



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 24 158 T2** 2005.12.29

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 159 423 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 24 158.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB99/02129**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 973 696.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/49132**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **24.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.12.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **09.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/12**

**A01K 67/027, C07K 14/78, A61K 38/39,
A61K 48/00, A61K 49/00**

(30) Unionspriorität:

103550 P 08.10.1998 US

(73) Patentinhaber:

The University of Hong Kong, Hong Kong, HK

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**CHEAH, Kathryn, Hong Kong, CN; CHEUNG,
Kenneth, Hong Kong, CN**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG TRANSGENER TIERE, DIE EINE MUTATION DES COLLAGEN X ENTHALTEN**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

Typ-X-Collagen und seine Funktion

[0001] Typ-X-Collagen ist ein Homotrimer aus drei $\alpha 1(X)$ -Ketten, mit einem kurzen (38 Aminosäuren) nicht-helikalen Aminoterminal (NC2), einer Tripelhelix aus 463 Aminosäuren und einer C-terminalen hochkonservierten nichtcollagenischen Domäne (NC1) aus 161 Aminosäuren. Dieses Collagen ist die hauptsächlich extrazelluläre Komponente, die von hypertrophen Chondrocyten in Wachstumsknorpel, der verkalkt werden soll, und in Zonen der sekundären Ossifikation synthetisiert wird (1, 2). Die Expression des $\alpha 1(X)$ -Collagen-Gens ist spezifisch mit hypertrophen Chondrocyten assoziiert und geht dem Einsetzen der endochondralen Ossifikation voraus (3). Obwohl dieses Collagen keine Fibrillen bildet, hat es sich als feine perizelluläre Filamente in Verbindung mit Knorpelcollagenfibrillen gezeigt (4). Typ-X-Collagen-Moleküle können in der Matrix auch andere supramolekulare Strukturen bilden, da sich erwiesen hat, dass sie sich *in vitro* zu einem hexagonalen Gitter zusammenfügen (5).

[0002] Neben der Assoziation mit Collagenfibrillen wechselwirkt Typ-X-Collagen auch mit anderen Matrixkomponenten, wie Annexin V, Chondrocalcin (6) und Proteoglycanen (4). Es hat sich auch gezeigt, dass Typ-X-Collagen innig mit dem Verkalkungsvorgang assoziiert ist, indem es an Ca^{2+} und Matrixvesikel bindet; letztere sind von Zellen abgeleitete Mikrostrukturen, die man in der Matrix von verkalkendem Knorpel und Knochen findet und von denen angenommen wird, dass sie eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Mineralablagerung spielen (7). Außerdem geht die Expression von Typ-X-Collagen der Mineralablagerung durch kultivierte Chondrocyten voraus (8).

[0003] Trotz der reichhaltigen Informationen über Typ-X-Collagen sind die genaue Funktion dieses Proteins und seine Rolle bei der Pathogenese von Chondrodysplasie immer noch Gegenstand von Kontroversen. Wegen seiner speziellen Assoziation mit hypertrophen Chondrocyten in der Verkalkungszone von Wachstumplattenknorpel wurde vorgeschlagen, dass Typ-X-Collagen wichtig für die endochondrale Knochenbildung ist (2). Zu den vorgeschlagenen Funktionen gehören die Bereitstellung eines leicht resorbierbaren Gewebes für die Ablagerung von Knochenmatrix während des endochondralen Wachstums von Röhrenknochen; die Bereitstellung eines Trägers, wenn die Knorpelmatrix während der endochondralen Ossifikation abgebaut wird (9, 10); oder die Regulierung des Verkalkungsvorgangs während der endochondralen Ossifikation (11–14). Diese einander widersprechenden Sichtweisen miteinander in Einklang zu bringen war ebenfalls schwierig, da die Folgen von Genmutationen, die zu einem Mangel an Typ-X-Collagen führen, bei Mensch und Maus voneinander abweichen.

[0004] Es hat sich gezeigt, dass Mutationen in der NC1-codierenden Domäne des humanen $\alpha 1(X)$ -Collagen-Gens (COL10A1) mit der autosomalen dominanten erblichen Skelettstörung metaphysäre Chondrodysplasie Typ Schmid (SMCD) assoziiert sind (15–18). SMCD ist eine relativ milde Form der metaphysären Chondrodysplasie, die sich durch Abnormalitäten der Wachstumsplatte ergibt. Der SMCD-Phänotyp ist hinsichtlich seiner Ausprägung variabel und durch eine kurze bis normale Statur mit Genu varum (O-Beine), Coxa vara (einen reduzierten Winkel zwischen dem Oberschenkelhals und -schaft) und ein Aufflackern der Metaphysen von Röhrenknochen gekennzeichnet (19, 20). Transgene Mäuse, die verkürztes Hühner-Typ-X-Collagen exprimieren, zeigen viel schlimmere Skelett-Abnormalitäten, ähnlich der humanen spondylometaphysären Dysplasie (SMD) (21), bei der es zu einer Kompression der hypertrophen Zone der Knochenplatte und zu einer Abnahme der neugebildeten Knochenbälkchen kommt.

[0005] Die Phänotypen von SMCD-Patienten und der SMD-artigen transgenen Mäuse sprechen für eine Rolle als Träger für Typ-X-Collagen (15, 16, 22). Daher war es überraschend, als sich herausstellte, dass Mäuse, die eine Nullmutation im $\alpha 1(X)$ -Collagen-Gen (Col10a1) tragen, angeblich keine Abnormalität und keine Anzeichen von SMCD zeigen (23). K. Cheah in Zusammenarbeit mit anderen hatte durch homologe Rekombination in ES-Zellen ebenfalls eine Nullmutation in Maus-Col10a1 geschaffen, um Einblick in die Funktion von Typ-X-Collagen zu erlangen (24). Um die anscheinend widersprüchlichen Folgen von Mutationen im Gen bei Mensch und Maus aufzulösen und einen besseren Einblick in die Pathogenese von SMCD zu erlangen, konzentrierten wir unsere Untersuchung auf die Folgen eines Typ-X-Collagen-Mangels für die Struktur der Wachstumsplatte und des trabekulären Knochens sowie für die Organisation von Matrixkomponenten innerhalb des Knorpels.

[0006] Diese Offenbarung zeigte, dass ein Mangel an Typ-X-Collagen bei Mäusen sehr wohl phänotypische

Folgen hat, die zum Teil SMCD ähneln, was die scheinbare Diskrepanz im Phänotyp zwischen Mensch und Maus reduziert (24). Interessanterweise liegt die hauptsächliche Wirkung eines Mangels an Typ-X-Collagen nicht an seiner Expressionsstelle, der hypertrophen Zone, sondern beeinflusst andere Zonen der Wachstumsplatte und im Knochen. Es zeigte sich auch, dass die Folge eines Verlustes von Typ-X-Collagen bei mutanten Mäusen eine größere Änderung in der Verteilung von Matrixmaterialien, wie Proteoglycanen und Matrixvesikeln, innerhalb des epiphysären Knorpels ist. Weitere Merkmale eines Mangels an Typ-X-Collagen sind eine beträchtliche Kompression der Ruhezone und Gelenkknorpel.

[0007] Phänotypische Merkmale, die teilweise SMCD ähneln, wurden gefunden, wie eine Persistenz des Knorpels in trabekulärem Knochen, Veränderungen der Knochenmineralisierung und der Bälkchenstruktur. Insbesondere entwickeln Mäuse mit Mangel an Typ-X-Collagen Coxa vara, eine der phänotypischen Änderungen, die bei humanem SMCD üblich sind. Diese Ergebnisse haben uns dazu geführt, eine Funktion für Typ-X-Collagen vorzuschlagen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse schlagen wir vor, dass Typ-X-Collagen eine Rolle bei der normalen Kompartimentierung der Knorpelmatrix spielt. Ein Mangel an Typ-X-Collagen verändert die Verteilung von Knochenmatrixkomponenten, was einen Einfluss auf die tragenden Eigenschaften der Wachstumsplatte und den Mineralisierungsvorgang hat, was zu abnormalem trabekulärem Knochen führt. Diese Hypothese würde die zuvor widersprüchlichen Sichtweisen der Funktion von Typ-X-Collagen und der molekularen Pathogenese von SMCD miteinander in Einklang bringen.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0008] Diese Erfindung stellt eine isolierte DNA bereit, die die Sequenz umfasst, welche für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum reguliert. Die DNA umfasst die Sequenz Col10-13del, wie in [Fig. 2](#) dargelegt ist. Diese Erfindung stellt auch einen Vektor bereit, der die oben beschriebene DNA umfasst.

[0009] Diese Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das das Knochenwachstum reguliert, bereit, welches ein Wirt-Vektor-System beinhaltet, das den obigen Vektor und einen geeigneten Wirt umfasst.

[0010] Diese Erfindung stellt ein Polypeptid bereit, das von der isolierten DNA codiert wird, welche die Sequenz umfasst, die für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum reguliert. Diese Erfindung stellt auch ein Polypeptid bereit, das den Teil des mutierten Collagens X, der zur Regulierung des Knochenwachstums befähigt ist, umfasst.

[0011] Diese Erfindung stellt eine Zusammensetzung bereit, die das obige Polypeptid und einen geeigneten Träger umfasst. Diese Erfindung stellt eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Erhöhung des Knochenwachstums bereit, die das obige Polypeptid und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

[0012] Diese Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten bereit, der unter Zwergwuchs leidet, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: das Verabreichen einer Menge des Polypeptids, das einen Teil des mutierten Collagens X, der zur Regulierung des Knochenwachstums befähigt ist, umfasst, oder der isolierten DNA, die die Sequenz umfasst, die für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, an den Patienten, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum so reguliert, dass eine Umkehrung des Zwergwuchses bewirkt wird.

[0013] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten bereit, der unter einer geringen Knochenmasse leidet, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: das Verabreichen einer Menge des Polypeptids, das einen Teil des mutierten Collagens X, der zur Regulierung des Knochenwachstums befähigt ist, umfasst, oder der isolierten DNA, die die Sequenz umfasst, die für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, an den Patienten, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum so reguliert, dass eine Behandlung der geringen Knochenmasse bei dem Patienten bewirkt wird.

[0014] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zur Verbesserung der Qualität und der Geschwindigkeit der Knochenvereinigung nach einem Bruch bei einem Patienten bereit, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: das Verabreichen einer Menge des Polypeptids, das einen Teil des mutierten Collagens X, der zur Regulierung des Knochenwachstums befähigt ist, umfasst, oder der isolierten DNA, die die Sequenz umfasst, die für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, an den Patienten, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum so reguliert, dass eine Verbesserung der Qualität und der Geschwindigkeit der Knochenvereinigung bewirkt wird.

[0015] Diese Erfindung stellt weiterhin ein transgenes Tier bereit, das eine isolierte DNA umfasst, die die Sequenz umfasst, die für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum reguliert.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0016] Fig. 1: Diagramm, das die Struktur des Col10-13del-Transgens zeigt. Collagen-X-Gen und Proteinstruktur.

[0017] Fig. 2: Vergleich der Maus und Human-Nonsense-Sequenz, die durch eine äquivalente Deletion von 13 Basenpaaren innerhalb der NC1-Domäne von Collagen X erzeugt wird. Die Aminosäuren sind vom Beginn der Translation her nummeriert (3). Die unterstrichenen Basen in der wt-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) stellen die 13 bp dar, die in der mutanten Sequenz deletiert sind (SEQ ID Nr. 2). Variationen zwischen der Maus- und Human-Nonsense-Sequenz sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die in Kästchen eingerahmten Aminosäuren stellen ein mutantes spezifisches Polypeptid dar, das für die Produktion von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen synthetisiert wurde. Die Nonsense-Aminosäuresequenzen, die sich aus der Deletion bei der Maus und beim Menschen ergeben, sind zum Vergleich untereinander angeordnet. Die Aminosäuren sind vom Beginn der Translation her nummeriert (3). Die unterstrichenen Basen in der wt-Sequenz stellen die 13 bp dar, die in der mutanten Sequenz deletiert sind. Variationen zwischen der Maus- und Human-Nonsense-Sequenz sind gelb hervorgehoben. Die in Kästchen eingerahmten Aminosäuren stellen ein mutantes spezifisches Polypeptid dar, das für die Produktion von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen synthetisiert wurde. Wildtyp-Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 3). Mutante Maus-Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 4). Mutante humane Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 5).

[0018] Fig. 3: Bilder von 6 Monate alten Col10-13del-transgenen (Tg) und nichttransgenen (NT) Mäusen und Röntgenaufnahmen. Die hier und in den anschließenden Figuren gezeigten Röntgenaufnahmen wurden mit denselben Bestrahlungsdosen unter Verwendung einer Mammographie-Maschine aufgenommen. A und B: Der Skalenstrich entspricht 1 cm; C bis E: Der Skalenstrich entspricht 0,5 cm. A. Links 34.10.57 (NT), rechts 34.10.54 (Tg) im Alter von 6 Monaten zeigen Unterschiede in der Gesamtkörperlänge und -form, insbesondere Unterschiede in der Länge der Gliedmaßen. B. Links 34.10.57 (NT), rechts 34.10.224 (Tg) im Alter von 6 Monaten zeigen Unterschiede in der Form des Kopfes. C bis E. 34.10.372 (NT), 34.10.373 (Tg) bzw. 34.10.224 (Tg). Zeigt die Variabilität der Ausprägung der Missbildung der Füße und Zehen. E hat außerdem eine zusätzliche Zehe. F. Röntgenaufnahme von 34.10.224, die die Anwesenheit einer zusätzlichen Zehe zeigt.

[0019] Fig. 4: Röntgenbilder von 5 Wochen alten Col10-13del-Mäusen im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen. Man beachte die ausgeprägte Hyperostose von Knochen, was durch die erhöhte Undurchsichtigkeit (weiße Bereiche) des Bildes angezeigt wird. A–B: 34.10.372 (NT) und 34.10.373 (Tg), Draufsichten. C–D: 34.10.372 und 34.10.373, Seitenansicht.

[0020] Fig. 5: Röntgenbilder von 10 Wochen alten Col10-13del-Mäusen im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen. A–B: 34.10.57 (NT) und 34.10.54 (Tg), Draufsichten. C–D: 34.10.57 und 34.10.54, Seitenansicht.

[0021] Fig. 6: Röntgenbilder von 15 Wochen alten Col10-13del-Mäusen im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen. A–B: 34.10.57 (NT) und 34.10.54 (Tg), Draufsichten. C–D: 34.10.57 und 34.10.54, Seitenansicht.

[0022] Fig. 7: Histologie von Wachstumsplatten von Col10-31del und Wildtyp aus demselben Wurf. A, C, E sind Wildtyp-nichttransgen (NT); B, D, F sind Col10-13del-transgen (T). Man beachte die stark vergrößerten Höhen der proliferierenden (p) und hypertrophen (h) Zonen bei den Col10-13del-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp aus demselben Wurf.

[0023] Fig. 8: Expression von p57kip2, PCNA und Hsp47 in distalen Oberschenkel-Wachstumsplatten 2 Tage nach der Geburt bei Col10-13del-Transgenen und nichttransgenen Mäusen. Die folgende Expression ist gezeigt: a, b) Inhibitor der cyclinabhängigen Kinase p57kip2; c, d) Kernantigen proliferierender Zellen (PCNA, Antikörper von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien); e, f) Hitzeschockprotein 47 (Hsp47). Ein positives Signal in Zellen zeigt sich durch braune Immunperoxidase-Färbung unter Verwendung eines Vectastain-ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien). Die Anfärbung der Knochenbälkchenmatrix ist unspezifisch. Alle Bilder haben 100fache Vergrößerung, außer den Kästchen, die 200fach vergrößerte Bereiche darstellen. T: trabekulärer Knochen, H: hypertrophe Zone, P: proliferative Zone.

[0024] Fig. 9: Expression von Wildtyp- und mutantern Collagen X. Immunfluoreszenz (FITC-Färbung) auf Ge-

frierschnitten von distalen Oberschenkelwachstumsplatten von neugeborenen Col10-13del-transgenen (tg, a, c, d) und nichttransgenen Mäusen (nt, b). a, b) ColX-Antikörperfärbung; c) Färbung mit Antikörper gegen 13-del-mutantes Protein. Man beachte die punktförmige Färbung in dem mit 13-del-Antikörper angefärbten Schnitt von einer transgenen Wachstumsplatte, was auf eine hauptsächlich intrazelluläre Anfärbung von hypertrophen Chondrocyten (c) im Vergleich zur extrazellulären Anfärbung mit Collagen-X-Antikörper der nichttransgenen Schnitte (b) hinweist. In den nichttransgenen Schnitten war nur ein sehr schwacher Hintergrund zu erkennen (nicht gezeigt). d) Immunfärbung, die die intrazelluläre Lokalisierung des Col10-13del-Proteins in osteoblastenartigen Zellen zeigt, die man in (c) im trabekulären Knochen findet. T: trabekulärer Knochen, H: hypertrophe Zone.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0025] Diese Erfindung stellt eine isolierte DNA bereit, die die Sequenz umfasst, welche für ein mutiertes Collagen X oder einen Teil davon codiert, wobei die Expression der DNA das Knochenwachstum reguliert. Diese Erfindung soll alle mutanten Collagene X abdecken, die in der Lage sind, das Knochenwachstum zu regulieren. Diese Erfindung deckt auch einen Teil des mutierten Collagen X, das die biologischen Wirkungen hat, das Knochenwachstum zu regulieren, und Polypeptide, die diese Domäne tragen (Teil), ab.

[0026] Diese Erfindung stellt eine isolierte DNA bereit, die die Sequenz Col10-13del, wie sie in [Fig. 2](#) dargestellt ist, oder einen Teil davon umfasst, der das Knochenwachstum reguliert, wenn er exprimiert wird.

[0027] Diese Erfindung stellt auch einen Vektor bereit, der die oben beschriebene DNA umfasst.

[0028] Vektoren, die das oben beschriebene isolierte Nucleinsäuremolekül umfassen, werden ebenfalls bereitgestellt. Geeignete Vektoren umfassen unter anderem ein Plasmid oder ein Virus. Diese Vektoren können in eine geeignete Wirtszelle transformiert werden, so dass ein Wirtszellen-Vektor-System für die Erzeugung eines Polypeptids, das das Knochenwachstum regulieren kann, entsteht.

[0029] Diese Erfindung stellt weiterhin ein isoliertes DNA- oder cDNA-Molekül bereit, wie es oben beschrieben ist, wobei die Wirtszelle prokaryontisch oder eukaryontisch ist. Zum Beispiel können die Zellen Bakterienzellen (wie E. coli), Hefezellen, Pilzzellen, Insektenzellen oder Tierzellen sein. Zu den geeigneten Tierzellen gehören unter anderem Vero-Zellen, HeLa-Zellen, COS-Zellen, CV1-Zellen und verschiedene primäre Säugerzellen.

[0030] Diese Erfindung stellt auch ein Polypeptid bereit, das von der oben beschriebenen DNA codiert wird. Diese Erfindung stellt auch ein Polypeptid bereit, das die Domäne(n) des mutanten Collagen X trägt, welche das Knochenwachstum reguliert (regulieren).

[0031] Diese Erfindung stellt auch eine Zusammensetzung bereit, die das oben beschriebene Polypeptid und einen geeigneten Träger umfasst. Ein geeigneter Träger ist ein Träger, der das Polypeptid auflösen kann, aber dennoch nicht die biologische Aktivität des Polypeptids beeinflusst. Zum Beispiel kann der Träger eine physiologische Kochsalzlösung sein.

[0032] Diese Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Erhöhung des Knochenwachstums bereit, die das oben beschriebene Polypeptid und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

[0033] Für die Zwecke dieser Erfindung bedeutet "pharmazeutisch annehmbare Träger" irgendeinen der pharmazeutischen Standardträger. Beispiele für geeignete Träger sind in der Technik wohlbekannt und können unter anderem einen beliebigen pharmazeutischen Standardträger umfassen, wie physiologische Kochsalzlösung, phosphatgepufferte Kochsalzlösungen, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, die Polysorb 80 enthält, Wasser, Emulsionen, wie Öl/Wasser-Emulsion, sowie verschiedene Arten von Netzmitteln. Weitere Träger können auch sterile Lösungen, Tabletten, Dragees und Kapseln umfassen.

[0034] Typischerweise enthalten solche Träger Arzneimittelhilfsstoffe, wie Stärke, Milch, Zucker, bestimmte Arten von Ton, Gelatine, Stearinsäure oder Salze davon, Magnesium- oder Calciumstearat, Talk, pflanzliche Fette oder Öle, Gummen, Glycole oder andere bekannte Arzneimittelhilfsstoffe. Solche Träger können auch Aromen und Farbaditive oder andere Bestandteile enthalten. Zusammensetzungen, die solche Träger umfassen, werden nach wohlbekanntem herkömmlichen Verfahren zubereitet.

[0035] Diese Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten bereit, der unter Zwergwuchs leidet, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: das Verabreichen einer Menge des obigen Polypeptids oder der oben beschriebenen DNA, die eine Umkehrung des Zwergwuchses bewirkt, an den Patienten.

[0036] Verfahren zur Bestimmung der "wirksamen Menge" sind dem Fachmann wohlbekannt und hängen von Faktoren ab, zu denen unter anderem die folgenden gehören: die Größe des Patienten und der verwendete Träger.

[0037] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten bereit, der unter einer geringen Knochenmasse leidet, einschließlich unter anderem Osteoporose, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: das Verabreichen einer Menge des obigen Polypeptids oder der DNA zum Beispiel über die Verabreichung von Knochenmark/Stroma-Zellen, die das Col10-13del-Transgen tragen und exprimieren.

[0038] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zur Verbesserung der Qualität der Bruchheilung und des geheilten Knochens eines Patienten bereit, das Folgendes umfasst: Verabreichen einer zur Verbesserung der Qualität der Bruchheilung und des geheilten Knochens wirksamen Menge des obigen Polypeptids oder einer DNA, die die oben beschriebene DNA umfasst, an den Patienten oder Implantieren derselben in den Knochen oder um den Knochen herum.

[0039] Der hier verwendete Ausdruck "Verbesserung der Qualität der Bruchheilung" bedeutet eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Kallus- und Knochenbildung, eine Reduktion der Häufigkeit des Heilungsversagens (Nichtverbindung), eine Erhöhung der Menge des gebildeten Knochens oder eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Kallus oder des gebildeten Knochens. "Verbesserung des geheilten Knochens" bedeutet eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Knochens oder eine Erhöhung der Menge des gebildeten Knochens.

[0040] Die Erfindung sorgt auch bei einem Patienten mit einer geringen Knochenmasse für eine Verbesserung der Qualität des geheilten Knochens. Da Typ-X-Collagen-Protein eine Komponente der extrazellulären Matrix ist, können es und seine mutanten Formen extrazellulär über eine lokale Therapie verabreicht werden, die biologisch abbaubare Träger beinhaltet. Verfahren zur Verabreichung des Polypeptids beinhalten eine Implantation von beschichteten oder imprägnierten Formen von festem Trägermaterial, z.B. Keramikpulver (Gordon, E., Lasserre, A., Stull, P., Bajpai, P.K., England, B., 1997, Biomed Sci Instrum 33: 131–136), Polymethylmethacrylat-Zement, biologisch abbaubare Polymere (wie Poly(lactide-co-glycolide); Ramchandani M., Robinson, D., 1998, J. Controlled Release 54: 167–175), Collagenträger, wie resorbierbare Collagenmembranen (King, G.N., King, N., Hughes, F.J., 1998, J. Periodontal Res 33: 226–236), oder Gele, die mit Proteinen der extrazellulären Matrix und dem Polypeptid imprägniert sind, und andere ähnliche Ansätze.

[0041] Verfahren zur Durchführung einer ortsspezifischen Genabgabe der DNA können das Implantieren von Osteoblasten, die mit dem Col10-13del-Transgen transfiziert wurden und die das Transgen exprimieren, umfassen. Wir haben zuvor eine Teilmenge der regulatorischen Sequenzen im Col10a1-Gen (innerhalb des gesamten col10-13del-Konstrukts) identifiziert, die die Expression spezifisch auf endosteale Zellen und Osteoblasten richten können (Cheah und Poon, unveröffentlichte Ergebnisse). Alternativ dazu können auch Implantate, die Chondrocyten enthalten, welche mit dem Col10-13del-Konstrukt transfiziert sind und das Transgen exprimieren, in Knochendefekte übertragen werden. Träger auf Liposomenbasis können ebenfalls als Mittel verwendet werden, um das Col10-13del-Transgen an Zellen an der Bruchstelle abzugeben.

[0042] In einer Ausführungsform wird die oben beschriebene DNA funktionell mit einem induzierbaren regulatorischen Element verknüpft.

[0043] Diese Erfindung stellt weiterhin ein transgenes Tier bereit, das eine isolierte DNA umfasst, die die Sequenz Col10-13-del, wie sie in [Fig. 2](#) dargelegt ist, oder ein Teil davon, das das Knochenwachstum reguliert, wenn es exprimiert wird, umfasst.

[0044] In einer Ausführungsform ist das beanspruchte transgene Tier eine Maus.

[0045] Diese Erfindung stellt auch ein transgenes Tier bereit, das eine als Col10-13del bezeichnete DNA umfasst, wie sie in [Fig. 2](#) dargelegt ist.

[0046] Diese Erfindung stellt ein Verfahren bereit, um zu identifizieren, ob ein Mittel das Knochenwachstum stimuliert, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Verabreichen des Mittels an das obige transgene Tier; und
- b) Untersuchen des transgenen Tiers nach der Verabreichung des Mittels, um zu bestimmen, ob das Knochenwachstum stimuliert wurde.

[0047] Diese Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit, um die Wirkung einer Operation auf die Zunahme der Knochenlänge zu bewerten, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Durchführen einer Operation an dem obigen transgenen Tier; und
- b) Bewerten der Zunahme der Knochenlänge des Tiers, um die Wirkung der Operation auf das Tier zu bestimmen.

[0048] In einer Ausführungsform wird die Bewertung durch direkte Messung der Zunahme der Knochenlänge durchgeführt, und das Tier wird zu einem anderen Zeitpunkt für die genaue Messung getötet.

[0049] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren bereit, um die Wirkung von das Knochenwachstum stimulierenden Mitteln auf die Bruchreparatur zu bewerten, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Erzeugen einer Bruchreparatur in dem oben beschriebenen transgenen Tier;
- b) Verabreichen des Mittels an das transgene Tier; und
- b) Untersuchen des transgenen Tiers nach der Verabreichung des Mittels, um zu bestimmen, ob das Knochenwachstum stimuliert wurde.

[0050] Diese Erfindung wird anhand der folgenden experimentellen Details besser zu verstehen sein. Der Fachmann wird sich jedoch ohne Weiteres darüber im Klaren sein, dass die speziellen Verfahren und Ergebnisse, die diskutiert werden, nur zur Veranschaulichung der Erfindung dienen, die ausführlicher in den danach folgenden Ansprüchen beschrieben ist.

Experimentelle Details

Molekulare Mechanismen, die den SMCD-Typ-X-Collagen-Mutationen bei Menschen zugrundeliegen

[0051] Eine wichtige Frage, die sich aufgrund unserer Ergebnisse stellt, ist die relativ schwache Ausprägung des Phänotyps bei den Nullmutanten im Vergleich zu den SMD-artigen transgenen Mäusen und humanen SMCD (Übersicht in 25). Da Collagen- α -Ketten über die NC1-Domäne assoziieren, wurde vorgeschlagen, dass die NC1-Mutationen bei humanem SMCD zu einem Versagen des Trimeraufbaus führen (15, 16) und die phänotypischen Veränderungen verursacht werden, weil Typ-X-Collagen in der Matrix abgereichert ist. Dieser Vorschlag wird von neueren Berichten gestützt, die besagen, dass Collagen- $\alpha 1(X)$ -Ketten, die SMCD-Mutationen tragen, bei in-vitro-Aufbau- und Zelltransfektionsexperimenten nicht in der Lage sind, Trimere zu bilden (26, 27). Es wird vermutet, dass die Chondrodysplasie bei den SMD-transgenen Mäusen durch eine Abreicherung von Typ-X-Collagen als Ergebnis einer Instabilität/eines Abbaus von mutantern Hühner-Maus-Hybrid-Protein verursacht wird (21), oder weil die Hühner- α -Ketten den normalen Aufbau von Maus-Typ-X-Collagen stören. Die Fähigkeit von $\alpha 1(X)$ -Ketten mit internen Deletionen innerhalb der Helix, mit normalen Ketten als Heterotrimere zusammenzutreten und sezerniert zu werden, stützt die letztere Erklärung (27). Es ist bemerkenswert, dass die Änderungen in der Bälkchenstruktur, die man bei SMD-artigen transgenen Mäusen beobachtet (21), ähnlich, aber schlimmer waren als bei den Typ-X-Collagen-Nullmutanten. Unsere Ergebnisse ließen vermuten, dass verschiedene Phänotypen der Nullmutanten und der SMD-artigen transgenen Mäuse wahrscheinlich die unterschiedliche Ausprägung des Ergebnisses von Mutationen widerspiegeln, die zu einem Verlust bzw. Gewinn einer Funktion führen.

[0052] Der Grund für das späte Einsetzen von Coxa vara und die milderen phänotypischen Veränderungen bei Typ-X-Collagen-Mutantenmäusen im Vergleich zu humanem SMCD wird immer noch nicht voll verstanden. Das späte Einsetzen des Defekts bei den mutanten Mäusen im Vergleich zu den SMCD-Patienten kann mit den Unterschieden der Beladung der Wachstumsplatte zwischen dem Menschen, einem Zweibeiner, und der Maus, einem Vierbeiner, zusammenhängen. Der Gehalt an Typ-X-Collagen in SMCD-Wachstumsplatten wurde jedoch nicht bestimmt. Außerdem ist nicht bekannt, ob die Synthese abnormer $\alpha 1(X)$ -Collagenketten, die sich nicht zusammenfügen können, zusätzliche Wirkungen auf hypertrophe Chondrocyten hat und ihr Wachstum beeinflusst. Es wäre daher wichtig, die phänotypischen Konsequenzen der Nullmutation mit denen einer SMCD-Mutation bei Mäusen zu vergleichen.

Expriemieren von Typ-X-Collagenketten, die eine SMCD-Mutation enthalten, in transgenen Mäusen

[0053] Wir haben genomische Sequenzen im 5'-flankierenden Bereich, im ersten und zweiten Intron des Maus-Col10a1-Gens identifiziert, die ausreichend waren, um die gewebespezifische Expression einer FLAG-negativen epitopenmarkierten Form von Collagen X in hypertrophen Chondrocyten bei transgenen Mäusen anzutreiben. Es gab auch eine gewisse Expression bei einigen Chondrocyten in der unteren proliferativen Zone. Expression wurde auch bei einigen Zellen im Knochenmarkkompartiment, die Osteoblasten sein könnten, beobachtet. Wir verwendeten diese Sequenzen, um Experimente einzuleiten, die zur Beantwortung dieser Fragen gestaltet sind, und haben damit begonnen, die phänotypische Folge der Expression von Collagen-a1(X)-Ketten, die eine SMCD-Mutation tragen, in hypertrophen Chondrocyten von Mäusen zu untersuchen, die heterozygot bzw. homozygot null in Bezug auf Typ-X-Collagen waren.

[0054] Ortsgerichtete Mutagenese (15) wird verwendet, um die Mutation in einen genomischen Klon einzuführen, der das gesamte Maus-Collagen-X-Gen (Col10a1) enthält, und der resultierende Klon wird als Col10-13del bezeichnet. Die Mutation war eine 13-bp-Deletion innerhalb der konservierten NC1-Domäne (**Fig. 1**). Diese Mutation verursacht eine Verschiebung im Aminosäureleseraster auf Position 619, was zur Erzeugung einer Nonsense-Sequenz (52 Aminosäuren) ab Rest 620 mit einem vorhergesagten frühzeitigen Stop bei 671 führt, 9 Aminosäuren kürzer als der Wildtyp (**Fig. 2**). Dieses mutante Konstrukt, Col10-13del, wurde durch Transgenese in die Keimlinie von Mäusen eingeführt, die dem Wildtyp entsprachen oder heterozygot für Col10a1 waren. Bei drei transgenen Mauslinien, die dieses Transgen vor einem genetischen Wildtyp-Col10a1-Hintergrund tragen, zeigte sich, dass sie einen abnormen Skelettphänotyp hatten, der zwar in der Ausprägung variabel, doch in diesen Linien sehr ähnlich war. Diese Linien exprimierten alle drei das Transgen, was durch RT-PCR mit RNAs aus Knorpel der Mäuse bewertet wurde. Überraschenderweise war der externe grobe Phänotyp dieser transgenen Mäuse dem bei humanem SMCD nicht ähnlich, sondern ähnelte anderen Störungen des humanen Skeletts wie folgt:

Grober Phänotyp: Der bei den Col10-13del-Mäusen beobachtete Phänotyp schien eine rhizomelische Skelettdysplasie mit Analogie zu humanen carnitubulären Remodellierungsstörungen zu sein. Das Einsetzen von beobachtbaren Unterschieden im Phänotyp zwischen transgenen und Wildtypmäusen erfolgt 4–6 Tage nach der Geburt. Die transgenen Mäuse sind kleiner als ihre Wurfgeschwister. Der beobachtete Phänotyp beinhaltet in diesem Stadium die distalen Zehen. Die Zehen sind kürzer und fetter als ihre Wildtyp-Gegenstücke und scheinen hypermobil zu sein (**Fig. 3**). Es gibt eine Variation im Grad, bei der die Zehen kurz, gebogen oder nach außen gekrümmt sind, aber dies ist ein Merkmal, das allen transgenen Mäusen gemeinsam ist. Vorder- und Hintergliedmaßen sind betroffen, letztere häufig schlimmer. Während sich die Mäuse entwickeln, tritt eine Abrundung des frontonasalen Bereichs zu Tage. Eine Röntgenanalyse der Mäuse ab der fünften Woche (5., 10., 15. Woche) zeigte eine progressive Hyperostose (hyper = erhöht, ost = Knochen, ose = Zustand, d.h. ein Zustand mit erhöhtem Knochen), die den Schädel, die Rippen, das Rückgrat und die Röhrenknochen betrifft (**Fig. 4 bis Fig. 6**). Wie bei den distalen Zehen sind auch die Röhrenknochen (Oberarm- und Oberschenkelknochen), Rippen und Hüftelemente kürzer und breiter, als man sie bei den Wildtypmäusen beobachtet. Es gibt auch eine starke Durchsichtigkeit und Expansion der Markhöhle distal zum Mittelpunkt der Oberschenkelknochen. Bis zur 10. bis 15. Woche zeigen die Mäuse unterschiedliche Grade von Watschelgang mit Plattfüßen, wobei die am schlimmsten betroffenen eine "schleppende Körperhaltung" ihres Hinterendes zeigen, wahrscheinlich weil die Hinterbeine nicht normal gebeugt werden können.

Histopathologie: Vergleich der Histologie von Schnitten aus den Wachstumsplatten von 10 Tagen und 4 Wochen alten nichttransgenen und Col10-13del-Mäusen zeigen ausgeprägte Unterschiede (**Fig. 7**). Die proliferative Zone von transgenen Mäusen ist im Vergleich zu nichttransgenen Wurfgeschwistern vergrößert. Die dramatischsten Änderungen beobachtet man in der hypertrophen Zone, die bei Col10-13del-Mäusen beträchtlich in der Höhe vergrößert ist, wobei hypertrophe Chondrocyten disorganisiert und verkleinert erscheinen. Außerdem erschienen die Bälkchen im Knorpel-Knochen-Bereich bei Mutanten vergrößert (**Fig. 7**).

Ultrastruktur: Ultrastrukturelle Änderungen in den Wachstumsplatten der Col10-13del-Mäuse wurden analysiert. Anfangsanalysen von 10 Tage alten Neugeborenen zeigen, dass die Matrixorganisation bei den transgenen Mäusen innerhalb der proliferierenden Zone derart ist, dass ein deutliches perizelluläres Matrixkompartiment fehlt, während es bei den nichttransgenen vorhanden ist. In der hypertrophen Zone ist dieses Kompartiment bei beiden Gruppen vorhanden. Die Dichte von Organellen innerhalb des Cytoplasmas (Raues Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien usw.) in den Zellen von transgenen Mäusen ist in der proliferierenden Zone erheblich reduziert, während man bei den nichttransgenen proliferierenden Zellen eine normale Dichte findet. In den hypertrophen Zonen ist dieser Wert viel schwieriger zu bewerten; bei den transgenen Mäusen identifizierten wir jedoch eine erhöhte Dichte von ausgedehnten und gefüllten Membranzisterne des Endoplasmatischen Retikulums, die bei nichttransgenen Mäusen nicht vorhanden sind. Um die Be-

deutung dieser Ergebnisse zu bewerten, werden weitere Analysen benötigt. Es ist jedoch möglich, dass die ultrastrukturellen Änderungen das Ergebnis von zwei Effekten sind: In der proliferierenden Zone, der das Typ-X-Collagen fehlt, verursacht die ektopische Expression des col10-13del-Transgens eine Störung/Veränderung im Matrixaufbau und beeinflusst die Chondrocytenproliferation. In der hypertrophen Zone, wo das Normaltyp-X-Collagen ebenfalls vorhanden ist, können sich Mutant-Wildtyp-Heterotrimere bilden, die schwierig zu sezernieren sind oder zum Abbau markiert werden, was eine Aufblähung des ER verursacht.

Molekulare Grundlagen der Wachstumsplatten- und Knochenabnormalitäten

[0055] Das Auftreten von Hyperostose in diesen Mäusen ist ein interessantes Phänomen, insbesondere da Typ-X-Collagen in Knochen normalerweise nicht synthetisiert wird. Es gibt jedoch bestimmte Beweise dafür, dass restliches Collagen X in den knorpeligen Restkörpern innerhalb der Knochenbälkchen vorhanden sind (24). Es gibt mehrere mögliche Ursachen, die einzeln oder in Kombination dem abnormen Knochenphänotyp bei diesen Mäusen zugrundeliegen können:

- a. Sowohl bei Human- als auch bei Maus-Collagen X führt die Mutation zu einer ähnlichen Nonsense-Aminosäuresequenz, die an demselben Rest aufhört. Es sind jedoch 15 der 52 Nonsense-Aminosäuren zwischen der Maus- und Humansequenz unterschiedlich (Fig. 2). Dies bedeutet 29% Variation, und es ist möglich, dass die veränderte Peptidsequenz zu den phänotypischen Änderungen beitragen kann, indem sie sich zum Beispiel wie ein Signalmolekül/Wachstumsfaktor verhält.
- b. Die phänotypischen Veränderungen könnten das Ergebnis einer ektopischen Expression des Transgens in der unteren proliferativen Zone und/oder den Osteoblasten sein.
- c. Synthese von abnormen Collagen-X-Molekülen, die Heterotrimere mit Wildtypketten bilden;
- d. Der Phänotyp wird durch den erhöhten Abbau von mutanten Molekülen durch die hypertrophen Chondrocyten verursacht.
- e. Da gezeigt wurde, dass Collagen X eine starke Affinität zu Proteoglycanen hat, könnte die Knochenhypertrophie durch ein Ungleichgewicht in den Matrixkomponenten, insbesondere Proteoglycanen, verursacht sein. Diese Veränderung in der Ablagerung oder Biosynthese von Proteoglycanen könnte zur Knochenhypertrophie beitragen, da sich gezeigt hat, dass diese Moleküle wichtig für Wachstum und Remodellierung der Knochen sind.
- f. Die Folge der Expression von abnormem Collagen X könnte die Zerstörung seiner Wechselwirkung intrazellulär mit Chaperonen und extrazellulär mit anderen Matrixmolekülen, Proteinasen und/oder Rezeptoren (z.B. Integrinen) sein. Diese veränderten Wechselwirkungen verändern wahrscheinlich die intrazelluläre Signaltransduktion und damit die Chondrocytenproliferation und/oder Differenzierung. Die Auswirkungen solcher Veränderungen finden sich wahrscheinlich hauptsächlich am Knorpel-Knochen-Übergang.

Weitere Experimente:

A. Grundlegende Studien

[0056] Eine Untersuchung der molekularen Basis der Abnormalitäten bei diesen Mäusen wird uns helfen, die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp zu verstehen, und zu einer weiteren Definition der Rolle von Typ-X-Collagen bei der Bildung und strukturellen Integrität von Wachstumsknorpel beitragen. Diese Einsicht wird äußerst wertvoll für ein Verständnis der Pathologie von Krankheiten sein, die zur Degeneration von Knorpel führen, wie Osteoarthritis. Die progressive Zunahme der Knochendichte bei diesen Mäusen impliziert auch eine Deregulation von Knochenwachstum und Remodellierung. Es ist noch nicht klar, ob die phänotypischen Abnormalitäten eine primäre oder sekundäre Wirkung der Expression des Col10-13del-Transgens sind. Aufgrund dieser Abnormalität stellen sich jedoch viele Fragen über die Regulationswege für das Knochenwachstum. Daher werden diese Mäuse verwendet, um:

- a) Schlüsselmoleküle und -wege zu identifizieren, die für die Regulierung des Knochenwachstums wichtig sind, mit Implikationen für Knochenstörungen beim Menschen.
- b) die Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Zellzyklusregulation in der Wachstumsplatte zu studieren.
- c) die Rolle der Knochenmark-Mikroumgebung und des Knorpel-Knochen-Übergangs auf die Blutbildung, Vaskularisierung des Knochens, Knochenbildung und Remodellierung zu studieren.

[0057] Die folgenden Studien werden durchgeführt:

- i) Phänotyp und molekulare Charakterisierung

[0058] Knorpel, die Wachstumsplatte und membranöser Knochen von Mutanten werden ausführlich analysiert.

siert. Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster des Transgens während der Entwicklung und des postnatalen Wachstums dieser Mäuse wird weiterhin durch in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht. In-situ-Hybridisierungsanalysen werden verwendet, um zu bestimmen, ob das Transgen zum richtigen Zeitpunkt in der Entwicklung als Wildtyp-Gen exprimiert wird. Spezifische Oligonucleotid- oder Ribosonden, die die Deletionsstelle überspannen, werden erzeugt. Die Hybridisierungsbedingungen werden optimiert, so dass eine spezifische Hybridisierung nur mit der Transgen-mRNA erfolgt. Da außerdem unsere früheren Studien mit dem Wildtyp-Gen, das durch ein FLAG-Epitop markiert ist, eine Expression in den hypertrophen Chondrocyten sowie einigen proliferierenden Chondrocyten zeigten. Eine in-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer Wildtyp-Col10a1-Sonde zeigt die Gesamtverteilung sowohl von mutanten als auch von normalen Transkripten und bewertet, ob das Col10-13del-Transgen eine ähnliche ektopische Expression zeigt. Da die 13-bp-Deletion eine neue Peptidsequenz in der NC1-Domäne ergibt, können Antikörper gegen das veränderte Peptid erzeugt und für Immunhistochemie verwendet werden. Dies wird es uns ermöglichen, die Lokalisierung des mutanten Collagen-X-Proteins zu bestimmen. Es wird auch darauf geachtet, zu bestimmen, ob ein mutantes Protein im Knochen in den Knorpelrestkörpern innerhalb der Knochenbälkchen vorhanden ist.

[0059] Die Expressionsniveaus des mutanten Transcripts relativ zum Wildtyp werden unter Verwendung von RNase-Schutzassays bestimmt, wobei man eine Ribosonde verwendet, die die Mutation überspannt, was es ermöglicht, beide Typen von Transkripten in einem einzigen Assay nachzuweisen.

[0060] Die richtige Chondrocytendifferenzierung wird unter Verwendung von geeigneten Molekülmarkern bewertet (30, 31), einschließlich Typ-IIA-Procollagen (Marker für Prächondrocyten), Langform-Col9a1, Col11a2, Aggrecan (von proliferierenden und reifen Chondrocyten exprimiert); Verbindungsprotein, Indian Hedgehog (proliferierende Chondrocyten); PTH-PTHrP-Rezeptor (markiert Chondrocyten an der Grenze zwischen der proliferativen und der hypertrophen Zone); und Col10a1 (markiert hypertrophe Chondrocyten); BMP-6, FGFR3 (markiert alle Chondrocyten). In-situ-Hybridisierungsstudien, um die biochemischen Folgen der Expression des Transgens in den Entwicklungsstadien 14,5, 16,5 dpc (Tage nach der Empfängnis) und in den postnatalen Stadien Neugeborenes, 5 dpp (Tage nach der Geburt), 5, 10, 15 Wochen zu analysieren, werden durchgeführt.

[0061] Um einen möglichen sekundären Einfluss der abnormen Knochenbildung bei Col10-13del-Mutantemäusen auf die Blutbildung zu untersuchen, analysieren wir die Röhrenknochen in situ auf Abweichungen von Normalzustand in Bezug auf das morphologische Erscheinungsbild der Stroma- und blutbildenden Zellen, die Häufigkeit von apoptotischen und cyclisierenden Zellen und Zahl und Zusammensetzung der Knochenmarkzellen. Für diese Bewertung werden spezifische Molekülmarker bei in-situ-Hybridisierungsstudien verwendet, wie für Osteoblasten (Osf2, Osteocalcin), Osteoclasten (acp5, codiert tartratresistente Saure Phosphatase, CSF-1, GM-CSF); Chemokine, die für die Einleitung der Blutbildung im Knochenmark in der Ontogenese wesentlich sind (z.B. SDF-1); Metalloproteinasen (BP-1, MMPs) und hämatopoetische Cytokine (z.B. IL-6, G-CSF) und andere.

ii) Weitere Kontrollstudien

[0062] Die folgenden Experimente werden durchgeführt, um zu bestimmen, ob der abnorme Phänotyp die Folge ist von:

- a) ektopischer Expression des Transgens;
- b) einer verkürzten NC1-Domäne in Collagen-X-Molekülen, die durch die 13bp-Deletion verursacht ist;
- c) der neuen mutanten Peptidsequenz, die durch die 13-bp-Deletion verursacht ist und sich von der humanen unterscheidet;
- d) der Bildung und/oder Prozessierung und/oder Matrixablagerung von Collagen-X-Heterotrimeren, die aus mutanten und Wildtypketten bestehen.

[0063] Für den obigen Punkt a) werden transgene Mäuse erzeugt, die normale Col10a1-Sequenzen mit denselben regulatorischen Elementen wie im Col10-13del-Konstrukt tragen. Der Phänotyp von Mäusen, die ein solches Transgen exprimieren, wird mit dem der Col10-13del-Mäuse verglichen. Das Expressionsmuster des Transgens kann überwacht werden, indem man eine interne Ribosomeneintrittsstellensequenz, gefolgt von einem ATG und Grünem Fluoreszentem Protein (GFP), an einer Position stromabwärts des Col10a1-Translatiionsstops, aber stromaufwärts des PolyA-Anbindungssignals einführt.

[0064] Alternativ dazu werden Mäuse erzeugt, die die col10-13del-Mutation tragen, wobei man eine homologe Rekombination in ES-Zellen verwendet, um eine "Knock-in"-Mutation zu erhalten (Ramires-Solis, R. & Bradley, A., *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 528–533 (1994); Baudoin, C., Goumans, M.-J., Mummery, C. & Sonnenberg A., *Genes & Development* 12, 1202–1216).

[0065] Für Punkt b) wurde ein Konstrukt hergestellt, das eine SMCD-Punktmutation enthält, die zu einem vorzeitigen Stopcodon in der NC1-Domäne führt. Dieses Konstrukt wird verwendet, um transgene Mäuse zu erzeugen und den Phänotyp dieser Mäuse mit dem der Col10-13del-Mäuse zu vergleichen.

[0066] Für Punkt c) werden transgene Mäuse (Col10-13delH) hergestellt, die dieselbe 13-bp-Deletionsmutation tragen, außer dass die stromabwärts gelegene Aminosäuresequenz nach der 13-bp-Deletion mit der bei einer humanen SMCD-Mutation identisch ist. Der Phänotyp dieser Maus wird mit dem der ursprünglichen Col10-13del-Maus verglichen.

[0067] Für Punkt d) werden transgene Mäuse (Col10-13del) vor unterschiedlichen genetischen Hintergründen erzeugt: heterozygot und homozygot null für Col10a1. Die Phänotypen dieser Mäuse werden mit dem der hier beschriebenen Mäuse verglichen, die Col10-13del vor einem Wildtyp-Col10a1-Hintergrund sind. Außerdem werden die Biosynthese und Verarbeitung von Collagen X in Chondrocyten, die aus mutanten Mäusen isoliert wurden, analysiert.

iii) Untersuchung der Rolle von Proteoglycanen (PGs) und Glycosaminoglycanen (GAGs) bei der Regulation des Knochenwachstums.

[0068] In einem neueren Bericht wurde gezeigt, dass EXT1, ein Transmembran-Glycoprotein, das im ER vorhanden ist, entscheidend für die Expression von Zelloberflächenglycosaminoglycanen (GAGs) sind. Mutationen in EXT1 sind der Grund für erbliche multiple Exostose (HME), eine vererbte Skelettstörung, die durch eine Missbildung des Skeletts aufgrund von übermäßigem Knochenwachstum gekennzeichnet ist (32). Es wurde gezeigt, dass Typ-X-Collagen eine starke Affinität bei der Bindung an Proteoglycanen (PGs) hat. Wir schlagen vor, die Möglichkeit zu testen, dass das abnorme Typ-X-Collagen bei den Col10-13del-Mäusen mit Proteoglycanen (PGs) und/oder GAGs anders assoziiert oder nicht assoziiert, wodurch die Knochenhypertrophie verursacht wird. Die Biosynthese von GAGs und PGs wird in Explantatskulturen von Wachstumsplatten aus nicht-transgenen und transgenen Mäusen untersucht und verglichen. Außerdem wird das Col10-13del-Konstrukt in hypertrophe Chondrocyten transfiziert, und die Wirkung auf die PG- und GAG-Biosynthese wird untersucht. Diese Experimente werden uns in die Lage setzen, zu bestimmen, ob der PG-Stoffwechsel durch das abnorme Typ-X-Collagen beeinflusst wurde.

iv) Zellproliferation und Zellcyclusregulation bei Col10-13del-hypertrophen Chondrocyten

[0069] Die Zellproliferation wird durch ein kompliziertes Netzwerk von extrazellulären und intrazellulären Signalwegen gesteuert, die wachstumsregulierende Signale verarbeiten und sie über die Kontrolle der cyclinabhängigen Kinasen (CDKs) in die grundlegende zellzyklusregulierende Maschinerie integrieren. CDKs werden durch Cycline (positive Regulation) und CDK-Inhibitorproteine (CKIs; negative Regulation) reguliert. Vor kurzem wurde gezeigt, dass Mäuse, denen der CDK-Inhibitor p57kip2 fehlt, eine abnorme Proliferation von hypertrophen Chondrocyten und eine abnorme endochondrale Ossifikation zeigen (33, 34). Die Proliferationsfähigkeit der hypertrophen Chondrocyten durch PCNA (Zellkernantigen proliferierender Zellen), Immunfärbung oder BrdU-Markierung wird untersucht und verglichen. Außerdem werden TUNEL-Assays (TdT-vermittelte dUTP-X-Nick-End-Markierungsassay, Boehringer Mannheim Ltd.) durchgeführt, um den Grad der Apoptose in der transgenen Wachstumsplatte im Vergleich zu nichttransgenen Wurfgeschwistern zu bewerten. Weiterhin wird ein PCR-Differentialdisplay verwendet, um die Expressionsprofile von Wildtyp- und transgenen Wachstumsplatten miteinander zu vergleichen und Gene, die hochreguliert oder herunterreguliert sind, auszuklonieren. Durch diese Studien werden Schlüsselregulatoren des Knochen- und Knorpelwachstums sowie die Signaltransduktionswege, die bei den Col10-13del-Mäusen betroffen sind, und molekulare Wechselwirkungen am Knorpel-Knochen-Übergang identifiziert.

[0070] Diese Studien haben auch Implikationen für das Verständnis der Mechanismen, die der Entwicklung von Knochen- und Knorpeltumoren zugrundeliegen. Zu diesen Knorpel- und Knochentumoren gehören unter anderem metastatische Knochentumoren, bei denen der primäre Tumor aus der Brust und Prostata stammt, osteoide Osteome, Osteochondrome, Chondrome, Osteoblastome, osteogene Sarkome, Chondrosarkome, Fibrosarkome oder irgendwelche anderen Tumoren, bei denen es zu einer Erhöhung der Knorpel- und/oder Knochenbildung kommt. Außerdem haben diese Studien auch Implikationen für das Verständnis des Mechanismus, der Krankheiten zugrundeliegt, die durch Hypertrophie- oder Remodellierungsprobleme von Knochen verursacht sind, wie bei Hyperostose, Exostosen und Osteopetrose usw.

v) Remodellierung und Umsatz von Knorpel und Knochen

[0071] Die Wirkung der 13del-Mutation auf den Abbau von Collagen X wird bewertet. Um den Abbau des mutanten Typ-X-Collagens in der Wachstumsplatte zu bewerten, isolieren wir das Typ-X-Collagensubstrat aus den Wachstumsplatten von transgenen und Wildtypmäusen (Chan, Azsodi, Fassler und Bateman, unveröffentlichte Daten). Intaktes und pepsinisiertes Collagen X wird durch selektive Salzfractionierung und durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Sephacryl-S-500-Harzen gereinigt. Dies ergibt chemische Mengen von intaktem Typ-X-Collagen (59 kDa), das sowohl NC1- als auch NC2-Domänen enthält, sowie pepsinisiertem (45 kDa, wobei die NC1- und die NC2-Domäne entfernt sind) für eine Analyse der Metalloproteinase-(MMP)-Spaltung. Dies ergibt Daten über die Anfälligkeit des mutanten Collagens für eine MMP-Spaltung. Eine N-terminale Aminosäuresequenzierung wird an Produkten mit einer größeren oder erheblichen MMP-Spaltung durchgeführt, und die durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgelösten MMP-Spaltprodukte werden direkt nach der Übertragung auf PVDF-Membranen sequenziert.

vi) Bioinformatik und strukturelle Analysen

[0072] Interspezies-Vergleiche von Genen und eine Identifizierung von Homologen bei Wirbeltieren und Wirbellosen können Einblicke in die Genfunktion und die biochemischen und genetischen Wege ermöglichen. Die Sequenzen von Genomen einiger Modellorganismen wurden bereits vollständig bestimmt oder stehen kurz davor. In einem Screening in Modellorganismen, wie Hefe, *C. elegans*, *Drosophila*, Zebrafisch und Kugelfisch, wird nach Sequenzen gesucht, die der normalen und 13-del-mutanten NC1-Domäne von Collagen X homolog sind, wobei man Werkzeuge der Bioinformatik verwendet. Die molekulare Modellierung der normalen und mutanten NC1-Domäne kann ebenfalls zu Einblicken in die möglichen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen führen.

B. Angewandte Studien für klinische Anwendungen

[0073] Es gibt viele verschiedene Ursachen von Zwergwuchs. Einige sind genetisch, andere umwelt- oder hormonbedingt. Einige Ursachen sind bekannt, andere noch unbestimmt. Mehrere menschliche Bedingungen können zu einem ähnlichen Phänotyp führen. Es muss jedoch noch gearbeitet werden, um zu bestimmen, ob sie aus demselben Gendefekt resultieren.

a. Die Maus dient als nützliches Modell zum Testen der Wirkung von Medikamenten auf das Wachstum und der Wirkung von Operationsverfahren auf Mäuse mit Collagendefekten.

Medikamente wie das Wachstumshormon werden verwendet, um Achondroplasie zu behandeln (Am J Med Genet 1997, 3. Okt.; 72(1): 71–76), mit beschränkter Wirkung. Die Wirkung von Wachstumshormon bei der Behandlung anderer Knochendysplasien ist nicht bekannt. Ein Mausmodell ist ein ideales Verfahren, durch das die Wirkung von Wachstumshormon auf das Skelettwachstum getestet werden kann. Außerdem können durch ein Verständnis des Grundmechanismus, durch den eine kurze Statur erzeugt wird, neue Medikamente entworfen werden, um das Knochenwachstum unter diesen Bedingungen zu stimulieren.

b. Durch eine chirurgische Verlängerung von Knochen können die Größe und die Gliedmaßenlängen bei Zwergen erhöht werden. Davon macht man Gebrauch, um ihr kosmetisches Erscheinungsbild zu verbessern. Solche Knochen können sich zwar verlängern und in der verlängerten Position heilen, doch ist nicht bekannt, welches die optimalen Bedingungen sind, um den Verlängerungsvorgang durchzuführen. Die Verfügbarkeit eines Mausmodells würde Experimente unter Verwendung einer externen Fixierungsvorrichtung ermöglichen, um eine Verlängerung mit verschiedenen Geschwindigkeiten und Häufigkeiten durchzuführen. Außerdem kann durch Variation der mechanischen Merkmale der externen Fixierung die optimale mechanische Umgebung für die Knochenbildung festgestellt werden.

c. Von besonderem Interesse ist, dass sich die zusätzliche Knochenbildung durch eine Verdickung im endostealen und kortikalen Knochen manifestiert. Wenn man sich diesen Vorgang in der klinischen Praxis zu Nutzen machen kann, ist er von Vorteil gegenüber den zur Zeit verfügbaren Knocheninduktionsmitteln (z.B. BMP2 und BMP7), da diese Agentien in unkontrollierter Weise zur Knochenbildung führen, was zu unerwünschtem Weichgewebe und sogar zu einer Muskelverkalkung führt.

[0074] Es gibt das Potential, die Knochenbildung bei Bedingungen einer geringen Knochenmasse (Osteoporose) zu verstärken und die Qualität und Geschwindigkeit der Knochenvereinigung nach einem Bruch zu verbessern. Diese Aussage wird unter der Annahme gemacht, dass der gebildete endosteale Knochen normale mechanische Merkmale hat und dass die Bruchheilung bei diesen Mäusen ereignislos erfolgt. Es werden also Experimente durchgeführt, um die mechanischen Eigenschaften dieser Knochen unter Biegung, Spannung, Torsion und Druck zu bestimmen. Die Bruchheilung wird bei diesen Mäusen unter Verwendung eines externen Fixierungsmodells bewertet, wobei der resultierende Bruchkallus mechanisch und histologisch bewertet wird.

Molekulare Marker werden verwendet, um den Heilungsvorgang bei Col10a1-13del-mutanten und Wildtypmäusen miteinander zu vergleichen.

[0075] Einige mögliche Methoden, um diese Ergebnisse zu verwenden, um die Knochenmasse zu erhöhen, können die folgenden sein:

- i. Man transfiziert das Col10a1-13del-Transgen in proliferierende hypertrophe Chondrocyten und Osteoblasten und bewerte die Wirkung auf die in-vitro-Mineralisierung unter Verwendung von Ansätzen, über die Bianco et al. einen Überblick geben (35).
- ii. Um das mutante Collagen-X-Protein durch DNA-Rekombinationstechnik und bakterielle/eukaryontische Zell/Baculovirus-Proteinexpressionssysteme zu erzeugen. Das rekombinante Protein kann in die Wachstumsplatte oder den Knochen implantiert werden, und die Wirkung auf das Knochenwachstum und die Bruchreparatur kann bewertet werden. Das Protein kann auch an Bruchstellen implantiert werden. Dies kann an normalem und osteoporotischem Knochen ausgetestet werden.
- iii. Gentherapie, um das Col10-13del-Konstrukt in Zellen an Bruchstellen oder in Osteoblasten in osteoporotischem Knochen abzugeben.
- iv. Um die obigen Punkte i)–iii) zu ergänzen, entwerfe und erzeuge man Vektoren für die induzierbare Expression des Col110-13del-Gens oder des mutanten Peptids in der NC1-Domäne. Diese Vektoren würde man durch Modifikationen des ursprünglichen Col10-13del-Konstrukts durch Hinzufügen von Sequenzen, die nach Zugabe eines Induktors und/oder Entfernen eines Repressors die Expression aktivieren können, ableiten. Es können noch weitere Modifikationen vorgenommen werden, um ein Abschalten der Expression dieses induzierbaren Gens zu ermöglichen. Ein solches Abschalten der Expression kann durch die Zugabe von Sequenzen erreicht werden, die Repressoren der Transcription binden können. Diese Vektoren können verwendet werden, um transgene Mäuse zu erzeugen, bei denen der Zeitpunkt, die Stelle und das Niveau der Expression des Transgens durch Induktion manipuliert werden kann. Geeignete transgene Mäuse, die den "Induktor" tragen, werden erzeugt und mit den induzierbaren Col10-13del-Mäusen gekreuzt.

[0076] Diese Erfindung gibt eine andere Verwendung der Col10-13del-Mäuse, der Col10a1-regulatorischen Elemente innerhalb des Vektors Col10-13del und der neuen Peptidsequenz, die durch die Col10a1-13del-Mutation geschaffen wurde, für die Grundlagenforschung der Regulation des Knochenwachstums und für klinische Anwendungen für Knochenstörungen an. Insbesondere gibt diese Erfindung die Verwendung der Maus gemäß der folgenden Aufstellung und die Verwendung der Gene, die durch Expression des mutanten Typ-X-Collagens beeinflusst wurden, an. Solche Gene können für die Entwicklung von Werkzeugen verwendet werden, um Knochenbildung und -wachstum zu verändern.

[0077] Das Transgen oder die Schlüsselmoleküle in dem Weg, der infolge der Bestimmung der Ursache, die der Knochenhypertrophie zugrundeliegt, aufgedeckt wurde, können zur Verwendung bei der Entwicklung einer auf Genen oder Proteinen basierenden Therapie zur Behandlung von Knochen- und Knorpeltumoren durch Umkehrung oder Hemmung der Proliferation der Chondrocyten modifiziert werden.

[0078] Die Col10-13del-Maus kann verwendet werden, um:

1. Schlüsselmoleküle und -wege zu identifizieren, die für die Regulierung des Knochenwachstums und die Behandlung von Zwergwuchs wichtig sind;
 - 1.1. die Wirkung von Medikamenten oder anderen Mitteln auf die Stimulierung des Knochenwachstums zu testen;

[0079] Potentielle Medikamente zum Stimulieren des Knochenwachstums bei Zwergwuchs können transgenen und nichttransgenen Mäusen verabreicht werden, die in Bezug auf Alter und Geschlecht aufeinander abgestimmt sind. Die Wirkung des Medikaments wird bewertet, indem man das Gewicht und die Gesamtlänge des Tiers überwacht und indem man auch die Länge der Röhrenknochen und des Rückgrats auf Radiographien, die in regelmäßigen Abständen aufgenommen werden, misst. Außerdem werden in festgelegten Zeitabständen Mäuse getötet, und biochemische und immunhistochemische Analysen werden durchgeführt, um auf Synthese von knochencharakteristischen Markern zu testen, wie Typ-I-Collagen, Osteocalcin, Alkalische Phosphatase, Matrix-gla-Protein, Osteonectin usw.

[0080] Gruppen mit Kontroll- und Testtieren unterschiedlichen Alters und Geschlechts werden verwendet, um die Wirkung des Medikaments auf unterschiedliches Alter und Geschlecht zu bewerten.

[0081] Zu den potentiellen Medikamenten (einschließlich der Verwendung von rekombinanten humanen Hormonen) zur Erhöhung des Knochenwachstums gehören unter anderem die Hormonfamilie der natriuretischen Peptide (Yasoda et al., Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles

of C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway, *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 11695–700), Wachstumshormon (Kidder et al., Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats, *Calcif Tissue Int* 1997, 61: 327–35; Rosen et al., Treatment with growth hormone and IGF-1 in growing rats increases bone mineral content but not bone mineral density [veröffentlichtes Erratum erscheint in *J Bone Miner Res* 1995, 10. Nov (11): 1836], *J Bone Miner Res* 1995 10: 1352–8), Östrogen (Kidder et al., *Calcif Tissue Int* 1997, 61: 327–35), insulinartiger Wachstumsfaktor (Kidder et al., *Calcif Tissue Int* 1997, 61: 327–35) und Parathormon (Coxam et al., Insulin-like growth factor 1 and parathyroid hormone effects on the growth of fetal rat metatarsal bones cultured in serum-free medium, *Biol Neonate* 1995, 68: 368–76) oder eine beliebige Kombination der obigen. Weitere Mittel sind unter anderem die Expression eines Transgens, die zu einer lokalen Abgabe der oben genannten Hormone in Knochen und Wachstumsplatte führt (Yasoda et al., *J Biol Chem* 1998, 273: 11695–700), Ultraschall, elektromagnetische Strahlung, Infrarot- und Lasertherapie sowie Akupunktur.

1.2. die Wirkung von Operationen auf die Zunahme der Knochenlänge zu testen;

[0082] Eine Gliedmaßen-Verlängerungsvorrichtung (eine modifizierte externe Fixierung, die eine fortschreitende Änderung der Länge ihrer Verbindungsstäbe erlaubt) wird am Oberschenkelknochen der Maus befestigt. Dann wird der Oberschenkelknochen einer Osteotomie unterzogen. Wenn auf Radiographien eine frühe Kallusbildung beobachtet wird, beginnt die Verlängerung des Oberschenkelknochens (Kallotaxie). Eine Distraction wird unter regelmäßiger radiologischer Überwachung durchgeführt. Die Häufigkeit und das Ausmaß der Distraction werden variiert, um die optimalen Bedingungen für das Auftreten der Kallotaxie zu bewerten. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Distraction und am Ende des Experiments werden Tiere getötet. Die Oberschenkelknochen werden entnommen, und Proben für mechanische Tests und für die histologische Analyse der Qualität des neugebildeten Knochens werden versandt.

[0083] Eine Gliedmaßen-Verlängerungsvorrichtung ist eine modifizierte externe Fixierung, die eine fortschreitende Änderung der Länge ihrer Verbindungsstäbe erlaubt. Mehrere verschiedene Systeme werden heute gewöhnlich verwendet, um die Knochenlänge bei humanen Patienten zu erhöhen (Dahl, M.T. und Fischer, D.A., Lower extremity lengthening by Wagner's method and by callus distraction. *Orthop Clin North Am* 1991, 22: 643–9; Hardy et al., The Sequoia circular fixator for limb lengthening, *Orthop Clin North Am* 1991, 22: 663–75; Price, C.T. und Mann, J.W., Experience with the Orthofix device for limb lengthening, *Orthop Clin North Am* 1991, 22: 651–61; Saleh, M. und Burton, M., Leg lengthening: patient selection and management in achondroplasia, *Orthop Clin North Am* 1991, 22: 589–99).

2. die Wirkung von das Knochenwachstum stimulierenden Mitteln auf die Bruchreparatur zu testen

[0084] Ein Bruchreparaturmodell im Mäuseoberschenkelknochen wird aufgebaut, wobei man ein Verfahren mit externer Fixierung verwendet (Andrew, J.G. und Gregory, J., An externally fixed murine fracture model; The 25th European symposium on calcified tissues, *Bone*, Vol. 20, April 1997, S. 104S; Cheung et al., External fixation fracture model of the mouse femur; The HKOA annual congress, 15.–16. Nov. 1997).

[0085] Verfahren: Der Oberschenkelknochen wird durch einen Einschnitt im lateralen Aspekt der Hüfte freigelegt. Dann wird der äußere Schenkelmuskel aufgespalten, so dass der Mittelschaft des Oberschenkelknochens direkt freigelegt wird. Das Periosteum wird nicht abgezogen, um die Blutzufuhr zu erhalten. Die externe Fixierung wird angelegt, wobei man eine Bohrführung verwendet, um die vier Stifte zu platzieren. Der Oberschenkelknochen wird gebrochen, nachdem man Löcher in die Mitte zwischen den Stiftpaaren gebohrt hat; diese Löcher wirken zur Erhöhung der Beanspruchung, um den Bruch zu erleichtern. Die Haut wird mit einer resorbierbaren Naht geschlossen.

[0086] Das das Knochenwachstum stimulierende Mittel wird den Mäusen nach dem Bruch verabreicht. Bei einer zweiten Gruppe von Mäusen, die in Bezug auf Alter und Geschlecht abgestimmt sind, werden ebenfalls die externe Fixierung angelegt und der Knochen gebrochen. Es wird kein das Knochenwachstum stimulierendes Mittel verwendet. Diese Gruppe dient als Kontrolle.

[0087] Das Ergebnis wird durch regelmäßige Radiographien, histologische und mechanische Tests am nach der Tötung entnommenen Knochen überwacht. Außerdem werden biochemische, immunhistochemische und Genexpressionsstudien durchgeführt, um auf der molekularen Ebene zu bewerten, ob sich der Knochen normal bildet.

3. Behandlung von menschlichen Zuständen, die zu einer Knochenhypertrophie (einschließlich Osteopetrose) oder Mineralisierungsabnormalitäten durch Medikamente führen.

[0088] Eine Knochenhypertrophie kann lokal oder regional als Ergebnis bestimmter Tumoren oder als Reak-

tion auf bestimmte Faktoren, wie physikalisches Trauma, ionisierende Strahlung usw. auftreten. Eine verallgemeinerte Knochenhypertrophie kann bei Zuständen wie Fluorose (übermäßige Fluoridverabreichung) und Osteopetrose (Ursache unbekannt) auftreten. Bei Osteopetrose ist sie durch eine allgemeine Erhöhung der Menge des Knochen- und Mineralgehalts des Knochens gekennzeichnet. Sowohl der kortikale als auch der trabekuläre Knochen sind von einer resultierenden Reduktion der Knochenmarkzwischenräume innerhalb der Markhöhle betroffen. Die Ursache des Zustands ist nicht bekannt. Die Maus kann verwendet werden, um:

- i. Schlüsselmoleküle oder -wege zu identifizieren, die wichtig für die Regulation des Knochenwachstums und der Knochenhypertrophie sind;
- ii. Medikamente herzustellen, die verwendet werden können, um diesen Vorgang der Knochenhypertrophie umzukehren oder zu hemmen;
- iii. als Modell zu wirken, um die Wirkung anderer Medikamente auf die Umkehrung oder Hemmung der Knochenhypertrophie zu testen.

Verwendung des Modells, um Medikamente für die Behandlung von Knochenhypertrophie zu identifizieren

[0089] Indem man den Mechanismus, durch den das Col10-13del-Transgen eine Knochenhypertrophie verursachen kann, und die daran beteiligten Regulationswege versteht, kann ein Medikament entworfen werden, das als Inhibitor des Knochenwachstums wirken kann, zum Beispiel eines, das die Proliferation und/oder Differenzierung von Osteoblasten hemmt. Das Medikament kann auch ein Antagonist irgendeines entscheidenden Schrittes im Regulationsweg sein.

Verwendung des Modells, um die Wirkung von Medikamenten auf die Knochenhypertrophie zu testen

[0090] Das Verfahren beinhaltet die Verabreichung des Medikaments an eine Gruppe von transgenen Tieren, während eine andere Gruppe von transgenen Mäusen, die in Bezug auf Alter und Geschlecht abgestimmt sind, ein Placebo erhält und als Kontrolle dient. Die Wirkung des Medikaments auf die Knochendichte wird durch regelmäßige radiologische Überwachung bewertet. Zusätzlich können in der Zukunft Knochendensitometrie, Mikro-CT-Analyse oder andere empfindlichere Verfahren verwendet werden, um die Wirkung des Medikaments auf die Knochendichte zu bewerten. In regelmäßigen Zeitabständen werden Mäuse getötet, und die Knochen werden histologisch untersucht. Die Knochendichte kann auch unter Verwendung von Elektronen-Rückstreuungsanalysen in Kombination mit Elektronenmikroskopie abgeschätzt werden. Eine histomorphometrische Analyse wird durchgeführt, um die Wirkung auf den Knochengehalt zu quantifizieren. Biochemische und immunhistochemische Analysen werden ebenfalls durchgeführt, um das Niveau der Synthese von knochencharakteristischen Markern, wie Typ-I-Collagen, Osteocalcin, Alkalische Phosphatase, Matrix-gla-Protein, Osteonectin usw., zu untersuchen.

4. Das Transgen kann verwendet oder modifiziert werden, um es als Verfahren zur Regulation des Knochenwachstums zu verwenden, und es kann unter Bedingungen, bei denen mehr Knochen erforderlich ist, angeschaltet werden. Zum Beispiel – Verbesserung der Menge an Knochen bei Patienten mit Osteoporose und Erhöhung der Geschwindigkeit der Bruchheilung unter Verwendung eines Gentherapieansatzes, der einen induzierbaren/schaltbaren Ansatz beinhalten kann, wie er oben beschrieben ist.

5. Die Maus kann verwendet werden, um potentiell neue Gene und Wege zu finden, die für die Regulation des Knochenwachstums verantwortlich sind, mit Implikationen für Knochenstörungen beim Menschen.

6. Wenn ein durch einen regulatorischen Defekt in COL10A1 verursachter vererbter Zustand beim Menschen gefunden wird, kann die Mutation für eine Diagnose verwendet werden.

7. Die Verwendung der regulatorischen Sequenzen im Transgen Col10-13del, um die Expression therapeutischer Verbindungen zur Wachstumsplatte durch Transgenese zielzusteuern.

8. Die Verwendung der neuen Peptidsequenz in der NC1-Domäne, die durch die 13bp-Deletion erzeugt wurde, und von gegen diese Sequenz erzeugten Antikörpern, falls sich herausstellen sollte, dass sie eine Rolle bei der Verursachung des abnormen Knochenwachstums spielt.

Identifikation von genetischen Modifikatoren des Knochenwachstums

[0091] Da die Ausprägung des Phänotyps bei den Col10-13del-Mäusen innerhalb einer Linie variierte und diese Mäuse im Wesentlichen eine Kombination von 129sv/J-, CBA- und C57BL6-Hintergründen darstellen, dienen diese Mäuse auch als Modelle, um den Einfluss des genetischen Hintergrunds auf das Knochenwachstum zu untersuchen. Mäuse, die die Mutation vor einem anderen Zuchthintergrund exprimieren, können erzeugt werden, indem man diese Mäuse so züchtet, dass kongene mutante Mäuse mit unterschiedlichem Inzucht-Hintergrund entstehen. Ein Vergleich der phänotypischen Ausprägung und des Ausmaßes von Knorpel- und Knochenwachstum wird ein Licht auf den Grad werfen, zu dem die Knochenhypertrophie durch einen genetischen Hintergrund beeinflusst wird. Sollten Unterschiede in der Knochenhypertrophie bei verschiedenen

Inzucht-Hintergründen gefunden werden, könnten die Mäuse verwendet werden, um genetische Loci zu identifizieren, die für die genetische Variation im Knochenwachstum verantwortlich sind. Diese Loci können mit Hilfe von Genetik, Kopplungsanalysen und hochgradig polymorphen Markern, wie Einzelnucleotid-Polymorphismen (SNPs), nachgewiesen werden.

Molekulare Konsequenzen der Expression des mutanten (Col10-12del)-Proteins in hypertrophen Chondrocyten

[0092] Wie oben in Abschnitt iv diskutiert, wurde die Expression des Zellzyklusregulators p57kip2 in den Wachstumsplatten von nichttransgenen und Col10-12del-Mäusen mit Hilfe von Immunchemie analysiert (Antikörper, Spende von Dr. Anne Fergueson-Smith, Dept of Anatomy, Cambridge University, UK). Bei nichttransgenen Kontrollen wurde eine starke Färbung für p57kip2 in den hypertrophen Chondrocyten in der gesamten hypertrophen Zone beobachtet. Die Immunfärbung zeigte jedoch Bereiche einer reduzierten Färbung innerhalb der hypertrophen Zone von Col10-13del-Mäusen. Unter Verwendung von Antikörpern gegen POCNA (Boehringer Mannheim) beobachtete man eine starke Immunfärbung bei hypertrophen Chondrocyten der Col10-13del-Mäuse, die bei den nichttransgenen Kontrollen nicht beobachtet wurde. Diese Daten stehen mit einer abnormen Proliferation der hypertrophen Chondrocyten in den Col10-13del-Mäusen im Einklang, die zum Teil für die Expansion der hypertrophen Zone bei diesen Mäusen verantwortlich sind.

[0093] Wie oben in Abschnitt iv diskutiert wurde, wurde vorgeschlagen, dass es ein Problem mit der Sekretion des mutanten Collagen-X-Proteins bei den transgenen Mäusen geben könnte (siehe oben bei experimentelle Details). Antikörper gegen die geänderte Peptidsequenz, die sich aus den 13del-Mutationen ergibt, wurden erzeugt (siehe experimentelle Details oben in Abschnitt i). Dieser Antikörper wurde verwendet, um Wachstumsplattenschnitte von den Col10-13del und Kontrollmäusen anzufärben. Immunfärbung unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für die mutante Sequenz in dem Col10-13del-Protein sind, zeigt intrazellulär ein starkes Signal und extrazellulär ein fast nicht nachweisbares Signal. Bei den nichttransgenen Proben wurde keine Färbung beobachtet, was die Transgen-Spezifität des Antikörpers bestätigt. Diese Daten stehen mit einer beeinträchtigten Fähigkeit, das mutante Protein zu sezernieren, im Einklang. Dagegen zeigte die Immunfärbung mit Antikörpern gegen Collagen X (Spende von Björn Olsen, Harvard University), die sowohl das endogene normale als auch das mutante Protein anfärben würden, ein extrazelluläres Expressionsmuster. Die Zellen in den Knochenbälkchen können hypertrophe Chondrocyten in den knorpeligen Restkörpern innerhalb der Bälkchen oder Osteoblasten sein.

[0094] Es gab auch eine erhöhte Färbung von hypertrophen Chondrocyten in der Wachstumsplatte und den Zellen in den Knochenbälkchen von Col10-13del-Mäusen unter Verwendung von Antikörpern gegen Hitzeschockprotein 47 (hsp47), ein Chaperon von Collagenen (Lit.: Expression K Matrix Biol 1998: 7, 379–386). Es gab wenig Färbung mit hsp47 bei den hypertrophen Chondrocyten von nichttransgenen Mäusen. Zusammen mit den elektronenmikroskopischen Daten, die die Gegenwart eines aufgeblähten Endoplasmatischen Retikulums zeigen, stünde diese Beobachtung im Einklang mit einer intrazellulären Akkumulation von Protein aufgrund der Schwierigkeit mit der Sekretion und würde die Hypothese stützen (siehe oben Abschnitt f).

[0095] Ein aktiver Abbau von intrazellulären Proteinen kann erhebliche Folgen für das zelluläre Verhalten haben. Die Wechselwirkung von entfalteten X-Ketten mit Chaperonen, wie Proteindisulfid-Isomerase und Hsp47, glycoproteinspezifischen Chaperonen, wie Calnexin und Calreticulin, BiP und Ubiquitin (siehe Ellis RJ, Molecular chaperones: pathways and networks, Curr Biol 1999 9: 4, R137–139), wird in weiteren Studien ebenfalls mit Immuncoprecipitationsverfahren bewertet. Dies wird Einblicke in die intrazelluläre Handhabung von nicht zusammengesetzten Collagen-X-Ketten und den bevorzugten Clearance-Weg geben.

[0096] Eine Expression des Col10-13del-Transgens wurde (durch in-situ-Hybridisierung und Immunfärbung) in Zellen beobachtet, die wahrscheinlich Osteoblasten im kortikalen Knochen sind. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine Expression des mutanten Proteins sowohl in Knochen als auch in hypertrophem Knorpel die Ursache für den veränderten Phänotyp bei Col10-13del-Mäusen sein kann.

[0097] In Zusammenarbeit mit Dr. Davine Opelstein (Biochemistry Dept, University of Hong Kong) wurde die Zusammensetzung der Markzellen in Wildtyp- und Col10-13del-transgenen Mäusen analysiert. Es zeigte sich, dass in einem Alter von 26 Wochen eine ausgeprägte Erhöhung der Zahl der Adipocyten erfolgt. Es schien auch eine erhöhte Zahl von Blutgefäßen im Knochen zu geben. Es schien eine Erhöhung des Volumens der Markhöhle und eine große Gesamthäufigkeit von blutbildenden Zellen in Wildtyp- im Vergleich zu transgenen Mäusen zu geben.

[0098] Im Einklang mit einer Wirkung auf die Blutbildung stand die Beobachtung einer abnormen Morphologie des Thymus bei einer der transgenen Mäuse. Es müssen noch weitere Mäuse analysiert werden, um zu bestimmen, ob dies ein wiederholbares Ergebnis ist. Diese Änderungen zeigen eine Wirkung der veränderten Mikroumgebung des transgenen Knochens auf die Entwicklung von Zellen innerhalb der Markhöhle an. Es ist nicht bekannt, ob dies eine direkte Wirkung oder eine indirekte Folge ist, wobei blutbildende Zellen konstant bleiben, während Adipocyten vermehrt werden, um die erhöhte Größe der Markhöhle bei den transgenen Mäusen zu kompensieren. Die Mäuse werden auch ständig auf Anzeichen von Arthritis, wie rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis, überwacht.

Literatur

1. Mayne, R., and Irwin, M.H. (1986) in *Articular cartilage biochemistry* (Kuettner, K.E., Schleyerbach, R., and Hascall, V.C., eds) pp. 23–35, Raven Press, New York.
2. Schmid, T.M., and Linsenmayer, T.F. (1987) in *Structure and Function of Collagen Types* (Mayne, R., and Burgeson, R.E., eds) pp. 223–259, Academic Press, Orlando, Florida 20.
3. Kong, R.Y.C., Kwan, K.M., Lau, E.T., Thomas, J.T., Boot-Handford, R.P., Grant, M.E., and Cheah, K.S.E. (1993) *Eur. J. Biochem.* 213, 99–111.
4. Schmid, T.M., and Linsenmayer, T.F. (1990) *Dev. Biol.* 138, 53–62.
5. Kwan, A.P.L., Cummings, C.E., Chapman, J.A., and Grant, M.E. (1991) *J. Cell Biol.* 14, 597–604.
6. Kirsch, T., and Pfaffle, M. (1992) *FEBS Lett.* 310, 143–147.
7. Anderson, H.C. (1989) *Lab. Invest.* 60, 320–330.
8. Kirsch, T., Swoboda, B., and Von der Mark, K. (1992) *Differentiation* 52, 89–100.
9. Gibson, G.J., Bearman, C.H., and Flint, M.H. (1986) *Coll. Rel. Res.* 6, 163–184.
10. Schmid, T.M., and Linsenmayer, T.F. (1985) *J. Cell Biol.* 100, 598–605.
11. Bonen, D.K., and Schmid, T.M. (1991) *J. Cell Biol.* 115, 1171–1178.
12. Schmid, T.M., Bonen, D.K., Luchene, L., and Linsenmayer, T.F. (1991) *In Vivo* 5, 533–540.
13. Poole, A.R., and Pidoux, I. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 2547–2554.
14. Schmid, T.M., Popp, R.G., and Linsenmayer, T.F. (1990) *Ann. NY Acad. Sci.* 580, 64–73.
15. Warman, M.L., Abbott, M., Apte, S.S., Hefferon, T., McIntosh, I., Cohn, D.H., Hecht, J.T., Olsen, B.R., and Francomano, C.A. (1993) *Nature Genet.* 5, 79–82.
16. Wallis, G.A., Rash, B., Sweetman, W.A., Thomas, J.T., Super, M., Evans, G., Grant, M.E., and Boot-Handford, R.P. (1994) *Am. J. Hum. Genet.* 54, 169–178.
17. Wallis, G.A. (1993) *Curr. Biol.* 3, 687–689.
18. McIntosh, I., Abbott, M.H., and Francomano, C.A. (1995) *Hum. Mutat.* 5, 121–125.
19. Lachman, R.S., Rimoin, D.L., and Spranger, J. (1988) *Pediatr. Radiol.* 18, 93–102.
20. Horton, W.A., and Hecht, J.T. (1993) in *Connective tissue and its heritable disorders, molecular genetic and medical aspects* (Royce, P.M., and Steinmann, B., eds) pp. 641–675, Wiley-Liss, New York.
21. Jacenko, O., LuValle, P.A., and Olsen, B.R. (1993) *Nature* 365, 56–61.
22. Jacenko, O., LuValle, P., Solum, K., and Olsen, B.R. (1993) *Prog. Clin. Biol. Res.* 383B, 427–436.
23. Rosati, R., Horan, G.S.B., Pinero, G.J., Garofalo, S., Keene, D.R., Horton, W.A., De Crombrughe, B., and Behringer, R.R. (1994) *Nature Genet.* 8, 129–135.
24. K. M. Kwan, M.K.M. Pang, S. Zhou, S.K. Cowan, R.Y.C. Kong, T. Pfordte, B.R. Olsen, D. Sillence, P.P.L. Tam, & K.S.E. Cheah (1997) *J. Cell Biol.* 136 459–471.
25. Chan, D., Jacenko, O. (1998) *Matrix Biol.* 17: 169–184.
26. Chan, D., Cole, W.G., Rogers, J.G., and Bateman, J.F. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 4558–4562.
27. Chan, D., Weng, Y.M., Hocking, A.M., Golub, S., McQuillan, D.J., and Bateman, J.F. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 13566–13572.
28. Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). *Gene*, 77: 61–68.
29. Elima, K., Eerola, I., Rosati, R., Mets=E4ranta, M., Garofalo, S., Perala, M., de Crombrughe, B., and Vuorio, E. (1993) *Biochem. J.* 289: 247–253.
30. Cheah, K.S.E., Levy, A., Trainor, P.A., Wai, A.W.K., Kuffner, T., So, C.L., Leung, K.K.H., Lovell-Badge, R.H., and Tam, P.P.L. (1995) *J. Cell Biol.* 128, 223–237.
31. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996) *Science* 273, 613–622.
32. McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., esford, L.E., Dyer, A.P., and Tufaro, F. (1998) *Nature Genetics* 19: 158–161.
33. Zhang, P., Liegeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R.A., Elledge, S.J. (1997) *Nature* 387: 151–158.
34. Yan, Y. Frisen, J., Lee, M-H., Massague, J., Barbacid, M. (1997) *Genes & Dev.* 11: 973–983.
35. Bianco, P., Cancedda, F.D., Riminucci, M., Cancedda, R. (1998) *Matrix Biol.* 17: 185–192.

36. Nagata, K., (1998) Matrix Biol. 7: 379–386.
 37. Ellis, R.J., (1999) Curr. Biol. 9:4 R137–139.

Sequenzprotokoll

<110> Cheah, Kathryn
 Cheung, Kenneth

<120> Verwendungen von transgenen Tieren, die eine Typ-X-Collagen-Mutante
 enthalten

<130> 57114-A-PCT

<140> noch nicht bekannt

<141> 1999-10-08

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 486

<212> DNA

<213> Maus

<400> 1

```

gtcatgcctg atggcttcat aaaggcaggc cagaggceca ggctttctgg gatgcccgtt 60
gtcagtgcta accacggggg aacaggtatg cccgtgtctg cttttactgt cattctctct 120
aaagcttacc cagcagtagg tgcccccatc ccatttgatg agattctgta caataggcag 180
cagcattacg acccaagatc tggtatcttt acctgtaaga tcccaggcat atactatttc 240
tcctaccaacg tgcatgtgaa agggactcac gtttgggtag gcctgtataa gaacggcacg 300
cctacgatgt acacgtatga tgagtacagc aaaggctacc tggatcaggc ttcagggagt 360
gcaatcatgg agctcacaga aaatgaccag gtatggctcc aattgcccaa tgcagaatca 420
aacggcctct actctctga gtacgtcac tcgtccttct caggatctct agtggctccc 480
atgtga 486
    
```

<210> 2

<211> 459

<212> DNA

<213> Maus

<400> 2

```
gtcatgcctg atggcttcat aaaggcaggc cagaggccca ggctttctgg gatgcegett 60
gtcagtgcta accacggggt aacaggtagt cccgtgtctg cttttactgt cattctctct 120
aaagcttacc cagcagtagg tgccccatc ccatttgatg agattctgta caataggcag 180
cagcattacg acccaagatc tggatcttt acctgtaaga tcccaggcat atactatttc 240
tcctaccacg tgcattgtgaa agggactcac gtttgggtag gcctgtataa gaacggcaca 300
cgtatgatga gtacagcaaa ggctacctgg atcaggcttc agggagtgca atcatggagc 360
tcacagaaaa tgaccaggta tggctccaat tgcccaatgc agaatcaaac ggcctctact 420
cctctgagta cgtccactcg tccttctcag gattcctag 459
```

<210> 3

<211> 161

<212> PRT

<213> Maus

<400> 3

Val Met Pro Asp Gly Phe Ile Lys Ala Gly Gln Arg Pro Arg Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Met Pro Leu Val Ser Ala Asn His Gly Val Thr Gly Met Pro Val
 20 25 30
 Ser Ala Phe Thr Val Ile Leu Ser Lys Ala Tyr Pro Ala Val Gly Ala
 35 40 45
 Pro Ile Pro Phe Asp Glu Ile Leu Tyr Asn Arg Gln Gln His Tyr Asp
 50 55 60
 Pro Arg Ser Gly Ile Phe Thr Cys Lys Ile Pro Gly Ile Tyr Tyr Phe
 65 70 75 80
 Ser Tyr His Val His Val Lys Gly Thr His Val Trp Val Gly Leu Tyr
 85 90 95
 Lys Asn Gly Thr Pro Thr Met Tyr Thr Tyr Asp Glu Tyr Ser Lys Gly
 100 105 110
 Tyr Leu Asp Gln Ala Ser Gly Ser Ala Ile Met Glu Leu Thr Glu Asn
 115 120 125
 Asp Gln Val Trp Leu Gln Leu Pro Asn Ala Glu Ser Asn Gly Leu Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Glu Tyr Val His Ser Ser Phe Ser Gly Phe Leu Val Ala Pro
 145 150 155 160
 Met

<210> 4

<211> 152

<212> PRT

<213> Maus

<400> 4

Val Met Pro Asp Gly Phe Ile Lys Ala Gly Gln Arg Pro Arg Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Met Pro Leu Val Ser Ala Asn His Gly Val Thr Gly Met Pro Val
 20 25 30

Ser Ala Phe Thr Val Ile Leu Ser Lys Ala Tyr Pro Ala Val Gly Ala
 35 40 45

Pro Ile Pro Phe Asp Glu Ile Leu Tyr Asn Arg Gln Gln His Tyr Asp
 50 55 60

Pro Arg Ser Gly Ile Phe Thr Cys Lys Ile Pro Gly Ile Tyr Tyr Phe
 65 70 75 80

Ser Tyr His Val His Val Lys Gly Thr His Val Trp Val Gly Leu Tyr
 85 90 95

Lys Asn Gly Thr Arg Met Met Ser Thr Ala Lys Ala Thr Trp Ile Arg
 100 105 110

Leu Gln Gly Val Gln Ser Trp Ser Ser Gln Lys Met Thr Arg Tyr Gly
 115 120 125

Ser Asn Cys Pro Met Gln Asn Gln Thr Ala Ser Thr Pro Leu Ser Thr
 130 135 140

Ser Thr Arg Pro Ser Gln Asp Ser
 145 150

<210> 5

<211> 152

<212> PRT

<213> human

<400> 5

Val Met Pro Asp Gly Phe Ile Lys Ala Gly Gln Arg Pro Arg Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Met Pro Leu Val Ser Ala Asn His Gly Val Thr Gly Met Pro Val
 20 25 30

Ser Ala Phe Thr Val Ile Leu Ser Lys Ala Tyr Pro Ala Val Gly Ala
 35 40 45

Pro Ile Pro Phe Asp Glu Ile Leu Tyr Asn Arg Gln Gln His Tyr Asp
 50 55 60

Pro Arg Ser Gly Ile Phe Thr Cys Lys Ile Pro Gly Ile Tyr Tyr Phe
 65 70 75 80

Ser Tyr His Val His Val Lys Gly Thr His Val Trp Val Gly Leu Tyr
 85 90 95

Lys Asn Gly Thr Pro Met Met Asn Thr Pro Lys Ala Thr Trp Ile Arg
 100 105 110

Leu Gln Gly Val Pro Ser Ser Ile Ser Gln Lys Met Thr Arg Cys Gly
 115 120 125

Ser Ser Phe Pro Met Pro Ser Gln Met Ala Tyr Thr Pro Leu Ser Met
 130 135 140

Ser Thr Pro Leu Ser Gln Asp Ser
 145 150

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Nucleotidsequenz gemäß SEQ Kennnummer 2 aufweist, die ein mutiertes Kollagen-Protein, das das Col10-13del ist, codiert und einen Hyperostose-Phänotyp hat.
2. Vektor, der das Nukleinsäuremolekül von Anspruch 1 aufweist.
3. Polypeptid, das mit dem Nukleinsäuremolekül von Anspruch 1 oder einem Teil davon, der einen Hyperostose-Phänotyp hat, codiert ist.
4. Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ Kennnummer 4 aufweist.
5. Verfahren zur Herstellung des Polypeptids von Anspruch 3 oder 4, das ein Wirtsvektorsystem aufweist, das den Vektor von Anspruch 2 und eine geeignete Wirtszelle aufweist.
6. Zusammensetzung, die das Polypeptid von Anspruch 3 oder 4 und einen geeigneten Träger aufweist.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Steigerung des Knochenwachstums, die eine effektive Menge des Polypeptids von Anspruch 3 oder 4 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger aufweist.
8. Verwendung des Nukleinsäuremoleküls von Anspruch 1, des Polypeptids von Anspruch 3 oder 4, der Zusammensetzung von Anspruch 6 oder der pharmazeutischen Zusammensetzung von Anspruch 7 zum Herstellen eines Medikaments zum Behandeln niedriger Knochenmasse bei einem Patienten, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament so hergestellt ist, dass es dem Patienten in einer Menge verabreicht wird, die so wirksam ist, dass sie zu verstärktem Knochenwachstum führt.

9. Verwendung von Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die niedrige Knochenmasse durch Osteoporose verursacht ist.

10. Transgene Maus, deren Geschlechtszellen und Körperzellen die Nucleotidsequenz von Anspruch 1 aufweisen.

11. Verwendung der transgenen Maus von Anspruch 10 zum Feststellen, ob ein Agens das Knochenwachstum stimuliert, mit den folgenden Schritten:

- a) Verabreichen des Agens an die transgene Maus von Anspruch 10; und
- b) Untersuchen der transgenen Maus nach der Verabreichung des Agens, um zu ermitteln, ob das Knochenwachstum stimuliert worden ist.

12. Verwendung der transgenen Maus von Anspruch 10 zum Beurteilen der Wirkung eines chirurgischen Eingriffs auf die Knochenverlängerung mit den folgenden Schritten:

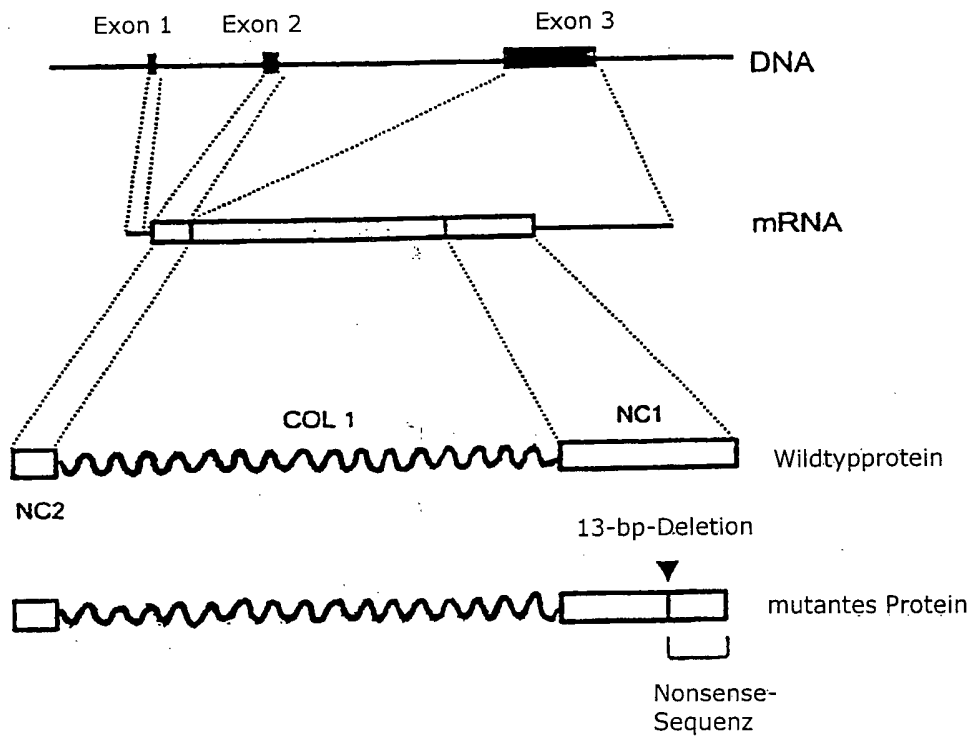
- a) Durchführen eines chirurgischen Eingriffs an der transgenen Maus von Anspruch 10; und
- b) Beurteilen der Knochenlänge der Maus, um die Wirkung des chirurgischen Eingriffs auf die Knochenlänge der Maus zu ermitteln.

13. Verwendung der transgenen Maus von Anspruch 10 zum Beurteilen der Wirkung des knochenwachstumsstimulierenden Agens auf die Bruchheilung mit den folgenden Schritten:

- a) Erzeugen eines Knochenbruchs bei der transgenen Maus von Anspruch 10;
- b) Verabreichen des Agens an die transgene Maus; und
- c) Untersuchen der transgenen Maus, um zu ermitteln, ob das Knochenwachstum stimuliert worden ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

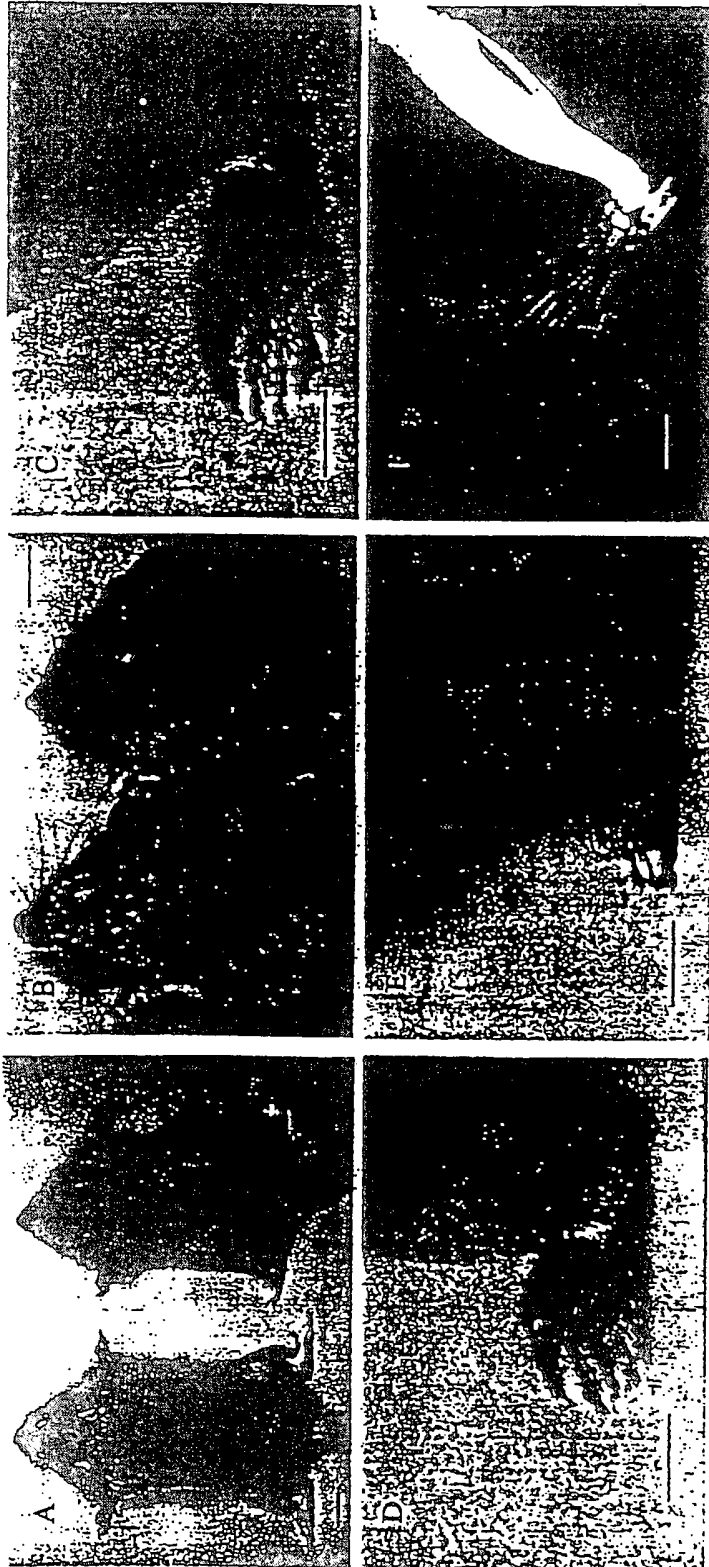
Figur 1



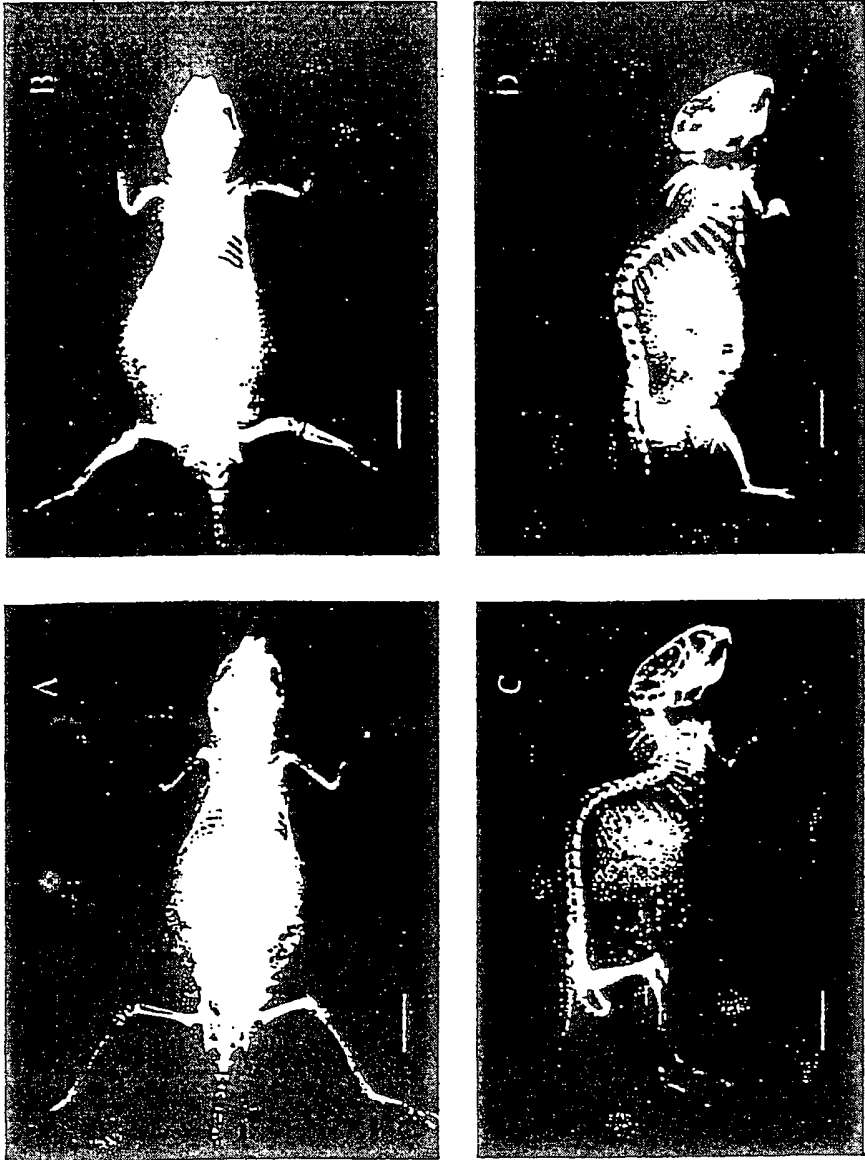
Figur 2

GTC ATG CCT CAT GGC TTC ATA AAG GCA GGC CAG AGG CCC AGG CTT TCT GGG ATG CCG CTT val met pro asp gly phe ile lys ala gly gln arg pro arg leu ser gly met pro leu	Maus wt
540 GTC AGT GCT AAC CAC GGG GTA ACA GGT ATG CCC GTG TCT GCT TTT ACT GTC ATT CTC TCT val ser ala asn his gly val thr gly met pro val ser ala phe thr val ile leu ser	Maus wt
560 AAA GCT TAC CCA GCA GTA GGT GCC CCC ATC CCA TTT GAT GAG ATT CTG TAC AAT AGG CAG lys ala tyr pro ala val gly ala pro ile pro phe asp glu ile leu tyr asn arg gln	Maus wt
580 CAG CAT TAC GAC CCA AGA TCT GGT ATC TTT ACC TGT AAG ATC CCA GGC ATA TAC TAT TTC gln his tyr asp pro arg ser gly ile phe thr cys lys ile pro gly ile tyr tyr phe	Maus wt
600 TCC TAC CAC GTG CAT GTG AAA GGG ACT CAC GGT TGG GTA GGC CTG TAT AAG AAC GGC ACG ser tyr his val his val lys gly thr his val trp val gly leu tyr lys asn gly thr	Maus wt
620 GTT ACG ATG TAC ACG TAT GAT GAG TAC AGC AAA GGC TAC CTG GAT CAG GCT TCA GGG AGT pro thr met tyr thr tyr asp glu tyr ser lys gly tyr leu asp gln ala ser gly ser	Maus 13del Maus 13del
CGT ATG ATG AGT ACA GCA AAG GCT ACC TGG ATC AGG CTT CAG GGA GTG CAA TCA TGG AGC arg met met ser thr ala lys ala thr trp ile arg leu gln gly val gln ser trp ser pro met met asn thr pro lys ala thr trp ile arg leu gln gly val pro ser ser ile	Maus 13del human 13del
640 GCA ATC ATG GAG CTC ACA GAA AAT GAC CAG GTA TGG CTC CAA TTG CCC AAT GCA GAA TCA ala ile met glu leu thr glu thr asp gln val trp leu gln leu pro asn ala glu ser	Maus wt
TCA CAG AAA ATG ACC AGG TAT GGC TCC AAT TGC CCA ATG CAG AAT CAA ACG GCC TCT ACT ser gln lys met thr arg tyr gly ser asn cys pro met gln asn gln thr ala ser thr ser gln lys met thr arg cys gly ser ser phe pro met pro ser gln met ala tyr thr	Maus 13del human 13del
660 AAC GGC CTC TCC TCT GAG TAC TCG TCC CAC TCG TTC TCA GGA TTC CTA GTG GCT CCC asn gly leu tyr ser ser glu tyr val his ser ser phe ser gly phe leu val ala pro	Maus wt
671 CCT CTG AGT ACG TCC ACT CGT CCT TCT CAG GAT TCC TAG pro leu ser thr ser thr arg pro ser gln asp ser STOP pro leu ser met ser thr pro leu ser gln asp ser STOP	Maus 13del human 13del
680 ATG TGA met stop	Maus wt

Figur 3



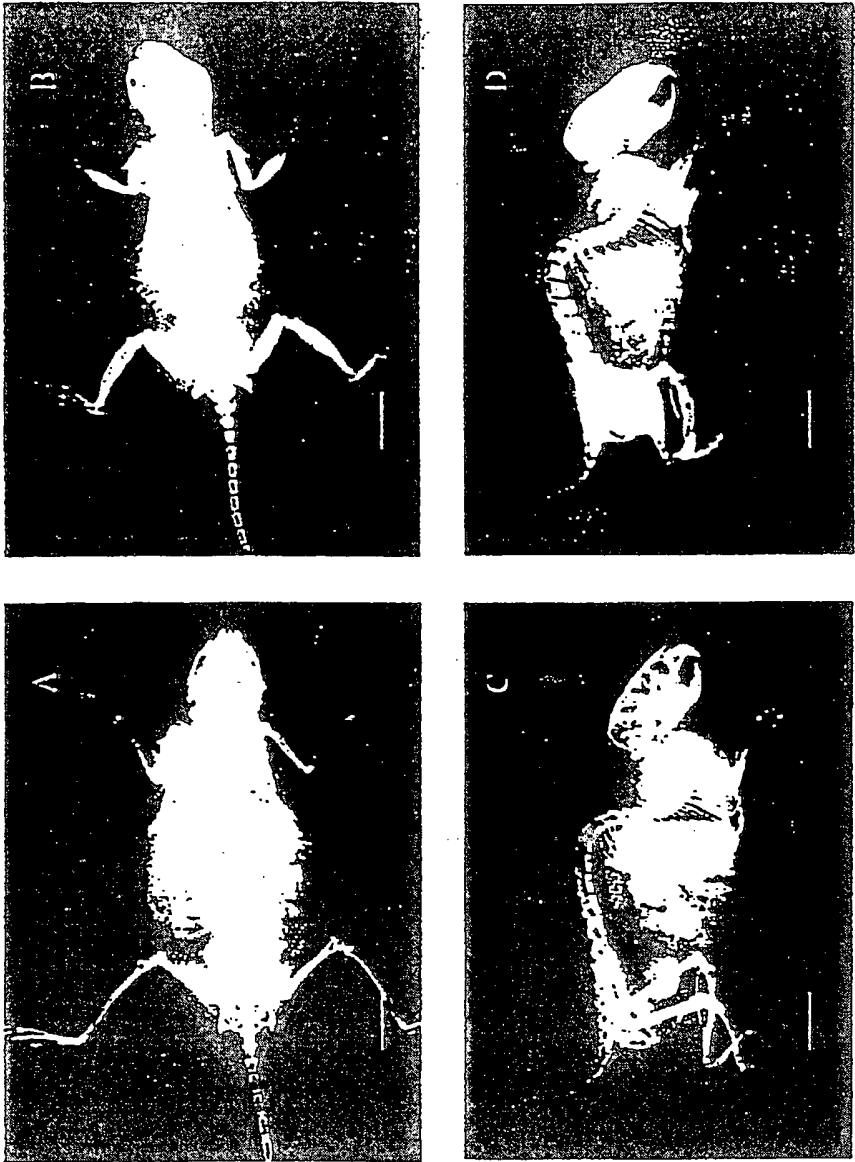
Figur 4



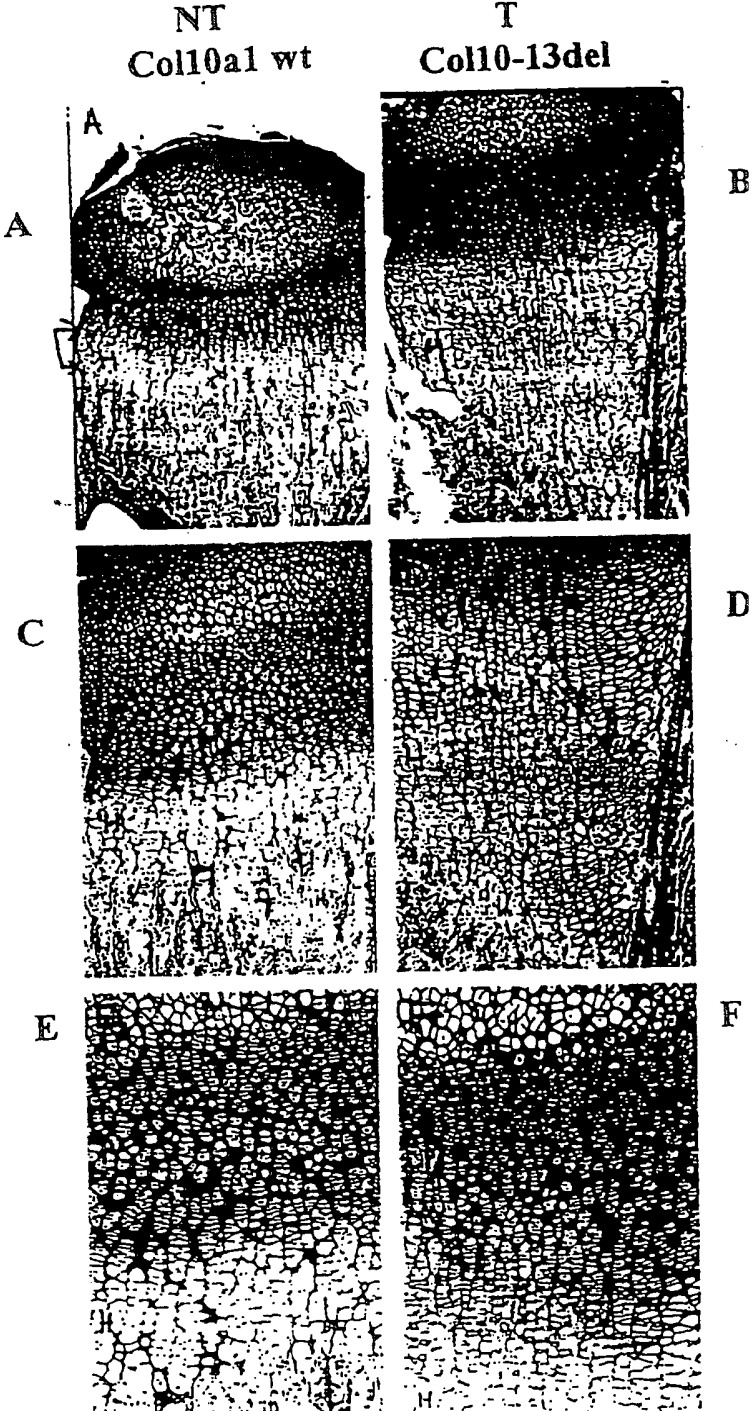
Figur 5



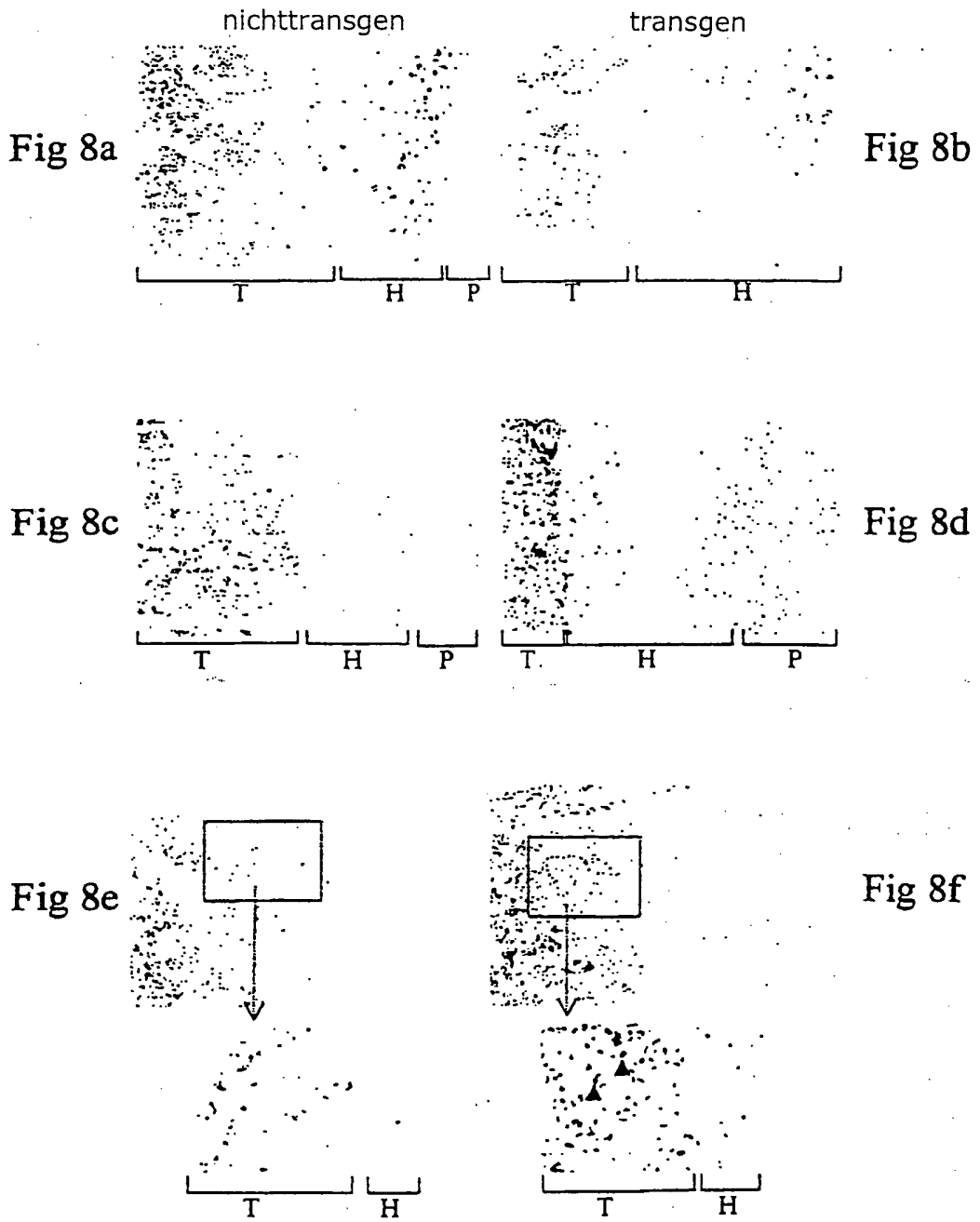
Figur 6



Figur 7



Figur 8



Figur 9

Fig 9a
(100X)

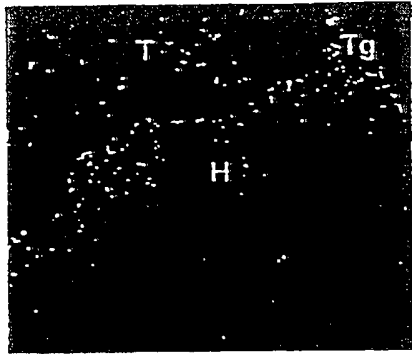


Fig 9b
(100X)

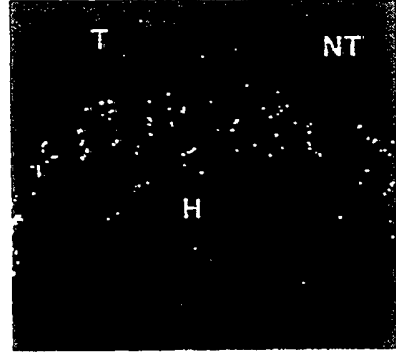


Fig 9c
(100x)

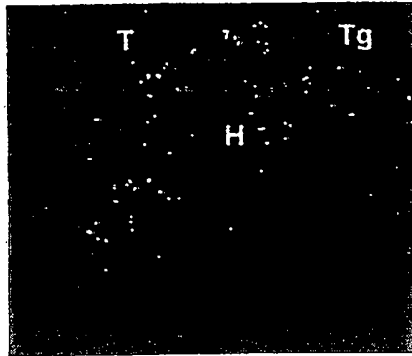


Fig 9d
(1000X)

