

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03816645.3

[51] Int. Cl.

G12N 15/12 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

G12N 5/06 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100577803C

[22] 申请日 2003.7.9 [21] 申请号 03816645.3

[30] 优先权

[32] 2002.7.12 [33] AT [31] A1053/2002

[86] 国际申请 PCT/EP2003/007390 2003.7.9

[87] 国际公布 WO2004/007722 英 2004.1.22

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.12

[73] 专利权人 阿克松神经科学研究和发展股份有限公司

地址 奥地利维也纳

[72] 发明人 E·康特赛克瓦 P·菲利普斯克

[56] 参考文献

WO0165252A1 2001.9.7

CN1179829A 1998.4.22

WO9630766A1 1996.10.3

审查员 于娜

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 赵艳华

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 10 页

[54] 发明名称

表达阿耳茨海默氏 tau 蛋白的转基因动物

[57] 摘要

本发明提供了包含人类 DNA 序列的转基因非人动物以及非人哺乳动物体细胞和生殖细胞,所述序列编码能够在转基因动物中诱发阿耳茨海默氏病(AD)病理的 AD 衍生 tau 蛋白。阿耳茨海默氏 tau 蛋白是在特定遗传背景上表达的,它们也能够模拟与神经变性有关而且是 AD 发展的重要致病因素的不同人类疾病,包括高血压、糖尿病、高胆固醇血症。本发明的转基因动物和细胞展示神经原纤维病理,而且可以作为体内和体外测定系统,用于筛选和开发 tau 病理和 AD 的治疗性和预防性物质以及诊断性标记和探针。另外,这些转基因动物及由其衍生的细胞系提供了神经变性疾病的体内和体外测定系统,优选 tau 病理和 AD,这是联合其它疾病像高血压和与神经变性过程有关的其它代表性致病因素的结果。

1. 使用DNA构建体制备转基因非人动物的方法，其中该DNA构建体包含引起N端和C端截短的tau分子表达的编码区，其中

- 所述编码区相对于分别编码四重复和三重复的tau蛋白的全长tau cDNA序列而言截短起始密码子下游至少30个核苷酸并截短终止密码子上游至少30个核苷酸；

- 最小的截短tau核心包含由SEQ ID No. 9编码的蛋白质片段；

- 所述DNA构建体在所述动物大脑细胞中表达时编码具有神经原纤维病理生成活性的蛋白质。

2. 依照权利要求1所述的方法，其包括瞬时或稳定修改所述非人动物的生殖细胞和体细胞。

3. 依照权利要求1或2所述的方法，其中由所述DNA构建体编码的蛋白质在大脑中表达。

4. 依照权利要求1或2所述的方法，其中所述动物是大鼠。

5. 依照权利要求3所述的方法，其中所述动物是大鼠。

6. 使用对权利要求1中所限定的DNA构建体特异的寡核苷酸对依照权利要求1~5任一项的方法获得的转基因动物基因分型的方法。

7. 依照权利要求3所述的方法获得的转基因非人动物的用途，所述转基因非人动物发展神经原纤维病理，而且具有能够诱发与阿耳茨海默氏病有关的致病因素的遗传背景，从而担当人的疾病模型。

8. 依照权利要求4所述的获得的转基因非人动物的用途，所述转基因非人动物发展神经原纤维病理，而且具有能够诱发与阿耳茨海默氏病有关的致病因素的遗传背景，从而担当人的疾病模型。

9. 依照权利要求5所述的获得的转基因非人动物的用途，所述转基因非人动物发展神经原纤维病理，而且具有能够诱发与阿耳茨海默氏病有关的致病因素的遗传背景，从而担当人的疾病模型。

10. 权利要求1或2所述的获得的转基因非人动物的用途，所述转基因非人动物担当阿耳茨海默氏病的动物模型，而且能够诱发作为阿耳茨海默氏病的致病因素的高血压。

11. 权利要求1或2所述的获得的转基因非人动物的用途，所述转基因非人动物担当阿耳茨海默氏病的动物模型，而且能够诱发作为阿耳茨海默氏病的致病因素的糖尿病。

12. 权利要求1或2所述的获得的转基因非人动物的用途，所述转基因非人动物担当阿耳茨海默氏病的动物模型，而且能够诱发作为阿耳茨海默氏病的致病因素的高胆固醇血症。

13. 经过依照权利要求1的构建体转化或衍生自通过权利要求1~5和7~12任一项方法获得的转基因动物的细胞系。

14. 依照权利要求13的细胞系，其特征是该细胞系是衍生自转基因大鼠胚胎的大鼠细胞系。

15. 包含依照权利要求13或14的细胞系的体外测定法，其中所述测定法作为筛选和确认工具用于发现阿耳茨海默氏病的治疗性、预防性和诊断性化合物以及标记，该方法包括将待筛选的化合物施用给细胞并检验该细胞的组织病理学或tau表达的变化。

表达阿耳茨海默氏tau蛋白的转基因动物

神经变性疾病是一组异类的遗传性和获得性神经学疾病，导致严重的和进行性的认知和运动损伤，在中年和老年发作（1）。痴呆的最常见原因是阿耳茨海默氏病。在少于5%的病例中涉及阿耳茨海默氏病遗传因子，其余病例是散发性的。

tau蛋白是在中枢神经系统中表达的蛋白质，而且通过稳定胞内微管网络而在神经元构造中发挥关键作用。截短、超磷酸化、或六种天然存在tau同种型（isoform）之间平衡的破坏对tau蛋白生理学作用的损害导致神经原纤维缠结（neurofibrillary tangle）（NFT）、营养不良神经突、和神经纤维丝（neuropil thread）的形成。这些结构是阿耳茨海默氏病的超微结构特点。这些结构的主要蛋白质亚基是与微管相关蛋白tau（2、3）。在AD患者尸检中发现的NFT数量与包括智力衰退在内的临床症状有关。因此，tau蛋白在AD病理学中发挥关键作用。关于tau基因中特定突变和与17号染色体连锁的帕金森氏病额颞痴呆疾病（FTDP-17）的共分离的最近发现证实了tau蛋白中的某些异常可能是患病个体中神经变性和痴呆的主要原因（4、5）。然而，没有实验模型能够直接提出关于tau蛋白在AD发病机理中的作用的细节。

最近的AD转基因模型是基于发生或未发生突变的与FAD（APP、PS1、ApoE等）有关的蛋白质的表达。它们包括单基因和多基因人化动物。然而，没有哪个模型能够再现AD的这两种特点，它们通常不显示神经原纤维病理，而且都不具有研究环境致病因素的功能的可能性，而它们在AD的发展中发挥主要作用。

最近得到的显示有些神经原纤维变化的动物模型只是基于衍生自与第17号染色体连锁的额颞痴呆（FTDP17）的突变型tau的转基因表达。这一类的典型范例是JNPL3转基因小鼠（6）。最近，Goedert和Spillantini（7）发表了关于突变型tau作用的另一项证据。

在另一个转基因动物模型中,研究了含四重复的tau蛋白的过度表达。报道了大脑和脊髓中的突出轴突病理学(axonopathy),而且显示含四重复的tau蛋白同种型的过度表达足以改变神经元生理学。在该模型中,证明了在中枢神经系统神经元中轴突扩张及神经原纤维积累,然而没有神经元内神经原纤维缠结的形成(8)。

还可以为了检验tau的正常细胞功能及其在发病机理中的作用而生成转基因小鼠。转基因小鼠过度表达基因组tau转基因,还有tau cDNA转基因。两种模型的比较显示了tau的分布在两种转基因系中是相似的。在cDNA小鼠脊髓中发现tau免疫反应性轴突膨胀,这与后肢异常有关,而在基因组小鼠中没有观察到神经病理学(9)。

尽管大鼠作为神经生物学实验模型相对于小鼠的优点,令人惊讶的是尚未生成神经原纤维病理学的tau转基因模型。一般而言,至今生成的神经变性的转基因大鼠模型的数量相当低。它们都不能概述tau病理学,而它对于AD而言是典型的。

Czech C等人(12)描述了在编码早衰素(presenilin)1(PS1)的基因中包含突变的转基因大鼠模型。PS1被认为是大多数家族性阿耳茨海默氏病早期发作病例的原因,然而已发表的模型未显示AD相关病理学的足够病征。Echeverria V和Cuellar AC(13)评论了 β -淀粉状蛋白胞内积累的作用和胞内 β -淀粉状蛋白积累在阿耳茨海默氏病中的可能神经病理学作用。他们提出了来自海马和皮层的神经元中具有A- β -片段胞内积累的表型但无斑和NFT形成的大鼠转基因模型的观察结果。因此,对于在转基因研究中第二最常用的动物大鼠,情况与小鼠相同:科学文献中尚未描述表达截短tau蛋白并显示NFT形成的转基因大鼠。

至今尚无可用于研究结合与AD有关的高血压或其它致病因素像糖尿病和异常脂血症(dislipidemia)的AD的病因学的实验模型。实验性转基因动物的遗传背景在合适转基因模型的开发中发挥作用。

众所周知AD与某些环境致病因素有关。流行病学研究显示,血管病和中风的致病因素与认知损伤和阿耳茨海默氏病有关;此外,脑血

管病的存在强化了阿耳茨海默氏病临床症状的存在和严重性(14)。Rotterdam研究(15)指出了高血压与AD型痴呆之间的联系。

因此,重要的是要开发AD的实验模型,它将模拟疾病的主要病理学特征,同时能够表达与AD病因学有关的环境因素。

因此,本发明的一个目标是提供尽可能贴切的反映AD特点的实验模型,还有用于治疗、预防、和诊断AD的物质的测定系统。

本发明涉及在转基因动物大脑中表达编码阿耳茨海默氏tau蛋白的cDNA的转基因非人动物。这些动物在大脑中表现有NF病理学活性。本发明还涉及可以作为筛选测定系统用于鉴定改进学习和记忆、抑制神经变性和降低大脑中神经原纤维缠结(NFT)的形成和清除速率的物质的转基因动物。这些动物可用于鉴定用于预防、治疗、和诊断神经变性疾病的物质,优选tau病理(tauopathy)和AD。转基因动物还可用于研究AD相关致病因素对AD发展的影响。这些动物的另一种用途在于药物靶的鉴定。

本发明描述了通过特定转基因诱发AD变化的转基因动物的遗传工程,类似这些动物中的阿耳茨海默氏病。这为发现和开发药物和诊断方法以及进一步研究正常和患病tau蛋白的体内作用提供了研究工具。

本发明依赖仅仅通过在转基因动物大脑中表达阿耳茨海默氏tau蛋白而在动物大脑中诱发NF病理学活性。这些动物具有AD的特点,倾向于诱发与AD病因学有关的致病因素,这是本发明的另一个优点。

除非特别说明,优选实施方案的描述中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的通常理解相同的含义。本发明描述了细胞培养、分子遗传学、生物化学、和核酸化学的优选方法、实验流程、和材料,但是本发明的测试中可以使用相似或相当的任何方法和材料。对于像重组核酸制备、生化分析、细胞培养、和转基因掺入等流程(像电穿孔、脂转染、和显微注射)使用了标准技术。

术语“阿耳茨海默氏tau”指经过遗传工程改造而相应于那些Al患病大脑中专门存在的tau蛋白的一组特定截短同种型。阿耳茨海默氏

tau能够自身或者联合大脑中的其它分子来诱发NF活性。在用于本文时,术语阿耳茨海默氏tau蛋白指AD患病人大脑组织中存在的一组截短tau形式。

术语“转基因”在用于本文时描述人工插入细胞特别是哺乳动物细胞的基因组中用于植入存活动物的遗传材料。对于特定国家,可能必需由这个方面专门排除某些主题,诸如人全能干细胞,因为这些细胞或导致这些细胞的过程被归入EC指令98/44/EC的6(1)和(2)条。

“阿耳茨海默氏病”(本文缩写为“AD”)指与神经原纤维缠结和 β -淀粉状斑形成以及学习和记忆二者损伤有关的状况。“AD”在用于本文时意欲涵盖AD以及AD型病理(即具有与AD相似的症状的中枢神经系统疾病)二者。

“神经原纤维活性”(本文缩写为“NF”活性)指与中枢神经系统中神经原纤维缠结形成有关且具有与AD相似的症状的状况。

“与AD相似的症状”和“与AD有关的现象”指与AD有关的结构、分子、或功能事件,特别是易于在动物模型中评估的事件。这些事件包括但不限于神经原纤维病理、学习和记忆缺乏、和其它AD相关特征。

“转基因动物”指在其部分细胞中具有非内源(即异源)核酸序列作为染色体外元件或稳定整合到其生殖系DNA(即其大多数或所有细胞的基因组序列)中的非人动物,通常是哺乳动物(如小鼠、大鼠、兔、仓鼠等)。通过对例如宿主动物胚胎的遗传操作将异源核酸导入这些转基因动物的生殖系。

“构建体”指可操作连接组织特异性或普通启动子的重组核酸序列,通常是重组DNA序列,生成它是为了在哺乳动物细胞中表达特定核苷酸序列,或用于构建其它重组核苷酸序列。

本发明提供了用于生成DNA构建体的结构、序列和方法,所述DNA构建体用于制备转基因动物,特征在于下列特点:

DNA构建体包含编码N端和C端截短tau分子的cDNA分子,其中:

- 如GeneBank序列编号NM_173727所示,该分子相对于分别编码含

四重复(4-repeat)和含三重复(3-repeat)的tau蛋白的全长tau cDNA序列而言截短了起始密码子下游至少30个核苷酸并截短终止密码子上游至少30个核苷酸;

-最低限度截短tau核心包含由第744-930位核苷酸编码的蛋白质片段(SEQ ID NO. 9; 编号依照tau蛋白同种型43);

-所述DNA构建体编码在动物大脑细胞中表达时具有神经原纤维(NF)病理生成活性的蛋白质。

可以通过每个选定大脑区域的神经原纤维缠结计数对此NF病理生成活性定量,如使用立体学方法。或者,神经行为测试可以用于学习记忆任务中认知得分的可靠评估。

依照本发明特别优选的tau cDNA分子包含选自SEQ ID NO: 1-14的核苷酸序列。序列描绘于图1中。

在本发明的一个优选实施方案中,所述cDNA分子是一组N端和C端双重截短cDNA,它包含如下核苷酸序列:

(来自四重复的tau(tau43)的衍生物标以R4,而来自三重复的tau(tau43)的衍生物标以R3)。此处所用编号来自Goedert等人(24)描述的全长tau cDNA:

SEQ ID NO: 1 (91-1059, R4)

ATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGAAGCAGGCATTG-
GAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGT-
CAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCAGCTCTGGT-
GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACCTCCCG-
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGCTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGC-
CCCCGTGCCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCT-
TAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCG-
GCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCT-
CATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCT-
TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTG-
GCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGC-
CAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGG-
GACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTC

SEQ ID NO: 2 (205-999, R4)

ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCAGCTCTGGT-
GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACCTCCCG-
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGCTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGC-
CCCCGTGCCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCT-
TAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCG-
GCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCT-
CATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCT-

TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTG-
GCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGC-
CAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 3 (277-999,R4)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGC-
CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGCCCCCGTGC-
CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
CGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGT-
GTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAAC-
CAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAG-
GAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACA-
GAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAG-
GAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGAC-
CACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 4 (205-1089,R4)

ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT-
GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG-
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC-
CCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCT-
TAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCG-
GCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCT-
CATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCT-
TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTG-
GCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGC-
CAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGG-
GACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGAC

SEQ ID NO: 5 (277-1089,R4)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGC-

CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGCCCCCGTGC-
CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
CGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGT-
GTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAAC-
CAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAG-
GAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACA-
GAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAG-
GAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGAC-
CACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCT-
CAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGAC

SEQ ID NO: 6 (715-999,R4)

ATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAG-
GTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG-
GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 7 (709-999,R4)

GATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCT-
GAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGC-
CAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGG-
GTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 8 (715-954,R4)

ATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAG-
GTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG-
GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTG

SEQ ID NO: 9 (741-930,R4)

GTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAG-
GCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCT-
TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTG-
GCGGAGGAAAT

SEQ ID NO: 10 (91-966,R3)

ATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGAAGCAGGCATTG-
GAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGT-
CAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT-
GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG-
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC-
CCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT-
GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG-
GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGC-
CAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTC

SEQ ID NO: 11 (205-906,R3)

ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT-
GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG-
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC-
CCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT-
GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG-
GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 12 (277-906,R3)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGC-
CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGCCCCCGTGC-
CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
CGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGT-
GTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCT-
GAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCAC-

CCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGC-
CAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 13 (205-996, R3)

ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCGCTCCAAAGACACCACCAGCTCTGGT-
GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG-
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC-
CCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT-
GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG-
GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGC-
CAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCG-
GCAGCATCGACATGGTAGAC

SEQ ID NO: 14 (277-996, R3)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGC-
CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGCCCCCGTGC-
CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
CGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGT-
GTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCT-
GAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCAC-
CCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGC-
CAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGG-
GACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGAC

可以将截短tau序列适应构建体将转染的特定宿主细胞(密码子使用、密码子偏爱性、同系物适应即用宿主细胞密码子交换一种或多种人类密码子,如果存在差异的话)而进行改造。

构建体的优选特征:

将上文cDNA序列连接调控序列以驱动截短tau蛋白在大脑中的表达。进行对Thy-1基因(25)的修饰,以删除指导在T细胞中表达的调控序列,而将截短cDNA序列导入SpeI和XhoI限制性位点之间。将经修饰的构建体剥去原核序列,并通过显微注射导入雄性前核。任何功能性启动子或启动子-增强子复合物都可用于上述截短tau cDNA的表达。

依照另一个方面,本发明提供了用于制备和测试依照本发明的分子的方法,特征是下列步骤:

(a) 构建携带双重截短tau分子编码序列的重组原核克隆质粒,其中删除覆盖三或四重复的tau cDNA分子的至少最前面30个和最后30个核苷酸;

(b) 构建携带用于大脑表达或普遍表达的合适启动子和截短tau分子的各自cDNA序列及其组合的真核表达质粒;

(c) 培养包含所述质粒的细菌,大量扩增并提取质粒;

(d) 将所述基因构建体转染到COS-7细胞中,并使用Western印迹技术对其进行分析;

(e) 基因构建体的分离和纯化,从而排除所有原核序列,并将转基因在缓冲液中稀释至适于显微注射的浓度(参见实施例1);

(f) 确认意欲用于显微注射的基因构建体。

这是通过限制性分析、基因测序、和在瞬时转染哺乳动物细胞后的蛋白质分析进行的,然后评估蛋白质的正确大小和它们与特异性单克隆抗体的反应性(见实施例1,图2b)。

因此,本发明提供了其生殖细胞和/或体细胞包含编码阿耳茨海默氏tau蛋白的DNA构建体的转基因非人动物,它可以用作阿耳茨海默氏病的合适动物模型。

因此,本发明的一个目标是提供其所有生殖细胞和/或体细胞都包含人截短tau cDNA分子的转基因非人动物。克隆的人阿耳茨海默氏tau cDNA序列连接指导阿耳茨海默氏tau以组织特异方式或普遍表达的启动子序列。

使用众所周知的常规显微注射方法导入一日龄大鼠雌性胚胎的前核来构建本发明的转基因动物。还可以通过本领域已知的其它方法将转基因导入胚胎细胞,包括转染、脂转染、电穿孔、和借助逆转录病毒,或者通过其它手段。然后,可以将携带转基因的胚胎植入假孕动物。

因此,本发明的一个目标是提供用于新生动物基因分型的方法。为此目的采用PCR分析,其中使用能够扩增转基因靶序列的特异性寡核苷酸。设计用于基因分型的寡核苷酸,从而能够最终通过PCR产物的DNA测序来检验转基因的转录起始位点(包括ATG密码子和Kozak序列)(引物对A)。此外,一条引物与异源启动子退火,另一条引物与编码阿耳茨海默氏tau蛋白的核苷酸序列退火。将类似设计标准应用于终止密码子(引物对B)。因此,可以通过这种方法来监测转基因的完整性。诊断性寡核苷酸的序列如下:

引物对 A:

有义: 5'-GTGGATCTCAAGCCCTCAAG-3'

反义: 5'-GATCCCCTGATTTTGGAGGT-3'

PCR 产物的期望大小是 235 个核苷酸。

引物对 B:

有义: 5'-AAGGTGACCTCCAAGTGTGG-3'

反义: 5'-GGTATGCATGGAGGGAGAAG-3'

PCR 产物的期望大小是 438 个核苷酸。

因此,PCR片段的存在对于转基因整合到基因组中的动物是特异的(见实施例2)。

生成动物(founder animal)可用于与野生型动物交配以生成F1代动物,它们对于转基因而言是杂合的。在其它实施方案中,可以将

这些杂合动物近交以获得能存活的转基因胚胎，它们的体细胞和生殖细胞对于编码阿耳茨海默氏tau蛋白的基因而言是纯合的。

本发明的另一个方面是提供其生殖细胞和体细胞瞬时或稳定表达编码阿耳茨海默氏tau蛋白的所述DNA构建体并在大脑中展示NF病理的非人动物。本发明的优选动物是大鼠，其中由所述DNA分子编码的蛋白质在大脑中表达。

本发明的最优选实施方案是转基因非人动物，其中由所述DNA分子编码的阿耳茨海默氏tau蛋白在动物大脑中表达。如实施例3所描述和图3所证明的，通过几种单克隆抗体检测到阿耳茨海默氏tau的表达。图4证明了蛋白质在转基因谱系不同大脑区域中的表达。

因此，本发明提供了转基因非人动物，其中编码阿耳茨海默氏tau蛋白的DNA分子稳定整合到所述动物的基因组中或以其它方式存在细胞核中以获得转录。所述动物的特征在于：

- 转基因依照孟德尔法则传递给下一代动物，形成转基因谱系（见实施例4）；
- 遗传得到的转基因在生成动物和后代大脑中表达截短型蛋白质（实施例3，图4）。

因此，本发明提供了在中枢神经系统（CNS）中表现神经原纤维病理的转基因非人动物。所述动物的特征在于：

- 截短tau蛋白的表达促进神经原纤维病理的形成（实施例5）；
- PHF 1免疫反应性NFT显示内源正常大鼠tau参与NFT的形成（实施例5）；
- 神经原纤维缠结表现为CNS神经元中的胞内包涵体和细丝，而且与人AD患病大脑中的NFT是同源的；
- 免疫荧光揭示了与在潜伏期（pre-clinical）阿耳茨海默氏病人脑组织中观察到的那些相似的小棒样结构的存在（实施例5）。

在本发明的优选实施方案中，转基因动物展示对甲酸敏感的诸如神经原纤维缠结、ghost缠结、和神经细丝等神经病理学。神经原纤维缠结由神经元内的细丝异常积累组成。缠结成分包括阿耳茨海默氏tau

以及正常tau分子。这些转基因动物作为合适模型系统用于研究阿耳茨海默氏病和治疗性、预防性、和诊断性物质的开发。

本发明提供了发展NF病理且具有能够诱发与AD有关的致病因素的遗传背景从而担当人的疾病模型的转基因动物。

因此，本发明提供了转基因非人动物，其遗传背景是其中DNA分子稳定整合到自发高血压动物的基因组中或以其它方式存在于细胞核中从而在特定遗传背景中实现转录。

本发明的另一个方面是提供包含遗传因素和下列与AD有关的其它致病因素的组的动物模型：

- 高血压，这是AD的最常见致病因素；
- 糖尿病，这可以通过饮食诱发（糖尿病是AD的最重要致病因素）；
- 高胆固醇血症，这可以通过饮食诱发（AD的另一个重要致病因素）。

所述病理学状况可以在提供的动物模型中容易的诱发。合适范例先前在文献中有报道（如26、27、28）。

此外，提供的动物模型是在SHR遗传背景上表达神经原纤维病理的第一个动物模型。

依照另一个方面，本发明提供了担当散发性阿耳茨海默氏病实验模型的动物，所述模型能够评估与AD发展有关的致病因素的作用。致病因素在绝大多数AD病例中发挥关键作用，因此，认为该模型是占到所有AD神经变性病例90%的散发性AD的模型。

在另一个优选实施方案中，本发明提供了用于治疗、预防、和诊断阿耳茨海默氏病的物质的筛选测定系统，包括：

- 通过下列方法评估物质：
 - 在所述动物中检测神经原纤维病理的变化；
 - 在转基因动物中测量神经行为的变化；
 - 在转基因动物中测量认知得分；
 - 在动物组织和体液中通过生物化学方法测量AD特异标记；

- 用于治疗 and 预防 tau 病理优选 AD 的物质的确认系统;
- 用于开发用于检测 tau 病理优选 AD 的诊断性标记和探针的确认系统;
- 用于治疗结合 tau 病理优选 AD 的高血压、糖尿病、异常脂血症、和高胆固醇血症的物质的确认系统。

因此, 本发明提供了用于评估物质或疗法特别是 NFT 减少或预防疗法的功效的体内测定法。所述动物可用于筛选用于神经变性疾病的物质或疗法, 特别是 tau 病理, 优选 AD 和伴随神经原纤维缠结形成的其它神经变性疾病。

因此, 本发明提供了模型系统, 由可用于研究阿耳茨海默氏病的病因学和治疗方法的转基因动物、细胞、和测定法组成。所述测定法还可用于筛选抑制神经原纤维病理形成的物质和物质的其它治疗性效果。

本发明的转基因动物及由其衍生的动物细胞用于筛选化合物在使用标准方法学治疗阿耳茨海默氏病中的潜在效果。以一段时间和各种剂量将化合物施用于动物或导入培养基, 然后对动物和动物细胞分别检验组织病理学和阿耳茨海默氏 tau 表达中的变化。另外, 对转基因动物进行神经行为测试的能力使之能够在用潜在治疗剂治疗后监测认知功能。化合物的筛选导致用于预防、治疗、或诊断阿耳茨海默氏病的特定试剂的选择。筛选方法的许多变化对于本领域熟练技术人员而言是已知的, 而且可用于本发明的范围内。

本发明的转基因动物模型还可用于解开导致神经变性和阿耳茨海默氏病事件的分子级联反应, 从而可能鉴定治疗靶。

本发明的还有一个方面是提供基于衍生自本发明转基因动物的细胞系或衍生自转基因大鼠胚胎的细胞系的体外测定法, 其中所述测定法作为筛选和确认工具用于发现和开发阿耳茨海默氏诊断方法和标记。所述体外测定法基于细胞系, 而且还可作为筛选和确认工具用于发现抗阿耳茨海默氏治疗性和预防性药物。

展示下面的实施例是为了作为例示, 而且因为各种其它实施方案

对于本领域技术人员而言是显而易见的，下面的实施例不应当解释为对本发明范围的限制。

图的简述

图1：用于基因表达构建体的基因工程的阿耳茨海默氏tau蛋白cDNA的示意图，它用于生成本发明的转基因动物。

图2：用于生成转基因动物的基因构建体的制备和确认。转基因动物的构建是通过包含阿耳茨海默氏tau编码序列的克隆基因构建体的前核显微注射进行的。通过限制性分析和使用转基因特异性引物的PCR（小图A，PCR扩增得到的DNA片段的琼脂糖凝胶）以及通过DNA测序来确认基因构建体，来控制潜在突变。确认之后纯化基因构建体（小图B，纯转基因片段的琼脂糖凝胶）并瞬时转染到哺乳动物细胞中（小图C，Western印迹确认蛋白质表达）。完成测定后，去掉构建体的原核序列并注射到一日龄大鼠胚胎中。底部的流程图显示了转基因动物生成的简化流程。

图3：转基因生成动物和转基因动物F1代的基因分型。小图A显示了基因分型实验的对照（+C，阳性对照；NAC，无扩增对照；NTC，无模板对照）。小图B显示PCR基因分型的结果。样品编号12是一只转基因阳性动物。小图C概述了用于确认生成动物的繁殖实验。此外，小图显示了依照孟德尔法则将转基因传递给下一代的本发明转基因系。

图4：阿耳茨海默氏tau蛋白在转基因大鼠大脑中的表达。左图描绘了Western印迹分析，右图展现了每道加载的蛋白质总量。阿耳茨海默氏tau蛋白以35kD的大小迁移（第1道，箭头），通过泛tau单克隆抗体DC 25检测。为了Western印迹，采用ECL技术，并在曝光1分钟后观察到特异信号。加载了由转基因动物大脑裂解物提取的7.5 μ g总蛋白（第1道），而加载了来自野生型对照动物的25 μ g蛋白质。M，分子量标记。

图5：阿耳茨海默氏tau蛋白在转基因大鼠不同大脑区域中的表达。来自转基因大鼠大脑区域的总蛋白裂解物的Western印迹分析。第1道，

生成动物 (F0代) 的全大脑裂解物 - 10 μ g 蛋白质; 第2道, F2代转基因动物的全大脑裂解物; 第3-6道, 来自F2代转基因动物的蛋白质裂解物: 3-海马, 4-皮层下区域, 5-大脑皮层, 6-脊髓和髓质; 第7-8道是来自F2代对照非转基因同窝幼仔的大脑裂解物: 7-皮层, 8-小脑 (第2-8道每道加载20 μ g总蛋白)。

图6: 来自转基因动物和非转基因对照野生型动物的大脑切片的银染。在转基因大鼠CNS的神经元中检测到胞内包涵体和神经原纤维细丝 (小图B和C, 转基因动物)。野生型大鼠在同源大脑区域中不显示这些结构 (A, 野生型对照)。放大倍数: 200倍 (A和B), 400倍 (C)。

图7: 在转基因动物中枢神经系统中使用泛tau单克隆抗体DC 25对神经原纤维缠结的检测。mAb DC 25识别AD患者神经元中的NFT。在转基因大鼠大脑中识别了等同结构 (小图B和D)。野生型大鼠在同源大脑区域中不显示任何相似结构 (A、C)。放大倍数: 100倍 (A、B), 200倍 (C、D)。

图8: 在转基因动物中枢神经系统中通过单克隆抗体PHF-1对神经原纤维缠结的检测。PHF-1是tau磷酸化的特异标记。与这种抗体的免疫反应性显示了阿耳茨海默氏tau的表达涉及NFT形成过程中的内源tau。另外, 免疫荧光染色显示了与在潜伏期阿耳茨海默氏病大脑组织中观察到的那些相似的小棒样结构。放大倍数: 100倍 (A)、200倍 (B)、1000倍 (C、D)。

图9: 作为筛选测定系统用于鉴定治疗指引和候选药物的神经元细胞培养物。转基因和非转基因大鼠神经元原代培养物可以在体外培养后用于此目的, 而且可以使用视频显微镜检查术来评估候选药物对线粒体运输的影响。体外培养3天后 (3DIV) 显示荷载活体染料 (如Mito-trek) 的皮层 (Cx) 和海马 (Hipp) 神经元。显现了线粒体 (MT)。

图10: 阿耳茨海默氏病的组织病理学特征, 在本发明转基因动物中再现。所示神经原纤维病理是阿耳茨海默氏病的主要特点之一。图10显示了通过Gallyas银技术 (A、C) 和通过免疫组化 (E) 在AD患者大脑中检测到的神经原纤维缠结与在本发明转基因动物中观察到的等

同病理结构的比较。免疫化学染色是使用识别串联重复区（29）中的普通tau表位的单克隆抗体7.51进行的。

实施例

实施例 1: 包含编码阿耳茨海默氏 tau 蛋白 - 人截短 tau 基因的 DNA 序列的基因构建体的设计; 基因构建体在转基因动物中的普遍性和组织特异性表达的工程和确认

构建阿耳茨海默氏tau表达载体的方法包括下列步骤:

- 图1显示了编码序列尤其是缺失和截短的设计;
- 使用校正型DNA聚合酶和含有合适限制性序列的寡核苷酸, PCR 扩增这些tau基因片段, 使得它们能够克隆到真核表达载体中, 位于常规或组织特异性启动子之下, 克隆使用标准方法在普通细菌菌株中进行;
- 进行克隆基因的确认以检查插入基因的取向, 其通过限制性消化和/或PCR分析确认(图2A)。另外, 将构建体部分测序以排除可能的突变形式;
- 纯化意欲用于显微注射的片段(图2B);
- 确认通过将转基因转染到哺乳动物细胞中获得的蛋白质表达, 主要是COS-7和C6大鼠神经胶质瘤细胞, 并通过Western印迹法分析蛋白质在真核细胞中的表达(图2C)。

所有方法描述于下面的指南: Sambrook等人,《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》即分子克隆: 实验室指南, 冷泉港实验室出版社, 1989, (14)。

实施例 2: 转基因大鼠的生成

将包含阿耳茨海默氏tau编码序列的克隆基因构建体注射到一日龄胚胎的雄性前核中。使用常规技术(15)在分开的实验中由SHR供体雌性抽取受精卵。显微注射DNA后, 将合子在CO₂温箱中体外培养大约12小时, 并移植到假孕养母的输卵管中。通过对基因组DNA中转基因特

异性靶序列的PCR来鉴定生成者。为了测定tau基因型，由采自每只大鼠的大约0.5cm尾巴纯化基因组DNA。通过PCR分析来鉴定包含转基因的后代。设计用于诊断性PCR筛选的寡核苷酸，从而能够容易的测定转基因的完整性。为了测定整合到大鼠基因组中的转基因拷贝数，进行实时PCR分析。

例如，Tg系#318包含4个拷贝的转基因，这是使用Sybre Green法和BioRad PCR仪通过实时PCR测定的。

实施例 3:

胚胎移植到养母后出生动物的基因分型，转基因动物的鉴定和转基因传递到后代的评价

由尾尖提取DNA: 使用DNeasy组织试剂盒(Qiagen)提取基因组DNA。

基因分型: 对衍生自转基因动物亲代的基因组DNA进行编码双重截短tau形式的转基因的特异性扩增, 显示于图3A和3B。对F1代基因组DNA的进一步分析揭示了转基因是可遗传的, 因为它们在亲代的后代中也得到鉴定。因此, 编码阿耳茨海默氏tau的转基因固定在动物的染色体DNA中。对两只阳性对照(质粒和TG阳性基因组DNA)和两只阴性对照(无扩增对照异源基因组DNA; 无模板对照作为化学制品对照)进行基因分型, 如图3A所示。

转基因表达的分析: 通过RT-PCR分析来评估衍生自转基因的mRNA的表达, 运用公知方法, 包括RT-PCR和凝胶电泳。由迅速冷冻的转基因动物组织提取RNA, 并进行逆转录, 随后是cDNA的特异性扩增。

大鼠繁殖以及杂合和纯合大鼠的生成: 将转基因阳性大鼠与野生型SHR交配。在几种系中实现了种系传递。在此实施例中显示了Tg系#318。将雄性和雌性转基因大鼠(每一只都包含4个拷贝的截短人tau蛋白基因)彼此交配和与野生型SHR大鼠交配以扩大转基因群体。观察转基因在后代中的孟德尔分离比率(图3C)。

本发明的转基因动物可用于与过度表达包含家族性阿耳茨海默氏病(FAD)突变的人APP或PS1(13)的转基因动物杂交。由此得到的大

鼠将表达APP和PS1二者，而且在高血压遗传背景上有或无FAD突变。可以在体内和体外研究PS1和APP对NFT形成的影响。具体而言，可以通过免疫组织化学的手段来检验AD相关病理的发作和严重性。

实施例 4：阿耳茨海默氏 tau 蛋白在转基因大鼠大脑中的表达

使用tau蛋白特异性单克隆抗体通过Western印迹分析来进行蛋白质表达。我们分析了对转基因而言在遗传上阳性且能够将转基因传递给下一代的大鼠的大脑组织。实验对照是同时分析来自转基因阴性的年龄匹配大鼠和转基因阴性同窝幼仔的大脑提取物。

组织样品的制备：将大约2mg新鲜分离的大脑组织在30 μ l含有完全不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物（Roche）的修改Hunt氏裂解缓冲液（20mM Tris pH8.0、100mM NaCl、1mM EDTA、0.5% Igepal CA630、0.5% Triton X-100）中机械匀浆。添加170 μ l裂解缓冲液，用注射器和针头（22G）将匀浆液弄碎，并在液氮中冷冻。在冰上缓慢融化后，将裂解物超声处理并以10000g于4℃离心15分钟。使用Beckman分光光度计通过Bradford测定法测定样品中的蛋白质含量。

PAGE和Western印迹。在含0.1%（w/v）SDS的12%变性聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白质。在Tris-甘氨酸缓冲液（25mM Tris、192mM甘氨酸、0.1% SDS）中进行电泳。蛋白质分离后进行半干印迹。使用Tris-甘氨酸-异丙醇缓冲液系统（25mM Tris、192mM甘氨酸、20%异丙醇）。使用与mAb 7.51（29）以及mAb tau-1（21）同等识别tau蛋白的抗tau单克隆抗体DC 25将tau蛋白染色。使用抗小鼠HRP抗体通过ECL法测定阳性信号。通过Ponceau染色控制印迹流程的效率。蛋白质分析揭示了阿耳茨海默氏tau蛋白在转基因大鼠大脑总蛋白提取物中的特异性表达（图4），以及阿耳茨海默氏tau蛋白在转基因大鼠不同大脑区域中的表达（图5）。

实施例 5：转基因大鼠大脑的免疫组织化学分析

为了对转基因大鼠进行免疫组化分析，使用几种tau蛋白和阿耳茨

海默特异性单克隆抗体。这些研究中所采用的单克隆抗体的简短描述包括识别磷酸化表位Ser 396 - Ser 404的PHF 1; 识别不依赖磷酸的表位Lys 347 - Ile 353的mAb DC 25; 识别磷酸化表位Ser 198 - Ser 202的mAb AT 8; 识别非磷酸化表位的mAb tau 1; 识别不依赖磷酸的表位的mAb tau 5 (15、16、17、18、19、20、21、22)。

光学显微镜和免疫荧光: 如下制备组织并切片。用乙醚麻醉转基因动物和对照动物并立即心脏内灌注经过缓冲的4%多聚甲醛, 切除大脑, 用20%蔗糖防冻, 快速冷冻, 并在低温恒温器中切片, 厚度50 μm 。在染色前, 将一些切片用70%甲酸短暂预处理。将大鼠大脑组织切片在溶于PBS的1% H_2O_2 中保温, 并通过在封闭液(PBS、0.1% Triton)、5%正常马血清)中保温来封闭非特异结合位点。使用上文所列抗体进行免疫染色, 然后与生物素化马抗小鼠抗体一起保温, 随后是亲和素-生物素复合物保温, 并用VIP和DAB溶液显现。将组织切片放置在明胶包被载玻片上, 干燥, 用分级乙醇、二甲苯处理, 并用Entellan盖片。

银染: 调整先前描述的Gallyas银染法(23)适用于自由漂浮的50 μm 切片, 用金调色。

免疫荧光染色: 为了进行间接免疫荧光标记, 将切片用1% NaHBO_4 预处理30分钟以减少大脑组织的自身荧光。然后用一抗于4 $^{\circ}\text{C}$ 染色过夜, 与马抗小鼠生物素化抗体一起保温, 随后是与链霉亲和素Alexa 488缀合物保温。

图10描绘了在AD患者大脑中看到的NF病理与在本发明转基因动物中观察到的那些NF病理的比较。

实施例 6: 用于治疗 and 预防阿耳茨海默氏病的药物指引和药物候选的筛选测定系统

本发明的转基因动物可以作为细胞来源用于细胞培养。动物和细胞都可以用于本发明的测定法。例如, 可以使用标准培养技术来培养表达截短tau基因的大脑组织的细胞。动物和培养细胞可以作为体内和

体外系统用于研究候选药物对细胞构造、细胞分裂、和凋亡以及原代培养神经元的形态、原代培养物中神经突发芽、轴突分支、和轴突延长的作用，还用于研究细胞器运动（图9）。它们还可作为测试系统用于测试物质的神经营养效果。

可以设计研究来筛选可以通过测试物质来调节的tau与微管蛋白的相互作用和与细胞器交通（trafficking）的相互作用的数量或质量变化。

还可以设计研究来筛选在突触连接构建过程中调节细胞骨架蛋白的表达或活性的化合物。

还可以设计研究来筛选能够影响NFT形成或蛋白质-蛋白质相互作用的化合物，它们最终能够导致NFT形成的减缓、抑制、或消除，而且这可以作为有用测定法用于筛选对tau病理和其它神经变性疾病优选AD具有治疗潜力的物质。可以在细胞培养物中也可以在体内通过神经病理学、神经生理学、和行为分析的手段评估化合物对动物的效果。筛选方法的许多变化对于本领域技术人员而言是已知的，而且可用于本发明的范围。

这些实施例出于例示目的描述了本发明的特定方面和实施方案，而非限制下文权利要求所列的本发明范围。

参考文献

1. Martin, J.B., (1999) N. Engl. J. Med. 340, 1970-1980.
2. Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988a) Proc Natl Acad Sci USA 85: 4884-4888
3. Wischik CM, Novak M, Trogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jake R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A (1988b) Proc Natl Acad USA 85: 4506-4510
4. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S., Houlden H, Pickering-Brown S, Chackraverty S, Isaacs A, Grover A (1998) Nature 393, 702-705
5. Spillantini NG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 7737-7741.
6. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. : Science 2001 Aug 24;293(5534):1487-1491
7. Goedert M, Spillantini MG.: Biochem Soc Symp 2001; 67: 59-71
8. Spittaels, K., C. Van den Haute, et al. : Am J Pathol (1999), 155 (6): 2153-65.
9. Duff, K., H. Knight, et al.: Neurobiol Dis (2000) 7 (2): 87-98.
10. Czech C, Lesort M, Tremp G, Terro F, Blanchard V, Schombert B, Carpentier N, Dreisler S, Bonici B, Takashima A, Moussaoui S, Hugon J, Pradier L.: Neuroscience (1998) Nov; 87 (2): 325-36
11. Echeverria V and Cuello AC.: Mol Neurobiol (2002) Oct-Dec; 26(2-3):299-316
12. Breteler, MMB.: Neurobiology of Aging 21 (2000) 153-160

13. in't Veld B.A., A. Ruitenberga, A. Hofmana, B.H.Ch. Strickera, M.M.B. Bretelera,: Neurobiology of Aging 22 (2001) 407-412
14. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
15. Hogan,B. et al. Manipulating the Mouse Embryo, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986
16. Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM.: Neuron (1993) 10: 1089-99
17. Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al.: EMBO J (1992) Apr;11(4): 1593-7
18. Braak E, Braak H, Mandelkow EM: Acta Neuropathol (Berl). (1994); 87(6): 554-67.
19. Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E.: Neurosci Lett (1995) Apr 21;189(3):167-9
20. Szendrei GI, Lee VM, Otvos L Jr.: J Neurosci Res (1993) Feb 1;34(2): 243-9
21. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. J: Cell Biol (1985) Oct;101(4):1371-8
22. LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI.: Proc Natl Acad Sci U S A (1995) Oct 24;92(22):10369-73
23. Gallyas, F.: Acta Morphol.Acad.Sci.Hung. (1971) 19, 1-8.
24. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Neuron 4, 519.
25. Gordon JW, Chesa PG, Nishimura H, Rettig WJ, Maccari JE, Endo T, Seravalli E, Seki T, Silver J.: Cell.1987 Jul 31; 50(3):445-52.

-
26. Damiano PF, Roson MI, Armando I, Nowicki S, Dascal E, Cuniberti L, Albornoz LE, de la Riva IJ. Potential role of glycerol leading to rat fructose hypertension. *Hypertension* 1999 Oct; 34 (4Pt 2):1007-11;.
27. Jackson B, Fabris B, Paxton D, Franze L, Johnston CI. High salt diet ameliorates effects of angiotension converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1990 Mar; 17(3); 229-34.
28. Turley SD, Hansen CT. Rates of sterol synthesis in the liver and extrahepatic tissues of the SHR/N-corpulent rat, an animal with hyperlipidemia and insulin-independent diabetes. *J Lipid Res*. 1986 May; 27(5): 486-96.
29. Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jul 1; 88(13): 5837-41.

序列表

<110> Axon Neuroscience Forschungs- und Entwicklungs GmbH

<120> 表达阿尔茨海默氏 τ 蛋白的转基因动物

<130> R 41446

<150> A 1053/2002

<151> 2002-07-12

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 969

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

atgcaccaag accaagaggg tgacacggac gctggcctga aagctgaaga agcaggcatt	60
ggagacaccc ccagcctgga agacgaagct gctggtcacg tgacccaagc tcgcatggtc	120
agtaaaagca aagacgggac tggaagcgat gacaaaaaag ccaagggggc tgatggtaaa	180
acgaagatcg ccacaccgag gggagcagcc cctccaggcc agaagggcca ggccaacgcc	240
accaggattc cagcaaaaac cccgcccgtt ccaaagacac caccagctc tggatgaacct	300
ccaaaatcag gggatgcag cggtacagc agccccggct cccaggcac tcccggcagc	360
cgctcccga cccgtccct tccaaccca cccacccggg agccaagaa ggtggcagtg	420
gtccgtactc cacccaagtc gccgtcttcc gccaaagacc gcctgcagac agccccgtg	480
cccatgccag acctgaagaa tgtcaagtcc aagatcggct cactgagaa cctgaagcac	540
cagccgggag gcgggaaggt gcagataatt aataagaagc tggatcttag caacgtccag	600
tccaagtgtg gctcaaagga taatatcaaa cacgtcccgg gaggcggcag tgtgcaaata	660
gtctacaaac cagttgacct gagcaaggtg acctccaagt gtggctcatt aggcaacatc	720

catcataaac caggaggtgg ccaggtggaa gtaaatctg agaagcttga cttcaaggac 780
 agagtccagt cgaagattgg gtccctggac aatatcacc acgtccctgg cggaggaaat 840
 aaaaagattg aaaccacaa gctgaccttc cgcgagaacg ccaaagccaa gacagaccac 900
 ggggcggaga tcgtgtacaa gtcgccagtg gtgtctgggg acacgtctcc acggcatctc 960
 agcaatgtc 969

<210> 2

<211> 795

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

atggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat 60
 ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagcccctc caggccagaa gggccaggcc 120
 aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctccaa agacaccacc cagctctggt 180
 gaacctcaa aatcagggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggtcccc aggcactccc 240
 ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaaggtg 300
 gcagtgggcc gtactccacc caagtcgccc tcttcgcca agagccgcct gcagacagcc 360
 cccgtgcca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg 420
 aagcaccagc cgggaggcgg gaaggtgcag ataattaata agaagctgga tcttagcaac 480
 gtccagtcca agtgtggctc aaaggataat atcaaacacg tcccgggagg cggcagtggt 540
 caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc aaggtagcct ccaagtgtgg ctcatagagc 600
 aacatccatc ataaaccagg aggtggccag gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc 660
 aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc ctggacaata tcaccacagt ccctggcgga 720
 ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg accttccgag agaacgcca agccaagaca 780

gaccacgggg cggag

795

<210> 3

<211> 723

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

atgccacac cgcggggagc agcccctcca ggccagaagg gccaggccaa cgccaccagg 60

attccagcaa aaaccccgcc cgctccaaag acaccacca gctctggtga acctccaaaa 120

tcaggggatc gcagcggcta cagcagcccc ggctccccag gcactcccg cagccgctcc 180

cgcaccccggt cccttccaac cccaccacc cgggagccca agaaggtggc agtggctcgt 240

actccacca agtcgccgtc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccattg 300

ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg 360

ggaggcggga aggtgcagat aattaataag aagctggatc ttagcaacgt ccagtccaag 420

tgtggctcaa aggataatat caaacacgtc ccgggaggcg gcagtgtgca aatagtctac 480

aaaccagttg acctgagcaa ggtgacctcc aagtgtggct cattaggcaa catccatcat 540

aaaccaggag gtggccaggt ggaagtaaaa tctgagaagc ttgacttcaa ggacagagtc 600

cagtcgaaga ttgggtccct ggacaatatc acccacgtcc ctggcggagg aaataaaaag 660

attgaaaccc acaagctgac ctccgcgag aacgccaag ccaagacaga ccacggggcg 720

gag 723

<210> 4

<211> 885

<212> DNA

<213> 人

<400> 4

atggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat 60

ggtaaacga agatcgccac accgcgggga gcagcccctc caggccagaa gggccaggcc 120
 aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgtccaa agacaccacc cagctctggt 180
 gaacctcaa aatcagggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggctcccc aggcactccc 240
 ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaagggtg 300
 gcagtgggtcc gtactccacc caagtgcgcg tcttcgcca agagccgcct gcagacagcc 360
 cccgtgccca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg 420
 aagcaccagc cgggaggcgg gaaggtgcag ataattiaata agaagctgga tcttagcaac 480
 gtccagtcca agtgtggctc aaaggataat atcaaacacg tcccgggagg cggcagtgtg 540
 caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc aaggtgacct ccaagtgtgg ctcataggc 600
 aacatccatc ataaaccagg aggtggccag gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc 660
 aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc ctggacaata tcaccacgt ccctggcgga 720
 ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg accttcgcg agaacgcaa agccaagaca 780
 gaccacgggg cggagatcgt gtacaagtcg ccagtgggtg ctggggacac gtctccacgg 840
 catctcagca atgtctctc caccgcagc atcgacatgg tagac 885

<210> 5
 <211> 813
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 5
 atgccacac cgcggggagc agccctcca ggccagaagg gccaggcaa cgccaccagg 60
 attccagcaa aaaccccgcc cgtccaaag acaccacca gctctggtga acctcaaaa 120
 tcaggggatc gcagcggtc cagcagcccc ggctccccag gcactccgg cagccgctcc 180
 cgcaccccggt cccttccaac cccaccacc cgggagccca agaagggtggc agtggtccgt 240
 actccacca agtcgccgtc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccattg 300

ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg 360
 ggaggcggga aggtgcagat aattaataag aagctggatc ttagcaacgt ccagtccaag 420
 tgtggctcaa aggataatat caaacacgtc ccgggaggcg gcagtgtgca aatagtctac 480
 aaaccagttg acctgagcaa ggtgacctcc aagtgtggct cattaggcaa catccatcat 540
 aaaccaggag gtggccaggt ggaagtaaaa tctgagaagc ttgacttcaa ggacagagtc 600
 cagtcgaaga ttgggtccct ggacaatatc acccacgtcc ctggcggagg aaataaaaag 660
 attgaaaccc acaagctgac cttccgagag aacgccaaag ccaagacaga ccacggggcg 720
 gagatcgtgt acaagtcgcc agtgggtgtct ggggacacgt ctccacggca tctcagcaat 780
 gtctcctcca ccggcagcat cgacatggta gac 813

<210> 6
 <211> 285
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 6
 atcaaacacg tcccgggagg cggcagtggt caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc 60
 aaggtgacct ccaagtgtgg ctcattaggc aacatccatc ataaaccagg aggtggccag 120
 gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc 180
 ctggacaata tcaccacgt ccttggcgga ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg 240
 accttccgcg agaacgccaa agccaagaca gaccacgggg cggag 285

<210> 7
 <211> 291
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 7
 gataatatca aacacgtccc ggaggcggc agtgtgcaaa tagtctacaa accagttgac 60

ctgagcaagg tgacctccaa gtgtggctca ttaggcaaca tccatcataa accaggaggt 120
 ggccaggtgg aagtaaaatc tgagaagctt gacttcaagg acagagtcca gtcgaagatt 180
 gggctccctgg acaatatcac ccacgtccct ggccggaggaa ataaaaagat tgaaaccac 240
 aagctgacct tccgcgagaa cgccaaagcc aagacagacc acggggcgga g 291

<210> 8

<211> 240

<212> DNA

<213> 人

<400> 8

atcaaacacg tcccgggagg cggcagtgtg caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc 60
 aaggtgacct ccaagtgtgg ctcattaggc aacatccatc ataaaccagg aggtggccag 120
 gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc 180
 ctggacaata tcaccacgt ccctggcgga ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg 240

<210> 9

<211> 189

<212> DNA

<213> 人

<400> 9

gtgcaaatag tctacaaacc agttgacctg agcaaggtga cctccaagtg tggctcatta 60
 ggcaacatcc atcataaacc aggaggtggc caggtggaag taaaatctga gaagcttgac 120
 ttcaaggaca gagtccagtc gaagattggg tccctggaca atatcaccca cgtccctggc 180
 ggaggaaat 189

<210> 10

<211> 876

<212> DNA

<213> 人

<400> 10

atgcaccaag accaagaggg tgacacggac gctggcctga aagctgaaga agcaggcatt	60
ggagacaccc ccagcctgga agacgaagct gctggtcacg tgaccaagc tcgcatggtc	120
agtaaaagca aagacgggac tggaagcgat gacaaaaaag ccaagggggc tgatggtaaa	180
acgaagatcg ccacaccgcg gggagcagcc cctccaggcc agaagggcca ggccaacgcc	240
accaggattc cagcaaaaac cccgcccgt ccaaagacac caccagctc tggatgaacct	300
ccaaaatcag gggatcgcag cggctacagc agccccggct ccccaggcac tcccggcagc	360
cgtccccga ccccgctcct tccaaccca cccaccggg agccaagaa ggtggcagt	420
gtccgtactc caccaagtc gccgtcttcc gccaaagacc gcctgcagac agccccgtg	480
cccatgccag acctgaagaa tgtcaagtcc aagatcggt ccaactgagaa cctgaagcac	540
cagccgggag gcgggaaggt gcaaatagtc tacaaaccag ttgacctgag caaggtgacc	600
tccaagtgtg gctcattagg caacatccat cataaaccag gaggtggcca ggtggaagta	660
aaatctgaga agcttgactt caaggacaga gtccagtcga agattgggtc cctggacaat	720
atcacccacg tccctggcgg aggaaataaa aagattgaaa ccacaagct gaccttccgc	780
gagaacgcca aagccaagac agaccacggg gcggagatcg tgtacaagtc gccagtgtg	840
tctggggaca cgtctccacg gcctctcagc aatgtc	876

<210> 11

<211> 702

<212> DNA

<213> 人

<400> 11

atggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat	60
ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagcccctc caggccagaa gggccaggcc	120
aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctccaa agacaccacc cagctctggt	180

gaacctccaa aatcagggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggctcccc aggcactccc 240
 ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaaggtg 300
 gcagtgtgcc gtactccacc caagtcgccg tcttcgccca agagccgcct gcagacagcc 360
 cccgtgccca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg 420
 aagcaccagc cgggaggcgg gaagggtcaa atagtctaca aaccagttga cctgagcaag 480
 gtgacctcca agtgtggctc attaggcaac atccatcata aaccaggagg tggccaggtg 540
 gaagtaaaat ctgagaagct tgacttcaag gacagagtcc agtcgaagat tgggtccctg 600
 gacaatatca cccacgtccc tggcggagga aataaaaaga ttgaaacca caagctgacc 660
 ttccgcgaga acgccaagc caagacagac cacggggcgg ag 702

<210> 12

<211> 630

<212> DNA

<213> 人

<400> 12

atgccacac cgcggggagc agcccctcca ggccagaagg gccaggccaa cgccaccagg 60
 attccagcaa aaaccccgcc cgctccaaag acaccacca gctctggtga acctcaaaa 120
 tcaggggatc gcagcggcta cagcagcccc ggctccccag gcactcccgg cagccgctcc 180
 cgcaccccggt cccttccaac cccaccacc cgggagccca agaaggtggc agtggtccgt 240
 actccacca agtcgccgtc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccattg 300
 ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg 360
 ggaggcggga aggtgcaaat agtctacaaa ccagttgacc tgagcaaggt gacctccaag 420
 tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggaggtg gccagggtga agtaaaatct 480
 gagaagcttg acttcaagga cagagtccag tcgaagattg ggtccctgga caatatcacc 540

cacgtccctg gcgaggagaaa taaaaagatt gaaaccacaca agctgacctt ccgcgagAAC 600
 gccaaagcca agacagacca cggggcggag 630

 <210> 13
 <211> 792
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 13
 atgttcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat 60
 ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagcccctc caggccagaa gggccaggcc 120
 aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctccaa agacaccacc cagctctggt 180
 gaacctccaa aatcagggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggtcccc aggcactccc 240
 ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaaggtg 300
 gcagtggtec gtactccacc caagtcgccg tcttcgccca agagccgcct gcagacagcc 360
 cccgtgcccc tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg 420
 aagcaccagc cgggaggcgg gaaggtgcaa atagtctaca aaccagttga cctgagcaag 480
 gtgacctcca agtgtggctc attaggcaac atccatcata aaccaggagg tggccagggtg 540
 gaagtaaaat ctgagaagct tgacttcaag gacagagtcc agtcgaagat tgggtccctg 600
 gacaatatca cccacgtccc tggcggagga aataaaaaga ttgaaaccca caagctgacc 660
 ttccgcgaga acgccaagc caagacagac cacggggcgg agatcgtgta caagtcgcca 720
 gtggtgtctg gggacacgtc tccacggcat ctgagcaatg tctcctccac cggcagcatc 780
 gacatggtag ac 792

<210> 14
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 14

```

atgccacac cgggggagc agcccctcca ggccagaagg gccaggccaa cgccaccagg      60
attccagcaa aaaccccgcc cgctccaaag acaccacca gctctgggtga acctccaaaa      120
tcaggggatc gcagcggcta cagcagcccc ggctccccag gcactcccgg cagccgctcc      180
cgcaccccggt cccttccaac cccaccacc cgaggagccca agaagggtggc agtggtccgt      240
actccacca agtcgccgtc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccattg      300
ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg      360
ggaggcggga aggtgcaaat agtctacaaa ccagttgacc tgagcaaggt gacctccaag      420
tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggaggtg gccaggtgga agtaaaatct      480
gagaagcttg acttcaagga cagagtccag tcgaagattg ggtccctgga caatatcacc      540
cacgtccctg gcggaggaaa taaaaagatt gaaaccaca agctgacctt ccgcgagaac      600
gccaaagcca agacagacca cggggcggag atcgtgtaca agtcgccagt ggtgtctggg      660
gacacgtctc cagggcatct cagcaatgtc tcctccaccg gcagcatcga catggtagac      720

```

<210> 15

<211> 2946

<212> DNA

<213> 人

<400> 15

```

aatgtcccga attcccagcc tcaccacccc ttctcagtaa tgacctggt tggttgcagg      60
aggtacctac tccatactga gggtgaaatt aagggaaggc aaagtccagg cacaagagtg      120
ggaccccagc ctctcactct cagttccact catccaactg ggacctcac cacgaatctc      180
atgatctgat tcggttcctt gtctctcctt cccgtcacag atgtgagcca gggcactgct      240
cagctgtgac cctaggtgtt tctgccttgt tgacatggag agagcccttt cccctgagaa      300
ggcctggccc ctctctgtgc tgagcccaca gcagcaggct ggggtgtcttg gttgtcagtg      360

```

gtggcaccag gatggaaggg caaggcacc caggcaggcc cacagtcccg ctgtccccc	420
cttgcaccct agcttgtagc tgccaacctc ccagacagcc cagcccgtg ctcagctcca	480
catgcatagt atcagccctc cacacccgac aaaggggaac acacccctt ggaaatggtt	540
cttttcccc agtcccagct ggaagccatg ctgtctgttc tgctggagca gctgaacata	600
tacatagatg ttgccctgcc ctcccctct gcaccctgtt gattgtagt tggattgtc	660
tgtttatgct tggattcacc agagtgacta tgatagtga aaaaaaaaa aaaaaaaaa	720
aggacgcatg tatcttga aagtgtgta gaggtttcta acccaccctc acgaggtgtc	780
tctaccccc aactgggac tcgtgtggcc tgtgtggtgc caccctgtg gggcctcca	840
agttttgaaa ggcttctc agcacctggg acccaacaga gaccagctc tagcagctaa	900
ggaggccgtt cagctgtgac gaaggcctga agcacaggat taggactga gcgatgatg	960
ccccttcct acttccctt ggggctcct gtgtcagggc acagactagg tcttgtggt	1020
ggtctggctt gcggcgcgag gatggttctc tctgtcata gccgaagtc tcatggcagt	1080
cccaaaggag gcttacaact cctgcatcac aagaaaaagg aagccactgc cagctggggg	1140
gatctgcagc tcccagaagc tccgtgagcc tcagccacc ctcagactg gtctctctc	1200
aagctcgccc tctggagggg cagcgcagcc tcccaccaag ggccctgca ccacagcagg	1260
gattgggatg aattgcctgt cctggatctg ctctagaggc ccaagctgc tgcctgagga	1320
aggatgactt gacaagtcag gagacactgt tcccaaagc ttgaccagag cacctcagcc	1380
cgctgacctt gcacaaactc catctgtgc catgagaaaa gggaagccgc ctttgcaaaa	1440
cattgtgcc taaagaaact cagcagcctc aggcccaatt ctgccactt tggtttggt	1500
acagttaaag gcaaccctga gggacttggc agtagaaatc cagggcctcc cctggggctg	1560
gcagcttctg gtgcagctag agctttacct gaaaggaagt ctctgggccc agaactctc	1620
accaagagcc tccctgccgt tcgtgagtc ccagcaattc tcctaagttg aagggatctg	1680

agaaggagaa ggaaatgtgg ggtagatttg gtggtggtta gagatatgcc cccctcatta 1740
 ctgccaacag tttcggtgc atttcttcac gcacctcggg tcctcttcct gaagttcttg 1800
 tggcctgtc ttcagcacca tgggccttct tatacgaag gctctgggat ctccccctg 1860
 tggggcaggc tcttggggcc agcctaagat catggtttag ggtgatcagt gctggcagat 1920
 aaattgaaaa ggcacgttg cttgtgatct taaatgagga caatcccccc agggctgggc 1980
 actcctcccc tcccctcact tctccacct gcagagccag tgccttggg tgggctagat 2040
 aggatatact gtatgccggc tccttcaagc tgctgactca ctttatcaat agttccattt 2100
 aaattgactt cagtggtag actgtatcct gtttgctatt gcttgtttg ctatgggggg 2160
 aggggggagg aatgtgtaag atagttaaca tgggcaaagg gagatcttgg ggtgcagcac 2220
 ttaaaactgcc tcgtaaccct tttcatgatt tcaaccacat ttgctagagg gagggagcag 2280
 ccacggagtt agaggccctt ggggtttctc ttttccactg acaggcttcc ccaggcagct 2340
 ggctagtcca tcccccccc agccagggtc aggcgtagga atatggacat ctggttgctt 2400
 tggcctgtcg cctcttttca ggggtcctaa gccacaatc atgcctccct aagaccttgg 2460
 catccttccc tctaagccgt tggcacctct gtgccacctc tcacactggc tccagacaca 2520
 cagcctgtgc ttttgagct gagatcactc gcttcaccct cctcatcttt gttctccaag 2580
 taaagccacg aggtcggggc gagggcagag gtgatcacct gcgtgtccca tctacagacc 2640
 tgcagcttca taaaacttct gatttctctt cagctttgaa aagggttacc ctgggcactg 2700
 gcctagagcc tcacctccta atagacttag ccccatgagt ttgcatgtt gagcaggact 2760
 atttctggca cttgcaagtc ccatgatttc ttcgtaatt ctgagggtgg ggggagggac 2820
 atgaaatcat cttagcttag ctttctgtct gtgaatgtct atatagtgtt ttgtgtgttt 2880
 taacaaatga ttacactga ctgttgctgt aaaagtgaat ttggaaataa agttattact 2940
 ctgatt 2946

图 1

SEQ ID NO:	1				R1	R2	R3	R4		1149	tau 43
1	91									1059	
2		205								999	
3		277								999	
4		205								1089	
5		277								1089	
6					715					999	
7					709					999	
8					715					954	
9					741					930	
SEQ ID NO:	1				R1	R3	R4			1056	tau 44
10	91									966	
11		205								906	
12		277								906	
13		205								996	
14		277								996	

编号 SEQ ID NO:根据最短的R4异构体1-4和9-11
编号 SEQ ID NO:根据最短的R3异构体5-8

图 2

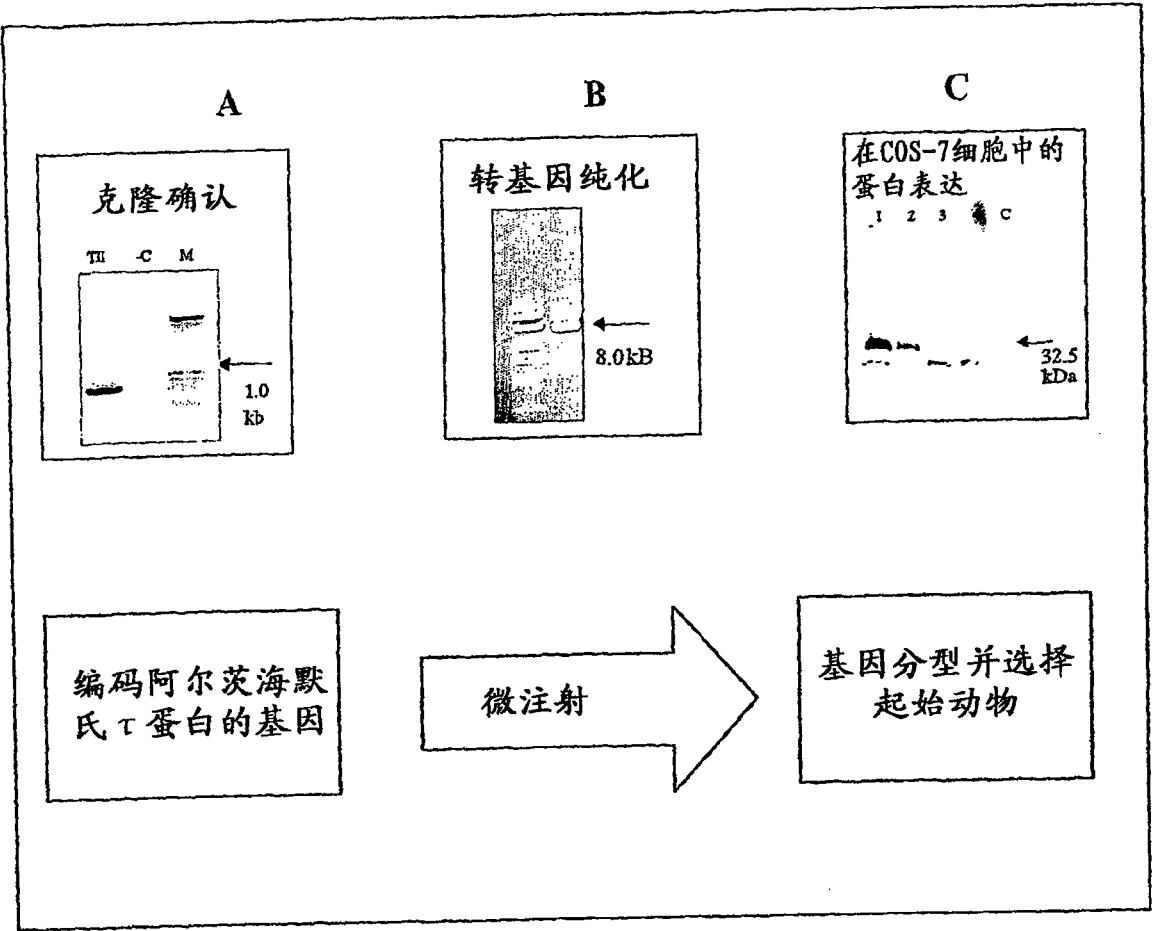


图 3

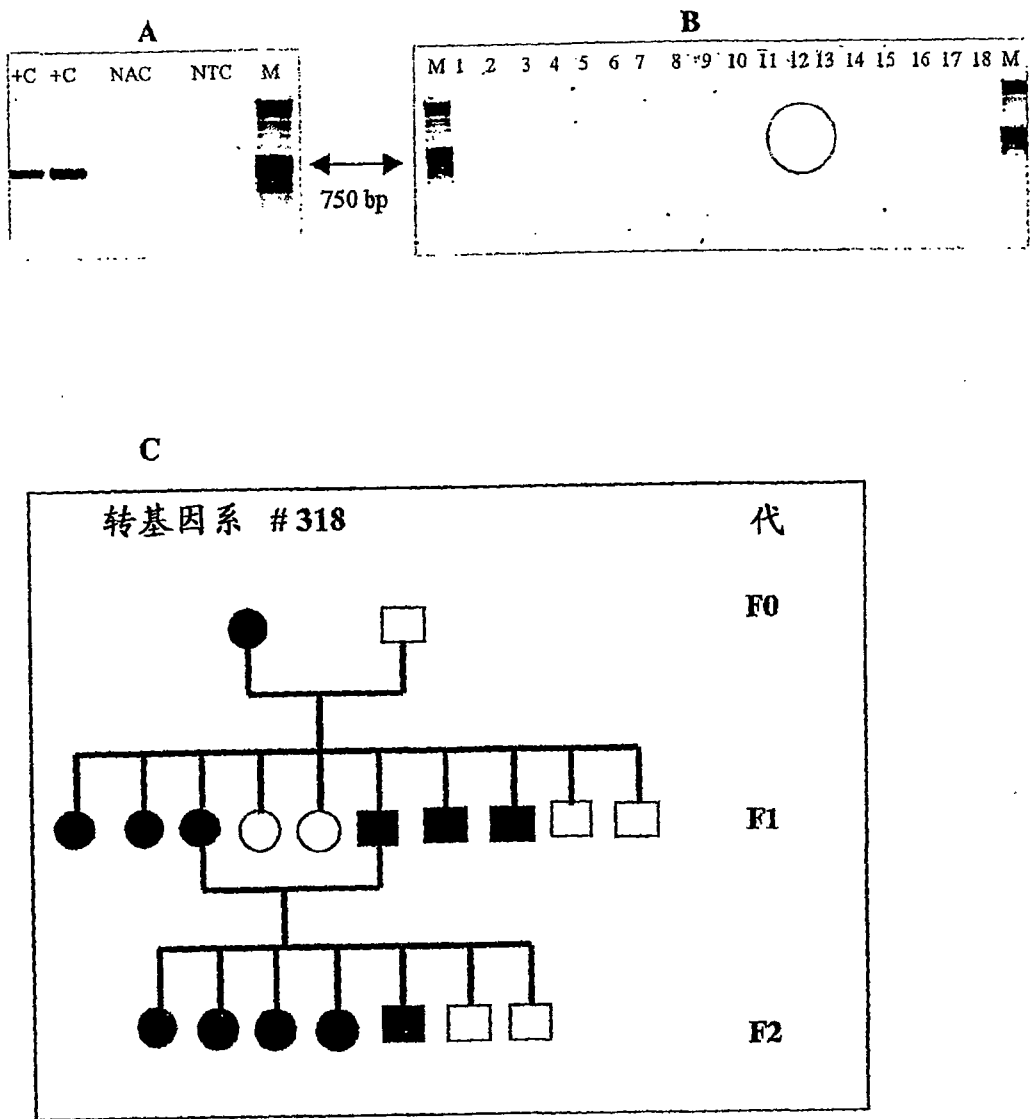


图 4

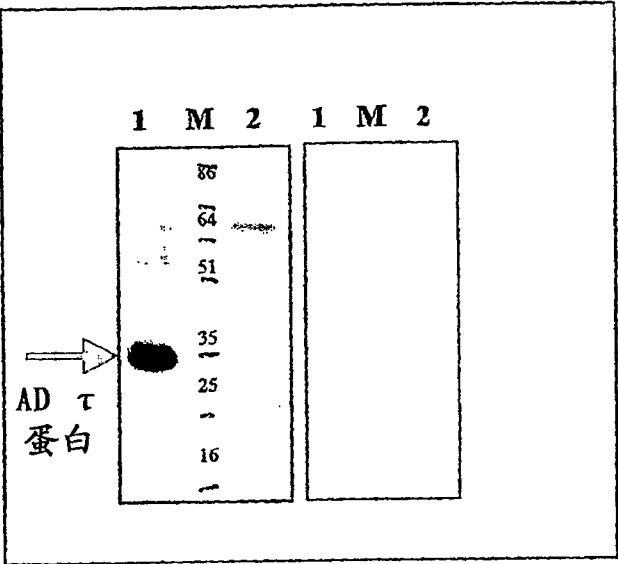


图5



图6

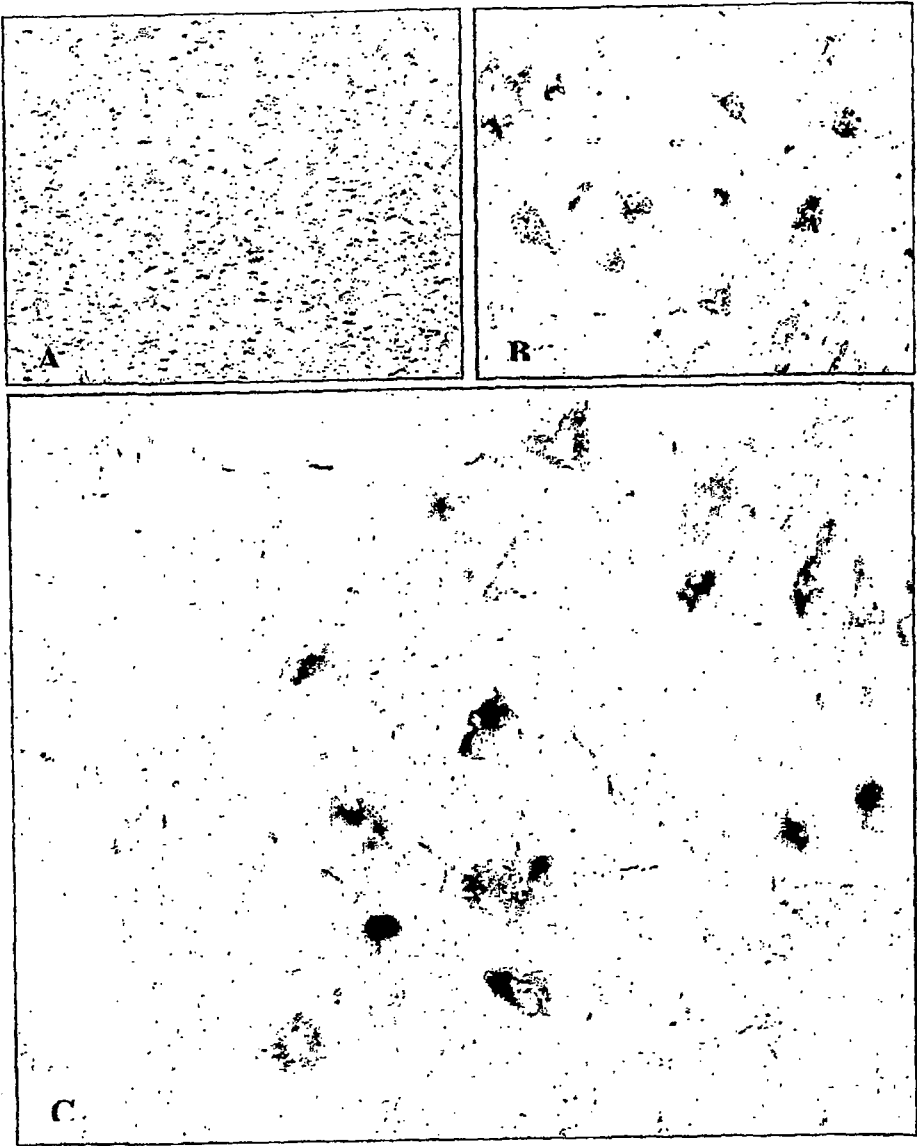


图7

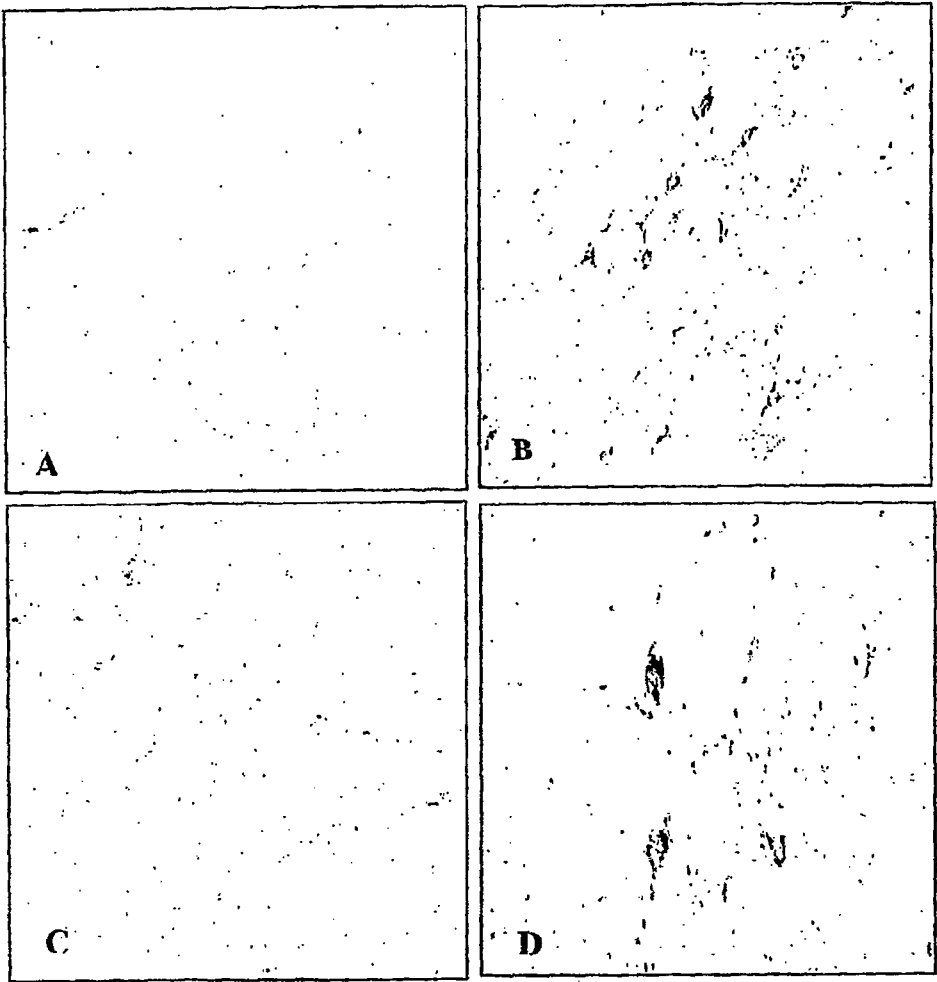


图 8

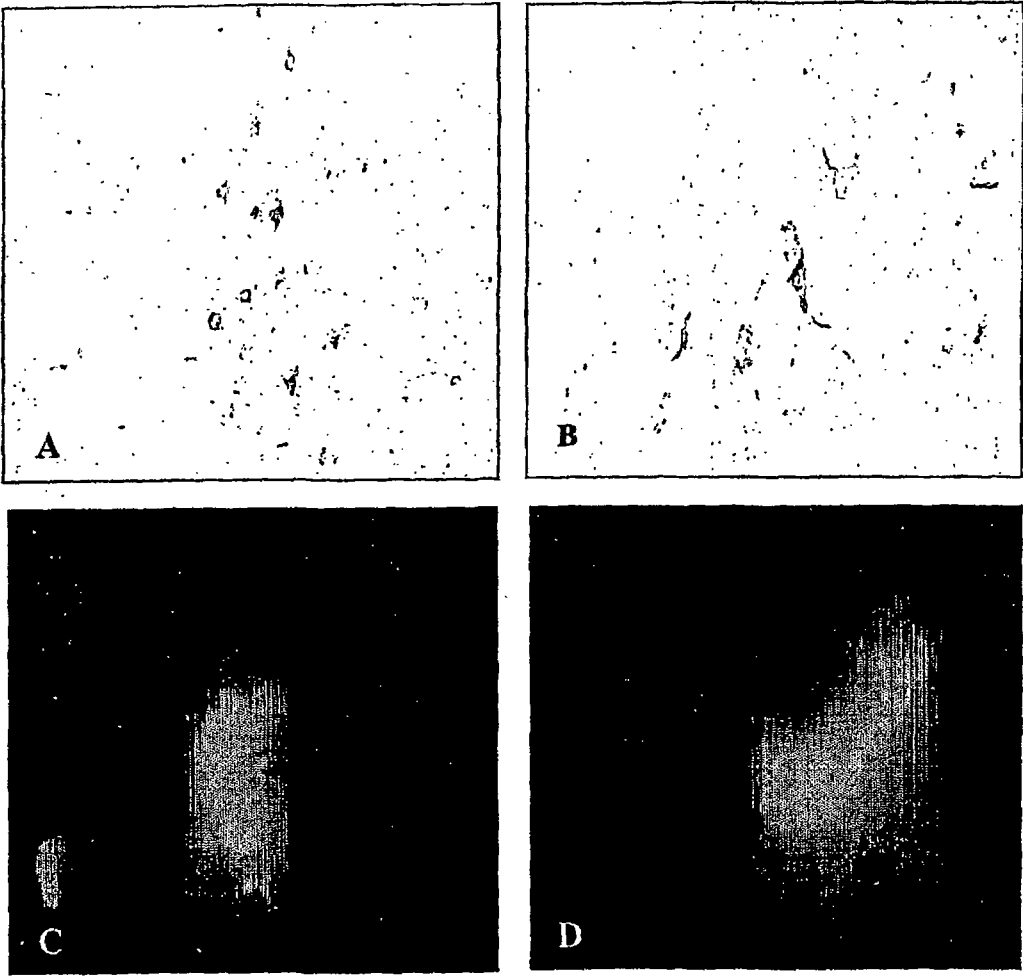


图 9

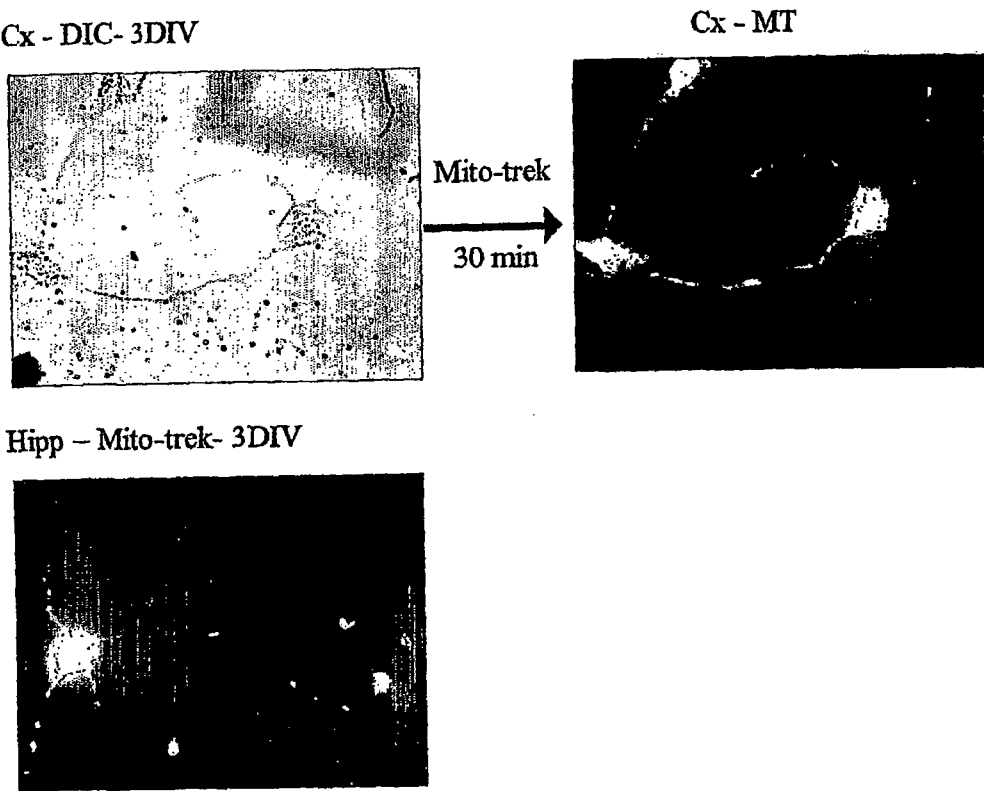


图10

人脑组织
AD病人的活检

转基因大鼠
脑组织 TG系Nr. 318

