

P0102809

**ELJÁRÁS A LEPTIN FIZIOLÓGIAI HATÁSÁT UTÁNOZÓ, FOKOZÓ VAGY GÁTLÓ  
VEGYÜLETEK DETEKTÁLÁSÁRA**

**KIVONAT**

A találmány a leptin fiziológias hatását utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek azonosítására alkalmas eljárásra vonatkozik, amelynek során

- (a) a leptin fiziológias hatását utánozó vegyületek esetén megállapítják a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált transzkripció szignál transzduktor és aktivátor (STAT) DNS válasz-elemre gyakorol; vagy
- (b) a leptin fiziológias hatását fokozó vagy gátló vegyületek esetén megállapítják a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület arra a válaszreakcióra gyakorol, amit a leptinnek egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált STAT DNS válasz-elemre gyakorolt hatása vált ki;

ahol

a válasz-elem és a riporter a CACO-2 humán Caucasian vastagbél epithelialis sejtvonalban expresszált, vagy

a válasz-elem és a riporter CACO-2 sejtekben expresszált, amely sejtvonal (a rekombináns sejtvonal) egy olyan polipeptiddel is transzfektált, amely polipeptid képes mediálni vagy fokozni egy leptin aktivált STAT DNS válasz-elem leptin általi stimulációját és tartalmazza a megfelelő STAT proteineket.

*1/10* . 2001. 08. 17.

## **ELJÁRÁS A LEPTIN FIZIOLÓGIAI HATÁSÁT UTÁNOZÓ, FOKOZÓ VAGY GÁTLÓ VEGYÜLETEK DETEKTÁLÁSÁRA**

A találmány tárgya új eljárás, közelebbről eljárás a leptin fiziológiai hatásait utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek detektálására. Az eljárás felhasználható a leptin készítmények és a leptin mimetikumok, potenciátorok vagy inhibitorok funkcionális aktivitásának a mérésére is.

Az obesitas (elhízás) az energiafelvétel és az energiafelhasználás közötti egyensúlyhiánynak az eredménye. Ez az állapot egyre gyakrabban jár együtt különféle patológiás kondíciókkal, egyebek mellett például nem-inzulinfüggő diabétesszel (NIDDM)<sup>1</sup>, cardiovascularis betegséggel, hipertenzióval és inzulinrezisztenciával, amely állapotok közös jellemzője az inzulinnak, a glükóznak, a triglicerideknek és a lipoproteineknek a normálistól eltérően magas plazmakoncentrációja. Az említett állapotban a táplálék összetevőiből származó energia tárolását és felhasználását összehangoló homeosztatikus mechanizmus a normálistól eltérően működik, és túlzott zsírszövetlerakódást eredményez. Ezzel arányos növekszik a zsírszöveti leptin hormon szintézise és szekréciója. A leptin egy közelmúltban felismert faktor, amely hatását a hipotalamuszra kifejtve gátolja a táplálékfelvételt és növeli az energiafelhasználást (1). Azt, hogy a leptin milyen jelentős szerepet játszik az energia-egyensúly szabályozásában, egyértelműen igazolja az úgynevezett kövér (obese) (*ob/ob*) egerek által mutatott korai rohamos elhízás, hyperinsulinaemia és inzulinrezisztencia (a kövér egerek egy

olyan törzsbe tartoznak, amelynek tagjaiból hiányzik a funkcionális leptin) (1). Azt követően, hogy az állatoknak beadták a rekombináns hormont, az egerek testtömege jelentősen csökkent, valamint mérséklődött az inzulin és a glükóz plazmakoncentrációja is (2-3). Egy fenotípusosan hasonló törzs, a diabetikus (*db/db*) egerek esetén olyan hiba van a leptin receptorban, amelynek eredményeként az ilyen egerek — számos *in vivo* és *in vitro* kísérlet szerint — nem vagy alig reagálnak a leptinre (4-8). Bár látszólag ritkán fordul elő, az emberek esetén észlelt leptinhiány példái azt bizonyítják, hogy a hormon emberekben hasonló szerepet játszik, mint a rágcsálókban (9). Ezenkívül megállapították, hogy a leptin szerepet játszik a haematopoeticus és reprodukciós működésben is (10).

Azok a protein molekulák, amelyek egy fel-fel-le-le topológiájú köteget képező négy  $\alpha$ -helixből álló magot tartalmaznak, egy citokineket és növekedési faktorokat magában foglaló családot alkotnak. Az ebbe a családba tartozó proteinek kiváltják a membrán receptoroknak a homo- és hetero-oligomerizációját, amelyről ismert, hogy a gén transzkripciót eredményező kináz kaszkádokat aktiválja. A családnak az oligomerizáció által aktivált receptorai két nagy osztályba sorolhatók: az egyik osztályba az olyan receptorok tartoznak, például az epidermalis növekedési faktor receptor, amelyek az intracelluláris doménjeikben integrális tirozin-kináz aktivitással rendelkeznek (11), míg a másik osztályt az olyan receptorok alkotják, például az IL4 és az erythropeietin receptor, amelyekből hiányzik ez az aktivitás, és amelyek a válaszreakciójukat egy asszociált pro-

tein tirozin-kináz útján mediálják (12). A citokinek mindkét receptor altípust aktiválják, a négyhélixes kötegű proteinek viszont csak a nem-integrális tirozin-kináz altípust aktiválják. A nem-integrális protein tirozin-kináz receptorok általánosan — legalább részben — egy Janus-kinázt (JAK), valamint asszociált transzkripciós szignál transzduktor és aktivátor (STAT) proteinjeiket magában foglaló folyamaton keresztül fejtik ki a hatásukat. Az aktiváció során a STAT proteinek hozzákapcsolódnak a DNS válaszelemekhez (response elements), és ezáltal kontrollálják a gén transzkripciót. DNS válaszelemként a TT(N)nAA általános szekvencia DNS regulátor elemeit tartalmazó oligonukleotid szekvenciákat azonosították (13). Ezek az elemek kötik meg a STAT proteineket a szignalizáló molekulákra, például a citokinekre adott válaszreakcióban.

A leptin receptor (OB-R) (14) a citokin receptorok I. osztályába tartozik, amely receptorok magukban foglalják a gp130-at, az IL6-tal kapcsolatos citokinek közös szignál transzdukciós komponensét; ismert, hogy ezek a citokinek aktiválják a latens citoszol STAT proteineket (15). Több OB-R izoforma létezik, amelyek közül legalább kettő, az OB-Ra és az OB-Rb alternatív illeszkedéssel alakul ki (4, 5, 7). A rövid izoformák, azaz az OB-Ra, az OB-Rc és az OB-Rd, az előbbi sorrendnek megfelelően 34, 32 és 40 aminosavból álló citoszol C-terminálist tartalmaznak. Egyetlen oldható izoforma létezik, az OB-Re, amelyből hiányzik a transzmembrán domén. Az OB-Rb izoforma tartalmaz egy olyan, 302 aminosavból álló teljes hosszúságú citoszol domént, amely magában foglalja a JAK/STAT (Janus

Kinase/Signal Transduktion and Activator of Transcription) szignalizáló folyamat aktivációjához szükséges kötő ismétlődések. Egy, az egér diabetes (*db*) génben lévő pontmutáció egy új illesztési donor helyet és egy korai transzlációs végződést eredményez (4, 5).

A csonkolt OB-R(*db*) esetén hiányzanak a JAK és a STAT közötti kölcsönhatáshoz szükséges szekvenciaismétlődések, és a *db/db* egér modellből nyert adatok arra utalnak, hogy az OB-Rb az egyetlen olyan receptor, amely mediálni képes a JAK/STAT aktivációt, valamint a táplálékfelvételre és a sejtproliferációra gyakorolt leptin-mediált hatásokat (4, 5, 16).

A WO 96/34885. számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben leírják, hogy a leptint egy négy hélix kötegű terciér struktúra jellemzi. Előzetes megfigyeléseinkkel összhangban kimutatták, hogy a leptin kölcsönhatásba lép a membrán-kötött receptorokkal, amelyek egyike (OB-R<sub>b</sub>) egy JAK-STAT kináz kaszkádot aktivál (17). Ez a kölcsönhatás képezi az alapját egy, a leptin fiziológiai hatásait utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek detektálására szolgáló vizsgálati rendszernek. Az ilyen vizsgálatot felhasználhatjuk például a leptin által modulált testtömeg-, energiaegyensúly-, haematopoeticus, termékenységi és egyéb rendellenességek kezelésére alkalmas vegyületek kiválogatására. A vizsgálat különösen jól használható az olyan vegyületek kiválogatására, amelyek az obesitasszal, anorexiával, cachexiával és diabetésszel kapcsolatos rendellenességek kezelésére alkalmazhatók.

A WO 96/38386. számon közzétett nemzetközi szabadalmi be-

jelentés egy JAK-STAT technikát alkalmazó új detektálási eljárásra vonatkozik. Hasonló módszerre vonatkozik a PCT/GB97/-02988. számú függő nemzetközi szabadalmi bejelentés is.

Azonosítottunk egy olyan sejtvonalat, amely különösen előnyösen alkalmazható a leptin mimetikumok, potenciátorok vagy antagonisták, köztük a leptin receptorral és szignál transzdukciónak a folyamatával kölcsönhatásba lépő vegyületek azonosítására szolgáló JAK-STAT technikában. Felismertük, hogy OB-Rb exprezeződik a tápanyagfelszívódással és a lipidfelvétellel kapcsolatos egér bél diszkrét régiókban, valamint a vékonybél epithelium egyik humán modelljében, a CACO-2 sejtekben. A leptin beadása gyorsan sejtmag STAT5 DNS kötési aktivitást indukál +/+ és *ob/ob* jejunumban, az OB-Rb hiányos *db/db* egérben viszont a leptin beadása teljesen hatástalan. A leptin beadása 90 perccel a zsír beadása után felére csökkenti az apolipoprotein AIV (APO-AIV) transzkript szinteket. Tehát a leptin egy OB-Rb és egy STAT5 mechanizmuson keresztül egy negatív-visszacsatolási szignált közvetít a lipidfeldolgozás elsődleges helyéhez. Az ezen a helyen előforduló leptinhoány vagy a közvetlen leptinhatással szembeni rezisztencia hozzájárulhat az obesitas és az ezzel kapcsolatos tünetek esetén megfigyelt fokozott triglicerid- és lipoproteinszintekhez.

Ennek megfelelően a találmány tárgyát képezi egy eljárás a leptin fiziológiás hatását utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek azonosítására, amelynek során

- (a) a leptin fiziológiás hatását utánozó vegyületek esetén megállapítjuk a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület

egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált transzkripciós szignál transzduktor és aktivátor (STAT) DNS válasz-elemre gyakorol; vagy

- (b) a leptin fiziológiás hatását fokozó vagy gátló vegyületek esetén megállapítjuk a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület arra a válaszreakcióra gyakorol, amit a leptinnek egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált STAT DNS válaszelemre gyakorolt hatása vált ki;

ahol

a válaszelem és a riporter a CACO-2 humán Caucasian vastagbél epithelialis sejtvonalban expresszált, vagy

a válaszelem és a riporter CACO-2 sejtekben expresszált, amely sejtvonal (a rekombináns sejtvonal) egy olyan polipeptiddel is transzfektált, amely polipeptid képes mediálni vagy fokozni egy leptin aktivált STAT DNS válaszelem leptin általi stimulációját és tartalmazza a megfelelő STAT proteineket.

A leptin aktivált STAT DNS válaszelem leptin általi stimulációját mediálni képes alkalmas polipeptid lehet az ob-gén receptor egyik funkcionális izoformája, például az, amelynek az azonosítását a következő ismertették: Tartaglia et al., CELL, 83, 1263 (1995). A leptin aktivált STAT DNS válaszelem leptin általi stimulációját fokozni képes alkalmas polipeptid lehet egy JAK kináz, különösen a JAK-2, vagy egy STAT, különösen a STAT 3 vagy a STAT 5.

Alkalmasan a válaszelem egy promoter génhez, előnyösen egy minimál promoterhez van kapcsolva.

Az egyik alkalmas válaszelem egy olyan  $TT(N)_nAA$  általános

képletű nukleotid, amelyben N tetszőleges nukleotidot jelent, és n értéke 4, 5 vagy 6.

Az előnyös válaszelemeket a receptorával kölcsönhatásba lépő leptin által mediált intracelluláris események szelektíven aktiválják. Az ilyen szelektív válaszelemeket úgy határozhatjuk meg, hogy megvizsgáljuk számos, a leptin versus más citokinek által egy ob-reszponzív sejtvonalba transzfektált válaszelem/-riporter gén konstrukció relatív aktivációját.

Az egyik előnyös válaszelem egy olyan  $TT(N)_nAA$  általános képletű nukleotid, amelyben N tetszőleges nukleotidot jelent, és n értéke 4 vagy 5.

Egy további alkalmas válaszelem a TTCCCGGAA oligonukleotid lehet.

További alkalmas válaszelem lehet egy, a leptin által regulált gén promoterjének a STAT kölcsönhatáshoz szükséges régiója. A gén a vizsgálattal kiválasztandó vegyület konkrét terápiás felhasználásától függ.

Alkalmas riporter gén a szentjánosbogár luciferáz vagy a kloramfenikol acetil-transzferáz enzim.

Alkalmas promoter egy olyan minimál promoter, amilyen például a herpes simplex vírus timidin-kináz vagy az SV40 promoter.

Az alábbiakban röviden ismertetjük az ábrákat.

1. ÁBRA: A leptin receptor (OB-R) mRNS izoformák expressziója a gastrointestinalis tractusból származó szövetekben és humán CACO-2 sejtekben.

A. A sovány (+/+) és kövér (ob/ob) egerek tractusának

diszkrét régiókban lévő többszörös OB-R izoformák RT-PCR detektálása (a kísérleti eljárásokban ismertetetteknek megfelelően); OB-Re (1), OB-Rd (2), OB-Rc (3), OB-Rb (4), OB-Ra (5) és végül egy 100 bp DNS létra.

B. A bal oldali panelben leptin specifikus primereket alkalmaztunk a zsiból származó szennyeződés kizárására és a rendellenes transzkripció detektálására. Pozitív kontrollként egy, az extracelluláris OB-R doménből származó közös szekvenciát amplifikáltunk ugyanazon mintákból. A jobb oldali panel a OB-Rb funkcionális leptin receptornak az RT-PCR detektálását mutatja a humán CACO-2 sejtvonalban.

2. ÁBRA: A gastrointestinalis tractusban és a CACO-2 sejtekben lévő OB-R receptor Western blot analízise.

A. Egy, a rövid izoforma karboxi-terminálisával szemben képződött antitest alkalmazásával OB-Ra-t detektáltunk a +/+ és az *ob/ob* egerek tractusának különböző szekcióiban.

B. Egy, az amino-terminálissal szemben képződött antitest alkalmazásával OB-R-t detektáltunk a humán CACO-2 sejtekben (valamennyi OB-R izoformában közös). A nyilak egy 120 kDa hozzávetőleges méretű sávra mutatnak.

3. ÁBRA: A teljes OB-R transzkript relatív expressziós szintjei a gastrointestinalis tractus különböző szekcióiban. A felső panel a +/+ egér gastrointestinalis tractusának különböző szekcióiban lévő közös OB-R extracelluláris domén PCR amplifikációjának a reprezentatív géljeit ábrázolja, ahol a korábbiakban ismertetetteknek (18) megfelelően a cDNSt különböző mennyiségekben alkalmaztuk. Az egyes mintákban a cDNS mennyiségét

a  $\beta$ -aktin mennyiségére vonatkoztattuk és ennek beállítását a hígítás előtt végeztük el. Az alsó panel az OB-R mRNS-nek a  $\beta$ -aktin mRNS-re normalizált, a PCR optimalizált lineáris régiójából nyert mennyiségi értékeit mutatja be  $+/+$  és *ob/ob* egerek esetén.

4. ÁBRA: Leptin reszponzív STAT proteinek expressziója egér bélben és humán CACO-2 sejtekben.

A. STAT1, 3 és 5 Western blot analízise  $+/+$  és *ob/ob* egerekből származó jejunum 25  $\mu$ g protein lizátumaiban. Mindhárom STAT könnyen detektálható a nyers protein extraktumokban. A  $+/+$  és *ob/ob* egerek diszkrét szekcióiban történő STAT5 expresszió összehasonlítása.

B. STAT1, 3 és 5 Western blot analízise CACO-2 sejtekben. A STAT1, 3 és 5 esetén a pozitív kontrollok — az előbbi sorrendnek megfelelően — a következők voltak: humán fibroblaszt, A 431 és humán endothelialis sejt lizátum. STAT2-t és 6-ot is detektáltunk (az adatok nincsenek feltüntetve).

5. ÁBRA: STAT DNS kötés gélmobilitás-eltolódási analízise leptinre adott *in vivo* reakcióban. A STAT5 DNS kötési aktivitásának az indukálása a  $\beta$ -kazein promoter STAT5 konszenzus elemhez. Sejtmagextraktumokat preparáltunk, majd az extraktumokat  $^{32}$ P-végjelzett próbával inkubáltuk és 4 %-os natív PAGE gélen frakcionáltuk. A leptin beadása (5 mg/kg) után 30 perccel indukciót észleltünk a  $+/+$  és *ob/ob* jejunalis sejtmagextraktumokban. Az anti-STAT5 antitestekkel végzett előzetes inkubálás kimutatta, hogy a fő komplex STAT5a-ból áll. A *db/db* egerekből vagy a kontroll  $+/+$  és *ob/ob* egerekből származó jejunum

sejtmagextraktumokban nem észleltünk indukciót.

6. ÁBRA: STAT DNS kötés gélmobilitás-eltolódási analízise leptinre adott reakcióban CACO-2 sejtekben. Az ábrán a leptinre adott válaszreakcióban (20-200 nM, 15 perc) fellépő STAT3 és STAT5 DNS kötési aktivitás indukció látható. A STAT3 aktivációban a letines kezelés után a CACO-2 sejtmagextraktumokban dózis/válasz összefüggést figyelhető meg, amit a *c-fos* promoterből származó STAT1/3 szelektív nagy affinitású m67-SIE konszenzus elem igazol. A komplexet anti-STAT3 és anti-STAT1 antitesttel végzett pre-inkubálással azonosítjuk. A leptines kezelés után a CACO-2 sejtek sejtmagextraktumaiban is megfigyelhető a  $\beta$ -kazein próbához történő STAT5 DNS kötés. A fő protein komplexet anti-STAT5b specifikus antitesttel végzett preinkubálással azonosítottuk.

7. ÁBRA: A gyors (azonnali korai; immediate-early) gén transzkripció leptin indukciója egér jejunumban és a humán CACO-2 sejtekben.

A. A Tris kontrollal és intravénás leptinnel (5 mg/kg) kezelt állatok *ob/ob* jejunumából származó teljes RNS Northern blot analízise. A leptin beadása után 30 perccel a *c-fos* mRNS szintekben ötszörös indukció figyelhető meg.

B. A leptinnel (200 nM) 30 percen keresztül kezelt CACO-2 sejt monorétegekből származó teljes RNS-en ismert módon (18) kvantitatív PCR-t hajtottunk végre. A PCR optimalizált lineáris régiójának a megállapításához a kontrollal és a leptinnel kezelt sejtből származó cDNS sorozathígítását alkalmaztuk.

8. ÁBRA: Nagy zsírterhelés után a leptin beadása csökkenti

az APO-AIV mRNS szintet. A leptinnel (5 mg/kg) végzett kezelés *ob/ob* egerek jejunumában szignifikáns mértékben, mintegy felére csökkenti az APO-AIV mRNS szintet. Az egereket 5 órán keresztül koplaltattuk, majd a zsírterhelés (0,75 ml növényi olaj) beadása előtt 15 perccel intravénásan adtuk be az állatoknak a leptint. Kilencven perccel később az állatokat leöltük, majd az RNS extrakcióhoz eltávolítottuk a jejunumot. Az APO-AIV mRNS expresszióját a 28S rRNS-re normalizáltuk, és az eredményeket átlag  $\pm$  SEM ( $n = 3$  és  $*p < 0,05$ ) formában fejeztük ki.

Az alábbiakban azt a metodológiát ismertetjük, amelynek segítségével a CACO-2 sejtvonalat mint egy leptin reszponzív sejtvonalat azonosítottuk. A leptin reszponzív sejtvonalak azonosításának az általános metodológiája ismert, amely például a következőket foglalja magában:

1. Mikrofiziométer. Az eljárás a sejtben történő biokémiai változások eredményeként fellépő kis pH-változásokat detektálja. Stimulálás után az *ob*-reszponzív sejtek olyan biokémiai változásokon mehetnek át, amelyek kismértékben megváltoztathatják az extracelluláris savasodási sebességet; az utóbbi változás egy szilícium mikrofiziométerrel detektálható. A mikrofiziométer bioszenzor módszer áttekintő ismertetése megtalálható — egyebek mellett — például a következő szakirodalmi helyen: McConnel, SCIENCE, 257, 1906 (1992).

2. Elektroforetikus mobilitáseltolódási vizsgálat (EMSA). *Ob*-proteinnel kezelt sejtekből nyert sejtmagextraktumokat egyes vagy specifikus STAT válaszelem DNS szekvenciát tartalmazó, radioizotóppal jelzett oligonukleotidokkal keverünk össze.

Az azokból a sejtekből származó extraktumok, amelyek reagáltak az ob-proteinre, a STAT válaszelem esetén az oligonukleotid géleltolódását okozhatják.

Szakirodalom: "Recombinant DNA", 2nd Edition, Watson et al., p. 158 (1992); Lamb et al., BLOOD, 83, 2063 (1994).

3. A protein foszforiláció mérésével végzett vizsgálat. A receptor aktiváció és a végső válasz közötti, az intracelluláris proteinek tirozin foszforilációján keresztül megvalósuló kapcsolatot a foszforilált tirozinokat felismerő antitestek alkalmazásával értékelhetjük. Részletesebben: mivel a leptin receptor stimulálhatja a JAK/STAT folyamat tirozin foszforilációját, az eljárás lehetőséget nyújt a leptin reszponz sejtvonalak azonosítására. A leptin reszponzív sejtvonalakban történő leptin aktiváció detektálására a tirozin foszforiláció antitestjei mellett specifikus JAK/STAT antitesteket alkalmazhatunk. A protein foszforiláció gátlása vagy stimulációja fordulhat elő. Inszulin receptorokat túlexpresszááló patkány-1 fibroblasztokban kimutatták az inzulin receptor és az inzulin receptor szubsztrát-1 inzulin stimulált foszforilációjának az ob-protein általi gátlását [Kroder et al., EXP. CLIN. ENDOCRINOL. DIABETES, 104 (2), 66 (1996)].

4. Helyettesítéses kötés. A sejtvonalak radioizotóppal jelzett leptinnel, például [<sup>125</sup>I]-leptinnel végzett inkubálása után jelzetlen leptin hozzáadásával tanulmányozhatjuk a nem-specifikus kötés versus specifikus kötés viszonyt. A nagy specifikus/nem-specifikus arányú kötés arra utal, hogy a sejtvonalt tartalmazhatja a leptin receptort.

5. A protein detektálása az ob-receptornak egy funkcionális formájára, előnyösen egy funkcionális hosszú formájára nézve szelektív antitestek alkalmazásával.

6. A mRNS detektálása az ob-receptornak egy funkcionális formájára, előnyösen egy funkcionális hosszú formájára nézve Northern, RT-PCR vagy "slot blot" analízis alkalmazásával.

7. A leptinnel végzett kezelés utáni megnövekedett c-fos mRNS detektálása. A c-fos mRNS Northern, RT-PCR vagy "slot blot" analízissel detektálható.

A válaszelem, a riporter és előnyösen a promoter alkalmasan egy, az ob-reszponzív sejtvonalat transzfektálni képes vektorba épül be.

Alkalmas vektorok lehetnek az olyan, kereskedelmi forgalomban kapható vektorok, amilyen például a pGL2-basic luciferáz vektor (Promega).

A vektornak egy alkalmas konfigurációjában a STAT DNS válaszelem egy promoter és egy riporter gén előtt (upstream) helyezkedik el. A vektornak egy még alkalmasabb konfigurációjában a STAT-DNS válaszelem egy timidin-kináz promoter és egy luciferáz riporter gén előtt (upstream) többszörös tandemben ismétlődik (2-10).

A vektorokat úgy állítjuk össze, hogy azok egy minimál promoterhez, például herpes simplex vírus timidin-kinázhoz vagy SV40 promoterhez kapcsolt riporter gént, például szentjánosbogár luciferázt vagy a kloramfenikol acetil-transzferáz enzimet tartalmaznak. A STAT válaszelem esetében a DNS fragmentumot a minimál promoter előtti (upstream) megfelelő restrikciós en-

zim helyek alkalmazásával inszertáljuk a vektorba.

A válaszelemet, a riportert és a promotert szokásos expressziós módszerek alkalmazásával építjük be a vektorba, például a válaszelem esetén a DNS fragmentumokat a minimál promoter előtti (upstream) megfelelő restrikciós enzim helyek alkalmazásával inszertálhatjuk a vektorba.

STAT válaszelem-luciferáz enzim riporter rendszereket ismert módszerekkel állíthatunk össze [lásd például: Lamb *et al.*, BLOOD, 8, 2063 (1994); és Seidel *et al.*, PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 92, 3041 (1995)].

Leptin-reszponzív sejteket standard módszerek, például a kalcium-foszfátos módszer [Graham and Van Der Eb, VIROLOGY, 52, 456 (1973)] alkalmazásával transzfektálhatunk a STAT válaszelem-minimál promoter-luciferáz riporter konstrukciókkal. A transzfekciós hatékonyságbeli eltérések korrekciójához a sejteket egy  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást expresszáló referencia plazmida ko-transzfektálhatjuk. A transzfekciós idő (12-24 óra) után a sejteket egy vegyület különféle koncentrációival reagáltatjuk, majd kinyerjük és lizáljuk a sejteket. A lizátumokat a luciferáz és — ha lehet — a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásra nézve vizsgáljuk. A hatásfokozó vagy az antagonistá aktivitást úgy értékelhetjük, hogy az értékelés előtt vagy azzal egyidejűleg megfelelő koncentrációban leptint adunk a vegyülethez, majd az önmagában alkalmazott leptinhez viszonyítva mérjük a luciferáz válasz fokozódását vagy csökkenését. A luciferáz enzimaktivitás mérésére standard módszereket alkalmazhatunk, amilyenek például a következő szakirodalmi helyeken ismertetett eljárások, illet-

ve az aktivitás mérésére alkalmazhatunk kereskedelmi forgalomban kapható készleteket (kit) is: Ow et al., SCIENCE, 234, 856 (1986); és de Wet et al., MOL. CELL BIOL., 7, 725 (1987)].

Alkalmas sejtvonalakat úgy állíthatunk elő, hogy egy letin reszponzív sejtvonalat a riporter konstrukcióval és egy szelektálható markerrel transzfektálunk. A szelektálható markerek a stabil sejtvonalak kialakítására szokásosan alkalmazott szelektálható markerek lehetnek [lásd például: *Recombinant DNA*, 2nd edition, J. D. Watson et al., p. 216 (1992)]. Ezekkel a stabilan transzfektált sejtvonalakkal a leptin fiziológiai hatásait utánozó, fokozó vagy blokkoló vegyületek értékelésére alkalmas nagyteljesítményű vizsgálatokat végezhetünk.

A találmány tárgyát képezik azok a leptin fiziológiai hatásait utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek is, amelyeket a találmány szerinti eljárással azonosítottunk.

A találmány továbbá tárgyát képezi egy olyan készlet (kit) is, amely a találmány szerinti eljárásban történő felhasználásra adaptált.

A találmány tárgyát képezi ezenkívül a natív vagy rekombináns CACO-2 sejtek alkalmazása a leptin fiziológiai hatásait utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek detektálására, amelynek során a leptin által az ilyen sejtekben kiváltottaktól eltérő válaszokat mérjük.

A találmány tárgyát képezi az előbbieken kívül a natív vagy rekombináns CACO-2 sejtek alkalmazása leptin mimetikumok, potenciátorok vagy inhibitorok funkcionális aktivitásának a mérésére.

A jelen leírásban alkalmazott "olyan vegyület, amely utánozza a leptin fiziológiai hatásait" kifejezés olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek a leptin hiányában képesek olyan hatást kifejteni, amely vagy stimulálja a leptin receptort, és így lényegében ugyanolyan élettani hatást biztosít, mint az ob protein, vagy pedig egy, az említett receptor utáni (downstream) választ (post-receptor) aktivál.

A jelen leírásban alkalmazott "olyan vegyület, amely fokozza a leptin fiziológiai hatásait" kifejezés olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek növelik a leptin hatékonyságát és/vagy maximális fiziológiai hatását.

A jelen leírásban alkalmazott "olyan vegyület, amely gátolja a leptin fiziológiai hatásait" kifejezés olyan vegyületekre vonatkozik, amelyek csökkentik vagy lényegében blokkolják a leptin fiziológiai hatását.

Az agonisták, illetve az antagonisták azonosításához a polipeptid expressziójának az optimalizálása érdekében a polipeptid funkcionális formáját kódoló cDNS-t egy konstitutív promóter (például egy virális promóter) vagy egy regulálható promóter kontrollja alatt transzfektálhatjuk. Alternatív módon a válaszkeletet és a riportert egy olyan sejtvonalban expresszáljuk, amelyben a homológ rekombináns módszerrel előzetesen egy konstitutív vagy regulálható promotert építettünk be a leptin receptor kromoszómálisan kódolt génjének egy felső (upstream) helyzetébe. Ilyen módszert ismertetnek — egyebek mellett — például a következő szakirodalmi helyeken: Waldman, CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY/HEMATOLOGY, 12, 49 (1992); és különösen Riele et

al., PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 89, 5128 (1992).

Az alábbi példák a találmány illusztrálására szolgálnak. A példák a találmány oltalmi körét, illetve terjedelmét nem korlátozzák.

### **Példa**

#### Általános eljárás

A CaCo-2 sejteket standard módszerek, például a kalcium-foszfátos módszer [Graham and Van Der Eb, VIROLOGY, 52, 456 (1973)] alkalmazásával, egy minimál promoter, például herpes simplex timidin-kináz és egy luciferáz gén riporter konstrukció előtt (upstream) többszörös tandem másolatokban egy STAT válaszzelemet tartalmazó riporter plazmiddal transzfektáljuk. A transzfekciós hatékonyságbeli eltérések korrekciójához a sejteket egy  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást expresszáló referencia plazmiddal ko-transzfektálhatjuk. A transzfekciós idő (12-24 óra) után a sejteket egy vegyület különféle koncentrációival reagáltatjuk, majd kinyerjük és lizáljuk a sejteket. A lizátumokat a luciferáz és — ha lehet — a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásra nézve vizsgáljuk. Az antagonista aktivitást úgy értékelhetjük, hogy az értékelés előtt vagy azzal egyidejűleg megfelelő koncentrációban leptint adunk a vegyülethez, majd az önmagában alkalmazott leptinhez viszonyítva mérjük a luciferáz válasz fokozódását vagy csökkenését. A luciferáz enzimaktivitás mérésére standard módszereket alkalmazhatunk, amilyenek például a következő szakirodalmi helyeken ismertetett eljárások, illetve az aktivitás mérésére alkalmazhatunk kereskedelmi forgalomban kapható kész-

leteket (kit) is: Ow et al., SCIENCE, 234, 856 (1986); és de Wet et al., MOL. CELL BIOL., 7, 725 (1987)].

## KÍSÉRLETI RÉSZ

### ÖSSZEFOGLALÁS

Az adipocita hormon leptin a hipotalamuszban aktiválja a STAT3-at, és így fokozott jóllakottságot és fokozott energiafelhasználást vált ki. A STAT folyamat leptin mediált *in vivo* aktivációját a hipotalamuszon kívül más szövetekben mindeddig nem igazolták. Az alábbiakban leírjuk az egér bél diszkrét régiókban a lipid kezeléssel kapcsolatos leptin receptor expressziót és *in vivo* szignalizációt. A funkcionális izoforma, az OB-Rb expressziója a jejunumra korlátozódik. A leptin intravénás injekciója gyorsan sejtmag STAT5 DNS kötési aktivitást indukál a *+/+* és *ob/ob* egerek jejunumában, az OB-Rb izoformát nem tartalmazó diabetikus (*db/db*) egérben viszont a leptin beadása teljesen hatástalan. Ezenkívül a gyors (azonnali korai; immediate-early) gén *c-fos* indukcióját észleljük *in vivo*. Ezt a hatást számos gyors gén leptin-mediált indukciója és a vékonybél epithelium CACO-2 sejteken alapuló humán modellben történő STAT3 és STAT5 aktiváció is alátámasztja. Ezenkívül a leptin intravénás beadása a zsírterhelés után 90 perccel a jejunumban szignifikáns mértékben, mintegy felére csökkentette az APO-AIV transzkript szintet. Az eredményeink arra utalnak, hogy a jejunum a leptin hatásának közvetlen targetje, és ez az aktivitás az OB-Rb jelenlététől függ. Leptin hiányában vagy leptin hatásával szembeni rezisztencia esetén ez a hely a lipidkezelés

közvetlen befolyásolásával hozzájárulhat az elhízáshoz és az elhízással kapcsolatos tünetekhez.

A jelen leírásban alkalmazott rövidítések az alábbi jelentésekkel rendelkeznek: NIDDM, nem-inzulinfüggő diabetes; OB-R, leptin receptor; RT-PCR, reverz transzkriptációs polimeráz láncreakció; JAK, Janus-kináz; STAT, transzkriptációs szignál transzduktorok és aktivátorok; CACO-2, humán vastagbél epithelialis sejtvonal; APO-AIV, apolipoprotein AIV; EMEM, Earles minimal essential medium.

## **KÍSÉRLETI ELJÁRÁSOK**

### *Állatok és sejtek*

Az Aston törzs hathetes nőstény vad típusú és *ob/ob* egereit szokásos víz és standard laboratóriumi táp (Beekay patkány és egér toxikológiai étrend, Bantin and Kingman, Hull, Nagy-Britannia) elérési lehetőség biztosítása mellett 12-12 órás nappal/éjszaka ciklusban tartottunk. A leptin (5 mg/kg) *in vivo* hatásait 10 mM Tris-ben oldott és a farokvénába injekcióval beadott rekombináns leptin (Peprtech, Rockyville, Amerikai Egyesült Államok), illetve kontrollként 10 mM Tris vivőanyag alkalmazásával értékeltük. A jelzett idő után az egereket cervicalis dislocatióval leöltük, majd a megfelelő szöveteket kimetsztük, tisztítottuk és jéghideg fiziológiás nátrium-klorid-oldatban mostuk. A sejtmagproteinek extrakciójához az alábbiaknak megfelelően friss szöveteket preparáltunk, illetve a szöveteket cseppfolyós nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk, majd -80 °C-

on tároltuk. A humán Caucasién vastagbél epithelialis sejteket, azaz a CACO-2 sejteket (European animal cell culture, Porton Down, Nagy-Britannia) a konfluencia állapotában kaptuk, és a kísérletek előtt 3-4 napon keresztül 37 °C-on, párasított 5 térfogat% szén-dioxid-tartalmú levegőt tartalmazó helyiségben olyan EMEM-ben tenyésztettük, amely 1 % nem-esszenciális aminosavakat, 2 mM L-glutamint, 10 % magzati borjúsérumot, 100 µg/ml penicillint és 100 µg/ml sztreptomicint (valamennyi beszerzési helye: Gibco/BRL, Nagy-Britannia) tartalmazott. A sejteket 24 órán keresztül 0,1 % bovin-szérumalbuminnal (BSA) kiegészített szérummentes EMEM-ben preinkubáltuk. Ezt követően a sejteket leptin nélkül vagy a megadott koncentrációjú leptinnel, illetve a Tris vivőanyag kontrollal 0,1 % bovin-szérumalbumint tartalmazó alap EMEM-ben inkubáltuk.

#### *Leptin receptor mRNA expresszió*

RNais plus kit (BIO 101, Inc., Amerikai Egyesült Államok) alkalmazásával szövetekből és sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, majd az izolált teljes RNS-t azonnal DNase I-gyel (Gibco/BRL, Nagy-Britannia) kezeltük. Körülbelül 4 µg RNS-t alkalmaztunk a cDNS első-szálas cDNS gyöngyökkel (Pharmacia, Biotech) és oligo (dT)<sub>12-18</sub>-cal történő előállításához. Az integritást és az RNS terhelést az agaróz gélben lévő riboszomális rRNS sávok (28S és 18S) detekciós szkennelésével vizsgáltuk. A zsírból származó potenciális szennyezést egy RT-PCR amplifikációban, leptin specifikus primerek (I. táblázat) alkalmazásával vizsgáltuk. Az egér bélben lévő többszörös OB-R

transzkript izoformák, valamint a CACO-2 sejtekben lévő OB-Rb transzkript RT-PCR detektálását az I. táblázatban felsorolt oligonukleotid primerek alkalmazásával hajtottuk végre. Valamennyi PCR amplifikációt egy Progene termikus ciklizátorban (cyclor) (Techne/Cambridge) kétszer hajtottuk végre, amelynek során a következő körülményeket alkalmaztuk: AmpliTaq (Perkin-Elmer 95 °C 45 másodperc denaturáció, 57 °C, 45 másodperc temperálás, 72 °C, 45 másodperc meghosszabbítás (kivéve, hogy a hosszú OB-Rb izoforma meghosszabbítása esetén 1 perces időtartamot alkalmaztunk). A PCR termékeket ezt követően közvetlenül egy pCR-TRAP klónozó rendszerbe (GeneHunter Corp., Amerikai Egyesült Államok) klónoztuk, és a PCR termékek azonosítását ThermoSequenase terminátor ciklus szekventáló kit (Amersham Life Sciences, Nagy-Britannia) alkalmazásával végzett szekventálással igazoltuk. A kvantitatív PCR-hez a +/+ és ob/ob ege-rekből származó cDNS mintákból sorozathígításokat készítettünk, majd ismert módon (18) rögzített számú ciklussal (OB-R esetén 37, illetve  $\beta$ -aktin esetén 30) PCR-t végeztünk.

#### *Szövetek és sejtek immunoblot analízise*

Friss szövetet proteáz inhibitor koktélt (Boehringer Mannheim, Német Szövetségi Köztársaság) tartalmazó jéghideg RIPA pufferben (1X PBS, 1 % IGEPAL, 0,5 % nátrium-dezoxikolát) homogenizáltunk, majd egy protein vizsgálatban (Sigma Diagnostics, Nagy-Britannia) és standard Western analízisben használtuk fel a protein lizátumokat. Körülbelül 20  $\mu$ g proteint összekevertünk a gélfeltöltő pufferrel (4 % SDS, 100 mM Tris, pH

6,8, 100 mM  $\beta$ -merkapto-etanol), majd az oldatot 10 % SDS-PAGE-re vittük. CACO-2 sejtek monorétegei esetén a proteint úgy extraháltuk, hogy gélfeltöltő puffert adtunk a lombikokba. A proteineket elektotranszferrel vittük át PVDF-re (Millipore, Nagy-Britannia), ezt követően 2 % bovin-szérumalbumin, 10 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 keverékben végzett blokkolással immunoblotokat hajtottunk végre, majd az OB-R-t M-18 vagy N-20 antitestekkel (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Amerikai Egyesült Államok) detektáltuk, a STAT proteineket STAT5 (C-17) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Amerikai Egyesült Államok) és STAT1, STAT2, STAT3, STAT6 (Transduction Laboratories, Amerikai Egyesült Államok) antitestekkel detektáltuk. A sávokat egy ECL kit alkalmazásával, a gyártó (Amersham, Nagy-Britannia) utasításainak megfelelően tettük láthatóvá.

#### *Sejtmag extraktumok*

A kezelés után a CACO-2 sejteket azonnal jégre helyeztük, majd eltávolítottuk a médiumot. A sejteket előbb jéghideg PBS-sel, majd 5 mM NaF-ot, 10 mM NaMoO<sub>4</sub>-ot és 1 mM aktivált NaVO<sub>3</sub>-ot tartalmazó PBS-sel gyorsan mostuk. A sejteket egy 10 mM HEPES-t, pH 7,9, 10 mM NaMoO<sub>4</sub>-et, 1 mM NaVO<sub>3</sub>-ot, 1 mM EDTA-t, 1 mM EGTA-t, 1 mM NaF-ot, 0,125  $\mu$ M okadainsavat (Okadaic Acid), 1 mM DTT-t, 2  $\mu$ g/ml leupeptint, 2  $\mu$ g/ml aprotinint, 50  $\mu$ g/ml AEBSF-et és 0,2 % IGEPAL CA-630 detergenst (Sigma, Nagy-Britannia) tartalmazó hipotóniás pufferrel (400  $\mu$ l/25 cm<sup>2</sup>), sejtkaparás és óvatos triturálás közben lizáltuk. A lizátumot 5 percen keresztül jégen inkubáltuk, majd a sejtmagokat 20 mp-en

keresztül 14 00 fordulat/perc sebességgel végzett mikrocentrifugálással kiülepítettük. A felülúszót félretettük, a sejtmagokat pedig 100  $\mu$ l nagy sótartalmú pufferben (200 mM NaCl-ot és 20 % glicerint tartalmazó hipotóniás puffer) óvatosan szuszpendáltuk. A sejtmag proteint úgy extraháltuk, hogy a csöveket 30 percen keresztül 4 °C-on forgattuk, majd töredékeket 20 percen keresztül 14 00 fordulat/perc sebességgel végzett mikrocentrifugálással kiülepítettük. A sejtmag extraktumokat részekre osztottuk, majd a gélmobilitás-eltolódási vizsgálat (lásd lentebb) előtt cseppfolyós nitrogénben hirtelen lefagyasztottuk. A szöveketek kimetszettük, jéghideg fiziológiás nátrium-klorid-oldattal mostuk, felaprítottuk, ezt követően 1:10 tömeg/térfogat arányú hipotóniás lízis pufferrel homogenizáltuk, majd lényegében a CACO-2 sejteknél ismertetett módszernek megfelelően előállítottuk a sejtmag extraktumokat.

#### *Gélmobilitás-eltolódási analízis*

5  $\mu$ l sejtmag extraktumot alkalmaztunk a DNS kötési vizsgálatokhoz, amelyek során a nem-specifikus kötés blokkolásához DNS kötési pufferben [Tris 10 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT és 1  $\mu$ g/ml polidezoxi Inozin/Citidin (Pharmacia, Svédország)] 100 ng/reakció  $^{32}$ Py-ATP végjelzett próbát alkalmaztunk. A kötési reakciókeveréket 20 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 4 %-os natív PAGE gélre vittük. A szupereltolódási (supershift) kísérletek egy további, a megfelelő antitesttel 15 percen keresztül végzett inkubálást is magukban foglaltak. Az oligonukleotid próbák a következők voltak: a mutált

nagy affinitású humán szérum indukálható elem (m67 SIE), 5'-cat ttc ccg taa atc at -3' a *c-fos* promoterből, és egy patkány  $\beta$ -kazein promoter elem szekvencia, 5'-gga ctt ctt gga att aag gga-3'. A komplementer oligonukleotid szálakat (Research Genetics, Amerikai Egyesült Államok) 200 ng/ $\mu$ l végkoncentrációban Tris 10 mM, pH 8,0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl keverékben úgy melegítettük, hogy a keveréket 10 percen keresztül 90 °C-on melegítettük, majd hagytuk lassan szobahőmérsékletre hűlni. A próbák radioizotópos jelzését 3E/ $\mu$ l T4 Polynucleotide Kinase-zal (Amersham, USB, Nagy-Britannia) 37 °C-on egy órán át 1  $\mu$ l  $^{32}$ Py-ATP-vel (6000 Ci/mmol, Amersham, Nagy-Britannia) végeztük.

*Az APO-AIV és a gyors (immediate-early) gén mRNS speciesek expressziója*

Leptinnel nem kezelt vagy leptinnal 30 percen keresztül kezelt szöveteket és CACO-2 sejteket cseppfolyós nitrogénben hirtelen lefagyasztottunk, majd az RNS-t a fentieknek megfelelően extraháltuk. Az *in vivo c-fos* és APO-AIV mRNS szintek meghatározásához digoxigenin-jelzett cDNS próbák alkalmazásával végzett standard Northern blot hibridizációt hajtottunk végre. A kötött próbákat az anti-digoxigenin detektálási rendszerrel detektáltuk, amelynek során a CDP-Star kemilumineszcens szubsztráttal (Tropix, Amerikai Egyesült Államok) egy alkálikus foszfatázhoz konjugált poliklonális antitestet (Boehringer Mannheim, Német Szövetségi Köztársaság) alkalmaztunk, végül a sávok kvantitatív meghatározását pásztázó lézer denzitométerrel hajtottuk végre. A leptinre adott válaszreakcióban a *c-fos*,

*c-jun*, *junB* és *junD* gyors gének expresszióját az I. táblázatban felsorolt primerek alkalmazásával végzett kvantitatív PCR-rel határoztuk meg.

### EREDMÉNYEK

RT-PCR alkalmazásával a többszörös OB-R mRNS izoformákat a gastrointestinalis tractus diszkrét szekcióiban detektáltuk (1A. ÁBRA). A különböző rövid izoformák (OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd és OB-Re) a bél teljes hosszában expresszálódnak. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a funkcionális hosszú OB-Rb mRNS túlnyomórészt a jejunumban expresszálódik (1A. ÁBRA). A +/+ és *ob/ob* egerek jejunumából származó cDNS minták leptin-specifikus primerekkel végzett RT-PCR amplifikációja negatív detektálást eredményezett, ugyanakkor az ugyanezen mintákban lévő OB-R közös extracelluláris doménjének a PCR amplifikációja jól megfigyelhető volt (1B. ÁBRA). Ez arra utal, hogy az 1A. ÁBRA által mutatott OB-R mRNS expresszió egyrészt nem a zsírszövetből származó szennyeződés eredménye, másrészt nem a szabálytalan transzkripció eredménye. A funkcionális leptin receptor OB-Rb mRNS expressziója az RT-PCR alkalmazásával könnyen detektálható volt a vékonybél epithelium CACO-2 humán modellben (1B. ÁBRA). 20 µg nyers protein lizátumnak az OB-Ra rövid izoforma, a számos szövetben legnagyobb mennyiségű izoforma karboxi-terminálisával szemben kialakult antitestek alkalmazásával végzett Western blot analízise egy, a várt méretnek megfelelő körülbelül 120 kDa protein sávot eredményez, ami túlnyomórészt a +/+ és az *ob/ob* egerek vékonybelében expresszálódik (2A. ÁBRA). Az

OB-R expresszió detektálására alkalmazott RT-PCR vagy Western analízissel kapott eredmények közötti különbség a két módszer detektálási határértékeinek az eltérését tükrözi. A Western analízis azt mutatja, hogy a bél különböző szekcióiban eltérő az OB-R mennyisége (2A. ÁBRA). A közös humán OB-R receptor amino-terminálisával szemben kialakult antitestek a CACO-2 sejtekben egy körülbelül 120 kDa proteint detektáltak, ami feltételezhetően a túlsúlyban lévő rövid OB-R izoformára vezethető vissza (2B. ÁBRA).

Ezt követően a korábbiakban ismertetett (22) kvantitatív PCR vizsgálat alkalmazásával a gastrointestinalis tractus diszkrét szekcióiban mértük az endogén módon expresszált  $\beta$ -aktinra normalizált relatív teljes OB-R transzkript expressziós szinteket, amelynek során olyan primereket alkalmaztunk, amelyek felismerik azt a szekvenciát, ami a receptor amino-terminálisát kódoló valamennyi izoforma esetében közös. Összehasonlítottuk az azonos mennyiségű cDNS-ből generált PCR optimalizált lineáris régiójából származó OB-R és  $\beta$ -aktin PCR termékek arányait (3A. ÁBRA). A +/+ és az *ob/ob* egér szövetek között nem találtunk eltérést az OB-R mRNS szintekben, viszont az OB-R transzkript 2-3-szor több a vékonybélben, mint a gyomorban és a colon transversumban (3B. ÁBRA). Ezek az eredmények jó összhangot mutatnak azokkal az eredményekkel, amelyeket a fentiekben az OB-Ra eloszlás Western analízisével nyertünk (2A. ÁBRA).

A vékonybélnek az OB-Rb-t expresszáló régiójában lévő leptin-szignalizációs mechanizmusok tisztázásához megvizsgáltuk a STAT proteinek jelenlétét, amelyek STAT proteinekről ismert,

hogy ezek továbbítják a leptin szignált. A  $+/+$  és  $ob/ob$  jejunum Western blot analízise jól detektálta a STAT5-öt, de csak lényegesen gyengébben a STAT1-et és a STAT3-at (4A. ÁBRA). Ezenkívül a STAT5 jól expresszálódik a vastagbélben és a duodenumban is (4A. ÁBRA). A CACO-2 sejtek is expresszálnak leptin reszponzív STAT izoformákat (4B. ÁBRA). Egy éjszakán keresztül koplaltatott  $+/+$  és  $ob/ob$  egereknek farokvénába adott injekcióval 5 mg/kg rekombináns rágcső (murine) leptint adtunk be. Az injekció beadása után 30 perccel az egereket leöltük, majd a mestmag extraktumok előállításához eltávolítottuk a jejunumot. A STAT aktiváció EMSA analízissel végzett értékeléséhez két szelektív próbát alkalmaztunk. A *c-fos* promoterből származó, m67-SIE mutált nagy affinitású STAT konszenzus kötőelem túlnyomórészt a STAT1-et és a STAT-3-at köti, viszont csak kis affinitással köti a STAT5-öt. Ez a próba nem tárt fel STAT DNS kötési aktivitás indukciót az egér bélben *in vivo* végzett leptin kezelésre adott válaszreakcióban (az adatok nem láthatók). A patkány  $\beta$ -kazein promoter STAT DNS kötési konszenzus elemet alkalmaztuk szelektív próbaként az *in vivo* STAT5 aktivitás vizsgálatánál. Az 5 mg/kg leptinnel végzett kezelés a  $+/+$  és az  $ob/ob$  egerekben egyaránt a DNS kötés aktivitás jelentős aktivációját váltotta ki, amit viszont nem észleltünk a csak Tris-sel kezelt kontroll állatokban (5A. ÁBRA). Ezzel ellentétben, amikor a leptin ugyanilyen dózist a  $db/db$  egerekbe injekcióztuk (amelyekből hiányzik az OB-Rb izoforma), a jejunum sejtmag extraktumaiban nem aktiválódott a STAT5 DNS kötés (5A. ÁBRA). A  $+/+$  és  $ob/ob$  jejunumban indukált STAT5 DNS kötés aktivitást a

specifikus anti-STAT5a antitesttel végzett preinkubálás teljesen megszüntette, míg az anti-STAT5b antitesttel végzett preinkubálás ennél csak lényegesen kisebb mértékben csökkentette (lásd az 5B. ÁBRA esetén az *ob/ob* jejunumból nyert eredményeket). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a jejunum a leptin hatásának a közvetlen targetje, valamint hogy ez az aktivitás az OB-Rb-n és egy STAT5 mechanizmuson keresztül mediált.

Szérummentes CACO-2 sejtekben egy 15 perces leptin kezelés az m67-SIE próbához történő STAT DNS kötés dóziszfüggő aktivációját eredményezte. Az anti-STAT3 antitest ezt az aktivitást megszüntette, míg az anti-STAT1 antitest hatástalannak bizonyult (6. ÁBRA). Ezenkívül a leptinnel kezelt CACO-2 sejtek aktiválták a STAT5-nek a  $\beta$ -kazein próbához történő DNS kötésének az aktivitását, és a szupereltolódási vizsgálatok a STAT5b-t azonosították mint a komplex fő tényezőjét (6. ÁBRA). Tehát a leptin az egér jejunumban és a CACO-2 sejtekben egyaránt sejtmag STAT5 DNS kötési aktivitást indukál, azonban úgy tűnik, hogy a két rendszerben a STAT5 eltérő izoformái alkotják a protein-DNS komplexet.

A leptin harminc perccel a beadás után az *ob/ob* egerek jejunumában lévő *c-fos* gyors gén indukcióját is kiváltja (7A. ÁBRA). A Northern blot analízis szerint 5 mg/kg leptin intravénás injekciója ötszörösére növelte a *c-fos* mRNS szintet. Hasonló módon, a leptin harminc perccel a beadás után drámai mértékben megnövelte a szérummentes CACO-2 sejtekben lévő *c-fos*, *c-jun*, *junB* és *junD* gyors gén expresszióját is a kvantitatív PCR-rel végzett meghatározás szerint (7B. ÁBRA). Mivel a STAT5

aktivációja általában nem jár együtt *c-fos* indukcióval, ezek az eredmények valószínűleg azt jelzik, hogy *in vivo* a STAT5 folyamaton kívül más folyamatok is aktiválódnak.

Ezt követően a leptinnek az APO-AIV mRNS szintekre gyakorolt hatását mérve megvizsgáltuk, hogy a leptin képes-e módosítani a jejunum egyik legfontosabb funkciójában, azaz a lipidkezelésben szerepet játszó gének transzkripcióját. Nagy zsírtartalmú étrenden tartott *ob/ob* egerekbe 5 mg/kg leptint injekcióztunk, amelynek hatására szignifikáns mértékben, felére csökkent az APO-AIV mRNS szint; APO AIV mRNS/ $\beta$ -aktin mRNS átlag  $\pm$  SEM: kontroll vivőanyag =  $2,23 \pm 0,16$  és leptinnel kezelt =  $1,04 \pm 0,16$  ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ) 90 perccel a nagy zsírtartalmú táplálék elfogyasztása után (8. ÁBRA). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a leptin a táplálékban lévő trigliceridek plazmába történő transzportjának a csökkentése révén azonnal képes megszakítani a zsírfelhalmozódást.

### ÉRTÉKELÉS

A adipocita hormon leptin jelzést ad a hipotalamusznak a táplálékfelvétel gátlására és az energiafelhasználás növelésére (1). A korábbiakban arról is beszámoltak, hogy a leptin a periferális szövetek biológiájában is szerepet játszik (8, 20, 23, 24). A *+/+* és az *ob/ob* egerek leptinnel végzett kezelése nagyobb testtömegcsökkenést és zsírmennyiség-csökkenést okoz, mint amekkora mértékű csökkenést csak a tápanyagfelvétel gátlása eredményezne (25). Ez arra utalna, hogy a leptin a tápanyagfelvétel szabályozásától részben függetlenül képes befolyásolni

a zsír felhalmozódását, metabolizálódását és az energia homeosztázist. Igazoltuk, hogy a vékonybélnek egy, a lipidfelvétellel kapcsolatos megkülönböztethető régiójában jelen van az OB-Rb teljes hosszúságú leptin receptor. A leptin beadása után 30 perccel a *+/+* és *ob/ob* egerek jejunumában aktiválódik a STAT5 szignalizációs folyamat, az OB-Rb hiányos *db/db* egerekben viszont a leptin beadása teljesen hatástalan. A leptin beadása 90 perccel a nagy mennyiségű zsír beadása után csökkenti az APO-AIV értékét. A leptinnek a jejunalis lipidkezelésre gyakorolt azonnali és közvetlen hatása az egyik legjelentősebb mechanizmus lehet a zsírfelhalmozódás ellen.

A rövid OB-R izoformák sokféle szövetben expresszálódnak, míg a hosszú OB-Rb izoforma szöveti eloszlása korlátozottabb (7). Az OB-Rb viszonylag jól expresszálódik a hipotalamuszban, különösen hipotalamusznak a testtömeg homeosztázis szabályozásával kapcsolatban álló a régióiban. Azonban rajtunk kívül mások is azonosították az OB-Rb periferialis szövetekben, például a hasnyálmirigyszigetekben, a nyirokcsomókban és a haematopoieticus őssejtekben történő expresszióját (7, 8, 24). Az eddigi vélemények szerint a leptin biológiai hatásainak a mediálásához csak az OB-Rb receptor zoforma képes a JAK/STAT kaszkádot aktiválni. Ezt számos olyan *in vivo* és *in vitro* kísérletre alapozzák, amelyek azt mutatják, hogy a tápanyagfelvétel, az inzulin-kiválasztás és a sejtprolifерáció stimulálásának a befolyásolásához OB-Rb-re van szükség (8, 16, 19). Ezekben a vizsgálatokban a rövid receptor izoformák, amelyek a legtöbb szövetben a legnagyobb mennyiségben vannak jelen, nem képesek ilyen választ

adni a leptinre, illetve ezekhez az izoformákhoz mindeddig nem rendeltek hozzá semmilyen biológiai funkciót. A korábbiakban történt utalás arra, hogy a rövidebb OB-R izoformák homodimerizáció és a citoszol domén ezt követő aggregációja útján módosíthatják az OB-Rb aktivitását (7). A rövidebb izoformáknak ez a hatása elég gyenge, azonban összhangban áll White adataival (27), aki azt bizonyította, hogy az OB-Rb szignalizáló (jelző) kapacitása a rövidebb receptor izoformák repressziójával szemben meglehetősen rezisztens. A jelen vizsgálatban azt igazoljuk, hogy a többszörös rövid izoformák a gastrointestinalis tractus teljes hosszában expresszálódnak, míg a funkcionális OB-Rb túlnyomórészt a jejunumban, és kisebb részben az ileumban, a lipidkezelésben szerepet játszó két legfontosabb helyen expresszálódik. Ezenkívül a Western blot analízis és a kvantitatív PCR analízis egyaránt azt mutatja, hogy az OB-R nagyobb mennyiségben van jelen a vékonybélben, mint akár a gyomorban, akár a vastagbélben. Egy közelmúltbeli, a leptinnek a gyomorkiürülésre gyakorolt hatásaival kapcsolatos vizsgálat arra utal, hogy a leptin nem szabályozza az erősen savas, félfolyékony anyagnak (chyme) a vékonybélbe történő átjutását, illetve ennek a sebességét (27). Ez összhangban áll a jelen vizsgálat azon megállapításával, miszerint ezen a helyen az OB-Rb nem expresszálódik. Az OB-R-vel kapcsolatos eredmények véleményünk szerint arra utalnak, hogy a vékonybél, különösen a jejunum a leptin hatásának egy jelentős targetje.

Korábbi *in vivo* vizsgálatok azt mutatták, hogy a leptin intravénás injekciója az *ob/ob* egér hipotalamuszban STAT3 DNS

kötési aktivitást indukál, a *db/db* egerek esetén viszont nem (9). A hipotalamuszból és több periferialis szövetből nyert sejtmag extraktum nem változtatja meg a STAT5-specifikus  $\beta$ -ka-zein promoter elemet. Kimutattuk, hogy a leptin intravénás injekciója a *+/+* és *ob/ob* egerek jejunumában STAT5 DNS kötési aktivitást indukál, a *db/db* egerben viszont ugyanez a kezelés teljesen hatástalan. A STAT aktivációra vonatkozó korábbi vizsgálatok (19) alapján a vizsgálatainkhoz szubmaximális leptinkoncentrációt (5 mg/kg) és 30 perces optimális időtartamot választottunk. Nem zártuk ki azonban azoknak az egyéb leptin mechanizmusoknak az aktivációját sem, amelyek észrevétlenül fedik át ezt az időkeretet a jejunumban. Az 5 mg/kg dózis némileg nagyobb, mint a leptin élettani koncentrációja, azonban a különféle forrásokból származó rekombináns leptinek aktivitása szignifikáns mértékben eltér egymástól. A szakirodalmi beszámolók azt mutatják, hogy a leptin 0,1 mg/kg és 5 mg/kg közötti dózisa a tápanyagfelvétel 50 %-os csökkenését okozzák. Ez arra utal, hogy a rekombináns leptin az endogén leptinnél lényegesen kevésbé hatékony.

A STAT5 DNS kötés és a gyors (immediate-early) gén transzkripció gyors aktivációja összhangban áll a leptinnek a bélre gyakorolt közvetlen hatásával. Az *in vivo* eredményeink azt mutatják, hogy a leptinnek a jejunumban kifejtett hatásához szükség van a hosszú OB-Rb izoforma jelenlétére. Ezenkívül a vékonybél epithelium humán modelljében, a CACO-2 sejtben a leptinre adott válaszreakció során fellépő STAT5 aktiváció és gyors gén indukció a leptinnek az enterocitákra gyakorolt köz-

vetlen hatásaként is értelmezhető. Az, hogy a STAT3-nak és a STAT5-nek a kapcsolódó aktivációja ebben a sejtvonalban szélesebbnek látszik, mint a primer bélszövetben, ismert jelenség az *in vitro* rendszerekben (7). Azt, hogy CACO-2 sejtekben a leptinnel végzett kezelés előtt és a kezelés ideje alatt a sejteket szérummentesíteni kell, valamint hogy a STAT DNS kötés aktivációjának az igazolásához a leptint nagyobb koncentrációkban kell alkalmazni, a korábbiakban már megfigyelték más sejtvonalak esetén (29). Azt, hogy a STAT5 milyen jelentős szerepet játszik a leptin testtömeg homeosztázisra gyakorolt hatásának a mediálásában, alátámasztják azok az *in vitro* bizonyítékok is, amiket olyan, kövér (*fa/fa*) Zucker patkányok esetén nyertek, amelyek az OB-R extracelluláris doménjében egy misszensz mutációt (Gln→Pro) tartalmaznak (30). Az OB-R(*fa*) a STAT1-nek és a STAT3-nak egy leptinfüggő (konstitutív) aktivációját mediálja, ugyanakkor a STAT5 aktivációja teljesen megszűnik (31). Ezekben az állatmodellekben és a leptinhiányos (*ob/ob*) és OB-Rb hiányos (*db/db*) egerek mindegyikében korai rohamos elhízás alakul ki, és véleményünk szerint az, hogy ezekben az állatmodellekben a vékonybélben hiányzik a leptin hatása, részlegesen hozzájárul az obesitas fenotípushoz.

A vékonybél alkotja a megemésztett táplálék és a szervezet gondosab szabályozott belső környezete közötti elsődleges érintkezési felületet. Az obesitas állapotában fokozott mértékű az endogén intestinalis triglicerid-termelés (32), ami hozzájárul a plazmában lévő nagyobb triglicerid-koncentrációhoz. Az eredményeink első közelítésben azt mutatják, hogy a leptin a

jejunumban a STAT5 gyors aktivációját okozza, és ezzel áll kapcsolatban az, hogy egy zsíros étel lenyelése után 90 perccel csökken az APO-AIV transzkript szintje is. Ez arra utal, hogy a leptin ezen a helyen *in vivo* élettani szerepet játszik a lipidkezelésben. Az APO-AIV rendszer összekötő szerepet játszik a triglicerideknek mint chylomicronoknak a keringésbe történő bekerülésében és a különféle szövetekben lévő akceptor membránokhoz történő eljuttatásában. Ennek a funkciónak a deregulálása részét képezheti egy olyan mechanizmusnak, amely obesitást és magasabb lipoprotein-koncentrációkat eredményez. Ezenkívül a hypertriglyceridaemia és a hyperlipoproteinaemia a cardiovascularis betegség és az atherosclerosis kockázati tényezője (33). Élettani körülmények között azonban a plazma leptinnek az APO-AIV csökkenése révén történő étkezés utáni növekedése (34) egy, a chylomicron triglicerid koncentrációk csökkentésére szolgáló pufferrendszerként funkcionálhat. Az is lehetséges, hogy a leptin egy, az APO-AIV rendszerre gyakorolt tónusgátló mechanizmusként szolgálva csökkenti a kiválasztott (szekretált) trigliceridek mennyiségét. Ugyancsak ismert, hogy a leptin indukálni képes a zsírsav-oxidáció enzimjeit (35), és így elősegíti a zsírsavak  $\beta$ -oxidációjához a tápanyag-metabolizálódás megindulását (36). Kimutattuk tehát a leptinnek egy új, a jejunum működésre gyakorolt, az OB-Rb receptor és egy STAT5 mechanizmus útján *in vivo* mediált periferialis hatását. Ez egy olyan, a zsírtartalékból a lipidkezelés elsődleges helyére küldött negatív visszacsatolási jelzést, azaz egy olyan adipo-entericus körfolyamatot jelenthet, ami hozzájárul a leptin obesitas-ellenes

hatásaihoz.

1. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). NATURE 372, 425-432
2. Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P. (1995). SCIENCE 269, 546-549
3. Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K. and Friedman, J. M. (1995). SCIENCE 269, 543-546
4. Chen, H., Churfat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Wang, X., Ellis, S. J., Lukey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, L. F., Duyk, G. M., Tepper, R. L. and Morgenstern, J. P. (1996). CELL 84, 491-495
5. Lee, G-H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. and Friedman, J. M. (1996). NATURE 379, 632-635
6. Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winter, D., Boone, T. and Collins, F. (1995). SCIENCE 269, 540-543
7. Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H. and Skoda, R. C. (1996). PROC. NATL. ACAD SCI. USA 93, 6231-6235
8. Emilsson, V., Liu, Y.-L., Cawthorne, M. A., Morton, N. M. and Davenport M. (1997). DIABETES 4, 17-22
9. Montague, C. T., Farooqi, L. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham N. J., Sewter, C. P., Digby J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Early, A.

R., Barnett, A. H., Prins, J. B. and Orahilly, S. (1997). NATURE 387, 903-908

10. Cioffi et al., NATURE MEDICINE, (1996), 2 (5), 585

11. A. Ullrich and J. Schlessinger, CELL, (1990), 61, 203-212

12. J.N. Ihle et al., TIBS, (1994), 19, 222-227

13. Seidel et al., PROC. NAT. ACAD. SCI. USA., (1995), 92, 3041

14. Tartaglia, L. A., Dembeki, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sankey, S., Moriaty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Woolf, F. A., Monroe, C. A. and Tepper, R. L. (1995). CELL 83, 1263-1271

15. Darnell, J. E. Jr., Ken, L. M. and Stark, G. R. (1994). SCIENCE 264, 1415-1421.

16. Ghilardi N. and Skoda R. C. (1997). MOL ENDOCRINOL. 11, 393-399

17. Ghilardi et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. (1996), 93, 6231-6235

18. Takahashi Y., Oimura Y., Mizuno I., Iida K., Takahashi T., Kaji H., Abe H. and Chihara K. (1997). J. BIOL. CHEM. 272, 12897-12900

19. Vaisse, C., Halaas, J. L., Horvath, C. M., Darnell, J. E., Stoffel, M. and Friedman, J. M. (1996). NATURE GENET. 14, 95-97

20. Kieffer, T. J., Heller, R. S., Leech, C. A., Holz, G. G. and Habener, J. F. (1997). DIABETES 46, 1087-1093

21. Hamann, A., Busing, B., Kausch, C., Ertl, J., Preibisch, G., Greten, H. and Matthaei, S. (1997). DIABETOLOGIA 40, 810-815
22. Liu Y.-L., Emilsson, V. and Cawthorne, M. A. (1997). FEBS LETTERS 411, 351-355
23. Chehab, F. F., Lim, M. E. and Lu, R. (1996). NATURE GENET. 12, 318-320
24. Cioffi, J., Shafer, A. W., Zupanic, T. J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A. A., Platika, D. and Snodgrass, H. R. (1996). NATURE MED. 2, 585
25. Levin, N., Nelson, C., Gurney, A., Vandlen, R. and De Sauvage, F. (1996). PROC. NATL. ACAD SCI. USA 93, 1726-1730
26. Mercer, J. G., Hoggard, N., Williams, L. M., Lawrence, C. B., Hannah, L. T., Morgan, P. J. and Trayhurn, P. (1996). J. NEUROENDOCRINOL. 8, 733-735
27. White, D. W., Kuropatwinski, K. K., Devos, R., Baumann, H. and Tartajlia, L. A. (1997). J. BIOL. CHEM. 14, 4065-4071.
28. Barrachima, M. D., Matinez, V., Wei, J. Y. and Tache, Y. (1997). AM. J. PHYSIOL. 41, 81007-81011
29. Islam M. S., Morton N. M., Hansson, A. and Emilsson, V. (1997). BIOCH. BIOPHYS. RES. COMMUN. 238, 851-855
30. Streamson, C., Chua Jr., Chung, W. K., Wu-Peng, S., Zhang, Y., Liu, S.-M., Tartaglia, L. A. and Leibel, R. L. (1996). SCIENCE 271, 994-996
31. White, D. W., Wang, Y. P., Chua, S. C., Morgenstern, J. P., Leibel, R. L., Baumann, H. and Tartaglia, L. A. (1997).

PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 94, 10657-10662

32. Feingold, K.R., Moser, A., Adi, S., Soved, M. and Grinfeld, C. (1990). ENDOCRINOL. 127, 2247-2252

33. Angelin, B. (1997). CURRENT OPINION IN LIPIDOLOGY 8, 337-341

34. Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J. Stahls, B. and Auwerx, J. (1995). NATURE 377, 527-529

35. Zhou, Y. T., Shimabukuro, M., Koyama, K., Lee, Y., Wang, M. Y., Trieu, F., Newgard, C. B. and Unger, R. H. (1997). PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 94, 6386-6390

36. Hwa, J. J., Fawzi, A. B., Graziano, M. P., Ghibaudi, L., Williams, P., Vanheek, M., Davis, H., Rudinski, M., Sybertz, E. and Strader, C. D. (1997). AM. J. PHYSIOL. 41, 81204-81209

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a leptin fiziológiás hatását utánzó, fokozó vagy gátló vegyületek azonosítására, **azzal jellemezve**, hogy

- (a) a leptin fiziológiás hatását utánzó vegyületek esetén megállapítjuk a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált transzkripció szignál transzduktor és aktivátor (STAT) DNS válasz-elemre gyakorol; vagy
- (b) a leptin fiziológiás hatását fokozó vagy gátló vegyületek esetén megállapítjuk a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület arra a válaszreakcióra gyakorol, amit a leptinnek egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált STAT DNS válasz-elemre gyakorolt hatása vált ki;

ahol

a válasz-elem és a riporter a CACO-2 humán Caucasian vastagbél epithelialis sejtvonalban expresszált, vagy

a válasz-elem és a riporter CACO-2 sejtekben expresszált, amely sejtvonal (a rekombináns sejtvonal) egy olyan polipeptiddel is transzfektált, amely polipeptid képes mediálni vagy fokozni egy leptin aktivált STAT DNS válasz-elem leptin általi stimulációját és tartalmazza a megfelelő STAT proteineket.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a válasz-elem egy promoter génhez, előnyösen egy minimál promoterhez kapcsolódik.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemez-**

**ve**, hogy a válaszelem egy olyan  $TT(N)_nAA$  általános képletű nukleotid, amelyben N tetszőleges nukleotidot jelent, és n értéke 4, 5 vagy 6, előnyösen 5.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a válaszelem egy TTCCCGGAA oligonukleotid.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a riporter gén szentjánosbogár luciferáz vagy kloramfenikol acetil-transzferáz enzim.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a promoter a herpes simplex vírus timidin-kináz vagy SV40 promoter.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy az ob-reszponzív sejtvonal egy máj- vagy májhepatoma-eredetű sejtvonal.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a válaszelem, a riporter és a promoter egy, az ob-reszponzív sejtvonalat transzfektálni képes vektorba van beépítve.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a vektor pGL2-basic luciferáz vektor (Promega).

10. A 8. vagy 9. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a vektor konfigurációja olyan, hogy a STAT DNS válaszelem a promoter és riporter gén előtt (upstream) helyezkedik el.

11. Részekből álló készlet — kit — olyan, a leptin fiziológiás hatását utánozó, fokozó vagy gátló vegyületek azonosítására szolgáló eljárásban történő felhasználásra, amely eljárás

rás során

- (a) a leptin fiziológiás hatását utánozó vegyületek esetén megállapítják a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált transzkripciós szignál transzduktor és aktivátor (STAT) DNS válasz-elemre gyakorol; vagy
- (b) a leptin fiziológiás hatását fokozó vagy gátló vegyületek esetén megállapítják a vegyületnek azt a hatását, amit a vegyület arra a válaszreakcióra gyakorol, amit a leptinnek egy riporter génhez kapcsolt, leptin aktivált STAT DNS válasz-elemre gyakorolt hatása vált ki;

ahol

a válasz-elem és a riporter a CACO-2 humán Caucasian vastagbél epithelialis sejtvonalban expresszált, vagy

a válasz-elem és a riporter CACO-2 sejtekben expresszált, amely sejtvonal (a rekombináns sejtvonal) egy olyan polipeptiddel is transzfektált, amely polipeptid képes mediálni vagy fokozni egy leptin aktivált STAT DNS válasz-elem leptin általi stimulációját és tartalmazza a megfelelő STAT proteineket.

A meghatalmazott:

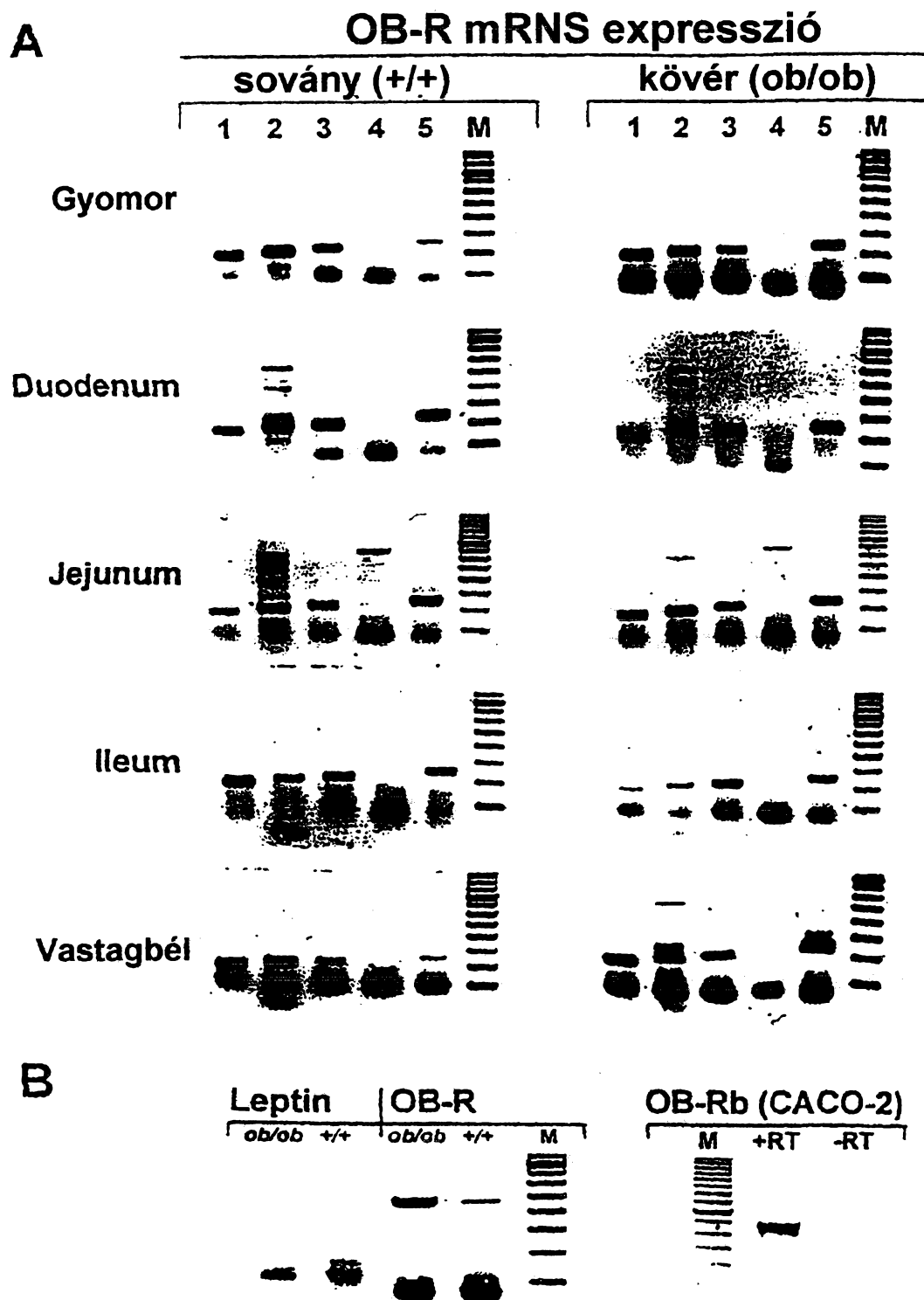
41 + 8 = 49 oldal

08.12.17

2001. 08. 17.

Berzsi Katalin  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.C. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-32

1/8



1. ÁBRA