AD unter Ausnutzung von einzelnen Transgenen (siehe Tabelle 1).

[0043] Ein Überblick über Mausmodelle der Alzheimerschen Erkrankung wurde veröffentlicht (16) und einige Beispiele sind in Tabelle 1 aufgelistet. Wie aus den aufgelisteten Eigenschaften bemerkt wird, repräsentieren die TgCRND8-Mäuse eine unerwartete und wesentliche Verbesserung gegenüber anderen gegenwärtig erhältlichen Tiermodellen von AD.

[0044] Zum Beispiel zeigte das kürzlich beschriebene doppel-cis-mutierte APP-Transgen-Modell, die „TgAPP22“-Maus, welche eine doppelt mutierte APP₇₅₁-Kassette nutzte (KM670/671NL + V717I), das Erscheinen von A β -Plaques mit einem Alter von 18 Monaten (19), und von der J9-Linie, eine doppelt mutierte APP₇₇₀-Kassette (KM670/671NL + V717F), wurde berichtet, dass sie Plaques nach 8-10 Monaten entwickelt (27).

[0045] Die kürzlich berichtete bitransgene Maus, Tg2576 x TgPSI, hatte minimale Plaqueablagerungen in dem Zingulumcortex mit einem Alter von 70 Tagen (39), aber zeigte letztendlich gut ausgebildete Ablagerungen nach 6 Monaten (22).

[0046] Die TgCRND8-Maus und die transgenen Mäuse der Erfindung sind nützlich für die Entdeckung und Entwicklung von Diagnostik und therapeutischen Verbindungen für die Behandlung von AD, ebenso wie für die bessere Beleuchtung der pathogenen Mechanismen der Erkrankung.

[0047] TgCRND8-Mäuse zeigen Defizite im räumlichen Lernen, wie bewertet durch die Version des Morris-Wassernetzes mit verborgener Plattform. Diese Defizite, gemessen gegen nicht-transgene Kontrollwurfgefährten, können bereits mit einem Alter von 11 Wochen detektiert werden (Fig. 1).

[0048] Die Erfinder zeigten auch, dass Immunisierung von TgCRND8-Mäusen mit menschlichem A β ₄₂-Peptid, unter Verwendung des Protokolls von Schenk et al. (26), in einer signifikanten Verbesserung von sowohl dem Verhalten als auch der Neuropathologie in einem Alter von 10-22 Wochen, wie beschrieben in Beispiel 5, resultiert. Im Gegensatz dazu wurde von den durch Schenk et al. verwendeten PDAPP-Mäusen nur gezeigt,

dass sie eine Verbesserung in der Neuropathologie, nicht jedoch im Verhalten zeigen (26).

[0049] Das TgCRND8-Modell ist folglich das erste AD-Tiermodell, bei welchem von der Modulation der A β -Ablagerung (ein bekanntes und breit akzeptiertes Startereignis bei der Alzheimerschen Erkrankung) gezeigt wurde, das sie zu einer Verbesserung von sowohl der Pathologie als auch dem Verhalten f \ddot{u} hrt, wodurch folglich das zur Zeit am besten geeignete Modell zum Testen von neuen Therapien und zum Screening f \ddot{u} r therapeutische Kandidatenverbindungen bereitgestellt wird.

[0050] Solche Therapien oder Verbindungen k \ddot{o} nnten darauf gerichtet werden, die Funktion von PS 1 bei der γ -Sekretasespaltung von β APP zu inhibieren oder das Entfernen von proteolytischen Derivaten von β APP zu beschleunigen. Diese proteolytischen APP-Derivate schlie β n A β selber ein, von dem bekannt ist, dass es in aggregierten Formen neurotoxisch ist, ebenso wie die C-terminalen Derivate, die aus der γ -Sekretasespaltung von α - und β -Abschnitten (C83/C99- β APP) resultieren, von welchen vorgeschlagen worden ist, dass sie neurotoxisch sind (25).

[0051] Die transgenen M \ddot{a} use der Erfindung sind auch n \ddot{u} tzlich f \ddot{u} r die Entwicklung von neuer Diagnostik. Zum Beispiel k \ddot{o} nnen mutma β liche Tests von zerebraler A β -Last oder Tests f \ddot{u} r neuronale Verletzung in Antwort auf A β -Akumulation mit den hierin beschriebenen transgenen M \ddot{a} usen durchgef \ddot{u} hrt werden.

[0052] Die hierin beschriebenen transgenen nicht-menschlichen S \ddot{a} uger, die ein Transgen haben, das APP₆₉₅ mit sowohl der „schwedischen“ als auch der „Indiana“-Mutation kodiert, k \ddot{o} nnen mit anderen Linien des S \ddot{a} ugers gekreuzt werden, der eine andere Mutation tr \ddot{a} gt, entweder in einem Transgen oder in einem endogenen Gen, um einen „bitransgenen S \ddot{a} uger“ zu produzieren.

[0053] Ein „bitransgener S \ddot{a} uger“, wie hierin verwendet, bedeutet ein S \ddot{a} uger, dessen Genom ein Transgen umfasst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein heterologes APP₆₉₅-Polypeptid, vorzugsweise ein menschliches APP₆₉₅-Polypeptid, kodiert, die die „schwedische“ und die „Indiana“-APP-Mutationen tr \ddot{a} gt, und ein ausgew \ddot{a} hlt zweites Gen, vorzugsweise ein Gen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Protein mit wenigstens einer ausgew \ddot{a} hlten Mutation kodiert.

[0054] Das zweite Gen kann ein endogenes Gen sein, das wenigstens die eine ausgew \ddot{a} hlte Mutation tr \ddot{a} gt, oder ein homologes oder heterologes Transgen, das die wenigstens eine ausgew \ddot{a} hlte Mutation tr \ddot{a} gt. Die ausgew \ddot{a} hlte Mutation kann zum Beispiel eine mit AD im Zusammenhang stehende Mutation oder eine Mutation in einem Gen im Zusammenhang mit A β -Verarbeitung sein.

[0055] Alternativ kann das ausgew \ddot{a} hlte zweite Gen ein normales Transgen sein.

[0056] Die hierin beschriebenen TgCRND8-M \ddot{a} use sind n \ddot{u} tzlich f \ddot{u} r die Schaffung des AD-Mausmodells der Erfindung, dahingehend, dass der Weg f \ddot{u} r die beschleunigte Synthese von A β -Peptid in diesen M \ddot{a} usen nicht ges \ddot{a} tigt ist, was es ihnen erlaubt, mit anderen transgenen M \ddot{a} usen gekreuzt zu werden, um die bitransgenen Modelle der Erfindung mit weiteren Verbesserungen des mit AD im Zusammenhang stehenden pathologischen Prozesses der Amyloidpeptidsynthese und -ablagerung zu ergeben.

[0057] TgCRND8-M \ddot{a} use k \ddot{o} nnen zum Beispiel mit transgenen Tieren gekreuzt werden, die ein mutiertes Presenilingen, ein mutiertes APOE4-Gen, ein mutiertes Nicatringen oder eine andere Mutante eines APP-Gens tragen.

[0058] Folglich werden in \ddot{u} bereinstimmung mit der Erfindung bitransgene M \ddot{a} use bereitgestellt, die herstellbar sind durch Kreuzen einer TgCRND8-Maus mit

- (a) einer transgenen Maus, umfassend ein Transgen, kodierend ein mutiertes Presenilin-1-Protein, vorzugsweise ein PS1-(L286V)-Presenilin-1-Protein;
- (b) eine transgene Maus, umfassend ein Transgen, kodierend ein mutiertes Presenilin-2-Protein, vorzugsweise ein PS2-(M239V)-Presenilin-2-Protein; oder
- (c) eine transgene Maus, umfassend ein Transgen, kodierend ein Presenilin-1-Protein mit zwei Mutationen, vorzugsweise ein PS1-(M146L + L286V)-Presenilin-1-Protein.

[0059] Die durch das Kreuzen erzeugten Nachfahren der ersten Generation werden gescreent unter Verwendung von \ddot{u} blichen Verfahren auf die Anwesenheit und Expression von sowohl dem ersten als auch dem zweiten Transgen, um bitransgene M \ddot{a} use zu selektieren.

[0060] TgCRND8-Mäuse können auch mit transgenen Tieren gekreuzt werden, die eine Mutation in einem Gen im Zusammenhang mit A β -Verarbeitung tragen, wie zum Beispiel ein mit dem Rezeptor für Lipoprotein niedriger Dichte im Zusammenhang stehendes Gen, ein α 2-Macroglobulinen oder ein β -Sekretasegen.

[0061] TgCRND8-Mäuse wurden mit transgenen Mäusen gekreuzt, welche mutierte menschliche Presenilin-(PS1- oder PS2-) Transgene überexprimieren (Tabelle 2). Eine starke Zunahme in der Plaquedichte wurde in TgCRND8-Mäusen festgestellt, welche ein mutiertes menschliches Presenilintransgen, genannt TgPS1(L286V)1274 (welches eine Mutation der familiären Alzheimerschen Erkrankung (FAD) trägt), coexprimieren. Folglich ist in TgCRND8 x TgPS1(L286V)1274-Mäusen eine Amyloidlast, die stark an das postmortale AD-Gehirn erinnert, bereits im Alter von 62 Tagen vorhanden (**Fig. 1A**: vergleiche mit TgCRND8-Mäusen mit einem Alter von 117 Tagen in [Abb. C](#)).

[0062] In einer ähnlichen Weise resultiert das Kreuzen von TgCRND8-Mäusen mit Mäusen, die die mutierte FAD-Form von Presenilin 2 (eine Methionin-zu-Valin-Mutation beim Aminosäurerest 239 der das PS2-Gen kodierenden Region) tragen, ebenfalls in einer starken Zunahme in der Plaquedichte. Ein Vergleich im Alter von 91 Tagen von TgCRND8- und TgCRND8 x TgPS2(M239V)-Mäusen (wo die PS2-Transgenlinie mit 1379 bezeichnet wird) ist in **Fig. 2** gezeigt.

[0063] Eine noch stärkere Steigerung wurde erhalten durch Kreuzen von TgCRND8-Mäusen mit Mäusen, die ein mutiertes menschliches Presenilintransgen mit zwei FAD-Mutationen in cis zueinander tragen – genannt Tg(M146L + L286V)6500. In TgCRND8 x TgPS1(M 146L + L286V)6500-Mäusen waren Hippocampusamyloidablagerungen mit einem Alter von 30 Tagen detektierbar (**Fig. 3**), was 5 Monate früher ist als kürzlich berichtet für irgendeine andere Doppel-APP/PS1-Tg-Maus (welche typischerweise Plaques mit oder nach einem Alter von 6 Monaten entwickeln) (22, 23).

[0064] Sämtliche dieser bitransgenen Mäuse der Erfindung zeigten sogar ein noch beschleunigteres Erscheinen von Hippocampusamyloidplaques, verglichen mit entweder dem TgCRND8-Elter oder dem TgPS1-Elter (Tabelle 2).

[0065] Zusätzlich zu dem beschleunigten Auftreten von mit AD im Zusammenhang stehenden Eigenschaften im Vergleich mit kürzlich beschriebenen Tg-Mäusen zeigen vorläufige Analysen, dass ein wesentlicher Verlust kortikaler Neuronen in 43 Tage alten bitransgenen TgCRND8 x TgPS1(M146L + L286V)6500-Mäusen ersichtlich ist.

[0066] Eine fortschreitende Zerstörung in der kognitiven Leistung, beginnen mit dem Alter von 8-10 Wochen, wurde auch in bitransgenen Mäusen, erzeugt durch Kreuzen von TgCRND8-Mäusen mit Mäusen, die ein FAD-Allel von Presenilin 2 exprimieren (TgPS2(M239V), Linie 1379 (**Fig. 5**)), gesehen.

[0067] Die hierin beschriebenen TgCRND8-Mäuse und Kreuzungen dieser Mäuse mit anderen Mauslinien, die eine ausgewählte Mutation tragen, zum Beispiel eine mit AD in Zusammenhang stehende Mutation, wie weiter hierin beschrieben, sind für eine Anzahl von Zwecken nützlich.

[0068] Diese Mäuse können verwendet werden, um mögliche pharmazeutische Verbindungen für ihre Effizienz beim Verhindern oder Verzögern der Entwicklung irgendeiner der pathologischen Indizien, zum Beispiel die mit AD im Zusammenhang stehenden phänotypischen Merkmale, die in diesen Mäusen gesehen werden, zu screenen. Es wird folglich ein Verfahren zum Screenen von Kandidatenverbindungen für ihre Effizienz beim Verhindern oder Verzögern der Entwicklung von AD in Aussicht gestellt. Das Screeningverfahren umfasst das Verabreichen einer Kandidatenverbindung an eine transgene Maus der Erfindung vor dem Erscheinen eines ausgewählten, mit AD im Zusammenhang stehenden phänotypischen Merkmals und Vergleichen des Alters, an welchem das ausgewählte phänotypische Merkmal in der behandelten Maus erscheint, mit jenem Alter des Auftretens jenes Merkmals in unbehandelten transgenen Mäusen. Geeignete mit AD im Zusammenhang stehende Merkmale für die Untersuchung würden das Auftreten von anormaler Gehirnhistologie oder das Auftreten von Verhaltensdefiziten einschließen. Verhaltensdefizite können zum Beispiel bestimmt werden durch Untersuchen der Leistung der Mäuse in einem Gedächtnis- oder Lerntest, wie zum Beispiel in dem Wasserirrgartentest, wie hierin beschrieben.

[0069] Diese Mäuse können auch verwendet werden, um potenzielle pharmazeutische Verbindungen für ihre Effizienz beim Verbessern der Symptome von AD zu screenen durch ähnliches Verabreichen und Vergleichen der Wirkungen von Kandidatenverbindungen in transgenen Mäusen nach dem Auftreten eines ausgewählten, mit AD im Zusammenhang stehenden Merkmals, wie zum Beispiel anormale Gehirnhistologie oder ein Verhal-

tensdefizit.

[0070] Die spezifische Ätiologie der Erkrankung kann während dem Wachstum und der Entwicklung von transgenen Tieren identifiziert werden, um das Erkrankungsfortschreiten und die Wirkungen sowohl physiologisch als auch physikalisch zu studieren. Transgene Mäuse der vorliegenden Erfindung, welche in einer kurzen Zeit Aβ im Gehirn schnell überexprimieren, können nun gemacht und studiert werden und als ein Modell verwendet werden, um mögliche Therapien zu studieren, einschließlich pharmazeutischem Eingriff, Gen-Targeting-Techniken, Antisense-Therapien, Antikörpertherapien etc.. Weiterhin können transgene In-vitro-Zelllinien nun auch etabliert werden und auch verwendet werden, um intrazelluläre Signalisierungssysteme zu beleuchten, die in der Erkrankung involviert sind, ebenso wie um potenzielle therapeutische Verbindungen zu testen und zu identifizieren.

[0071] Ferner können die transgenen Mäuse der vorliegenden Erfindung auch verwendet werden, um Situationen oder Umweltrisiken zu untersuchen, die verdächtigt werden, Alzheimersche Erkrankung zu beschleunigen oder auszulösen, wie zum Beispiel Kopftrauma oder toxische Umweltmittel. In diesem Fall kann die transgene Maus an eine bestimmte Situation ausgesetzt werden und dann beobachtet werden, um eine Verschlechterung in Bezug auf das neurobiologische Verhalten, vorzeitigen Tod, Gliose etc. als Indikatoren der Fähigkeit der Situation zu bestimmen, um weiter AD herauszufordern und/oder zu verstärken.

[0072] Die transgenen Mäuse der vorliegenden Erfindung sind nützlich für die detaillierte Charakterisierung von Alzheimerscher Erkrankung, um zur Beleuchtung der Pathogenese der progressiven neurologischen Pathologie und zur Bestimmung der Sequenz von molekularen Ereignissen zu führen. Die transgenen Mäuse sind nützlich zum Studieren verschiedener vorgeschlagener Mechanismen der Pathogenese der Erkrankung, um zu besseren Behandlungen für die Erkrankung zu führen.

[0073] Die transgenen Mäuse der Erfindung sind auch nützlich für die Identifikation von zuvor unerkannten Genen, welche auch eine Rolle bei AD spielen mögen, entweder eine günstige oder eine schädliche. Eine transgene Maus, die ein Kandidatengen trägt, wird mit einer transgenen Maus der Erfindung gekreuzt und die Wirkung der Anwesenheit des Kandidatengens auf die mit AD im Zusammenhang stehenden Merkmale der transgenen Maus werden untersucht. Ein Kandidatengen wird als günstig bewertet werden, falls es mit AD im Zusammenhang stehende Phänotypen wie Amyloidablagerung und beeinträchtigte kognitive Leistung verzögert oder abschwächt. Umgekehrt wird ein Kandidatengen als die Entwicklung von AD begünstigend bewertet werden, falls es das Alter des Einsetzens vorschreibt oder die Penetranz von mit AD im Zusammenhang stehenden Phänotypen wie Amyloidablagerungen und beeinträchtigte kognitive Leistung verstärkt.

[0074] Zusätzlich sind die transgenen Mäuse der Erfindung nützlich für das Testen von möglichen Gentherapien für familiäre AD, zum Beispiel Gentherapie durch Verabreichung von zusätzlichen Kopien eines normalen Presenilins.

[0075] Es wird von Fachleuten verstanden werden, dass die transgenen Mäuse der vorliegenden Erfindung nicht-menschliche Tiermodelle von menschlicher Alzheimerscher Erkrankung bereitstellen. Solche Modelle sorgen für die Identifikation der Rolle von βAPP und Aβ-Peptid während der Embryogenese, Wachstum und Entwicklung und für das Verstehen der Funktion von βAPP und Aβ-Peptid, wie sie bei der Alzheimerschen Erkrankung involviert sind.

[0076] Mäuse werden oftmals für transgene Tiermodelle genutzt, da sie leicht zu halten sind, vergleichsweise billig und leicht zu züchten sind. Es können jedoch auch andere nichtmenschliche transgene Säuger gemacht werden, wie zum Beispiel, jedoch nicht beschränkt auf Affen, Schaf, Kaninchen und Ratten. Transgene Tiere sind jene, die ein Transgen tragen, d. h. ein kloniertes Gen, eingeführt und stabil eingebaut, welches an nachfolgende Generationen weitergegeben wird. In der vorliegenden Erfindung wurde die menschliche APP₆₉₅-cDNA kloniert und modifiziert, um zwei FAD-Mutationen zu enthalten, die „schwedische“ (K670N, M671L) und die „Indiana“-Mutation (V717F). Dieses Konstrukt wurde dann stabil in das Genom einer Maus eingebaut.

[0077] Es gibt etliche Verfahren, durch welche ein transgenes Tiermodell geschaffen wird, das eine gewisse Gensequenz zusätzlich zu jenem trägt, das spezifisch hierin beschrieben ist.

[0078] Erzeugung einer spezifischen Änderung/Mutation der menschlichen APP-Gensequenz ist eine Strategie. Änderungen können bewerkstelligt werden durch eine Reihe von enzymatischen und chemischen Verfahren, die in vitro verwendet werden. Eines der häufigsten Verfahren ist die Verwendung eines spezifischen Oligonukleotids als ein Mutagen, um exakt bezeichnete Deletionen, Insertionen und Punktmutationen in einer

DNA-Sequenz zu erzeugen. Zweitens könnte ein menschliches Wildtypgen und/oder humanisiertes Mausgen durch homologe Rekombination inseriert werden. Es ist auch möglich, ein geändertes oder mutiertes (einzelns oder multiples) menschliches Gen als genomische oder Minigenkonstrukte unter Verwendung von Wildtyp- oder mutierten oder künstlichen Promotorelementen zu inserieren. Knockout der endogenen Mausgene kann bewerkstelligt werden durch die Insertion von künstlich modifizierten Fragmenten des endogenen Gens durch homologe Rekombination. Bei dieser Technik werden mutierte Allele durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen eingeführt. Die embryonalen Stammzellen, die eine Knockoutmutation in einem Allel des studierten Gens enthalten, werden in frühe Mausembryonen eingeführt. Die resultierenden Mäuse sind Chimären, die Gewebe enthalten, abgeleitet von sowohl den transplantierten ES-Zellen als auch den Wirtszellen. Die chimären Mäuse werden gepaart, um zu bewerten, ob die Mutation in die Keimbahn eingebaut ist. Jene chimären Mäuse, die jeweils für die Knockoutmutation heterozygot sind, werden gepaart, um homozygote Knockout-Mäuse zu erzeugen.

[0079] Gentargeting, das Gen-Knockouts produziert, erlaubt einem, In-vivo-Funktion eines Gens zu bewerten, welches geändert worden ist und verwendet worden ist, um eine normale Kopie zu ersetzen. Die Modifikationen schließen Insertion eines mutierten Stopcodons, die Deletion von DNA-Senuenzen oder der Einschluss von Rekombinationselementen (lox-p-Stellen), erkannt durch Enzyme wie Cre-Rekombinase, ein. Cre-lox-System sorgt für die Ablation eines gegebenen Gens oder die Ablation eines gewissen Teils der Gensequenz.

[0080] Um ein Gen zu inaktivieren, kann chemische oder Röntgenmutagenese von Mausgameten angewendet werden, gefolgt von Fertilisierung. Heterozygote Nachfahren können dann durch Southern Blotting identifiziert werden, um den Verlust eines Allels durch Dosierung oder Unvermögen, ein elterliches Allel zu erben, unter Verwendung von RFLP-Marker zu zeigen.

[0081] Um eine transgene Maus zu schaffen, kann eine geänderte Version des menschlichen Gens von Interesse in eine Mauskeimlinie unter Verwendung von Standardtechniken der Oocytenmikroinjektion oder Transfektion oder Mikroinjektion in Stammzellen inseriert werden. Alternativ, falls es gewünscht wird, das endogene Gen zu inaktivieren oder zu ersetzen, kann homologe Rekombination unter Verwendung von embryonalen Stammzellen angewendet werden, wie oben beschrieben.

[0082] Für die Oocyteninjektion können eine oder mehrere Kopien der geänderten/mutierten menschlichen APP-Gensequenz in den Vorkern einer gerade befruchteten Mausoocyte inseriert werden. Diese Oocyte wird dann in eine pseudoschwangere Pflegemutter reimplantiert. Die lebend geborenen Mäuse können dann für Integranter unter Verwendung von Analyse von Schwanz-DNA für die Anwesenheit der geänderten APP-Gensequenzen gescreent werden. Das Transgen kann entweder eine vollständige genomische Sequenz sein, injiziert als ein YAC oder Chromosomfragment, eine cDNA mit entweder dem natürlichen Promoter oder einem heterologen Promoter, oder ein Minigen, enthaltend die gesamte kodierende Region und der anderen Elemente, welche als für die optimale Expression notwendig befunden werden.

[0083] Retrovirusinfektion von frühen Embryonen können auch gemacht werden, um das geänderte Gen zu inserieren. Bei diesem Verfahren wird das geänderte Gen in einen Retrovirusvektor inseriert, welcher verwendet wird, um direkt Mausembryonen während den frühen Stadien der Entwicklung zu infizieren, um eine Chimäre zu erzeugen, von welchen manche zu Keimbahntransmission führen werden.

[0084] Homologe Rekombination unter Verwendung von Stammzellen sorgt für das Screening von Gentransferzellen, um die seltenen homologen Rekombinationsereignisse zu identifizieren. Wenn sie erst einmal identifiziert sind, können diese verwendet werden, um Chimären durch Injektion von Mausblastocysten zu erzeugen, und ein Teil der resultierenden Mäuse werden Keimbahntransmission für die rekombinante Linie zeigen. Diese Gentargetingmethodologie ist besonders nützlich, falls Inaktivierung des Gens gewünscht wird. Zum Beispiel kann Inaktivierung des Gens gemacht werden durch Gestalten eines DNA-Fragments, welches Sequenzen eines Exons enthält, das einen selektierbaren Marker flankiert. Homologe Rekombination führt zu der Insertion der Markersequenzen in die Mitte des Exons, wodurch das Gen inaktiviert wird. DNA-Analyse von einzelnen Klonen kann dann verwendet werden, um die homologen Rekombinationsereignisse zu erkennen.

[0085] Es ist auch möglich, Mutationen in der Mauskeimbahn zu erzeugen durch Injizieren von Oligonukleotiden, die die Mutation von Interesse enthalten, und Screening der resultierenden Zellen durch PCR.

[0086] Ein Fachmann würde leicht verstehen, dass die Nukleinsäurekonstrukte, wie sie verwendet werden, um die transgenen Säuger der Erfahrung zu erzeugen, jede geeignete Nukleinsäuresequenz enthalten kön-

nen, welche das mutierte APP₆₉₅-Protein kodiert, welches zu einer gesteigerten A β -Produktion im Gehirn führt. Solche Nukleinsäuresequenz ist vorzugsweise die mutierte APP₆₉₅-cDNA voller Länge, kann jedoch andere geänderten Derivate solcher Sequenz umfassen, solange wie die gewünschte mutierte Form des Proteins exprimiert und A β -Produktion merklich gesteigert ist.

BEISPIELE

[0087] Beispiele werden für Zwecke der Erläuterung beschrieben und es ist nicht beabsichtigt, dass sie den Schutzzumfang der Erfindung beschränken.

[0088] Verfahren der Synthesechemie, Protein- und Peptidbiochemie, Molekularbiologie, Histologie und Immunologie, auf die Bezug genommen wird, die aber nicht ausdrücklich in dieser Offenbarung und den Beispielen beschrieben sind, werden in der wissenschaftlichen Literatur berichtet und sind Fachleuten wohl bekannt.

Präparatives Beispiel 1 – Transgene TgCRND8-Mäuse

[0089] Eine menschliche β -Amyloidvorläuferprotein(1)- (APP)- cDNA-Kassette, umfassend 90 Basenpaare der 5'-untranslatierten Region, eine 695 Aminosäurenreste umfassende kodierende Region („APP695“) und 271 bp der 3 "-untranslatierten Region wurde mutageniert, um jeweils in *cis* zueinander zwei Mutationen, die mit familiärer Alzheimerscher Erkrankung (FAD) verbunden sind, einzuführen. Die erste Mutation war die „schwedische“ Mutation (2), eine Dinukleotidänderung, welche zwei benachbarte Codons betrifft (KM670/671NL: GA \rightarrow TC bei den Nukleotiden 1785 und 1786, unter Verwendung der Codon/Nukleotid-Nummerierung des APP770-Transkriptes (1)). Die zweite Mutation war eine einzelne Nukleotidänderung erzeugend die V717F-Substitution (3) G \rightarrow T beim Nukleotid 1924 unter Verwendung der Codon/Nukleotid-Nummerierung des APP770-Transkriptes (1)). Das APP695-Transkript, welchem die Exons 7 und 8 fehlt, die die Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne kodieren, ist das im Gehirn hauptsächlich exprimierte Transkript. Die doppelt mutierte APP-cDNA-Kassette wurde in den Prionproteinexpressionsvektor cosTet inseriert (10).

[0090] Der resultierende rekombinante Cosmidklon wurde in Kultur vermehrt, lysiert, um supergeknäulte DNA zu ergeben, und das Säuger-DNA-Insert, umfassend die PrP-Genregulationselemente und die APP-Kodierregion, wurde aus den prokaryotischen Vektorsequenzen in diesem molekularen Klon durch Verdauung mit der Restriktionsendonuklease Not 1 ausgeschnitten. Nach Agarosegelektrophorese, um dieses Transgen-Not-1-DNA-Fragment aufzureinigen, wurde gereinigte DNA in fertilisierte Mausoozyten (durch Paarung (C3H x C57BL6) x Mäuse gewonnen) unter Verwendung von Standardprotokolls mikroinjiziert (29). Nach Implantation in Pflegemütter wurden transgenpositive Nachfahren unter den Lebendgeburten durch Hybridisierungsanalyse von Schwanz-DNA unter Verwendung eines DNA-Sondenfragmentes, gewonnen von der 3'untranslatierten Region des PrP-Gens des syrischen Hamsters, gescreent (30).

[0091] APP-spezifische Antikörper (Senetek Inc., Boehringer-Mannheim) wurden verwendet, um Transgenexpression in transgenpositiven Nachfahren festzustellen. 10 % Gehirnhomogenate, hergestellt in 0,32 M Saccharose, wurden mit Laemlli-Puffer verdünnt, beschallt und auf 10-20 % Tric平gradientengelen (Novex) laufen gelassen. Nach Transfer auf Nitrocellulose wurden menschliches APP und PSI detektiert unter Verwendung von C- und N-terminal spezifischen Mabs und entwickelt durch ECL (Amersham). Die Ergebnisse sind in Fig. 6 gezeigt. Zusätzlich zu reifem und unreifem APP-Holoprotein voller Länger mit 120 und 100 kDa ergaben Westernblotanalysen Arten mit niedrigerem Molekulargewicht in Gehirnextrakten von TgCRND8-Mäusen, mit niedrigeren Spiegeln an APP-Expression. Detektion dieser Arten mit 6E10-Antiserum (N-terminal zu der α -Sekretasespaltstelle positioniert) und Antikörper 369 zeigt, dass diese von dem C-Terminus von APP stammen. Diese waren wahrscheinlich APP-Verarbeitungszwischenprodukte, die sich zu hohen Spiegeln aufgrund von Überexpression anhäuften, und entsprechen C-terminalen Fragmenten (CTFs), die bei der β -Sekretasestelle beginnen (sogenannte β -Stümpfe). In gealterten TgCRND8-Mäusen, nicht aber in altersangepassten Nicht-Tg-Wurfgefährten oder Tg2576-Mäusen, wurden ebenfalls steigende Spiegel von 4kDa-Arten beim Altern der Tiere detektiert. Die immunreaktiven 4kDa-Arten entsprechen dem A β -Peptid, welches sich während der Lebenszeit dieser Tiere zu hohen Spiegeln anhäuft.

[0092] Mikroinjektion von DNA-Transgenen in Oozyten, wie oben beschrieben, führt zur zufälligen Insertion der Transgene in das Mausgenom. Restriktionsendonukleasekartierung von inserierten Transgenen zeigt, dass sie in Kopf-Schwanz-Anordnungen inseriert sind, wobei die Anzahl von Transgenen pro Anordnung (Kopienzahl) mehr als 100 Transgenkopien pro haploides Genom erreicht (24).

[0093] Transgene Mäuse, die menschliches APP exprimieren, sollten eine Überexpression von APP zeigen,

vorzugsweise das 5- bis 6-fache des endogenen Expressionsspiegels, für eine optimale Amyloidgenese. APP-Expression im Gehirn wird bestimmt durch Westernblotanalyse unter Verwendung eines APP-gerichteten Antikörpers wie zum Beispiel 22C11 (Roche Diagnostics), welcher sowohl Maus- als auch menschliches APP erkennt.

[0094] Vorangegangene Arbeiten an dem Prionprotein cos.Tet-Vektor zeigten eine positionsunabhängige Expression von Transgenanordnungen, so dass die Transgenexpressionsspiegel parallel mit der Kopieanzahl steigen (4, 40). Wenn dieser Vektor verwendet wird, können transgene Mäuse mit dem gewünschten hohen Maß an APP-Expression deshalb zuerst identifiziert werden durch Identifizieren durch Hybridisierungsanalyse (30) von transgenpositiven Mäusen mit einer hohen Transgenkopiezahl, vorzugsweise wenigstens 30 Kopien.

[0095] Obwohl Mäuse, die den genetischen FVB/N-Hintergrund enthalten, zu frühem Tod im frühen Erwachsenenleben neigen, was einem schlecht definierten Effekt von APP-Überexpression zugeschrieben wird, wird diese Tendenz abgeschwächt bei einem genetischen Hintergrund, abgeleitet aus C57 und C3H-Stämmen. Die TgCRND8-Mäuse belegen deshalb, dass Spiegel von A β -Peptid ohne Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit toleriert werden können.

Neuropathologische Änderungen bei TgCRND8-Mäusen

[0096] Immunfärbung wurde durchgeführt unter Verwendung des menschlichen spezifischen Antikörpers 4G8, welcher mit dem proteolytischen A β -Fragment von APP reagiert, unter Verwendung von Schnitten von formalinfixiertem, in Paraffinwachs eingebettetem Gehirnmaterial. Standardprotokolls für dieses immunhistochemische Vorgehen wurden anderswo beschrieben (17, 20, 23). Isolierte Plaqueablagerungen wurden als erstes in TgCRND8-Mäusen so früh wie 60 Tage nach der Geburt sichtbar, mit einer starken Ablagerung von diffusen Amyloidplaques vom 90. Tag des Alters an. Plaques mit dichtem Kern waren mit einem Alter von 4-5 Monaten ersichtlich, wobei viele dieser Typen an Ablagerungen mit Kongorot (ein Reagenz, das in β -faltblattreiche Amyloidablagerungen interkaliert) färbten, um grün/goldene Doppelbrechung unter polarisiertem Licht zu ergeben. Ähnlich doppelbrechende Ablagerungen sind in menschlichen AD-Gehirnproben vorhanden. Amyloidablagerungen waren im Hippocampus und zerebralen Cortex (besonders im frontalen Cortex) von TgCRND8-Mäusen auffallend, Bereiche, die durch Alzheimersche Erkrankung in Menschen stark betroffen sind. Das Cerebellum, welches gewöhnlich bei sporadischer AD verschont wird, welches jedoch durch diffuse A β -Ablagerungen in schweren, früh einsetzenden Fällen von AD leicht betroffen sein kann, ist ebenfalls in ein Jahr alten TgCRND8-Mäusen und in TgCRND8-Mäusen, die mutiertes PS1 oder PS2 coexprimieren, im Alter von 6 Monaten leicht betroffen.

[0097] Obwohl das APP systemisch in TgCRND8-Mäusen exprimiert wurde (wie es das Hamster-PrP-Gen ist), waren Amyloidablagerungen durch Immunfärbung nicht ersichtlich in der Niere, im Skelettmuskel und Herzmuskel von gealterten Tieren mit stark ausgeprägter ZNS-Ablagerung, obwohl diese bekannte Stellen für PrP-mRNA-Expression sind.

Verhaltensänderungen bei TgCRND8-Mäusen

[0098] Räumliches Lernen wurde bewertet in TgCRND8-Mäusen unter Verwendung eines wohl etablierten Paradigmas, der Morris-Wasserirrgarten (31), wie beschrieben (32). Die Analyse des Verhaltens von TgCRND8-Mäusen ergab so früh wie im Alter von 11 Wochen ein signifikantes kognitives Defizit bei ihrem Erwerb von räumlicher Information, bewertet bei der Version der Platzunterscheidung (verborgene Plattform in derselben räumlichen Position) des Wasserirrgartens. Während des Trainings zeigten die Mäuse eine signifikant langsamere Lernrate, wiedergespiegelt durch ihre längeren Fluchtdistanzen und Suchwege, ebenso wie bei der Suche auf einem zufälligen Niveau des Quadranten, der die verborgene Plattform enthält (Fig. 1). Die TgCRND8-Mäuse zeigten auch Defizite im räumlichen Gedächtnis, wenn sie in dem Sondierungspfad getestet werden. Während dieses Versuchs wurde die verborgene Plattform entfernt und den Mäusen wurde erlaubt, für ihre Position für 60 Sekunden zu suchen. Während die Nicht-Tg-Mäuse eine deutliche, selektive räumliche Tendenz für die Plattformposition zeigten (Fig. 1, Fig. E und Fig. F), war die Suche von TgCRND8-Mäusen generalisierter und schloss die Nachbarschaft zu TQ-Quadranten ein und sie querten den Annulus der Plattformposition signifikant weniger als Nicht-Tg-Wurfgefährten. Die Schwimmfähigkeiten von sowohl APP-positiven als auch Nicht-Tg-Mäusen waren während des Testens vergleichbar, beeinflussten folglich die Messungen des Lernens nicht ungünstig.

Beispiel 2-Bitransgene TgCRND8 x TgPS1 (L286V)1274-Mäuse

[0099] TgCRND8-Mäuse wurden mit transgenen Mäusen gepaart, die ein mit FAD im Zusammenhang stehendes mutiertes Presenilin-1-Gen tragen, genannt TgPS1 (L286V) Linie 1274, ihre Jungen wurden gesäugt und Schwanzbiopsien wurden für die Zubereitung von genomischer DNS entfernt. Gereinigte Schwanz-DNAs wurden in doppelten „dot-blot“-Anordnungen auf einer Nylonmembran immobilisiert und damit unter Verwendung einer für das Gen für die menschliche APP-Kodierregion spezifische Sonde, ausgeschnitten aus einem cDNA-Klon, oder einem menschlichen PS1-Klonerregionssondenfragment, ausgeschnitten aus einem cDNA-Klon, hybridisiert. Diese DNA-Restriktionsfragmente wurden durch zufälliges Priming mit α -32p-dCTP (33) markiert. Die doppelten Nylonmembranen wurden mit entweder APP- oder PS1-Hybridisierungssonden inkubiert und wurden in einer Lösung aus 0,1 % Natriumdodecylsulfat, 0,1 x Salzlösung Natriumcitrat bei einer Temperatur von 65 °C (dies entspricht einer „stringenten“ Posthybridisierungswaschung, so dass Signale, stammend von endogenen PS1- und APP-Genen in dem Mausgenom minimiert werden) gewaschen. Bitransgene Mäuse wurden identifiziert aufgrund der Tatsache, dass die entsprechenden Schwanz-DNA-Proben sowohl an die APP- als auch die PS1-genspezifischen Sonden hybridisierten.

Neuropathologische Änderungen in bitransgenen TgCRND8 x TgPS1 (L286V)1274-Mäusen

[0100] Amyloidablagerung wurde in den resultierenden bitransgenen Mäusen verstärkt, diese Mäuse zeigten eine Amyloidlast, die stark an das postmortale menschliche AD-Gehirn erinnert, in einem Alter von 62 Tagen.

[0101] In gealterten Mäusen war Amyloidablagerung wesentlich stärker ausgeprägt, so dass sie auf Strukturen ausgedehnt wurde, die gewöhnlich bei einzeltransgenen Mäusen verschont blieben (z. B. Cerebellum).

Beispiel 3 – Bitransgene TgCRND8 x TgPS2(M239V)1379-Mäuse

[0102] TgCRND8-Mäuse wurden auch mit der Transgenlinie, genannt TgPS2(M239V) Linie 1379, gekreuzt, welche ein mutiertes Presenilin-2-Allel im Zusammenhang mit demselben PrionproteinCosmidexpressionsvektor cosTet exprimiert. Bitransgene TgCRND8 x TgPS2(M239V)1379-Mäuse wurden genotypisiert, wie beschrieben oben für TgCRND8 x TgPS 1(L286V)1274-Mäuse, mit der Ausnahme, dass eine PS2-Kodierregion-DNA-Hybridisierungssonde anstelle einer PS 1-Kodierregionhybridisierungssonde verwendet wurde.

[0103] Diese bitransgenen Mäuse zeigten 91 Tage nach der Geburt reiche ZNS-Amyloidablagerungen in der Form von sphärischen Plaques, die immunreaktiv für A β -Peptid sind. Diese Amyloidablagerungen waren in dem Hippocampus und zerebralen Cortex lokalisiert, Bereiche, die von Alzheimerscher Erkrankung im Menschen stark betroffen sind. Das Cerebellum wird gewöhnlich durch diffuse A β -Ablagerungen nur in schweren früh einsetzenden Fällen von Alzheimerscher Erkrankung betroffen; es ist betroffen in Mäusen mit den allerschwersten Plaquelasten.

Verhaltensänderungen in bitransgenen TgCRND8 x TgPS2(M239V)1379-Mäusen

[0104] Bitransgene TgCRND8 x TgPS2(M239V)1379-Mäuse wurden mit einem Alter von 2 Monaten getestet und zeigten einen signifikanten kognitiven Defekt beim Erwerb von räumlichem Lernen mit der Effektgröße im Bereich von 40 % (**Fig. 2, Abb. A** und **Abb. B**). Während dem folgenden Umkehrtest zeigten die bitransgenen Mäuse jedoch, obwohl sie am Anfang schwächer waren, eine vergleichbare Leistung am Ende des Tests (ungefähr 20 % Varianz, erklärt durch den Transgenotyp) (**Fig. 2, Abb. C** und **Abb. D**). Während dem erneuten Test in einem Alter von 5 Monaten zeigten dieselben bitransgenen Mäuse hochsignifikante Lerndefizite während dem Erwerb und Umkehrtest (Effektgröße aufgrund von Transgenotyp von 60 bzw. 70 %) (**Fig. 2, Abb. E** und **Abb. F**). Auch unterschieden sich die bitransgenen Mäuse bei jedem untersuchten Alter nicht von TgPS2(M239V)1379-Mäusen in ihrer Schwimmgeschwindigkeit. Expression von mutiertem menschlichen APP in der Anwesenheit von mutiertem PS2-Gen verleiht Beeinträchtigung im räumlichen Lernen und Gedächtnis so früh wie mit einem Alter von 2 Monaten, wie verglichen mit der Leistung von TgPS2(M239V)1379-Mäusen, welche sich in einer Weise ähnlich verhalten wie nicht transgene Mäuse, gewonnen aus derselben Kombination von Inzuchtstämmen. Diese Beeinträchtigung schreitet mit dem Alter fort und mit dem Alter von 5 Monaten zeigten die Mäuse konstante Defizienz beim Erwerb von neuer räumlicher Information.

Beispiel 4 – Bitransgene TgCRND8 x Tg(M146L + L386V)6500-Mäuse

[0105] TgCRNDB-Mäuse wurden gekreuzt mit transgenen Mäusen, die zwei Mutationen von PS1 tragen

(M146L + L286V) (34). Die doppelt mutierten PS1-Mäuse wurden geschaffen durch Standardvorgänge, wie kürzlich beschrieben (35). Bitransgene Mäuse wurden identifiziert durch Genotypanalyse von Schwanz-DNA durch Hybridisierung mit zwei unabhängigen DNA-Sonden, wie oben beschrieben für TgCRND8 x TgPS1(L286V)1274 bitransgenen Mäusen.

[0106] Die resultierenden doppel bitransgenen Mäuse zeigten punktförmige AB-Amyloidablagerungen in dem Cortex in einem Alter von einem Monat, mit mehrfachen diffusen Ab-Amyloidplaques vorhanden im Alter von 43 Tagen. Etliche der im Alter von 43 Tagen erschienenen Plaques waren kongophil, d.h. können mit dem Kongorotreagenz gefärbt werden).

Vergleichsbeispiel 5 – Aktive Immunisierung gegen A β ändert kognitive Defizits in TgCRND8-Mäusen

[0107] Eine Gruppe aus TgCRND8-Mäusen und eine Gruppe aus nicht-transgenen Wurfgefährten wurden mit synthetischen A β 42-Peptid immunisiert, wie beschrieben durch Schenk et al. (36). Kontrollgruppen aus TgCRND8-Mäusen und nicht transgenen Wurfgefährten wurden immunisiert mit einem amyloidogenen Kontrollpeptid (Inselamyloidpolypeptid (IAPP), welches mit der Pathogenese von Diabetes in Zusammenhang steht). Die Leistung dieser beiden transgenen Gruppen im Wasserirrgartentest, wie oben beschrieben, wurde mit der Leistung von Nicht-Tg-Wurfgefährten verglichen. Die Ergebnisse sind in **Fig. 3** gezeigt.

[0108] Wie in **Fig. 3** gesehen wird, schwächte die Immunisierung mit A β 42-Peptid die kognitive Beeinträchtigung von TgCRND8-Mäusen in frühen Stadien der Immunisierung ab. Die Wasserirrgartenleistung von TgCRND8-Mäusen, die mit A β ₄₂ oder 1APP immunisiert worden sind (Immunisierung begann mit einem Alter von 6 Wochen), wurde mit einem Alter von 11 Wochen getestet. Die Immunisierung mit dem A β ₄₂-Peptid reduzierte signifikant kognitives Defizit in TgCRND8-Mäusen, wie gemessen durch Fluchtlatenzzeit (**Abb. A**) und Suchweglänge (**Abb. D**), im Vergleich mit Nicht-Tg-Wurfgefährten. Obwohl die mit A β 42 immunisierten TgCRND8-Mäuse insgesamt längere Fluchtlatenzzeiten (**Abb. A**) und Suchwege zeigten (**Abb. D**), (F(1,30) = 9,71, p < 0,01; F(1,30) = 10,9, p < 0,01 für Latenz bzw. Weg) als Nicht-Tg-Mäuse, lag der Unterschied an ihrem längeren Ausgangssuchen (Gruppe x Tag Wechselwirkungen: F(4,129)-2,83, p < 0,05 – Latenz; F(3,120) = 4,73, p < 0,01 – Weg). Die Vergleiche ihrer Leistung während der letzten drei Tage des Trainings ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (F(1,30) = 0,64, p > 0,05 – Latenz; F(1,30) = 1,24, p > 0,05 – Weg). Die mit A β 42 immunisierten TgCRND8-Mäuse zeigten eine leichte Tendenz, den TQ weniger zu suchen (F(1,30) = 3,71, p = 0,06, **Abb. E**), aber ihre Schwimmgeschwindigkeit (**Abb. G**) unterschied sich nicht signifikant von Nicht-Tg-Mäusen (F(1,30) = 1,33, p > 0,05). Die IAPP-immunisierten TgCRND8-Mäuse zeigten signifikant längere Fluchtlatenzzeiten (**Abb. B**) und Suchwege (**Abb. C**) als ihre Nicht-Tg-Wurfgefährten (F(1,26) = 39,9, p < 0,001 – Latenz; F(1,26) = 43,9, p < 0,001 – Weg). Obwohl die transgenen Tiere sich nicht in ihrer Ausgangssuche von den Nicht-Tg-Mäusen unterschieden, verbesserten sie ihre Leistung während des Trainings nicht (Gruppe x Tag – Wechselwirkungen: F(4,104) = 6,31, p < 0,001 – Latenz; F(4,104) = 5,69, p < 0,001 – Weg). Sie verbrachten auch signifikant weniger Zeit mit Suchen des Zielquadranten (F(1,26) = 7,39, p < 0,05, **Abb. F**), aber ihre Schwimmgeschwindigkeit war durch die Immunisierung nicht beeinträchtigt (F(1,26) = 1,73, p > 0,05, **Abb. H**).

[0109] Zusammenfassend verbesserte die Immunisierung mit A β 42-Peptid von TgCRND8-Mäusen mit 6 Wochen, gefolgt von einem Boost nach 8 Wochen, signifikant die kognitiven Fähigkeiten von TgCRND8-Mäusen in dem Wasserirrgartenparadigma, verabreicht mit einem Alter von 11 Wochen. Auf der anderen Seite, zeigten die mit IAPP immunisierten Mäuse, eine signifikante Beeinträchtigung beim Erwerb von räumlicher Information, wie mit Nicht-Tg-Wurfgefährten verglichen (**Fig. 3**), und diese Beeinträchtigung war von einer ähnlichen Natur wie jene, die in nicht immunisierten TgCRND8-Mäusen gesehen wurde (Daten nicht gezeigt).

[0110] Immunisierung mit A β 42 oder IAPP-Peptiden beeinträchtigte die Schwimmfähigkeiten der Mäuse nicht. Diese Ergebnisse zeigen, dass Immunisierung mit A β 42 (aber nicht mit dem Kontroll-IAPP-Peptid) die Leistung im Wasserirrgarten verbessert und dass diese Verbesserung zu einer Zeit geschehen kann, die mit der ersten Ablagerung von A β -Amyloidplaques in dem Hippocampus zusammentrifft. Diese Ergebnisse belegen auch, dass die kognitive Beeinträchtigung in TgCRND8 nicht an einem irreversiblen kongenitalen Defekt liegt.

Literaturverzeichnis

1. Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature*, 325: 733-736.

2. Mullan, M. J., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., Lannfelt, L., and Hardy, J. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's Disease in the APP gene at the N-terminus of B-amyloid. *Nature Genetics*, 1: 345-347.
3. Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M. D. (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's Disease. *Science*, 254: 97-99.
4. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, C., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the B-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's Disease increases B-protein production. *Nature*, 360: 672-674.
5. Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D. B., et al. (1994) Excessive production of amyloid B-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish Familial Alzheimer's Disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11993-11997.
6. Haas, C., Lemere, C., Capell, A., Citron, M., and Selkoe, D. (1995) The Swedish mutation causes early onset Alzheimer's disease by B-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Med.*, 1: 1291-1296.
7. Haas, C., Hung, A. Y., and Selkoe, D. J. (1991) Processing of Beta-Amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favours an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci.*, 11: 3783-3793.
8. Haas, C., Hung, A. Y., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's Disease result in alternative processing of amyloid B-protein precursor. *J. Biol. Chem.*, 269: 17741-17748.
9. Shoji, M., Golde, T., Ghiso, J., et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid B protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258: 126-129.
10. Scott, M. R., Kohler, R., Foster, D., and Prusiner, S. B. (1992) Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci.*, 1: 986-997.
11. Nee, L., Polinsky, R. J., Eldridge, R., Weingartner, H., Smallberg, S., and Ebert, M. (1983) A family with histologically confirmed Alzheimer Disease. *Arc. Neuro.*, 40: 203-208.
12. Foncin, J.-F., Salmon, D., Supino-Viterbo, V., Feldman, R. G., Macchi, G., Mariotti, P., Scopetta, C., Caruso, G., and Bruni, A. C. (1985) Alzheimer's Presenile dementia transmitted in an extended kindred. *Rev. Neurol. (Paris)*, 141: 194-202.
13. Frommelt, P., Schnabel, R., Kuhne, W., Nee, L. E., and Polinsky, R. J. (1991) Familial Alzheimer Disease: a large multigenerational German kindred. *Alzheimer Dis. Assoc. Disorders*, 5: 36-43.
14. Lippa, C. F., Saunders, A. M., Smith, T. W., et al. (1996) Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway. *Neurology*, 46: 406-412.
15. Lippa, C. F., Nee, L. E., Mori, H., and St George-Hyslop, P. (1998) Abeta42 deposition precedes other changes in PS1 Alzheimer's Disease. *Lancet*, 352: 1117-1118.
16. van Leuven, F. (2000) Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's Disease. *Prog. Neurobiol.*, 61: 305-312.
17. Games, D., Adams, D., Alessandrini, A., et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373: 523-527.
18. Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Horigoya, Y., Younkin, S., Yang, F. S., and Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274: 99-102.
19. Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P. A., Waridel, C., Calhoun, M. E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., and Sommer, B. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (24), 13287-92
20. Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., et al. (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that over-express different mutants of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 274: 6483-6492.
21. Citron, M., Eckman, C. B., Diehl, T. S., et al. (1998) Additive effects of PS 1 and APP mutations on secretion of the 42-residue amyloid beta-protein. *Neurobiol. Dis.*, 5: 107-116.
22. Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., et al. (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Med.*, 4: 97-100.
23. Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., and Sisodia, S. (1997) Accelerated amyloid deposition in brains of transgenic mice co-expressing mutant PS 1 and Amyloid Precursor Protein. *Neuron*, 19: 939-945.
24. Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1986) *Annu. Rev. Genet.* 20: 465-499.
25. Daniel C. Lu; Shahrooz Rabizadeh; Sreeganga Chandra; Rana F. Shayya; Lisa M. Ellerby; Xin Ye; Guy S. Salvesen; Edward H. Koo; Dale E. Bredesen. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. (2000) *Nature Medicine* 6: 397-404
26. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., et al. (1999) Immunization with Abeta attenuates Alzheimer's Disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400: 173-177.
27. Hsia A. Y., Masliah E., McConlogue L., Yu G. Q., Tatsuno G., Hu Kholodenko D., Malenka R. C., Nicoll R. A., Mucke L. (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 3228-33.
28. Carlson G. A., Borchelt D. R., Dake A., Turner S., Danielson V., Coffin J. D., Eckman C., Meiners J., Nilsen

- S. P., Younkin S. G, Hsiao K. K. (1997) Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 6, 1951-1959.
29. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., und Lacy E. (1994) Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbour NY, USA.
30. Scott et al., (1989) *Cell* 59, 847-857
31. Morris, R. G. M. (1984) *J. Neuroscience Methods* 11, 47-60
32. Janus, C., D'Amelio, S., Amitay, O., Chishti, M. A., Strome, R., Frase, P. E., Carlson, G. A., Roder, J., St. George-Hyslop, P und Westway, D. (2000) *Neurobiology of disease*, im Druck
33. Feinberg, A. P., und Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132, 6-13
34. Citron, M., Eckman, C. B., Diehl, T. S., Corcoran, C., Ostaszewski, B., L., Xia, W., Levesque, G., St. George Hyslop, P., Younkin, S. G., und Selkoe, D. J. (1998) *Neurobiol Dis* 5, 107-116.
35. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G. A., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommnes, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St-George-Hyslop, P. und Selkoe, D., (1997) *Nature Medicine* 3, 67-72.
36. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandervert, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., und Seubert, P. (1999) *Nature* 400 (6740), 173-7.
37. Forss-Petter et al., (1990) *Neuron* 5, 217.
38. Sasahara et al. (1991) *Cell* 64, 217.
39. McGowan et al., (1999), *Neurobiol. of Disease*, Bd. 6, S. 231-244 40. Prusiner et al., (1990), *Cell* 63, 673-686.
41. Andra, K. Abramowski, D., Duke, M., Pobst, A., Wiederhold, K. H., Burki, K., Goedert, M., Sommer, B., und Staufenbiel, M. (1996). Expression of APP in transgenic mice: a comparison of neuron-specific promoters.

Tabelle 1: Eigenschaften von transgenen Mäusen mit mutiertem humanem APP, die A β -Ablagerungen.

APP-Linie	APP-Mutation	menschliche APP-Isoform(en)	Alter des Einsetzens für Hippocampus-A β -Amyloidplaques durch Immunfärbung	Alter des Einsetzens für reife A β -Amyloidplaques (Kongorotfärbung)	Alter des Einsetzens für Defizite in der Version des Wasserirrgartens mit verborgener Plattform
PDAPP ¹⁷	V717F	695, 751 770*	8 Monate	nicht berichtet	Keine Defizite berichtet
Tg2576 ¹⁸	K670N, M671L	695	9-11 Monate	nicht berichtet	Beeinträchtigung mit 9-10 Monaten im C57 x SJL-Stammhintergrund
TgAPP23 ¹⁹	K670N, M671L	751	Seltene Ablagerungen mit 6 Monaten	6 Monate	Keine Defizite berichtet
TgAPP22 ¹⁹	K670N,	751	18 Monate	Untersatz der mit	Keine Defizite

	M671L plus V717I			18 Monaten vorhandenen Plaques	berichtet
APP/Ld/2 ²⁰	V717I	695	13-18 Monate	[†] nicht berichtet	Beeinträchtigung mit 3-6 Monaten bei FVB/N x C57- Stammhintergrund
TgCRND8	K670N, M671L plus V717F	695	Mehrfahe Ablagerungen mit 3 Monaten	Ein Untersatz aus Plaques, erscheinend von einem Alter von 4-5 Monaten an	Beeinträchtigung mit 2,8 Monaten bei C57 x C3H- Stammhintergrund

* cDNA-Kassette schloss Introns ein, um für die Produktion von APP695, -751 und -770 gesplitten mRNAs zu sorgen. [†]Von Plaqueablagerungen wurden berichtet, dass sie mit Kongorot färben, aber das Alter wurde nicht vermerkt. Färbung mit Thioflavin-S wurde mit 8 Monaten in PDAPP-Mäusen und mit 354 Tagen in Tg2576-Mäusen berichtet.

Tabelle 2: Eigenschaften von Kreuzungen von mutiertem APP mit mutiertem Presenilin

<i>Mutiertes APP-Elter</i>	<i>Mutiertes Presenilin-Elter</i>	<i>Alter des Einsetzens für Hippocampus Aβ-Amyloidplaques durch Immunfärbung</i>	<i>Alter des Einsetzens für reife Aβ-Amyloidplaques (Kongo-rotfärbung)</i>	<i>Alter des Einsetzens für Defizite bei der Version des Wasserirrgartens mit verborgener Plattform</i>
Kein	<i>mutiertes PS1 oder PS2</i>	Kein	Kein	Kein
TgCRND8	Kein	3 Monate	4-5 Monate	2,8 Monate [†]
TgCRND8	PS1(L286V)1274	2 Monate	nicht gemacht	nicht gemacht
TgCRND8	PS2(M239V)1379	2 Monate	nicht gemacht	2,8 Monate [†]
TgCRND8	PS1(M146L+L286V) 6500	1 Monat	1,5 Monate	nicht gemacht
Tg2576	PS1(M146L)	6 Monate, kein bei 3 Monaten	7 Monate	[†] nicht berichtet

+ Defizite wurden für diese Mäuse berichtet in anderen Paradigmen (Y-Irrgarten) und in „Einzel-Tg-“Tg2576-Mäusen wie durch Tabelle 1.

Das Testen von Mäusen mit jüngerem Alter wurden nicht routinemäßig durchgeführt, da die Mäuse ein Gewicht von 25 g erreichen müssen und zwei Wochen Vortraining vor dem Testen im Wasserirrgartenparadigma brauchen.

Patentansprüche

1. Transgene Maus, herstellbar durch:

a) Kreuzen einer ersten transgenen Maus, deren Genom ein Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die an einen Promotor operabel gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-)Polypeptid kodiert, worin der Lysinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und worin das Transgen exprimiert wird,

mit einer zweiten transgenen Maus, die ein Genom hat, welches ein Transgen umfasst, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die an einen Promoter operabel gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-2-Polypeptid kodiert, worin der Methioninrest an Position 239 durch Valin ersetzt ist, um Nachfahren der ersten Generation zu erzeugen; und

b) Selektieren aus den Nachfahren der ersten Generation einer transgenen Maus mit einem Genom, das wenigstens ein erstes Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist, und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-)Polypeptid umfasst, worin der Lysinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und das wenigstens ein zweites Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-2-Polypeptid kodiert, worin der Methioninrest an Position 239 durch Valin ersetzt ist, und die sowohl das erste als auch das zweite Transgen exprimiert.

2. Transgene Maus, herstellbar durch:

a) Kreuzen einer ersten transgenen Maus, deren Genom ein Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die an einen Promotor operabel gekoppelt ist, und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-)Polypeptid kodiert, worin der Lysinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und worin das Transgen exprimiert wird,

mit einer zweiten transgenen Maus, die ein Genom hat, welches ein Transgen umfasst, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die an einen Promoter operabel gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-1-Polypeptid kodiert, worin der Leucinrest an Position 286 durch Valin ersetzt ist, um Nachfahren der ersten Generation zu erzeugen; und

b) Selektieren aus den Nachfahren der ersten Generation einer transgenen Maus mit einem Genom, das wenigstens ein erstes Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-)Polypeptid umfasst, worin der Lysinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und das wenigstens ein zweites Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-1-Polypeptid kodiert, worin der Leucinrest an Position 286 durch Valin ersetzt ist, und die sowohl das erste als auch das zweite Transgen exprimiert.

3. Transgene Maus, herstellbar durch:

a) Kreuzen einer ersten transgenen Maus, deren Genom ein Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die an einen Promotor operabel gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-)Polypeptid kodiert, worin der Lysinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und worin das Transgen exprimiert wird,

mit einer zweiten transgenen Maus, die ein Genom hat, welches ein Transgen umfasst, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die an einen Promoter operabel gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-1-Polypeptid kodiert, worin der Methioninrest an Position 146 durch Leucin ersetzt ist und der Leucinrest an Position 286 durch Valin ersetzt ist, um Nachfahren der ersten Generation zu erzeugen; und

b) Selektieren aus den Nachfahren der ersten Generation einer transgenen Maus mit einem Genom, das wenigstens ein erstes Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promoter gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅-)Polypeptid umfasst, worin der Lysinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und das wenigstens ein zweites

Transgen umfasst, welches eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-1-Polypeptid kodiert, worin der Methioninrest an Position 146 durch Leucin ersetzt ist und der Leucinrest an Position 286 durch Valin ersetzt ist, und die sowohl das erste als auch das zweite Transgen exprimiert.

4. Transgene Maus nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin die Maus eine (C3H X C57 BL6) X C57-Maus ist.

5. Transgene Maus nach Anspruch 4, worin die Maus eine anormale A β -Ablagerung in ihrem Zentralnervensystem zeigt.

6. Transgene Maus nach Anspruch 4, worin die Maus ein beschleunigtes Auftreten von mit Alzheimererkrankung im Zusammenhang stehender Pathologie zeigt.

7. Transgene Maus, deren Genom das Folgende umfasst:

ein erstes Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅)Polypeptid kodiert, worin der Lyinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und

ein zweites Transgen, umfassend ein Transgen, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-2-Polypeptid kodiert, worin der Methioninrest an Position 239 durch Valin ersetzt ist, und worin die Transgene exprimiert sind.

8. Transgene Maus, deren Genom das Folgende umfasst:

ein erstes Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅)Polypeptid kodiert, worin der Lyinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und

ein zweites Transgen, umfassend ein Transgen, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-1-Polypeptid kodiert, worin der Leucinrest an Position 286 durch Valin ersetzt ist, und worin die Transgene exprimiert sind.

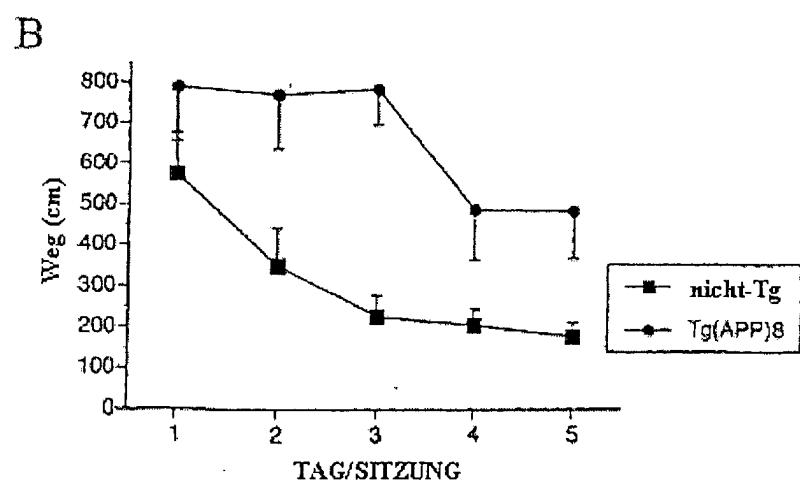
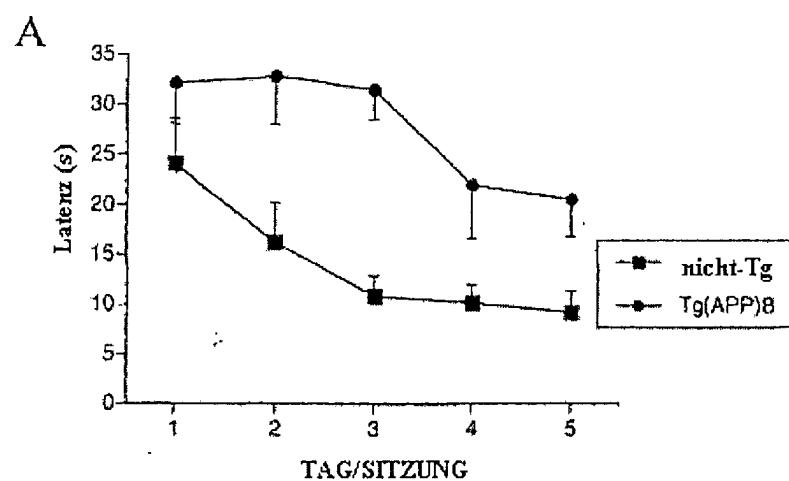
9. Transgene Maus, deren Genom das Folgende umfasst:

ein erstes Transgen, umfassend eine Nukleotidsequenz, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Amyloid-Vorläuferprotein-695- (APP₆₉₅)Polypeptid kodiert, worin der Lyinrest an Position 670 durch Asparagin ersetzt ist, der Methioninrest an Position 671 durch Leucin ersetzt ist und der Valinrest an Position 717 durch Phenylalanin ersetzt ist, und

ein zweites Transgen, das eine Nukleotidsequenz umfasst, die operabel an einen Promotor gekoppelt ist und die ein menschliches Presenilin-1-Polypeptid kodiert, worin der Methioninrest an Position 146 durch Leucin ersetzt ist und der Leucinrest an Position 286 durch Valin ersetzt ist, und worin die Transgene exprimiert sind.

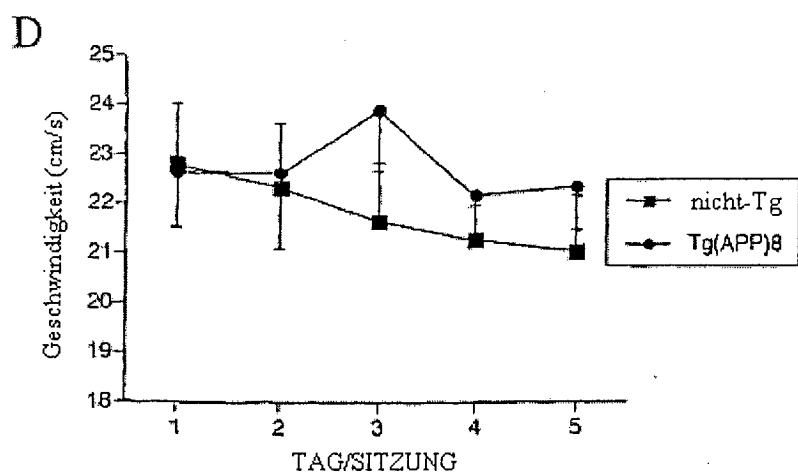
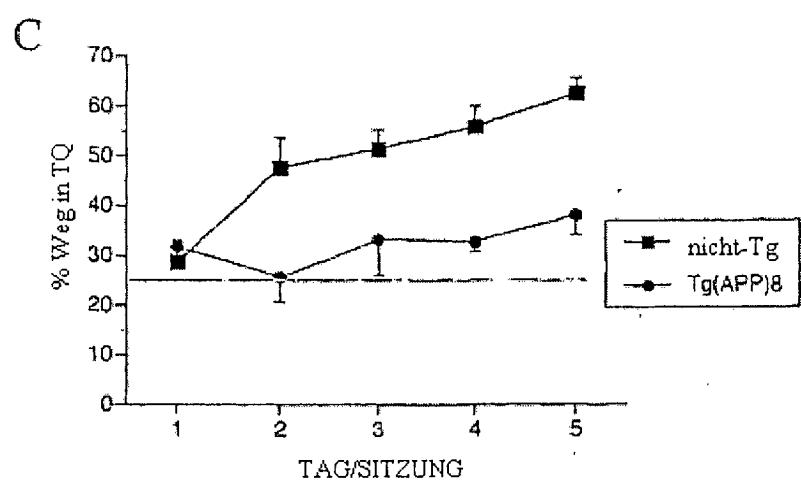
Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



Alter: 11 Wochen

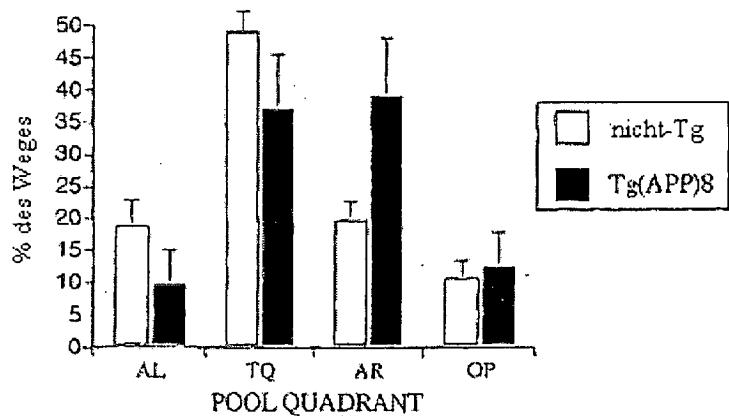
WM: Platzunterscheidung (verborgene Plattform) - Lernerwerbphase



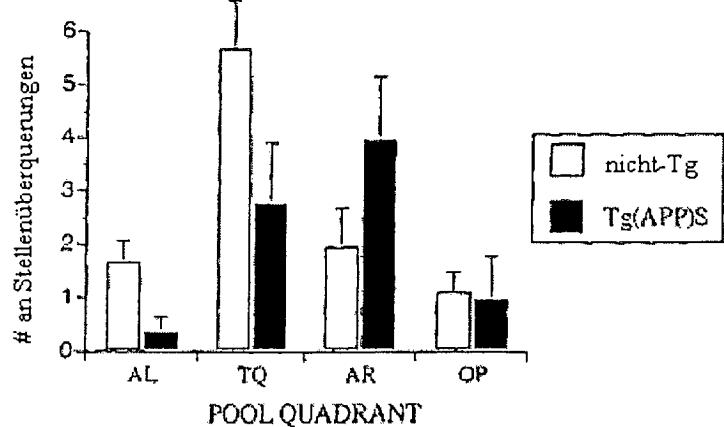
Alter: 11 Wochen

WM: Platzunterscheidung (verborgene Plattform) - der Sondierungsversuch

E

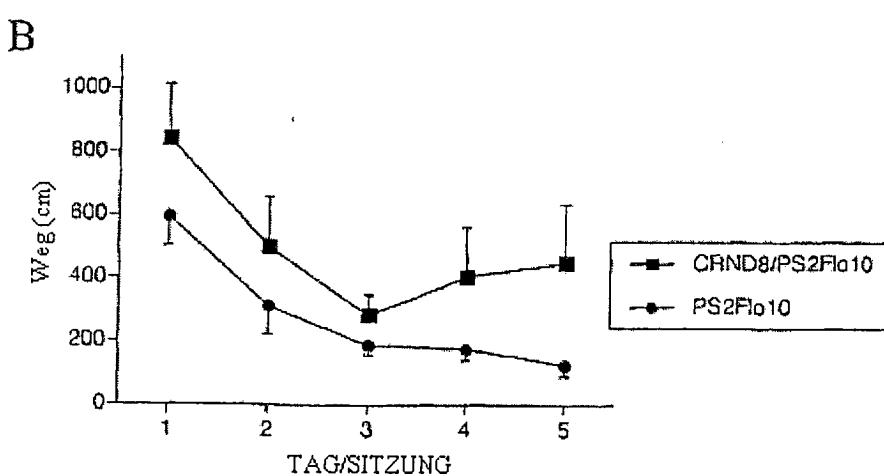
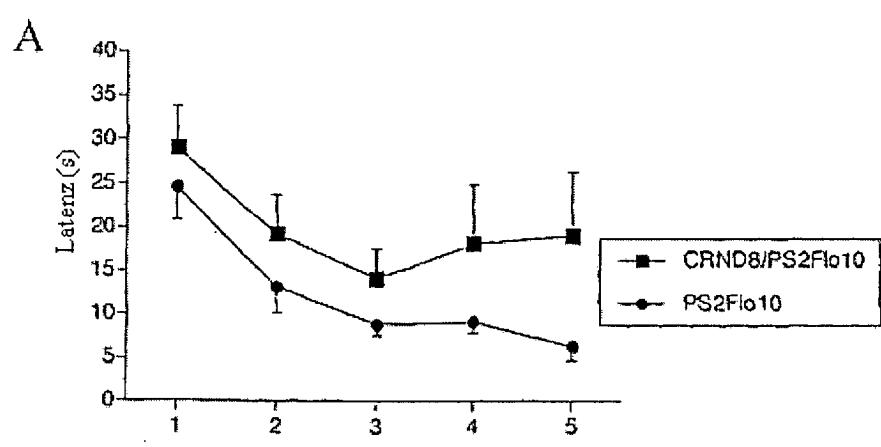


F



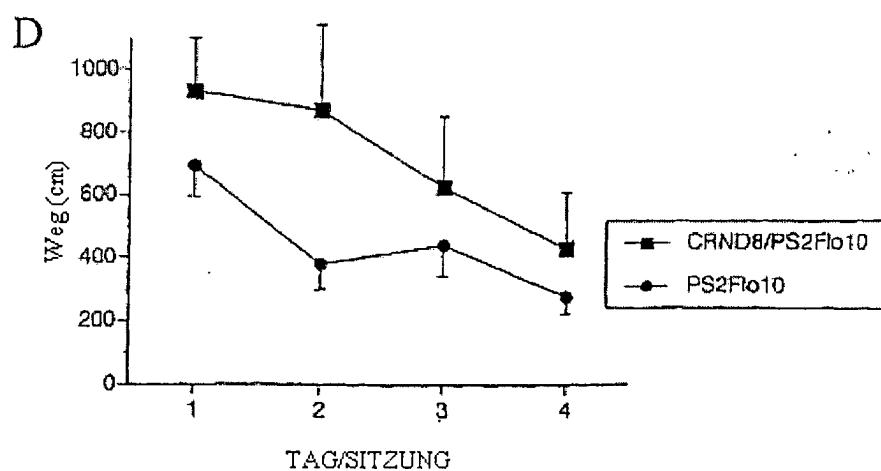
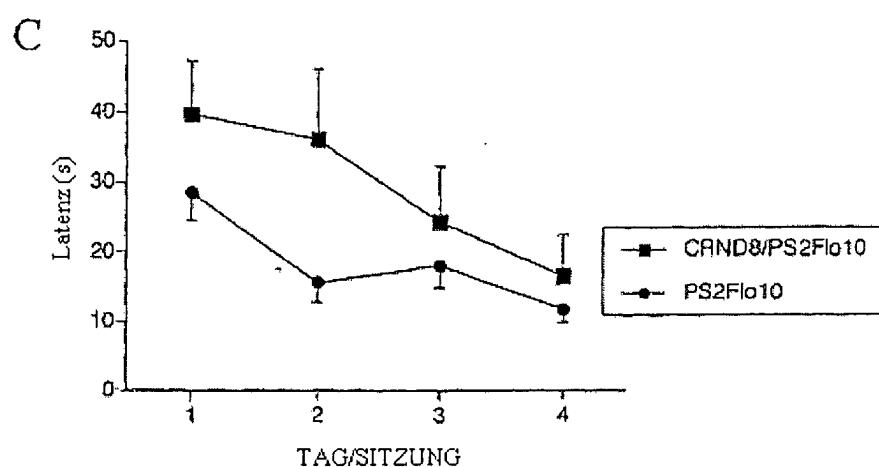
Alter: 2 Monate

WM: Platzunterscheidung (verborgene Plattform) - Lernerwerbphase



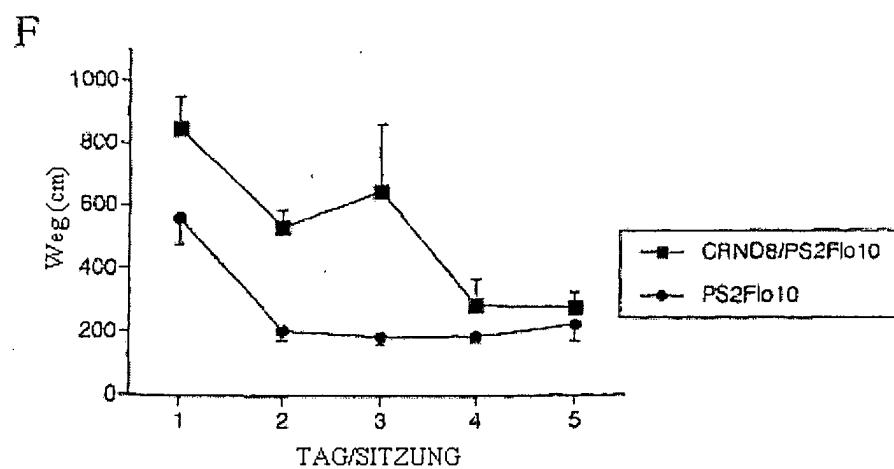
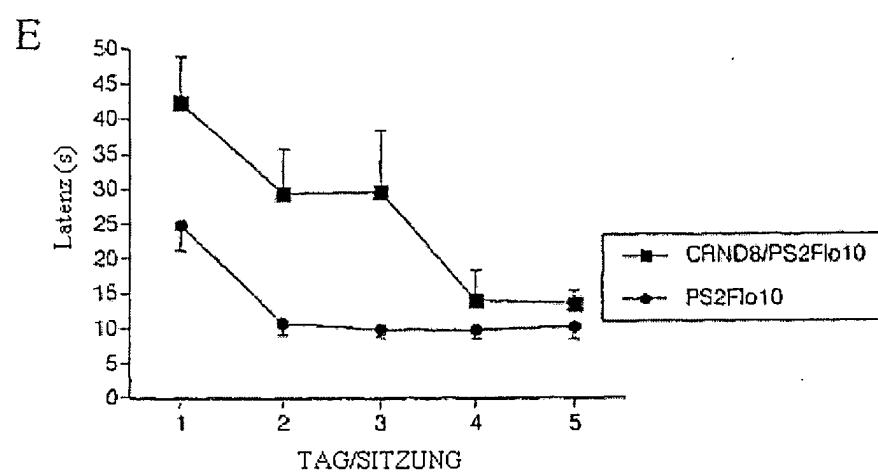
Alter: 2 Monate

WM: Platzunterscheidung (verborgene Plattform) - Lernumkehrphase



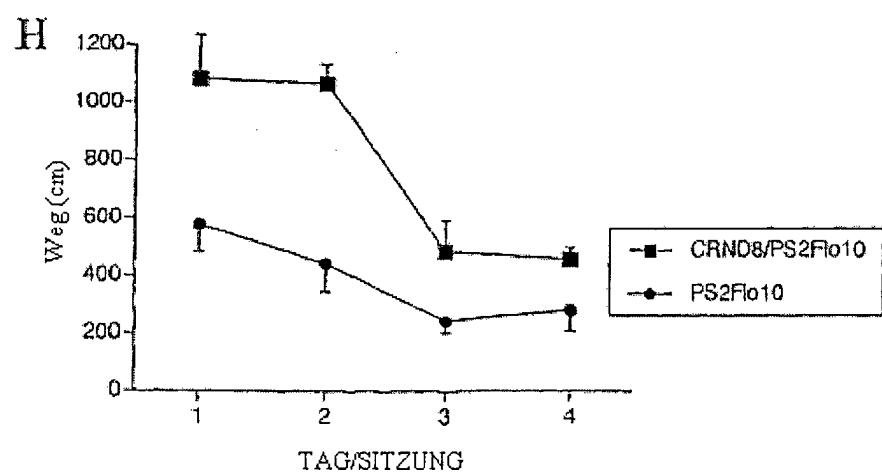
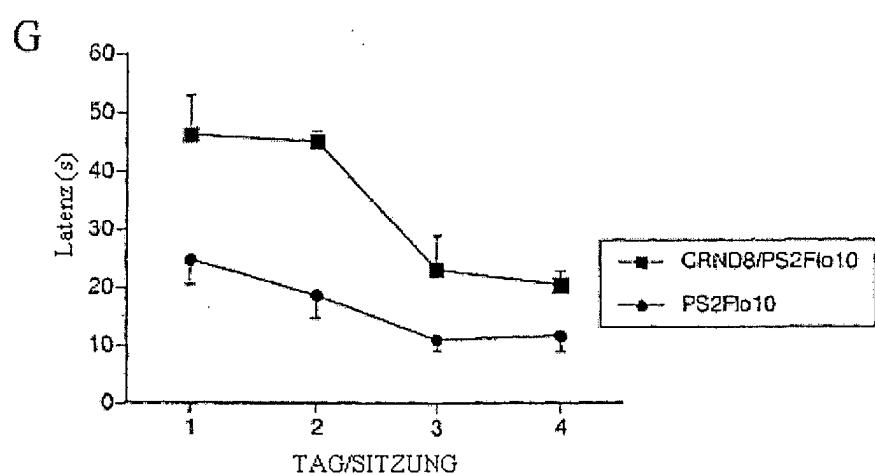
Alter: 5 Monate

WM: Platzunterscheidung (verborgene Plattform) - Lernerwerbphase

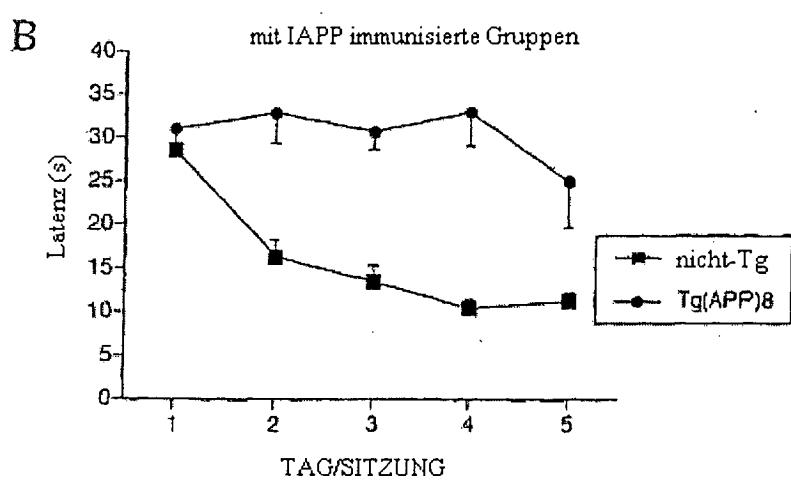
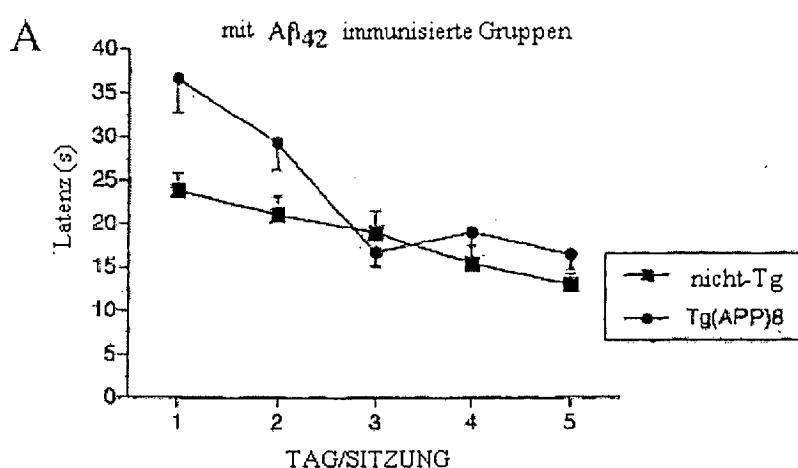


Alter: 5 Monate

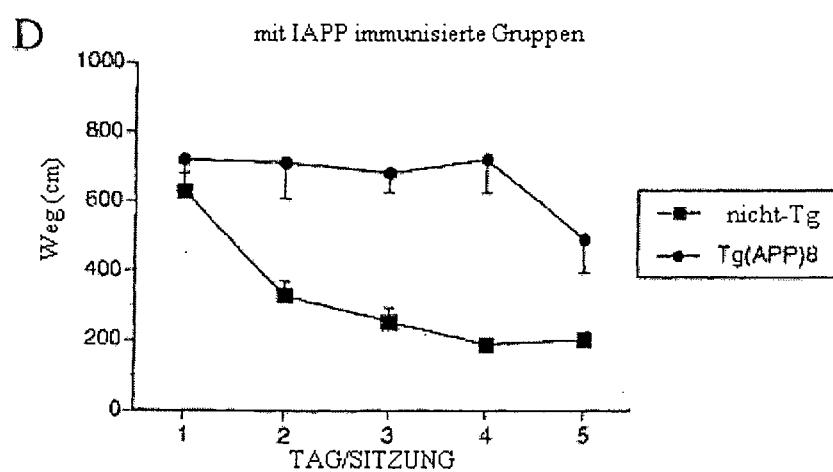
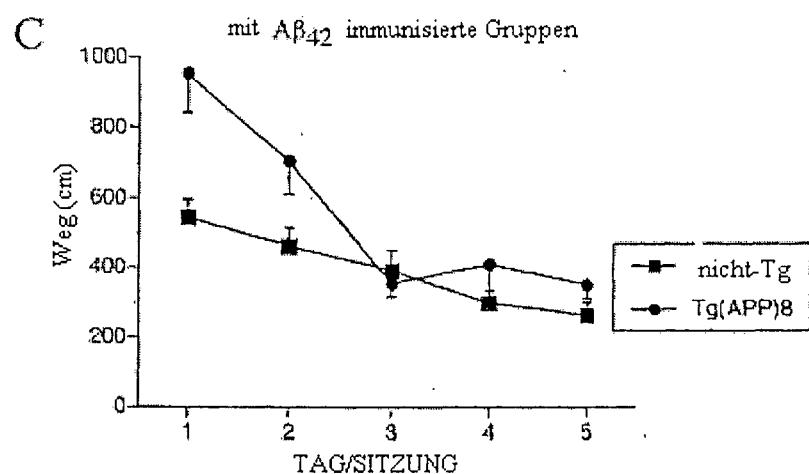
WM: Platzunterscheidung (verborgene Plattform) - Lernumkehrphase



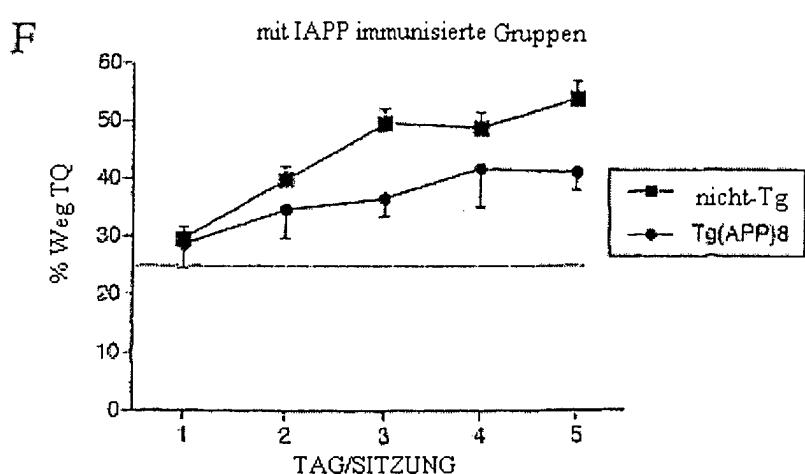
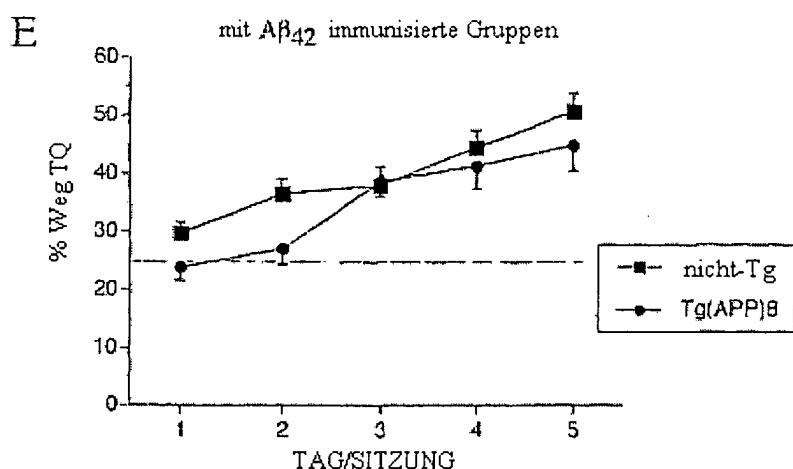
Alter: 11 Wochen



Alter: 11 Wochen



Alter: 11 Wochen



Alter: 11 Wochen

