



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 37 644 T2 2008.10.30

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 115 863 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 37 644.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/21194

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 969 439.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/017353

(86) PCT-Anmeldetag: 15.09.1999

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 30.03.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 18.07.2001

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 28.11.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 30.10.2008

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

101279 P 22.09.1998 US

114223 P 30.12.1998 US

129674 P 16.04.1999 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Genentech, Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:

ADAMS, Sean, Belmont, CA 94002, US; PAN,
James, Foster City, CA 94404, US; ZHONG, Alan,
South San Francisco, CA 94080, US

(54) Bezeichnung: UCP4

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

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

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Identifikation und Isolierung neuer DNA mit Homologie zu bestimmten menschlichen Entkopplungsproteinen, sowie die rekombinante Produktion neuer Polypeptide, die hierin als "Entkopplungsprotein 4" oder "UCP4" ("uncoupling Protein 4") bezeichnet werden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Entkopplungsproteine oder "UCPs", von denen angenommen wird, dass sie bei Stoffwechselvorgängen eine Rolle spielen, wurden in der Literatur beschrieben. UCPs wurden erstmals in den braunen Fettzellen von Tieren angetroffen und beschrieben, die Winterschlaf halten, wie z. B. bei Bären. Von UCPs wurde angenommen, sie würden diesen Winterschläfern, sowie anderen, dem kalten Wetter angepassten Tieren bei der Erhaltung der Körperkerntemperatur bei kaltem Wetter helfen, indem sie den Stoffumsatz ihres Körpers im Ruhezustand anheben. Da Menschen relativ geringe Mengen an braunem adipösem Gewebe besitzen, wurde ursprünglich angenommen, UCPs würden eine geringe Rolle im menschlichen Stoffwechsel spielen.

[0003] Mehrere verschiedene menschliche Entkopplungsproteine wurden nun bereits beschrieben (siehe allgemein Gura, Science 280, 1369–1370 (1998)). Das menschliche Entkopplungsprotein, das als UCP1 bezeichnet wird, wurde von Nicholls et al. identifiziert. Nicholls et al. zeigten, dass die innere Membran von braunen Fettzellen-Mitochondrien für Proteine sehr durchlässig war und die Forscher führten die beobachtete Durchlässigkeit auf ein Protein, genannt UCP1, in der Mitochondrialmembran zurück. Nicholls et al. berichteten, dass das UCP1 durch Erzeugung einer solchen Durchlässigkeit die Anzahl an ATPs reduzierte, die aus einer Nahrungsquelle erzeugt werden können, wodurch der Stoffumsatz des Körpers angehoben und Wärme erzeugt wird (Nicholls et al., Physiol. Rev. 64, 1–64 (1984)).

[0004] Später wurde herausgefunden, dass UCP1 tatsächlich nur in braunem adipösem Gewebe exprimiert wird (Bouillaud et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 445–448 (1985); Jacobsson et al., J. Biol. Chem. 260, 16250–16254 (1985)). Studien bezüglich der genetischen Kartierung haben gezeigt, dass sich das menschliche UCP1-Gen auf Chromosom 4 befindet (Cassard et al., J. Cell. Biochem. 43, 255–264 (1990)).

[0005] Ein weiteres menschliches UCP, UCPH oder UCP2 genannt, wurde ebenfalls beschrieben (Gimeno et al., Diabetes 46, 900–906 (1997); Fleury et al., Nat. Genet. 15, 269–272 (1997); Boss et al., FEBS Letters 408, 39–42 (1997); siehe auch Wolf, Nutr. Rev. 55, 178–179 (1997)). Fleury et al. lehren, dass das UCP2-Protein eine Aminosäureidentität von 59% mit UCP1 aufweist und dass UCP2 an Regionen des menschlichen Chromosoms 11 kartiert, die mit Hyperinsulinämie und Fettleibigkeit assoziiert wurden (Fleury et al., s. o.). Es wurde ebenfalls berichtet, dass UCP2 beim Erwachsenen in einer Reihe von Geweben, wie z. B. in Gehirn- und Muskel- und Fett-Zellen, exprimiert wird (Gimeno et al., s. o., sowie Fleury et al., s. o.).

[0006] Ein drittes menschliches UCP, UCP3, wurde vor kurzem von Boss et al., s. o.; Vidal-Puig et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 235, 79–82 (1997); Solanes et al., J. Biol. Chem. 272, 25433–25436 (1997); sowie Gong et al., J. Biol. Chem. 272, 24129–24132 (1997), beschrieben. (Siehe auch GB-Patent-Nr. 9716886). Solanes et al. berichten, dass UCP3 im Gegensatz zu UCP1 und UCP2 vorzugsweise in menschlichen Skelettmuskeln exprimiert wird und dass das UCP3-Gen an das menschliche Chromosom 11 neben dem UCP2-Gen kartiert (Solanes et al., s. o.). Gong et al. beschreiben, dass die UCP3-Expression durch bekannte thermogene Stimuli, wie z. B. Schilddrüsenhormon, β 3-adrenergische Agonisten und Leptin, reguliert werden kann (Gong et al., s. o.).

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Ein cDNA-Klon (DNA 77568-1626) wurde identifiziert, der gewisse Homologien mit manchen bekannten menschlichen Entkopplungsproteinen aufweist, wobei dieser für ein neues Polypeptid kodiert, das in der vorliegenden Anmeldung als "UCP4" bezeichnet wird.

[0008] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das DNA umfasst, die für ein UCP4-Polypeptid kodiert.

[0009] In einem Aspekt umfasst die isolierte Nucleinsäure (a) DNA, die für ein UCP4-Polypeptid kodiert und zumindest 80% Sequenzidentität, vorzugsweise zumindest 85% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumin-

dest 90% Sequenzidentität, insbesondere zumindest 95% Sequenzidentität, mit einem DNA-Molekül aufweist, das für ein UCP4-Polypeptid kodiert, das die Sequenz der Aminosäurereste 1 bis 323 (Grenzen eingeschlossen) von [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) umfasst, oder (b) das Komplement des DNA-Molekùls gemäß (a).

[0010] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekùl, das für ein UCP4-Polypeptid kodiert, umfassend DNA, die an das Komplement der Nucleinsäure zwischen den Nucleotiden 40 und 1011 (Grenzen eingeschlossen) aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt vorzugsweise unter stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen.

[0011] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekùl, umfassend (a) DNA, die für ein UCP4-Polypeptid kodiert und zumindest 80% Sequenzidentität, vorzugsweise zumindest 85% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 90% Sequenzidentität, insbesondere zumindest 95% Sequenzidentität, mit einem DNA-Molekùl aufweist, das für dasselbe reife Polypeptid kodiert, für das die cDNA der ATCC-Hinterlegungsnr. 203134 kodiert, oder (b) das Komplement des DNA-Molekùls gemäß (a). In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nucleinsäure DNA, die für dasselbe reife Polypeptid kodiert, für das die cDNA der ATCC-Hinterlegungsnr. 203134 kodiert.

[0012] In noch einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekùl, umfassend (a) DNA, die für ein UCP4-Polypeptid mit zumindest 80% Sequenzidentität, vorzugsweise zumindest 85% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 90% Sequenzidentität, insbesondere zumindest 95% Sequenzidentität, mit der Sequenz der Aminosäurereste 1 bis 323 (Grenzen eingeschlossen) aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) kodiert, oder (b) das Komplement der DNA gemäß (a).

[0013] Die Beschreibung offenbart auch ein isoliertes Nucleinsäuremolekùl, umfassend (a) DNA, die für ein Polypeptid kodiert, das bei Vergleich mit der Aminosäuresequenz der Reste 1 bis etwa 323 (Grenzen eingeschlossen) aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) zumindest etwa 80% Positive, vorzugsweise zumindest etwa 85% Positive, noch bevorzugter zumindest etwa 90% Positive, insbesondere zumindest etwa 95% Positive, erzielt, oder (b) das Komplement der DNA gemäß (a).

[0014] Die Beschreibung offenbart auch Fragmente der für UCP4 kodierenden Sequenz, die lang genug sind, um als Hybridisierungssonden verwendet zu werden. Solche Fragmente enthalten vorzugsweise zumindest etwa 20 bis etwa 80 aufeinander folgende Basen, die in der Sequenz aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) enthalten sind. Gegebenenfalls umfassen solche Fragmente den N-Terminus oder den C-Terminus der Sequenz aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2).

[0015] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung einen Vektor bereit, der DNA umfasst, die für UCP4 oder dessen Varianten kodiert. Der Vektor kann beliebige der hierin oben definierten isolierten Nucleinsäuremoleküle umfassen.

[0016] Eine Wirtszelle, die solch einen Vektor umfasst, wird ebenfalls bereitgestellt. Bei den Wirtszellen kann es sich beispielsweise um CHO-Zellen, E.-coli-Zellen oder Hefe-Zellen handeln. Weiters wird ein Verfahren zur Herstellung von UCP4-Polypeptiden bereitgestellt und umfasst das Züchten von Wirtszellen unter Bedingungen, die für die Expression von UCP4 geeignet sind, sowie das Gewinnen von UCP4 aus der Zellkultur.

[0017] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung ein isoliertes UCP4-Polypeptid bereit, für das eine beliebige der hierin oben definierten isolierten Nucleinsäuresequenzen kodiert.

[0018] In einem spezifischen Aspekt stellt die Erfindung ein isoliertes Nativsequenz-UCP4-Polypeptid bereit, das in einer Ausführungsform eine Aminosäuresequenz umfasst, welche die Reste 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) umfasst.

[0019] In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein isoliertes UCP4-Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz mit zumindest 80% Sequenzidentität, vorzugsweise zumindest 85% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 90% Sequenzidentität, insbesondere zumindest 95% Sequenzidentität, mit der Sequenz der Aminosäurereste 1 bis etwa 323 (Grenzen eingeschlossen) aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1).

[0020] Die Beschreibung offenbart auch ein isoliertes UCP4-Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die bei Vergleich mit der Aminosäuresequenz der Reste 1 bis etwa 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) zumindest etwa 80% Positive, vorzugsweise zumindest etwa 85% Positive, noch bevorzugter zumindest etwa 90% Positive, insbesondere zumindest etwa 95% Positive, erzielt.

[0021] Die Beschreibung offenbart auch ein isoliertes UCP4-Polypeptid, umfassend die Sequenz der Aminosäurereste 1 bis etwa 323 (Grenzen eingeschlossen) aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1), oder ein Fragment davon, das ausreicht, um z. B. eine Bindungsstelle für einen Anti-UCP4-Antikörper bereitzustellen. Das UCP4-Fragment behält vorzugsweise zumindest eine biologische Aktivität des nativen UCP4-Polypeptids bei.

[0022] In noch einem weiteren Aspekt, stellt die Erfindung ein UCP4-Polypeptid bereit, das durch (i) Hybridisierung eines Test-DNA-Moleküls unter stringenten Bedingungen mit (a) einem DNA-Molekül, das für ein UCP4-Polypeptid mit der Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 (Grenzen eingeschlossen) aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) kodiert, oder (b) dem Komplement des DNA-Moleküls gemäß (a) und, falls das Test-DNA-Molekül zumindest 80% Sequenzidentität, vorzugsweise zumindest 85% Sequenzidentität, noch bevorzugter zumindest 90% Sequenzidentität, insbesondere zumindest 95% Sequenzidentität, mit (a) oder (b) aufweist, (ii) Züchten einer Wirtszelle, die das Test-DNA-Molekül umfasst, unter Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids geeignet sind, sowie (iii) Gewinnen des Polypeptids aus der Zellkultur hergestellt wurde.

[0023] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung chimäre Moleküle bereit, die ein UCP4-Polypeptid umfassen, das an ein heterologes Polypeptid oder eine Aminosäuresequenz fusioniert ist. Ein Beispiel eines solchen chimären Moleküls umfasst ein UCP4-Polypeptid, das an eine Epitop-Markierungssequenz oder eine Fc-Region eines Immunglobulins fusioniert ist.

[0024] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung einen Antikörper bereit, der spezifisch an UCP4-Polypeptid bindet. Gegebenenfalls handelt es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen Antikörper.

[0025] Die Beschreibung offenbart Agonisten und Antagonisten eines nativen UCP4-Polypeptids. In einer bestimmten Ausführungsform handelt es sich bei dem Agonisten oder Antagonisten um einen Anti-UCP4-Antikörper.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifikation von Agonisten oder Antagonisten eines nativen UCP4-Polypeptids, umfassend das Kontaktieren des nativen UCP4-Polypeptids mit einem Kandidatenmolekül, sowie das Beobachten der gewünschten Aktivität. Die Beschreibung offenbart Therapie- und Diagnoseverfahren, die UCP4 verwenden.

[0027] Die Beschreibung offenbart ebenfalls eine Zusammensetzung, die ein UCP4-Polypeptid oder, wie hierin oben definiert, einen Agonisten oder Antagonisten in Kombination mit einem Träger umfasst.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0028] [Fig. 1](#) zeigt die von einem Nativsequenz-UCP4 abgeleitete Aminosäuresequenz.

[0029] [Fig. 2](#) zeigt die Nucleotidsequenz einer für Nativsequenz-UCP4 kodierenden cDNA.

[0030] [Fig. 3](#) zeigt einen Aminosäuresequenzabgleich von UCP4 mit anderen bekannten Entkopplungsproteinen, UCP1 (Seq.-ID Nr. 16), UCP2 (Seq.-ID Nr. 17) und UCP3 (Seq.-ID Nr. 18). Die sechs mutmaßlichen Transmembrandomänen werden gezeigt und sind unterstrichen (und jeweils mit I bis VI markiert). Die unter der Proteinsequenz angegebenen Sternchen (*) geben drei (3) mutmaßliche mitochondriale Trägerprotein-Motive an. Eine mutmaßliche Nucleotid-Bindungsdomäne ist doppelt unterstrichen.

[0031] Die [Fig. 4A–Fig. 4H](#) zeigen die Resultate einer Northern-Blot-Analyse. Menschliche erwachsene Gewebearten und Gehirngewebe (Clontech) wurden zusätzlich zu Peripherblut-Leukozyten (PBLs), Krebszellen und fötalen Gewebearten mit UCP4-cDNA sondiert. Die Figuren veranschaulichen, dass das UCP4-Transkript in menschlichen Gehirngeweben, im Rückenmark, in der Medulla, im Corpus callosum und in der Substantia nigra detektiert wurde.

[0032] Die [Fig. 5A–Fig. 5B](#) zeigen die Resultate von In-vitro-Tests, die durchgeführt wurden, um die Wirkungen von UCP4-Expression auf das mitochondriale Membranpotential zu bestimmen.

[0033] Die [Fig. 6A–Fig. 6F](#) zeigen die Resultate von In-vitro-Tests, die durchgeführt wurden, um die subzelluläre Position von UCP4 zu bestimmen.

[0034] [Fig. 7](#) zeigt eine "fromDNA"-Sequenz, die aus ausgewählten EST-Sequenzen zusammengesetzt wur-

de.

[0035] Die **Fig. 8A–8C** zeigen die Resultate von In-vitro-Tests, die durchgeführt wurden, um die Wirkung von Nahrungsaufnahme auf die Expression von UCP4-mRNA zu bestimmen.

[0036] Die **Fig. 9A–9D** zeigen die Resultate von In-vitro-Tests, die durchgeführt wurden, um die Wirkung von Fettkonsum auf die Expression von UCP4-mRNA zu bestimmen.

[0037] Die **Fig. 10A–10G** zeigen die Resultate von In-vitro-Tests, die durchgeführt wurden, um die Wirkung von Temperaturbelastung auf die Expression von UCP4-mRNA zu bestimmen.

Ausführliche Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

I. Definitionen

[0038] Die Ausdrücke "UCP4-Polypeptid", "UCP4-Protein" und "UCP4" umfassen bei Verwendung hierin Nativsequenz-UCP4 sowie UCP4-Varianten (die hierin näher definiert werden). Das UCP4 kann aus einer Reihe von Quellen isoliert werden, wie z. B. aus menschlichen Gewebearten oder aus einer anderen Quelle, oder es kann durch Rekombinations- und/oder Syntheseverfahren hergestellt werden.

[0039] Ein "Nativsequenz-UCP4" umfasst ein Polypeptid mit derselben Aminosäuresequenz wie ein UCP4, das aus der Natur stammt. Solch ein Nativsequenz-UCP4 kann aus der Natur isoliert werden, oder es kann durch Rekombinations- und/oder Syntheseverfahren hergestellt werden. Der Ausdruck "Nativsequenz-UCP4" umfasst spezifisch natürlich vorkommende, trunkierte oder lösliche Formen, Varianten natürlich vorkommender Formen (z. B. alternativ gespleißte Formen) und natürlich vorkommende Allel-Varianten des UCP4. In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Nativsequenz-UCP4 ein reifes Nativsequenz-UCP4 oder ein Nativsequenz-UCP4 voller Länge, umfassend die Aminosäuren 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1).

[0040] "UCP4-Variante" beschreibt alles andere als ein Nativsequenz-UCP4 und umfasst UCP4 mit zumindest etwa 80% Aminosäuresequenzidentität mit der die Reste 1 bis 323 der die in [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) dargestellte UCP4-Polypeptidsequenz umfassenden Aminosäuresequenz. Solche UCP4-Varianten umfassen z. B. UCP4-Polypeptide, worin ein oder mehrere Aminosäurereste am N- oder am C-Terminus sowie innerhalb einer oder mehrerer interner Domänen der Sequenz aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) hinzugefügt oder deletiert wurden. Normalerweise weist eine UCP4-Variante zumindest etwa 80% Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 85% Aminosäuresequenzidentität, noch bevorzugter zumindest etwa 90% Aminosäuresequenzidentität und insbesondere zumindest etwa 95% Sequenzidentität, mit der die Reste 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) umfassenden Aminosäuresequenz auf.

[0041] "Prozent (%) Aminosäuresequenzidentität" ist für die hierin identifizierten UCP4-Sequenzen als jener Prozentsatz von Aminosäureresten in einer Kandidatensequenz definiert, der mit den Aminosäureresten in der UCP4-Sequenz identisch ist, nachdem die Sequenzen angeordnet und falls erforderlich Lücken eingeführt wurden, um den maximalen Prozentsatz an Sequenzidentität zu erzielen, wobei etwaige konservative Substitutionen nicht als Teil der Sequenzidentität in Betracht gezogen werden. % Identität können mittels WU-BLAST-2, erhalten von Altschul et al., Methods in Enzymology 266, 460–480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>; bestimmt werden. WU-BLAST-2 verwendet mehrere Suchparameter, von denen die meisten auf die Standardwerte eingestellt sind. Die einstellbaren Parameter sind auf die folgenden Werte eingestellt: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11. Die HSP-S- und HSP-S2-Parameter sind dynamische Werte und werden vom Programm selbst in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der jeweiligen Sequenz und der Zusammensetzung der jeweiligen Datenbank bestimmt, die nach der Sequenz von Interesse durchsucht wird; die Werte können jedoch eingestellt werden, um die Empfindlichkeit zu erhöhen. Ein %-Wert an Aminosäuresequenzidentität wird anhand der Anzahl an übereinstimmenden identischen Resten, dividiert durch die Gesamtanzahl der Reste der "längeren" Sequenz in der angeordneten Region, bestimmt. Die "längere" Sequenz ist jene, welche die meisten tatsächlichen Reste in der angeordneten Region aufweist (Lücken, die durch WU-Blast-2 eingeführt wurden, um den Anordnungsscore zu maximieren, werden außer Acht gelassen).

[0042] Der Ausdruck "Positive" im Kontext des wie oben beschrieben durchgeföhrten Sequenzvergleichs umfasst Reste in den verglichenen Sequenzen, die nicht identisch sind, jedoch ähnliche Eigenschaften aufweisen (z. B. als ein Resultat konservativer Substitutionen). Der %-Wert an Positiven wird anhand des Anteils an Resten bestimmt, die einen positiven Wert in der BLOSUM-62-Matrix erzielen, dividiert durch die Gesamtanzahl

an Resten in der längeren Sequenz, wie sie oben definiert ist.

[0043] Auf ähnliche Art und Weise ist der "Prozentsatz (%) an Nucleinsäuresequenzidentität" als jener Prozentsatz an Nucleotiden in einer Kandidatensequenz definiert, die identisch mit den Nucleotiden in der für UCP4 kodierenden Sequenz sind. Die Identitätswerte können durch das BLASTN-Modul der WU-BLAST-2-Gruppe generiert werden, das auf Standardparameter eingestellt ist, wobei overlap span und overlap fraction auf 1 bzw. 0,125 eingestellt werden.

[0044] "Isoliert" bedeutet bei Verwendung zur Beschreibung der verschiedenen hierin offenbarten Polypeptide ein Polypeptid, das identifiziert und von einer Komponente seiner natürlichen Umgebung getrennt und/oder daraus gewonnen wurde. Kontaminierende Komponenten seiner natürlichen Umgebung sind Materialien, die typischerweise diagnostische oder therapeutische Verwendungszwecke des Polypeptids stören würden, und umfassen Enzyme, Hormone und andere proteinhaltige oder nicht proteinhaltige gelöste Stoffe. In bevorzugten Ausführungsformen ist das Polypeptid gereinigt, und zwar (1) in einem Ausmaß, das ausreicht, um bei Verwendung eines Spinning-Cup-Sequenators zumindest 15 Reste N-terminaler oder interner Aminosäuresequenz zu erhalten, oder (2) bis zur Homogenität mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen unter Verwendung von Coomassie-Blau- oder vorzugsweise Silberfärbung. Isoliertes Polypeptid umfasst Polypeptid *in situ* innerhalb rekombinanter Zellen, da zumindest eine Komponente der natürlichen UCP4-Umgebung nicht vorhanden ist. Normalerweise wird das isolierte Polypeptid jedoch mittels zumindest eines Reinigungsschritts hergestellt.

[0045] Ein "isoliertes" Nucleinsäuremolekül, das für ein UCP4-Polypeptid kodiert, ist ein Nucleinsäuremolekül, das identifiziert und von zumindest einem kontaminierenden Nucleinsäuremolekül getrennt wurde, mit dem es normalerweise in der natürlichen Quelle der für UCP4 kodierenden Nucleinsäure assoziiert ist. Ein isoliertes, für UCP4 kodierendes Nucleinsäuremolekül weist eine andere Form oder ein anderes Setting auf als jene(s), die/das in der Natur anzutreffen ist. Isolierte Nucleinsäuremoleküle unterscheiden sich daher von dem für UCP4 kodierenden Nucleinsäuremolekül, wie es in natürlichen Zellen vorkommt. Ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, das für ein UCP4-Polypeptid kodiert, umfasst jedoch für UCP4 kodierende Nucleinsäuremoleküle, die in Zellen enthalten sind, die normalerweise UCP4 exprimieren, wobei sich z. B. das Nucleinsäuremolekül in einer chromosomal Position befindet, die sich von jener natürlicher Zellen unterscheidet.

[0046] Der Ausdruck "Kontrollsequenzen" bezieht sich auf DNA-Sequenzen, die für die Expression einer operabel gebundenen kodierenden Sequenz in einem bestimmten Wirtsorganismus erforderlich sind. Die Kontrollsequenzen, die für Prokaryoten geeignet sind, umfassen z. B. einen Promotor, gegebenenfalls eine Operatorsequenz und eine Ribosomenbindungsstelle. Von eukaryotischen Zellen ist bekannt, dass sie Promotoren, Polyadenylierungssignale und Enhancer nutzen.

[0047] Eine Nucleinsäure ist "operabel gebunden", wenn sie in eine funktionellen Beziehung mit einer anderen Nucleinsäuresequenz gestellt wird. DNA für eine Präsequenz oder einen Sekretionsleader ist z. B. operabel an DNA für ein Polypeptid gebunden, wenn sie als Präprotein exprimiert wird, das an der Sekretion des Polypeptids beteiligt ist; ein Promotor oder ein Enhancer ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst; oder eine Ribosomenbindungsstelle ist operabel an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn sie so positioniert ist, dass die Translation erleichtert wird. Allgemein bedeutet "operabel gebunden", dass die DNA-Sequenzen, die gebunden werden, zusammenhängend sind und, im Fall eines Sekretionsleaders, zusammenhängend und in Lesephase. Enhancer müssen jedoch nicht zusammenhängend sein. Die Bindung wird durch Ligation an passenden Restriktionsstellen erzielt. Falls solche Stellen nicht existieren, so werden die synthetischen Oligonucleotidadaptoren oder Linker in Einklang mit Verfahren der herkömmlichen Praxis verwendet.

[0048] Der Ausdruck "Antikörper" wird im weitesten Sinn gebraucht und umfasst spezifisch einzelne monoklonale Anti-UCP4-Antikörper (umfassend Agonisten, Antagonisten und neutralisierende Antikörper) sowie Anti-UCP4-Antikörper-Zusammensetzungen mit polypeptidischem Spezifität. Der Ausdruck "monoklonaler Antikörper" bezieht sich bei Verwendung hierin auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten wurde, d. h. die einzelnen Antikörper, welche die Population umfassen, sind identisch – mit Ausnahme möglicher natürlich vorkommender Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können.

[0049] Die "Stringenz" der Hybridisierungsreaktionen ist vom Fachmann leicht zu bestimmen und ist allgemein eine empirische Berechnung, die von der Sondenlänge, der Waschtemperatur und der Salzkonzentration abhängig ist. Allgemein erfordern längere Sonden höhere Temperaturen für ein korrektes Annealing, während

kürzere Sonden niedrigere Temperaturen benötigen. Die Hybridisierung hängt allgemein von der Fähigkeit de-naturierter DNA zum erneuten Annealing ab, wenn komplementäre Stränge in einer Umgebung unter ihrer Schmelztemperatur vorhanden sind. Je höher das Ausmaß der gewünschten Homologie zwischen der Sonde und der hybridisierbaren Sequenz ist, desto höher ist die relative Temperatur, die verwendet werden kann. Als Resultat folgt, dass höhere relative Temperaturen dazu tendieren würden, die Reaktionsbedingungen stringenter zu gestalten, während dies bei niedrigeren Temperaturen weniger der Fall wäre. Für zusätzliche Details und eine Erklärung der Stringenz von Hybridisierungsreaktionen siehe Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995).

[0050] "Stringente Bedingungen" oder "Bedingungen hoher Stringent" können, wie hierin definiert, als jene identifiziert werden, die: (1) eine niedrige Ionenstärke und eine hohe Temperatur zum Waschen verwenden, z. B. 0,015 M Natriumchlorid/0,0015 M Natriumcitrat/0,1% Natriumdodecylsulfat bei 50°C; (2) während der Hybridisierung ein Denaturierungsmittel verwenden, wie z. B. Formamid, z. B. 50 Vol.-% Formamid mit 0,1% Rinderserumalbumin/0,1% Ficoll/0,1% Polyvinylpyrrolidon/50 mM Natriumphosphatpuffer mit einem pH von 6,5 mit 750 mM Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C; oder (3) 50% Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1% Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, beschallte Lachsspermien-DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS und 10% Dextransulfat bei 42°C verwenden, mit Waschschritten bei 42°C in 0,2 × SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50% Formamid bei 55°C, gefolgt von einem Waschschritt hoher Stringenz, bestehend aus 0,1 × SSC, enthaltend EDTA bei 55°C.

[0051] "Mäßig stringente Bedingungen" können, wie von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1989), beschrieben, identifiziert werden und umfassen die Verwendung von Waschlösung und Hybridisierungsbedingungen (z. B. Temperatur, Ionenstärke und % SDS), die weniger stringent sind als jene, die oben beschrieben wurden. Ein Beispiel fürmäßig stringente Bedingungen ist die Übernacht-Inkubation bei 37°C in einer Lösung, umfassend: 20% Formamid, 5 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat und 20 mg/ml denaturierte, gescherte Lachsspermien-DNA, gefolgt vom Waschen der Filter in 1 × SSC bei etwa 37–50°C. Der Fachmann erkennt, wie die Temperatur, die Ionenstärke etc. je nach Notwendigkeit einzustellen sind, um Faktoren wie z. B. die Sondenlänge und dergleichen zu berücksichtigen.

[0052] Der Ausdruck "epitopmarkiert" bezieht sich bei Verwendung hierin auf ein chimäres Polypeptid, umfassend ein UCP4-Polypeptid, das an ein "Markierungspolypeptid" fusioniert ist. Das Markierungspolypeptid besitzt genug Reste, um ein Epitop bereitzustellen, gegen das ein Antikörper hergestellt werden kann, ist jedoch kurz genug, um die Aktivität des Polypeptids, an das es fusioniert ist, nicht zu stören. Das Markierungspolypeptid ist vorzugsweise auch eher einzigartig, so dass der Antikörper im Wesentlichen keine Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen eingeht. Geeignete Markierungspolypeptide besitzen allgemein zumindest sechs Aminosäurereste und normalerweise zwischen etwa 8 und 50 Aminosäurereste (vorzugsweise zwischen etwa 10 und 20 Aminosäurereste).

[0053] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Ausdruck "Immunadhäsin" antikörperartige Moleküle, welche die Bindungsspezifität eines heterologen Proteins (eines "Adhäsins") mit den Effektorfunktionen konstanter Immunglobulindomänen kombinieren.

[0054] Strukturell gesehen umfassen die Immunoadhäsine eine Fusion einer Aminosäuresequenz mit der gewünschten Bindungsspezifität, wobei es sich um eine andere als die Antigenerkennungs- und -bindungsstelle eines Antikörpers handelt (d. h. die "heterolog" ist), mit einer konstanten Immunglobulin-Domänensequenz. Der Adhäsin-Teil eines Immunoadhäsinemoleküls ist typischerweise eine zusammenhängende Aminosäuresequenz, umfassend zumindest die Bindungsstelle eines Rezeptors oder eines Liganden. Die konstante Immunglobulin-Domänensequenz im Immunoadhäsin kann aus einem beliebigen Immunglobulin, wie z. B. IgG-1-, IgG-2-, IgG3- oder IgG4-Subtypen, IgA (umfassend IgA-1 und IgA-2), IgE, IgD oder IgM, erhalten werden.

[0055] "Aktiv" oder "Aktivität" bezieht sich für die Zwecke hierin auf eine oder mehrere Formen von UCP4, welche die biologischen und/oder immunologischen Aktivitäten von nativem oder natürlich vorkommendem UCP4 beibehalten. Eine bevorzugte Aktivität ist die Fähigkeit, das mitochondriale Membranpotential auf eine Art und Weise zu beeinflussen, die zu einer Hinaufregulierung oder einer Hinunterregulierung des Stoffumsatzes und/oder der Wärmeerzeugung führt. Eine solche Aktivität umfasst die Erzeugung eines Protonenaustritts in der mitochondrialen Membran, der zu einer Erhöhung des Stoffumsatzes führt. Die Aktivität kann *in vitro* oder *in vivo* gemessen oder quantifiziert werden.

[0056] Der Ausdruck "Antagonist" wird im weitesten Sinn verwendet und umfasst jedes Molekül, das eine bi-

ologische und/oder immunologische Aktivität eines hierin offenbarten UCP4-Polypeptids teilweise oder vollständig blockiert, inhibiert oder neutralisiert. Auf eine ähnliche Art und Weise wird der Ausdruck "Agonist" im weitesten Sinn verwendet und umfasst ein beliebiges Molekül, das eine biologische und/oder immunologische Aktivität eines nativen, hierin offenbarten UCP4-Polypeptids imitiert. Geeignete Agonisten- oder Antagonistenmoleküle umfassen spezifisch Agonisten- oder Antagonisten-Antikörper oder -Antikörper-Fragmente, Immunoadhäsine von UCP4-Polypeptiden oder Fragmente oder Aminosäuresequenzvarianten nativer UCP4-Polypeptide.

[0057] "Behandlung" bezieht sich sowohl auf therapeutische Behandlung als auch auf prophylaktische oder präventive Maßnahmen, wobei es das Ziel ist, das pathologische Leiden oder die Erkrankung, auf das/die abgezielt wird, zu verhindern oder zu verlangsamen (abzuschwächen). Jene, die einer Behandlung bedürfen, umfassen Individuen, bei denen die Erkrankung bereits vorliegt, sowie Individuen, die zum Ausbruch der Erkrankung neigen, oder auch jene, bei denen die Erkrankung verhindert werden soll.

[0058] Eine "chronische" Verabreichung bezieht sich auf eine Verabreichung des/der Mittel(s) auf kontinuierliche Art und Weise im Gegensatz zu einer akuten Art und Weise, um die anfängliche therapeutische Wirkung (Aktivität) für eine ausgedehnte Zeitspanne beizubehalten. Eine "intermittierende" Verabreichung ist eine Behandlung, die nicht fortlaufend ohne Unterbrechung durchgeführt wird, sondern vielmehr zyklischer Natur ist.

[0059] "Säugetier" bezieht sich für die Zwecke der Behandlung auf ein beliebiges Tier, das als Säugetier klassifiziert wird, umfassend Menschen, domestizierte Tiere und landwirtschaftliche Nutztiere, sowie Zoo-, Sport- oder Haustiere, wie z. B. Hunde, Katzen, Kühe, Pferde, Schafe, Schweine etc. Bei dem Säugetier handelt es sich vorzugsweise um einen Menschen.

[0060] Eine Verabreichung "in Kombination mit" einem oder mehreren therapeutischen Mitteln umfasst die simultane (gleichzeitige) und die aufeinanderfolgende Verabreichung in beliebiger Reihenfolge.

II. Zusammensetzungen und Verfahren

A. UCP4 voller Länge

[0061] Die vorliegende Erfindung umfasst neu identifizierte und isolierte Nucleotidsequenzen, die für Polypeptide kodieren, die in der vorliegenden Anmeldung als UCP4 bezeichnet werden. Insbesondere wurde cDNA identifiziert und isoliert, die für ein UCP4-Polypeptid kodiert, wie ausführlicher in den unten stehenden Beispielen offenbart wird. Aus Gründen der Einfachheit wird das Protein, für das DNA 77568-1626 kodiert, sowie alle weiteren nativen Homologe und Varianten, die in der obigen Definition von UCP4 inkludiert sind, in der vorliegenden Beschreibung als "UCP4" bezeichnet, unabhängig von Ursprung oder Herstellungsart.

[0062] Wie in den unten stehenden Beispielen offenbart, wurde eine Klon-DNA 77568-1626 bei der ATCC hinterlegt. Die tatsächliche Nucleotidsequenz des Klons kann vom Fachmann durch Sequenzierung des hinterlegten Klons unter Verwendung von Routineverfahren nach dem Stand der Technik leicht bestimmt werden. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz kann unter Verwendung von Routineverfahren aus der Nucleotidsequenz bestimmt werden. Für das hierin beschriebene UCP4 haben die Anmelder etwas identifiziert, von dem angenommen wird, dass es sich dabei um den Leseraster handelt, der mit der zum Zeitpunkt der Einreichung erhältlichen Sequenzinformation am besten identifizierbar war.

[0063] Unter Verwendung des Megalign-DNASTAR-Computerprogramms (sowie von Algorithmen und Parametern in dieser Software, eingestellt vom Hersteller) (Oxford Molecular Group, Inc.), wurde herausgefunden, dass ein Nativsequenz-UCP4 voller Länge (dargestellt in [Fig. 1](#) und Seq.-ID Nr. 1) eine Aminosäuresequenzidentität von etwa 34% mit UCP3 aufweist, eine Aminosäuresequenzidentität von etwa 33% mit UCP2 aufweist und eine Aminosäuresequenzidentität von etwa 29% mit UCP1 aufweist. Dementsprechend wird momentan angenommen, dass das in der vorliegenden Anmeldung offenbare UCP4 ein neu identifiziertes Mitglied der Familie der menschlichen Entkopplungsproteine ist und eine oder mehrere Aktivitäten und/oder Eigenschaften aufweisen kann, die für diese Proteinfamilie typisch sind, wie z. B. die Fähigkeit, den Stoffumsatz durch Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials zu verstärken oder zu unterdrücken.

B. UCP4-Varianten

[0064] Zusätzlich zu den Nativsequenz-UCP4-Polypeptiden voller Länge, die hierin beschrieben werden, wird die Möglichkeit der Herstellung von UCP4-Varianten in Betracht gezogen. UCP4-Varianten können durch Ein-

führung geeigneter Nucleotidänderungen in die UCP4-DNA und/oder durch Synthese des gewünschten UCP4-Polypeptids hergestellt werden. Der Fachmann weiß zu schätzen, dass Aminosäureänderungen post-transkriptionale Prozesse des UCP4 verändern können, wie z. B. die Änderung der Anzahl oder der Position von Glykosylierungsstellen oder die Änderung der Membranverankerungsmerkmale.

[0065] Variationen im Nativsequenz-UCP4 voller Länge oder in verschiedenen Domänen des hierin beschriebenen UCP4 können z. B. unter Verwendung beliebiger der Verfahren und Richtlinien für konservative und nichtkonservative Mutationen erfolgen, die z. B. im US-Patent Nr. 5.364.934 dargelegt sind. Variationen können eine Substitution, Deletion oder Insertion eines oder mehrerer Codons sein, die für das UCP4 kodieren, was zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des UCP4 im Vergleich zum Nativsequenz-UCP4 führt. Gegebenenfalls erfolgt die Variation durch eine Substitution zumindest einer Aminosäure durch eine beliebige andere Aminosäure in einer oder mehreren der Domänen des UCP4. Richtlinien zur Bestimmung jenes Aminosäurerests, der insertiert, substituiert oder deletiert werden kann, ohne die gewünschte Aktivität nachteilig zu beeinträchtigen, können durch Vergleichen der Sequenz des UCP4 mit jener homologer bekannter Proteinmoleküle erhalten werden, sowie durch Minimieren der Anzahl der Aminosäuresequenzänderungen, die in Regionen hoher Homologie erfolgen. Aminosäuresubstitutionen können das Resultat des Ersetzens einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen strukturellen und/oder chemischen Eigenschaften sein, wie z. B. das Ersetzen eines Leucins durch ein Serin, d. h. konservative Aminosäure-Ersetzungen. Insertionen oder Deletionen können gegebenenfalls im Bereich von 1 bis 5 Aminosäuren erfolgen. Die erlaubte Variation kann durch systematische Durchführung von Insertionen, Deletionen oder Substitutionen von Aminosäuren in der Sequenz bestimmt werden, sowie, falls gewünscht, durch Testen der resultierenden Varianten auf ihre Aktivität in Tests, die nach dem Stand der Technik bekannt sind oder hierin beschrieben werden.

[0066] Die Beschreibung offenbart UCP4-Varianten, bei denen es sich um Fragmente des UCP4 voller Länge handelt. Solche Fragmente behalten vorzugsweise eine gewünschte Aktivität oder Eigenschaften des UCP4 voller Länge bei.

[0067] Die Variationen können unter Anwendung von nach dem Stand der Technik bekannten Verfahren erfolgen, wie z. B. durch oligonucleotidvermittelte (ortsspezifische) Mutagenese, Alanin-Scanning sowie durch PCR-Mutagenese. Ortsspezifische Mutagenese (Carter et al., Nucl. Acids Res. 13, 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res. 10, 6487 (1987)), Kassettenmutagenese (Wells et al., Gene 34, 315 (1985)), Restriktionsselektionsmutagenese (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317, 415 (1986)) oder andere bekannte Verfahren können mit der klonierten DNA durchgeführt werden, um die UCP4-Varianten-DNA herzustellen.

[0068] Scanning-Aminosäuren-Analyse kann auch verwendet werden, um eine oder mehrere Aminosäuren in einer zusammenhängenden Sequenz zu identifizieren. Unter den bevorzugten Scanning-Aminosäuren finden sich relativ kleine, neutrale Aminosäuren. Solche Aminosäuren umfassen Alanin, Glycerin, Serin und Cystein. Alanin ist typischerweise eine bevorzugte Scanning-Aminosäure in dieser Gruppe, da es die Seitenkette über den β -Kohlenstoff hinaus eliminiert und die Wahrscheinlichkeit einer Änderung der Hauptketten-Konformation der Variante geringer ist (Cunningham und Wells, Science 244, 1081–1085 (1989)). Alanin wird ebenfalls typischerweise bevorzugt, da es die häufigste Aminosäure ist. Weiters ist es häufig sowohl in unzugänglichen als auch in exponierten Positionen zu finden (Creighton, The Proteins, W. H. Freeman & Co., N. Y.; Chothia, J. Mol. Biol. 150, 1 (1976)). Falls Alaninsubstitution keine angemessenen Mengen der Variante ergibt, so kann eine isotere Aminosäure verwendet werden.

C. Modifikationen von UCP4

[0069] Kovalente Modifikationen von UCP4 liegen auch im Umfang dieser Erfindung. Eine Art kovalenter Modifikation umfasst das Umsetzen von Aminosäureresten eines UCP4-Polypeptids, auf die abgezielt wird, mit einem organischen Derivatisierungsmittel, das in der Lage ist, mit ausgewählten Seitenketten oder den N- oder C-terminalen Resten des UCP4 zu reagieren. Die Derivatisierung mit bifunktionellen Mitteln ist von Nutzen, z. B. zur Vernetzung von UCP4 an eine wasserunlösliche Trägermatrix oder Oberfläche zur Verwendung in einem Verfahren zur Reinigung von Anti-UCP4-Antikörpern, oder umgekehrt. Häufig verwendete Vernetzungsmittel umfassen z. B. 1,1-Bis(diazoacetyl)-2-phenylethan, Glutaraldehyd, N-Hydroxysuccinimidester, z. B. Ester mit 4-Azidosalicylsäure, homobifunktionelle Imidoester, unter anderem Disuccinimidylester, wie z. B. 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat), bifunktionelle Maleimide, wie z. B. Bis-N-maleimido-1,8-octan, sowie Mittel wie z. B. Methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat.

[0070] Andere Modifikationen umfassen die Desamidierung von Glutamyl- und Asparaginyl-Resten zu den entsprechenden Glutamyl- bzw. Aspartyl-Resten, die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die Phosphorylie-

rung von Hydroxylgruppen von Seryl- oder Threonyl-Resten, die Methylierung der α -Amino-Gruppen von Lysin-, Arginin- und Histidin-Seitenketten (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., 79–86, San Francisco, (1983)), die Acetylierung des N-terminalen Amins und die Amidierung etwaiger C-terminaler Carboxylgruppen.

[0071] Eine andere Art der kovalenten Modifikation des UCP4-Polypeptids, die im Umfang dieser Erfindung liegt, umfasst das Ändern des nativen Glykosylierungsmusters des Polypeptids. Das "Ändern des nativen Glykosylierungsmusters" beschreibt für die Zwecke hierin das Deleteieren einer oder mehrerer Kohlenhydratgruppierungen, die in Nativsequenz-UCP4 zu finden sind (entweder durch Entfernen der darunter liegenden Glykosylierungsstelle oder durch Deleteieren der Glykosylierung durch chemische und/oder enzymatische Mittel), und/oder durch Hinzufügen einer oder mehrerer Glykosylierungsstellen, die im Nativsequenz-UCP4 nicht vorhanden sind. Zusätzlich dazu umfasst der Ausdruck qualitative Änderungen in der Glykosylierung der nativen Proteine, einschließlich Änderungen der Art und der Anteile der verschiedenen vorhandenen Kohlenhydrat-Gruppierungen.

[0072] Die Hinzufügung von Glykosylierungsstellen zum UCP4-Polypeptid kann durch Änderung der Aminosäuresequenz erzielt werden. Die Änderung kann z. B. durch Addition eines oder mehrerer oder Substitution mit einem oder mehreren Serin- oder Threonin-Reste(n) im Nativsequenz-UCP4 erfolgen (für O-gebundene Glykosylierungsstellen). Die UCP4-Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls durch Änderungen auf der DNA-Ebene geändert werden, insbesondere durch Mutieren der DNA, die für das UCP4-Polypeptid kodiert, an vorselektierten Basen, so dass Codons erzeugt werden, die in die gewünschten Aminosäuren translatiert werden.

[0073] Ein anderer Weg zu Erhöhung der Anzahl der Kohlenhydrat-Gruppierungen auf dem UCP4-Polypeptid ist durch chemische oder enzymatische Kopplung von Glykosiden an das Polypeptid. Solche Verfahren werden im Stand der Technik beschrieben, z. B. in WO 87/05330, veröffentlicht am 11. September 1987, sowie von Aplin und Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem. 259–306 (1981).

[0074] Die Entfernung von auf dem UCP4-Polypeptid vorhandenen Kohlenhydratgruppierungen kann chemisch oder enzymatisch erreicht werden oder durch Mutationssubstitution von Codons, die für Aminosäurereste kodieren, die als Glykosylierungsziele dienen. Chemische Deglykosylierungsverfahren sind nach dem Stand der Technik bekannt und werden z. B. von Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys. 259, 52 (1987), sowie von Edge et al. Anal. Biochem. 118, 131 (1981), beschrieben. Die enzymatische Abspaltung von Kohlenhydratgruppierungen auf Polypeptiden kann unter Verwendung einer Reihe von Endo- und Exoglykosidasen erreicht werden, wie von Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138, 350 (1987), beschrieben wird.

[0075] Eine andere Art der kovalenten Modifikation von UCP4 umfasst die Bindung des UCP4-Polypeptids an eines einer Reihe nichtproteinhaltiger Polymere, z. B. Polyethylenglykol (PEG), Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylene, und zwar auf die in den US-Patenten Nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 oder 4.179.337 dargelegte Art und Weise.

[0076] Das UCP4 der vorliegenden Erfindung kann auch auf eine Art und Weise modifiziert werden, dass es ein chimäres Molekül bildet, das UCP4 umfasst, das an eine andere heterologe Polypeptid- oder Aminosäuresequenz fusioniert ist.

[0077] In einer Ausführungsform umfasst solch ein chimäres Molekül eine Fusion des UCP4 mit einem Markierungspolypeptid, das ein Epitop bereitstellt, an das ein Anti-Markierungs-Antikörper selektiv binden kann. Die Epitopmarkierung liegt allgemein am Amino- oder Carboxyl-Terminus des UCP4. Die Gegenwart solcher epitopmarkierter Formen des UCP4 kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen das Markierungspolypeptid detektiert werden. Die Bereitstellung der Epitopmarkierung ermöglicht auch eine leichte Reinigung des UCP4 mittels Affinitätsreinigung unter Verwendung eines Anti-Markierungs-Antikörpers oder einer anderen Art von Affinitätsmatrix, die an die Epitopmarkierung bindet. Es sind verschiedene Markierungspolypeptide und ihre jeweiligen Antikörper nach dem Stand der Technik bekannt. Beispiele umfassen Poly-Histidin-(Poly-His-) oder Poly-Histidin-Glycin-(Poly-His-Gly-)Markierungen; das Grippe-HA-Markierungspolypeptid und seinen Antikörper 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8, 2159–2165 (1988)); die c-myc-Markierung und die 8F9-, 3C7-, 6E10-, G4-, B7- und 9E10-Antikörper dagegen (Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5, 3610–3616 (1985)); sowie die Herpes-simplex-Virus-Glycoprotein-D-(gD-)Markierung und ihren Antikörper (Paborsky et al., Protein Engineering 3 (6), 547–553 (1990)). Andere Markierungspolypeptide umfassen das Flag-Peptid (Hopp et al., Bio-Technology 6, 1204–1210 (1988)); das KT3-Epitop-Peptid (Martin et al., Science 255, 192–194 (1992)); ein α -Tubulin-Epitop-Peptid (Skinner et al., J. Biol. Chem. 266, 15163–15166 (1991)); sowie

die T7-Gen-10-Protein-Peptid-Markierung (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6393–6397 (1990)).

[0078] In einer alternativen Ausführungsform kann das chimäre Molekül eine Fusion des UCP4 mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins umfassen. Bei einer zweiwertigen Form des chimären Moleküls (auch als "Immunadhäsin" bezeichnet) könnte solch eine Fusion an die Fc-Region eines IgG-Moleküls erfolgen. Die Ig-Fusionen umfassen vorzugsweise die Substitution einer löslichen Form (mit deletierter oder deaktivierter Transmembrandomäne) eines UCP4-Polypeptids anstelle zumindest einer variablen Region innerhalb eines Ig-Moleküls. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Immunglobulin-Fusion die Gelenks-, CH2- und CH3- oder die Gelenks-, CH1-, CH2- und CH3-Regionen eines IgG1-Moleküls. Zur Produktion von Immunglobulin-Fusionen siehe auch US-Patent Nr. 5.428.130, ausgestellt am 27. Juni 1995.

[0079] Das UCP4 der Erfindung kann auch auf eine Art und Weise modifiziert werden, dass ein chimäres Molekül gebildet wird, das UCP4 umfasst, das an einen Leucin-Zipper fusioniert ist. Es wurden verschiedene Leucin-Zipper-Polypeptide im Stand der Technik beschrieben. Siehe z. B. Landschulz et al., Science 240, 1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe et al., FEBS Letters 344, 1991 (1991); Maniatis et al., Nature 341, 24 (1989)). Der Fachmann weiß, dass der Leucin-Zipper entweder am 5'- oder am 3'-Ende des UCP4-Moleküls fusioniert sein kann.

D. Herstellung von UCP4

[0080] Die unten stehende Beschreibung betrifft hauptsächlich die Produktion von UCP4 durch Züchten von Zellen, die mit einem Vektor transformiert oder transfiziert wurden, der UCP4-Nukleinsäure enthält. Es wird natürlich in Betracht gezogen, dass Alternativverfahren, die nach dem Stand der Technik wohlbekannt sind, zur Herstellung von UCP4 verwendet werden können. Beispielsweise kann/können die UCP4-Sequenz oder Abschnitte davon durch direkte Peptidsynthese unter Anwendung von Festphasen-Verfahren hergestellt werden (siehe z. B. Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149–2154 (1963)). Die In-vitro-Protein-Synthese kann unter Anwendung händischer Verfahren oder durch Automatisierung durchgeführt werden. Die automatisierte Synthese kann z. B. unter Verwendung eines Applied-Biosystems-Peptid-Synthesegeräts (Foster City, CA) unter Anwendung der Angaben des Herstellers verwendet werden. Verschiedene Abschnitte des UCP4 können getrennt chemisch synthetisiert werden und unter Verwendung chemischer oder enzymatischer Verfahren kombiniert werden, um das UCP4 voller Länge zu produzieren.

1. Isolierung von DNA, die für UCP4 kodiert

[0081] DNA, die für UCP4 kodiert, kann aus einer cDNA-Bibliothek erhalten werden, die aus Gewebe hergestellt wurde, von dem angenommen wird, dass es UCP4-mRNA umfasst und diese in einem detektierbaren Ausmaß exprimiert. Dementsprechend kann menschliche UCP4-DNA passenderweise aus einer cDNA-Bibliothek erhalten werden, die aus menschlichem Gewebe hergestellt wurde, wie z. B. in den Beispielen beschrieben wird. Das für UCP4 kodierende Gen kann auch aus einer genomischen Bibliothek oder mittels Oligonukleotidsynthese erhalten werden.

[0082] Bibliotheken können mit Sonden gescreent werden (wie z. B. Antikörper für das UCP4 oder Oligonukleotide mit zumindest etwa 20–80 Basen), die erzeugt wurden, um das Gen von Interesse oder das dadurch kodierte Protein zu identifizieren. Das Screening der cDNA- oder genomischen Bibliothek mit der ausgewählten Sonde kann unter Anwendung von Standard-Verfahren, wie z. B. von Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), beschrieben, durchgeführt werden. Ein Alternativverfahren zur Isolierung des Gens, das für UCP4 kodiert, ist die Anwendung des PCR-Verfahrens (Sambrook et al., s. o.; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1995)).

[0083] Die unten stehenden Beispiele umfassen Verfahren zum Screening einer cDNA-Bibliothek. Die als Sonden ausgewählten Oligonukleotidsequenzen sollten ausreichend lang und ausreichend unzweideutig sein, so dass falsche Positive minimiert werden. Das Oligonukleotid wird vorzugsweise so markiert, dass es nach der Hybridisierung an DNA in der Bibliothek, die gescreent wird, detektiert werden kann. Verfahren zum Markieren sind nach dem Stand der Technik wohlbekannt und umfassen die Verwendung von Radiomarkierungen, wie z. B. ^{32}P -markiertem ATP, Biotinylierung oder Enzymmarkierung. Hybridisierungsbedingungen, unter anderem mäßiger und hoher Stringenz, werden in Sambrook et al., s. o., bereitgestellt und oben in Abschnitt I

beschrieben.

[0084] Sequenzen, die in solchen Bibliotheksscreeningverfahren identifiziert werden, können mit anderen bekannten Sequenzen, die in öffentlichen Datenbanken, wie z. B. GenBank oder anderen privaten Sequenzdatenbanken, hinterlegt und erhältlich sind, verglichen und abgeglichen werden. Die Sequenzidentität (entweder auf Aminosäure- oder Nucleotid-Ebene) innerhalb definierter Regionen des Moleküls oder über die Sequenz voller Länge kann durch Sequenzabgleich unter Verwendung öffentlich erhältlicher Computer-Software-Programme (auf Standardparameter eingestellt), wie z. B. BLAST, BLAST2, ALIGN, DNAsstar und INHERIT, bestimmt werden, um Identität oder Positive für den Sequenzvergleich zu messen.

[0085] Eine Nucleinsäure mit einer für ein Protein kodierenden Sequenz kann durch Screening ausgewählter cDNA- oder genomicscher Bibliotheken unter Verwendung der hierin offenbarten abgeleiteten Aminosäuresequenz und, falls notwendig, unter Anwendung herkömmlicher Primerextensions-Verfahren, wie z. B. in Sambrook et al., s. o., beschrieben, erhalten werden, um Vorläufer zu detektieren, und Prozessierung von mRNA-Zwischenprodukten, die eventuell nicht zu cDNA revers transkribiert wurden.

2. Selektion und Transformation von Wirtszellen

[0086] Wirtszellen werden mit Expressions- oder Klonierungsvektoren, die hierin beschrieben werden, zur UCP4-Produktion transfiziert oder transformiert und in herkömmlichem Nährstoffmedium gezüchtet, das je nach Eignung zur Induktion von Promotoren, zur Selektion von Transformanten oder zur Amplifikation der Gene, die für die gewünschten Sequenzen kodieren, modifiziert wurde. Die Kulturbedingungen, wie z. B. Medium, Temperatur, pH und dergleichen, können vom Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden. Allgemein sind die Prinzipien, Arbeitsvorschriften und praktischen Verfahren zur Maximierung der Produktivität von Zellkulturen in Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler (Hrsg.), IRL Press (1991), sowie in Sambrook et al., s. o., zu finden.

[0087] Verfahren der Transfektion sind dem Fachmann bekannt, z. B. CaPO₄ und Elektroporation. In Abhängigkeit von der verwendeten Wirtszelle wird die Transformation unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt, die für solche Zellen geeignet sind. Calciumbehandlung unter Verwendung von Calciumchlorid, wie von Sambrook et al., s. o., beschrieben, oder Elektroporation wird allgemein für Prokaryoten oder andere Zellen verwendet, die nennenswerte Zellwand-Barrieren enthalten. Infektion mit Agrobacterium tumefaciens wird für die Transformation gewisser Pflanzenzellen verwendet, wie von Shaw et al., Gene 23, 315 (1983), sowie in WO 89/05859, veröffentlicht am 29. Juni 1989, beschrieben wurde. Bei Säugetierzellen ohne solche Zellwände kann das Calciumphosphatpräzipitationsverfahren von Graham und van der Eb, Virology 52, 456–457 (1978), verwendet werden. Allgemeine Aspekte von Säugetierzellen-Wirtssystem-Transformationen wurden im US-Patent Nr. 4.399.216 beschrieben. Transformationen in Hefe werden typischerweise nach dem Verfahren von Van Soolingen et al., J. Bact. 130, 946 (1977), sowie von Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 3829 (1979), durchgeführt. Es können jedoch auch andere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen verwendet werden, wie z. B. durch Kermikroinjektion, Elektroporation, bakterielle Protoplastenfusion mit intakten Zellen oder durch Polykationen, z. B. Polybren, Polyornithin. Bezuglich verschiedener Verfahren zur Transformation von Säugetierzellen siehe Keown et al., Methods in Enzymology 185, 527–537 (1990) und Mansour et al., Nature 336, 348–352 (1988).

[0088] Geeignete Wirtszellen zum Klonieren oder zum Exprimieren der DNA in den Vektoren umfassen hierin Prokaryotenzellen, Hefezellen oder Zellen höherer Eukaryoten. Geeignete Prokaryoten umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Eubakterien, wie z. B. gramnegative oder grampositive Organismen, z. B. Enterobacteriaceae, wie z. B. E. coli. Verschiedene E.-coli-Stämme sind öffentlich erhältlich, wie z. B. der E.-coli-K12-Stamm MM294 (ATCC 31.446); E.-coli X1776 (ATCC 31.537); E.-coli-Stamm W3110 (ATCC 27.325) und K5772 (ATCC 53.635).

[0089] Zusätzlich zu Prokaryoten sind eukaryotische Mikroben, wie z. B. Fadenpilze oder Hefe, geeignete Klonierungs- oder Expressionswirte für Vektoren, die für UCP4 kodieren. *Saccharomyces cerevisiae* ist ein häufig verwendet, niederer eukaryotischer Wirts-Mikroorganismus.

[0090] Geeignete Wirtszellen zur Expression von glykosyliertem UCP4 stammen von mehrzelligen Organismen. Beispiele für Zellen wirbelloser Organismen umfassen Insektenzellen, wie z. B. *Drosophila* S2 und *Sophoptera* Sf9, sowie Pflanzenzellen. Beispiele für nützliche Säugetier-Wirtszelllinien umfassen Chinahamster-Eierstock(CHO)-Zellen und COS-Zellen. Spezifischere Beispiele umfassen die Affen-Nieren-CV1-Linie, transformiert mit SV40 (COS-7, ATCC CRL1651); die menschliche Embryo-Nierenlinie (293-Zellen oder

293-Zellen, die zur Vermehrung in Suspensionskultur subkloniert wurden, Graham et al., J. Gen Virol. 36, 59 (1977); Chinahamster-Eierstockzellen/-DHFR (CHO, Urlaub und Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980)); Maus-Sertoli-Zellen (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23, 243–251 (1980)); menschliche Lungenzellen (W138, ATCC CCL75); menschliche Leberzellen (Hep G2, HB 8065); sowie den Maus-Mammatumor (MMT 060562, ATCC CCL51). Die Auswahl der geeigneten Wirtszelle wird als Stand der Technik angesehen.

3. Selektion und Verwendung eines replizierbaren Vektors

[0091] Die Nucleinsäure (z. B. cDNA oder genomische DNA), die für UCP4 kodiert, kann in einen replizierbaren Vektor zum Klonieren (Amplifikation der DNA) oder zur Expression insertiert werden. Es sind verschiedene Vektoren öffentlich erhältlich. Der Vektor kann z. B. die Form eines Plasmids, eines Cosmids, eines viralen Partikels oder eines Phagen annehmen. Die geeignete Nucleinsäuresequenz kann durch eine Reihe von Verfahren in den Vektor insertiert werden. Allgemein wird DNA unter Verwendung von Verfahren, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, in eine oder mehrere geeignete Restriktionsendonuclease-Stellen insertiert. Vektorkomponenten umfassen allgemein, sind jedoch nicht beschränkt auf eine oder mehrere von Signalsequenz, Replikationsstartpunkt, einem oder mehreren Markergenen, Enhancer-Element, Promotor und Transkriptionsterminationssequenz. Die Konstruktion geeigneter Vektoren, die eine oder mehrere dieser Komponenten enthalten, erfolgt unter Anwendung von Standard-Ligationsverfahren, die dem Fachmann bekannt sind.

[0092] Das UCP4 kann nicht nur direkt rekombinant produziert werden, sondern auch als Fusionspolypeptid mit einem heterologen Polypeptid, das eine Signalsequenz oder ein anderes Polypeptid mit einer spezifischen Spaltstelle am N-Terminus des reifen Proteins oder Polypeptids sein kann. Allgemein kann die Signalsequenz eine Komponente des Vektors sein, oder sie kann ein Teil der für das UCP4 kodierenden DNA sein, die in den Vektor insertiert wird. Die Signalsequenz kann eine prokaryotische Signalsequenz sein, die z. B. aus der aus alkalischer Phosphatase, Penicillinase, Ipp oder wärmestabilen Enterotoxin-II-Leadern bestehenden Gruppe ausgewählt wird. Für die Hefesekretion kann die Signalsequenz z. B. der Hefe-Invertase-Leader, der α -Faktor-Leader (umfassend Saccharomyces- und Kluyveromyces- α -Faktor-Leader, wobei Letzterer im US-Patent Nr. 5.010.182 beschrieben wird), oder der saure-Phosphatase-Leader, der C.-albicans-Glucoamylase-Leader (EP 362.179, veröffentlicht am 4. April 1990) oder das in WO 90/13646, veröffentlicht am 15. November 1990, beschriebene Signal sein. Bei der Säugetierzellen-Expression können Säugetiersignal-Sequenzen verwendet werden, um die Sekretion des Proteins zu steuern, wie z. B. Signalsequenzen aus sekretierten Polypeptiden derselben oder verwandter Spezies, sowie virale Sekretionsleader.

[0093] Sowohl Expressions- als auch Klonierungsvektoren enthalten eine Nucleinsäuresequenz, die es dem Vektor ermöglicht, sich in einer oder mehreren ausgewählten Wirtszellen zu replizieren. Solche Sequenzen sind für eine Reihe von Bakterien, Hefe-Arten und Viren bekannt. Der Replikationsstartpunkt aus dem Plasmid pBR322 ist für die meisten gramnegativen Bakterien geeignet, der 2 μ m-Plasmid-Ursprung ist für Hefe geeignet, und verschiedene virale Ursprünge (SV40, Polyoma, Adenovirus, VSV oder BPV) sind für Klonierungsvektoren in Säugetierzellen geeignet.

[0094] Expressions- und Klonierungsvektoren enthalten typischerweise ein Selektionsgen, auch selektierbarer Marker genannt. Typische Selektionsgene kodieren für Proteine, die (a) Resistenz gegenüber Antibiotika oder anderen Toxinen verleihen, z. B. Ampicillin, Neomycin, Methotrexat oder Tetrazyklin, (b) auxotrophe Defizienzen komplementieren oder (c) essentielle Nährstoffe bereitstellen, die aus komplexen Medien nicht erhältlich sind, z. B. das Gen, das für D-Alanin-Racemase kodiert, für Bacilli.

[0095] Ein Beispiel geeigneter selektierbarer Marker für Säugetierzellen sind jene, welche die Identifikation von Zellen ermöglichen, die in der Lage sind, die für UCP4 kodierende Nucleinsäure aufzunehmen, wie z. B. DHFR oder Thymidinkinase. Eine geeignete Wirtszelle bei Verwendung von Wildtyp-DHFR ist die CHO-Zelllinie, die bezüglich DHFR-Aktivität defizient ist, hergestellt und vermehrt, wie von Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980), beschrieben. Ein geeignetes Selektionsgen zur Verwendung in Hefe ist das trp1-Gen, das im Hefe-Plasmid YRp7 vorhanden ist (Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschemper et al., Gene 10, 157 (1980)). Das trp1-Gen stellt einen Selektionsmarker für einen mutierten Hefestamm bereit, dem die Fähigkeit fehlt, sich in Tryptophan zu vermehren, z. B. ATCC-Nr. 44076 oder PEP4-1 (Jones, Genetics 85, 12 (1977)).

[0096] Expressions- und Klonierungsvektoren umfassen normalerweise einen Promotor, der operabel an die für UCP4 kodierende Nucleinsäuresequenz gebunden ist, um die mRNA-Synthese zu steuern. Promotoren, die von einer Reihe potentieller Wirtszellen erkannt werden, sind wohlbekannt. Promotoren, die zur Verwendung mit prokaryotischen Wirten geeignet sind, umfassen die β -Lactamase- und Lactose-Promotor-Systeme

(Chang et al., *Nature* 275, 615 (1978); Goeddel et al., *Nature* 281, 544 (1979)), alkalische Phosphatase, ein Tryptophan-(trp-)Promotor-System (Goeddel, *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980); EP 36.776), sowie Hybrid-Promotoren, wie z. B. den tac-Promotor (deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 21–25 (1983)). Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Systemen enthalten auch eine Shine-Dalgarno(S. D.-)Sequenz, die operabel an die für UCP4 kodierende DNA gebunden ist.

[0097] Beispiele geeigneter Promotorsequenzen zur Verwendung mit Hefe-Wirten umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglycerokinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 (1968); Holland, *Biochemistry* 17, 4900 (1978)), wie z. B. Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphat isomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatekinase, Triosephosphat isomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase.

[0098] Andere Hefepromotoren, wobei es sich um induzierbare Promotoren mit dem zusätzlichen Vorteil einer Transkription handelt, die durch Wachstumsbedingungen gesteuert wird, sind die Promotorregionen für Alkoholdehydrogenase 2, Isocytochrom C, saure Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit Stickstoffstoffwechsel assoziiert sind, Metallothionein, Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, sowie Enzyme, die für die Maltose- und Galactose-Verwertung verantwortlich sind. Geeignete Vektoren und Promotoren zur Verwendung in der Hefe-Expression werden weiters im EP 73.657 beschrieben.

[0099] Die UCP4-Transkription aus Vektoren in Säugetier-Wirtszellen wird z. B. durch Promotoren gesteuert, die aus den Genomen von Viren erhalten werden, wie z. B. dem Polyoma-Virus, dem Gefügelpockenvirus (UK 2.211.504, veröffentlicht am 5. Juli 1989), dem Adenovirus (wie z. B. Adenovirus 2), dem Rinder-Papillom-Virus, dem Vogel-Sarkom-Virus, dem Zytomegalievirus, einem Retrovirus, dem Hepatitis-B-Virus und dem Simian-Virus 40 (SV40), aus heterologen Säugetier-Promotoren, wie z. B. dem Actin-Promotor oder einem Immunoglobulin-Promotor, sowie aus Hitzeschock-Promotoren, vorausgesetzt diese Promotoren sind mit den Wirtszell-Systemen kompatibel.

[0100] Die Transkription einer DNA, die für das UCP4 kodiert, durch höhere Eukaryoten, kann durch Insertionen einer Enhancer-Sequenz in den Vektor erhöht werden. Enhancer sind cis-agierende DNA-Elemente, normalerweise von etwa 10 bis 300 bp, die auf einen Promotor wirken, um dessen Transkription zu erhöhen. Es sind nun viele Enhancer-Sequenzen aus Säugetier-Genen bekannt (Globin, Elastase, Albumin, α -Fötoprotein und Insulin). Typischerweise wird jedoch ein Enhancer aus einem eukaryotischen Zellvirus verwendet. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsstartpunkts (bp 100–270), den frühen Promotor-Enhancer von Zytomegalievirus, den Polyoma-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsstartpunkts, sowie Adenovirus-Enhancer. Der Enhancer kann in den Vektor an einer Position 5' oder 3' von der für UCP4 kodierenden Sequenz gespleißt werden, befindet sich jedoch vorzugsweise an der Stelle 5' vom Promotor.

[0101] Expressionsvektoren, die in eukaryotischen Wirtszellen verwendet werden (Hefe-, Pilz-, Insekten-, Pflanzen-, Tier-Zellen, menschliche Zellen oder kernhaltige Zellen anderer mehrzelliger Organismen), enthalten auch Sequenzen, die für die Termination der Transkription und für die Stabilisierung der mRNA erforderlich sind. Solche Sequenzen sind normalerweise aus den untranslatierten 5'- und gelegentlich 3'-Regionen eukaryotischer oder viraler DNAs oder cDNAs erhältlich. Diese Regionen enthalten Nucleotidsegmente, die als polyadenyierte Fragmente im untranslatierten Abschnitt der für UCP4 kodierenden mRNA transkribiert werden.

[0102] Wiederum andere Verfahren, Vektoren und Wirtszellen, die für die Anpassung an die Synthese von UCP4 in rekombinanter Wirbeltier-Zellkultur geeignet sind, werden von Gething et al., *Nature* 293, 620–625 (1981); Mantei et al., *Nature* 281, 40–46 (1979); EP 117.060; sowie EP 117.058, beschrieben.

4. Detektion von Gen-Amplifikation/-Expression

[0103] Gen-Amplifikation und/oder -Expression kann direkt in einer Probe gemessen werden, z. B. durch herkömmliches Southern-Blotting, durch Northern-Blotting, um die Transkription der mRNA zu quantifizieren (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201–5205 (1980)), durch Dot-Blotting (DNA-Analyse), oder durch In-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer geeignet markierten Sonde, basierend auf den hierin bereitgestellten Sequenzen. Alternativ dazu können Antikörper verwendet werden, die spezifische Duplexe erkennen können, unter anderem DNA-Duplexe, RNA-Duplexe, sowie DNA-RNA-Hybrid-Duplexe oder DNA-Protein-Duplexe. Die Antikörper wiederum können markiert sein, und der Versuch kann durchgeführt werden, wenn der Duplex an eine Oberfläche gebunden ist, so dass nach der Duplexbildung auf der Oberfläche die Gegenwart von

an den Duplex gebundenem Antikörper detektiert werden kann.

[0104] Genexpression kann alternativ dazu durch immunologische Verfahren gemessen werden, wie z. B. durch immunohistochemische Färbung von Zellen oder Gewebeschnitte, sowie durch Tests der Zellkultur oder von Körperflüssigkeiten, um die Expression des Genprodukts direkt zu quantifizieren. Antikörper, die für eine immunhistochemische Färbung und/oder Tests von Probeflüssigkeiten nützlich sind, können entweder monoklonal oder polyklonal sein und können in einem beliebigen Säugetier erzeugt werden. Passenderweise können die Antikörper gegen ein Nativsequenz-UCP4-Polypeptid oder gegen ein synthetisches Peptid erzeugt werden, basierend auf den hierin bereitgestellten DNA-Sequenzen, oder gegen eine exogene Sequenz, die an UCP4-DNA fusioniert ist und für ein spezifisches Antikörper-Epitop kodiert.

5. Reinigung des Polypeptids

[0105] Formen von UCP4 können aus dem Kulturmedium oder aus Wirtszelllysaten gewonnen werden. Bei Membranbindung können sie aus der Membran unter Verwendung einer geeigneten Detergenslösung (z. B. Triton-X100) oder durch enzymatische Spaltung freigesetzt werden. Zellen, die in der Expression von UCP4 verwendet werden, können durch verschiedene physikalische oder chemische Verfahren zerstört werden, z. B. durch Gefrier-Auftau-Zyklen, Beschallung, mechanischen Aufschluss oder durch zelllysierende Mittel.

[0106] Es kann erwünscht sein, UCP4 aus rekombinanten Zellproteinen oder Polypeptiden zu reinigen. Die folgenden Verfahren sind Beispiele geeigneter Reinigungsverfahren: durch Fraktionierung auf einer Ionenaustauschsäule; Ethanol-Präzipitation; Umkehrphasen-HPLC; Chromatographie auf Kieselgel oder einem Kationenaustauschharz, wie z. B. DEAE; Chromatofokussierung; SDS-PAGE; Ammoniumsulfat-Präzipitation; Gelfiltration, z. B. unter Verwendung von Sephadex G-75; Protein-A-Sepharose-Säulen, zur Entfernung von Kontaminanten, wie z. B. IgG; sowie durch metallchelatisierende Säulen, um epitopmarkierte Formen des UCP4 zu binden. Verschiedene Verfahren der Proteinreinigung können verwendet werden, und solche Verfahren sind nach dem Stand der Technik bekannt und werden z. B. von Deutscher, Methods in Enzymology 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982), beschrieben. Der/die ausgewählte(n) Reinigungsschritt(e) hängt/hängen z. B. von der Art des verwendeten Produktionsprozesses und dem spezifischen UCP4, das hergestellt wird, ab.

E. Verwendungen für UCP4

[0107] Nucleotidsequenzen (oder ihr Komplement), die für UCP4 kodieren, finden verschiedenste Anwendung auf dem Gebiet der Molekularbiologie, umfassend die Verwendung als Hybridisierungssonden, in der Chromosomen- und Gen-Kartierung, sowie in der Erzeugung von Anti-Sense-RNA und -DNA. Die UCP4-Nucleinsäure ist auch für die Herstellung von UCP4-Polypeptiden durch die hierin beschriebenen Rekombinationsverfahren von Nutzen.

[0108] Das Nativsequenz-UCP4-Gen voller Länge (beschrieben in Beispiel 1, Seq.-ID Nr. 2) oder Fragmente davon können unter anderem als Hybridisierungssonden für eine cDNA-Bibliothek verwendet werden, um das UCP4-Gen voller Länge zu isolieren oder um noch weitere Gene zu isolieren (z. B. jene, die für natürlich kodierende Varianten von UCP4 oder für UCP4 anderer Spezies kodieren), die eine gewünschte Sequenzidentität mit der in [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) offenbarten UCP4-Sequenz aufweisen. Gegebenenfalls liegt die Länge der Sonden bei etwa 20 bis etwa 80 Basen. Die Hybridisierungssonden können von der Nucleotidsequenz aus Seq.-ID Nr. 2 oder von genomischen Sequenzen stammen, die Promotoren, Enhancer-Elemente und Introns von Nativsequenz-UCP4 umfassen. Als Beispiel umfasst ein Screeningverfahren das Isolieren der kodierenden Region des UCP4-Gens unter Verwendung der bekannten DNA-Sequenz, um eine ausgewählte Sonde von etwa 40 Basen zu synthetisieren. Hybridisierungssonden können mit einer Reihe von Markierungen markiert sein, unter anderem mit Radionukleotiden, wie z. B. ^{32}P oder ^{35}S , oder enzymatischen Markierungen, wie z. B. alkalische Phosphatase, gekoppelt an die Sonde durch Avidin/Biotin-Kopplungssysteme. Markierte Sonden mit einer Sequenz, die komplementär zu jener des UCP4-Gens der vorliegenden Erfindung ist, können verwendet werden, um Bibliotheken menschlicher cDNA, genomicscher DNA oder mRNA zu screenen, um zu bestimmen, an welche Mitglieder solcher Bibliotheken die Sonde hybridisiert. Hybridisierungsverfahren werden ausführlicher in den unten stehenden Beispielen beschrieben.

[0109] Fragmente von UCP4-DNA, die hierin offenbart werden, umfassen Sequenzen, die zumindest etwa 20 bis 30 aufeinanderfolgende Nucleotide der DNA von Seq.-ID Nr. 2 umfassen. Vorzugsweise umfassen solche Sequenzen zumindest etwa 50 aufeinanderfolgende Nucleotide der DNA von Seq.-ID Nr. 2.

[0110] Die Sonden können auch in PCR-Verfahren verwendet werden, um einen Pool von Sequenzen zur Identifikation von eng verwandten, für UCP4 kodierenden Sequenzen zu erzeugen.

[0111] Nucleotidsequenzen, die für ein UCP4 kodieren, können auch verwendet werden, um Hybridisierungs-sonden zum Kartieren des Gens zu konstruieren, das für dieses UCP4 kodiert, sowie zur genetischen Analyse von Individuen mit genetischen Erkrankungen. Die hierin bereitgestellten Nucleotidsequenzen können an ein Chromosom und spezifische Regionen eines Chromosoms unter Verwendung bekannter Verfahren, wie z. B. In-situ-Hybridisierung, Bindungsanalyse gegen bekannte chromosomale Marker und Hybridisierungsscreening mit Bibliotheken, kartiert werden.

[0112] Kodieren die kodierenden Sequenzen für UCP4 für ein Protein, das an ein anderes Protein bindet, so kann das UCP4 in Tests verwendet werden, um die anderen Proteine oder Moleküle zu identifizieren, die in die Bindungswechselwirkung involviert sind. Durch solche Verfahren können Inhibitoren der Rezeptor/Ligand-Bindungswechselwirkung identifiziert werden. Proteine, die in solche Bindungswechselwirkungen involviert sind, können auch verwendet werden, um auf Peptid- oder kleinmolekulare Inhibitoren oder Agonisten der Bindungswechselwirkung zu screenen. Das Rezeptor-UCP4 kann auch verwendet werden, um einen oder mehrere in Wechselbeziehung stehende Liganden zu isolieren. Es können Screening-Tests geschaffen werden, um Leitverbindungen zu finden, welche die biologische Aktivität eines Nativ-UCP4 oder eines Rezeptors für UCP4 imitieren. Solche Screeningtests umfassen Tests, die für ein Screening chemischer Bibliotheken mit hohem Durchsatz zugänglich sind, was sie besonders zur Identifikation von kleinmolekularen Arzneimittelkandidaten geeignet macht. Kleine Moleküle, die in Betracht gezogen werden, umfassen synthetische organische oder anorganische Verbindungen. Die Tests können in einer Reihe von Formaten durchgeführt werden, umfassend Protein-Protein-Bindungstests, biochemische Screeningtests, Immuntests und zellbasierte Tests, die nach dem Stand der Technik ausführlich beschrieben sind.

[0113] Nucleinsäuren, die für UCP4 oder dessen modifizierte Formen kodieren, können auch verwendet werden, um entweder transgene Tiere oder "Knockout"-Tiere zu erzeugen, die wiederum bei der Entwicklung und dem Screening von therapeutisch nützlichen Reagenzien von Nutzen sind. Ein transgenes Tier (z. B. eine Maus oder eine Ratte) ist ein Tier mit Zellen, die ein Transgen enthalten, wobei das Transgen in das Tier oder einen Vorfahren des Tiers in einem pränatalen, z. B. einem embryonalen, Stadium eingeführt wurde. Ein Transgen ist eine DNA, die in das Genom einer Zelle integriert ist, aus dem sich ein transgenes Tier entwickelt. In einer Ausführungsform kann cDNA, die für UCP4 kodiert, verwendet werden, um genomische DNA zu klonieren, die für UCP4 kodiert, und zwar in Einklang mit etablierten Verfahren und den genetischen Sequenzen, die verwendet werden, um transgene Tiere zu erzeugen, die Zellen enthalten, die für UCP4 kodierende DNA exprimieren. Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere, insbesondere von Tieren wie etwa Mäusen oder Ratten, sind bereits herkömmliche Verfahren nach dem Stand der Technik und werden z. B. im US-Patent Nr. 4.736.866 und 4.870.009 beschrieben. Typischerweise würde zur UCP4-Transgen-Inkorporierung mit gewebspezifischen Enhancern auf bestimmte Zellen abgezielt. Transgene Tiere, die eine Kopie eines Transgens umfassen, das für UCP4 kodiert, das in die Keimbahn des Tieres in einem embryonalen Stadium eingeführt wurde, können verwendet werden, um die Wirkung einer erhöhten Expression der DNA, die für UCP4 kodiert, zu untersuchen. Solche Tiere können als Testtiere für Reagenzien verwendet werden, von denen angenommen wird, dass sie z. B. vor pathologischen Zuständen, die mit ihrer Überexpression oder Unterexpression assoziiert sind, schützen. In Einklang mit dieser Facette der Erfindung wird ein Tier mit dem Reagens behandelt, und ein reduziertes Auftreten des pathologischen Leidens im Vergleich zu unbehandelten Tieren, die das Transgen tragen, würde eine potentielle therapeutische Maßnahme gegen das pathologische Leiden anzeigen.

[0114] Alternativ dazu können nichtmenschliche Homologe von UCP4 verwendet werden, um ein UCP4-"Knockout"-Tier zu konstruieren, das als Resultat einer homologen Rekombination zwischen dem endogenen Gen, das für UCP4 kodiert, und veränderter genetischer DNA, die für UCP4 kodiert, ein defektes oder verändertes Gen aufweist, das für UCP4 kodiert und das in eine Embryozelle des Tieres eingeführt wurde. cDNA, die für UCP4 kodiert, kann z. B. verwendet werden, um gemäß etablierten Verfahren genetische DNA zu klonieren, die für UCP4 kodiert. Ein Abschnitt der genetischen DNA, die für UCP4 kodiert, kann deletiert oder durch ein anderes Gen ersetzt werden, z. B. durch ein Gen, das für einen selektierbaren Marker kodiert, der zur Beobachtung der Integration verwendet werden kann. Typischerweise sind mehrere Kilobasen der unveränderten flankierenden DNA (sowohl an den 5'- als auch an den 3'-Enden) im Vektor inkludiert (siehe z. B. Thomas und Capecchi, Cell 51, 503 (1987), für eine Beschreibung homologer Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in eine embryonale Stammzellenlinie eingeführt (z. B. durch Elektroporation), und Zellen, in denen die eingeführte DNA eine homologe Rekombination mit der endogenen DNA eingegangen ist, werden selektiert (siehe z. B. Li et al., Cell 69, 915 (1992)). Die selektierten Zellen werden anschließend in eine Blastozyste

eines Tieres (z. B. einer Maus oder Ratte) injiziert, um Aggregations-Chimären zu bilden (siehe z. B. Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, 113–152, E. J. Robertson (Hrsg.), IRL, Oxford (1987)). Ein chimärer Embryo kann anschließend in ein geeignetes scheinträchtiges weibliches Ziehtier implantiert und der Embryo ausgetragen werden, um ein "Knockout"-Tier zu schaffen. Nachkommen, welche die homolog rekombinierte DNA in ihren Keimzellen in sich tragen, können mittels Standardverfahren identifiziert werden und verwendet werden, um Tiere zu züchten, bei denen alle Zellen des Tieres die homolog rekombinierte DNA enthalten. Knockout-Tiere können z. B. bezüglich ihrer Fähigkeit, sich gegen gewisse pathologische Leiden zu schützen, sowie bezüglich ihrer Entwicklung pathologischer Leiden durch die Abwesenheit des UCP4-Polypeptids beschrieben werden.

[0115] Nucleinsäure, die für die UCP4-Polypeptide kodiert, kann auch in der Gentherapie verwendet werden. In gentherapeutischen Anwendungen werden Gene in Zellen eingeführt, um eine In-vivo-Synthese eines therapeutisch wirksamen genetischen Produkts zu erzielen, z. B. um ein defektes Gen zu ersetzen. Die "Gentherapie" umfasst sowohl die herkömmliche Gentherapie, wobei eine anhaltende Wirkung durch eine einzelne Behandlung erzielt wird, als auch die Verabreichung gentherapeutischer Mittel, welche die einmalige oder wiederholte Verabreichung einer therapeutisch wirksamen DNA oder mRNA umfasst. Antisense-RNAs und -DNAs können als therapeutische Mittel zum Blockieren der Expression gewisser Gene in vivo verwendet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass kurze Antisense-Oligonucleotide in Zellen importiert werden können, wo sie trotz ihrer niedrigen intrazellulären Konzentrationen, die durch ihre eingeschränkte Aufnahme durch die Zellmembran hervorgerufen werden, als Inhibitoren fungieren (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143–4146 (1986)). Die Oligonucleotide können modifiziert werden, um ihre Aufnahme zu erhöhen, z. B. durch Substituieren ihrer negativ geladenen Phosphodiestergruppen durch ungeladene Gruppen.

[0116] Es gibt eine Reihe von Verfahren, die zur Einführung von Nucleinsäuren in lebensfähige Zellen erhältlich sind. Die Verfahren variieren je nach Abhängigkeit davon, ob die Nucleinsäure in vitro in gezüchtete Zellen transferiert wird oder, ob sie in vivo in die Zellen des gewünschten Wirts transferiert wird. Verfahren, die sich für den In-vitro-Transfer von Nucleinsäure in Säugetierzellen eignen, umfassen die Verwendung von Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran, das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren etc. Die momentan bevorzugten In-vivo-Gentransfer-Verfahren umfassen die Transfektion mit viralen (typischerweise retroviralen) Vektoren sowie die durch virale Hüllproteine und Liposomen vermittelte Transfektion (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205–210 (1993)). In manchen Situationen ist es wünschenswert, die Nucleinsäurequelle mit einem Mittel zu versorgen, das auf die Target-Zellen abzielt, wie z. B. einem Antikörper, der für ein Zelloberflächen-Membranprotein oder die Target-Zelle spezifisch ist, einem Liganden für einen Rezeptor auf der Target-Zelle etc. Werden Liposomen verwendet, so können Proteine, die an ein Zelloberflächen-Membranprotein binden, das mit Endozytose assoziiert ist, zum Targeting und/oder zur Erleichterung der Aufnahme verwendet werden, z. B. Capsid-Proteine oder Fragmente davon, die für einen bestimmten Zelltyp tropistisch sind, Antikörper für Proteine, die bei Zyklierung eine Internalisierung erfahren, Proteine, die auf die intrazelluläre Lokalisierung abzielen und die intrazelluläre Halbwertszeit erhöhen. Das Verfahren der rezeptorvermittelten Endozytose wird z. B. von Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429–4432 (1987); sowie Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410–3414 (1990), beschrieben. Für eine Rezension der Genmarkierungs- und der Gentherapie-Arbeitsvorschriften siehe Anderson et al., Science 256, 808–813 (1992).

[0117] Es wird angenommen, dass die UCP4-Gentherapie z. B. bei der Behandlung von Stoffwechselerkrankungen Anwendung findet. Dies kann z. B. durch die Verwendung der oben stehend beschriebenen Verfahren, sowie durch Einführung eines viralen Vektors, der ein UCP4-Gen enthält, in gewisse Gewebe (wie etwa Muskeln oder Fett) erzielt werden, um den Stoffumsatz in diesen Geweben, auf die abgezielt wird, zu erhöhen und dadurch den Energieumsatz zu erhöhen.

[0118] Allgemein sind hierin Verfahren zur Behandlung unter Verwendung von UCP4 offenbart. Die Verbrennung von Brennstoff, der Elektronentransport, das Protonenpumpen und der O₂-Verbrauch (was in seiner Gesamtheit als Stoffumsatz bezeichnet werden kann) sind an die ATP-Synthese gekoppelt. Es kann bei Säugetieren eine "Ineffizienz" geben, so dass ein Anteil des Stoffumsatzes (der in manchen Fällen über 20% liegen kann) einem H⁺-Rückeintritt in den Matrixraum ohne ATP-Synthese zugeschrieben werden kann.

[0119] Es wird angenommen, dass UCP4 an der Katalyse des H⁺-Austritts beteiligt sein könnte und dadurch in vivo eine Rolle bei der energetischen Ineffizienz spielt. Dementsprechend kann eine Modulierung der UCP4-Aktivität oder der Mengen (der Gegenwart) von UCP4 in Säugetier-Geweben (insbesondere in für den Stoffwechsel wichtigen Geweben) gleichzeitig den H⁺-Austritt, den Stoffumsatz und die Wärmeerzeugung modulieren. Die Verfahren, die (entweder in einem hinaufregulierenden oder in einem hinunterregulierenden Modus) den Stoffumsatz in einem Säugetier modulieren, haben eine Reihe von therapeutischen Anwendungen,

unter anderem die Behandlung von Fettleibigkeit, sowie die Symptome, die mit Schlaganfall, Trauma (wie z. B. Verbrennungstrauma), Sepsis und Infektion, assoziiert sind.

[0120] Bei der Behandlung von Fettleibigkeit weiß es der Fachmann zu schätzen, dass die Modulierung des mitochondrialen Membranpotentials verwendet werden kann, um den Stoffumsatz des Körpers zu erhöhen, wodurch die Fähigkeit eines Individuums zum Gewichtsverlust verstärkt wird. Es können Screeningtests durchgeführt werden, um Moleküle zu identifizieren, welche die Expression oder die Aktivität (wie z. B. die Entkopplung) von UCP4 hinaufregulieren können. Die so identifizierten Moleküle können anschließend verwendet werden, um den Stoffumsatz zu erhöhen und den Gewichtsverlust zu verstärken. Die UCP4-Polypeptide sind in Tests zur Identifikation von Leitverbindungen für therapeutisch aktive Mittel von Nutzen, welche die Expression oder Aktivität von UCP4 modulieren. Kandidatenmoleküle oder -verbindungen können mit den Zellen oder Geweben des Säugetiers getestet werden, um die Wirkung(en) des/der Kandidatenmoleküls/Kandidatenverbindung auf die UCP4-Expression oder -Aktivität zu bestimmen. Solche Screeningtests können für ein Screening chemischer Bibliotheken mit hohem Durchsatz zugänglich sein und sind besonders zur Identifikation von kleinemolekularen Arzneimittelkandidaten geeignet. Kleine Moleküle umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf synthetische organische oder anorganische Verbindungen. Die Tests können in einer Reihe von Formaten durchgeführt werden, umfassend Protein-Protein-Bindungstests, biochemische Screeningtests, Immuntests und zellbasierte Tests etc. Diese Testformate sind nach dem Stand der Technik bekannt.

[0121] Dementsprechend wird in einer Ausführungsform ein Verfahren zur Durchführung eines In-vitro-Screening-Tests bereitgestellt, um ein Molekül zu identifizieren, das die Expression von UCP4 verstärkt oder hinaufreguliert, umfassend die Schritte des Exponierens einer Säugetier-Zell- oder -Gewebeprobe, von der angenommen wird, sie würde UCP4 umfassen, gegenüber einem Kandidatenmolekül, sowie das darauf folgende Analysieren der Expression von UCP4 in der Probe. Bei diesem Verfahren kann die Probe weiter auf das mitochondriale Membranpotential analysiert werden.

[0122] Gegebenenfalls ist das UCP4 ein Polypeptid, das die Aminosäurereste 1 bis 323 von [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) umfasst. Die Probe, die analysiert wird, kann verschiedene Säugetierzellen oder -gewebe umfassen, unter anderem, jedoch nicht beschränkt auf menschliches Gehirngewebe. Das im Screeningtest verwendete Kandidatenmolekül kann ein kleines Molekül sein, das eine synthetische organische oder anorganische Verbindung umfasst. In einer alternativen Ausführungsform wird der Screeningtest durchgeführt, um ein Molekül zu identifizieren, das die Expression von UCP4 verringert oder hinunterreguliert. Die Wirkung(en), die solch ein Kandidatenmolekül auf die Expression und/oder die Aktivität von UCP4 haben kann, kann/können mit einer Kontroll- oder Vergleichs-Probe verglichen werden, wie z. B. die Expression oder Aktivität von UCP4, die bei einem ähnlichen Säugetier beobachtet wurde.

[0123] UCP4 kann auch in Diagnoseverfahren verwendet werden. Die Gegenwart oder das Fehlen von UCP4 oder alternativ dazu die Über- oder Unterexpression von UCP4 in den Zellen oder Geweben eines Individuums kann unter Verwendung von Tests, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, detektiert werden, unter anderem jenen, die in den unten stehenden Beispielen beschrieben werden. Daher stellt die Erfindung auch ein Verfahren zur Detektion der Expression von UCP4 in einer Säugetierzell- oder -gewebeprobe bereit, umfassend das Kontaktieren einer Säugetierzell- oder -gewebeprobe mit einer DNA-Sonde, sowie das Analysieren der Expression von UCP4-mRNA-Transkript in der Probe. Die Probe kann verschiedene Säugetierzellen oder -gewebe umfassen, unter anderem, jedoch nicht beschränkt auf menschliches Gehirngewebe. Der Fachmann kann Informationen, die aus solchen Detektionstests hervorgehen, verwenden, um die Prognose von Stoffwechselerkrankungen oder bezüglich des Risikos für den Beginn von Fettleibigkeit zu unterstützen. Wird z. B. festgestellt, dass die UCP4-Aktivität bei einem Patienten abnormal hoch oder niedrig ist, so könnte eine Therapie, wie z. B. eine Hormontherapie, verabreicht werden, um die UCP4-Aktivität in einen physiologisch annehmbaren Zustand zurückzubringen.

[0124] Die Detektion einer verminderten UCP4-Funktion des Säugetiers kann auch verwendet werden, um die Diagnose einer verminderten neuralen Aktivität oder einer neuralen Degeneration zu unterstützen. Es wird momentan davon ausgegangen, dass UCP4 in die Regulierung der Gehirntemperatur oder des Stoffumsatzes involviert sein könnte, die/der für die normale Gehirnfunktion (sowie für die assoziierte neurale Aktivität) erforderlich ist. Es wird momentan ebenfalls davon ausgegangen, dass UCP4 die Erzeugung reaktiver Sauerstoff-Arten steuern und dadurch zu neuraler Degeneration beitragen könnte. Moleküle, die in den Screeningtests identifiziert wurden und von denen herausgefunden wurde, dass sie die UCP4-Expression oder -Funktion unterdrücken, können auch verwendet werden, um Fieber zu behandeln, da angenommen wird, dass UCP4 während Fieberschüben hinaufreguliert wird.

F. Anti-UCP4-Antikörper

[0125] Die vorliegende Erfindung stellt weiters Anti-UCP4-Antikörper bereit. Beispiele für Antikörper umfassen polyklonale, monoklonale, humanisierte, bispezifische und Heterokonjugat-Antikörper.

1. Polyclonale Antikörper

[0126] Die Anti-UCP4-Antikörper können polyklonale Antikörper umfassen. Verfahren zur Herstellung polyklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt. Polyclonale Antikörper können in einem Säugetier gezüchtet werden, z. B. durch eine oder mehrere Injektionen eines immunisierenden Mittels und, falls gewünscht, eines Adjuvans. Typischerweise wird das immunisierende Mittel und/oder das Adjuvan in das Säugetier mittels mehrerer subkutaner oder intraperitonealer Injektionen injiziert. Das immunisierende Mittel kann das UCP4-Polypeptid oder ein Fusionsprotein davon umfassen. Es kann nützlich sein, um das immunisierende Mittel an ein Protein zu konjugieren, von dem bekannt ist, dass es in dem Tier, das immunisiert wird, immunogen wirkt. Beispiele solcher immunogener Proteine umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf Keyhole-Limpet-Hämocyanin, Serum-Albumin, Rinder-Thyroglobulin sowie den Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor. Beispiele von Adjuvanzien, die verwendet werden können, umfassen Freunds vollständiges Adjuvan und MPL-TDM-Adjuvan (Monophosphoryl-Lipid-A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat). Die Arbeitsvorschrift bezüglich der Immunisierung kann durch einen Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren ausgewählt werden.

2. Monoklonale Antikörper

[0127] Die Anti-UCP4-Antikörper können alternativ dazu monoklonale Antikörper sein. Monoklonale Antikörper können unter Verwendung von Hybridom-Verfahren erzeugt werden, wie z. B. jene, die von Kohler und Milstein, *Nature* 256, 495 (1975), beschrieben wurden. In einem Hybridom-Verfahren wird eine Maus, ein Hamster oder ein anderes geeignetes Wirtstier typischerweise mit einem immunisierenden Mittel immunisiert, um Lymphozyten zu erhalten, die Antikörper produzieren oder dazu in der Lage sind, die spezifisch an das immunisierende Mittel binden. Alternativ dazu können die Lymphozyten *in vitro* immunisiert werden.

[0128] Das immunisierende Mittel umfasst typischerweise das UCP4-Polypeptid oder ein Fusionsprotein davon. Allgemein werden entweder Peripherblut-Lymphozyten ("PBLs") verwendet, wenn Zellen menschlichen Ursprungs gewünscht werden, oder es werden Milzzellen oder Lymphknotenzellen verwendet, wenn nicht-menschliche Säugetierquellen gewünscht werden. Die Lymphozyten werden anschließend unter Verwendung eines geeigneten Fusionsmittels, wie z. B. Polyethylenglykol, mit einer immortalisierten Zelllinie fusioniert, um eine Hybridom-Zelle zu ergeben (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 59–103 (1986)). Immortalisierte Zelllinien sind normalerweise transformierte Säugetierzellen, insbesondere Myelom-Zellen von Nagetieren, Rindern oder Menschen. Normalerweise werden Ratten- oder Maus-Myelom-Zelllinien verwendet. Die Hybridom-Zellen können in einem geeigneten Kulturmedium gezüchtet werden, das vorzugsweise eine oder mehrere Substanzen enthält, die das Wachstum oder Überleben der nicht fusionierten, immobilisierten Zellen inhibieren. Falls den Ausgangszellen z. B. das Enzym Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT oder HPRT) fehlt, so umfasst das Kulturmedium für die Hybridome typischerweise Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin ("HAT-Medium"), da diese Substanzen die Vermehrung von HGPRT-defizienten Zellen verhindern.

[0129] Bevorzugte immobilisierte Zelllinien sind jene, die effizient fusionieren, in hohem Ausmaß eine stabile Antikörperexpression durch die ausgewählten antikörperproduzierenden Zellen unterstützen und auf ein Medium, wie z. B. HAT-Medium, empfindlich reagieren. Weitere bevorzugte immobilisierte Zelllinien sind murine Myelom-Linien, die z. B. vom Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Kalifornien, und der American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, erhalten werden können. Menschliche Myelom- und Maus-Mensch-Heteromyelom-Zelllinien wurden ebenfalls für die Herstellung menschlicher monoklonaler Antikörper beschrieben (Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51–63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987)).

[0130] Das Kulturmedium, in dem die Hybridom-Zellen gezüchtet werden, kann anschließend auf die Gegenwart monoklonaler Antikörper getestet werden, die gegen UCP4 gerichtet sind. Die Bindungsspezifität monoklonaler Antikörper, die von den Hybridom-Zellen produziert werden, wird vorzugsweise mittels Immunpräzipitation oder durch einen *In-vitro*-Bindungstest, wie z. B. einen Radioimmunttest (RIA) oder einen enzymgekoppelten Immunadsorptionsbestimmungstest (ELISA), bestimmt. Solche Verfahren oder Tests sind nach dem Stand der Technik bekannt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers kann z. B. durch die

Scatchard-Analyse von Munson und Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980), bestimmt werden.

[0131] Nachdem die gewünschten Hybridom-Zellen identifiziert sind, können die Klone durch Verfahren der Grenzverdünnung subkloniert und mittels Standardverfahren gezüchtet werden (Goding, s. o.). Für diesen Zweck geeignete Kulturmedien umfassen z. B. Dulbeccos Modifiziertes Eagle-Medium und RPMI-1640-Medium. Alternativ dazu können die Hybridom-Zellen *in vivo* als Ascites in einem Säugetier gezüchtet werden.

[0132] Die von den Subklonen sekretierten monoklonalen Antikörper können aus dem Kulturmedium oder der Ascites-Flüssigkeit mittels herkömmlicher Immunglobulin-Reinigungsverfahren, wie z. B. Protein-A-Sepharose, Hydroxylapatitchromatographie, Gelelektrophorese, Dialyse oder Affinitätschromatographie, isoliert oder gereinigt werden.

[0133] Die monoklonalen Antikörper können auch durch DNA-Rekombinationsverfahren erzeugt werden, wie z. B. jene, die im US-Patent Nr. 4.816.567 beschrieben werden. DNA, die für die monoklonalen Antikörper der Erfindung kodiert, kann unter Anwendung herkömmlicher Verfahren leicht isoliert und sequenziert werden (z. B. unter Verwendung von Oligonucleotidsonden, die in der Lage sind, spezifisch an Gene zu binden, die für die Schwer- und Leichtketten muriner Antikörper kodieren). Die Hybridom-Zellen der Erfindung dienen als bevorzugte Quelle dieser DNA. Einmal isoliert, kann die DNA in Expressionsvektoren platziert werden, die anschließend in Wirtszellen, wie z. B. Affen-COS-Zellen, Chinahamster-Eierstock-(CHO-)Zellen oder Myelom-Zellen, transfiziert werden, die andernfalls kein Immunglobulinprotein produzieren, um die Synthese monoklonaler Antikörper in den rekombinanten Wirtszellen zu erzielen. Die DNA kann auch modifiziert werden, z. B. durch Substituieren der für menschliche konstante Schwer- und Leichtketten-Domänen kodierenden Sequenz anstelle der homologen murinen Sequenzen (US-Patent Nr. 4.816.567; Morrison et al., s. o.), oder durch kovalente Bindung der gesamten oder eines Teils der für ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid kodierenden Sequenz an die für Immunglobulin kodierende Sequenz. Die konstanten Domänen eines Antikörpers der Erfindung können durch solch ein Non-Immunglobulin-Polypeptid substituiert werden, oder die variablen Domänen einer antigenkombinierenden Stelle eines Antikörpers der Erfindung können durch solch ein Nicht-Immunglobulin-Polypeptid substituiert werden, um einen zweiwertigen chimären Antikörper zu erzeugen.

[0134] Bei den Antikörpern kann es sich um einwertige Antikörper handeln. Verfahren zur Herstellung einwertiger Antikörper sind nach dem Stand der Technik wohlbekannt. Ein Verfahren umfasst z. B. die rekombinante Expression einer Immunglobulin-Leichtkette und einer modifizierten Schwerkette. Die Schwerkette ist allgemein an einem beliebigen Punkt in der Fc-Region trunkiert, um eine Schwerkettens-Vernetzung zu verhindern. Alternativ dazu werden die relevanten Cystein-Reste durch einen anderen Aminosäurerest substituiert oder deletiert, um eine Vernetzung zu verhindern.

[0135] In-vitro-Verfahren sind ebenfalls zur Herstellung einwertiger Antikörper geeignet. Der Verdau von Antikörpern zur Herstellung von Fragmenten dieser, insbesondere von Fab-Fragmenten, kann unter Verwendung von Routineverfahren erzielt werden, die nach dem Stand der Technik bekannt sind.

3. Menschliche und humanisierte Antikörper

[0136] Die Anti-UCP4-Antikörper der Erfindung können weiters humanisierte Antikörper oder menschliche Antikörper umfassen. Humanisierte Formen nichtmenschlicher (z. B. muriner) Antikörper sind chimäre Immunglobuline, Immunglobulinketten oder Fragmente davon (wie z. B. Fv-, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- oder andere antigenbindende Subsequenzen von Antikörpern), die eine minimale Sequenz enthalten, die von nichtmenschlichem Immunglobulin stammt. Humanisierte Antikörper umfassen menschliche Immunglobuline (Rezipienten-Antikörper), in denen Reste einer komplementätsbestimmenden Region (CDR) des Rezipienten durch Reste einer CDR einer nichtmenschlichen Spezies (Spender-Antikörper), wie z. B. einer Maus, einer Ratte oder eines Kaninchens, ersetzt werden, welche die gewünschte Spezifität, Affinität und Kapazität aufweisen. In manchen Fällen werden Fv-Gerüst-Reste des menschlichen Immunglobulins durch entsprechende nichtmenschliche Reste ersetzt. Humanisierte Antikörper können auch Reste umfassen, die weder im Rezipienten-Antikörper noch in den importierten CDR- oder Gerüst-Sequenzen zu finden sind. Allgemein umfasst der humanisierte Antikörper im Wesentlichen alle von zumindest einer und typischerweise zwei variablen Domänen, in der/denen alle oder im Wesentlichen alle der CDR-Regionen jenen eines nicht menschlichen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der FR-Regionen jene einer menschlichen Immunglobulin-Consensussequenz sind. Der humanisierte Antikörper umfasst im Optimalfall auch zumindest einen Abschnitt einer konstanten Immunglobulin-Region (Fc), typischerweise jenen eines menschlichen Immunglobulins (Jones et al., Nature 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., Nature 332, 323–329 (1988); sowie Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593–596 (1992)).

[0137] Verfahren zur Humanisierung nicht menschlicher Antikörper sind nach dem Stand der Technik wohlbekannt. Allgemein besitzt ein humanisierter Antikörper einen oder mehrere Aminosäurereste, die in ihn aus einer nicht menschlichen Quelle eingeführt wurden. Diese nicht menschlichen Aminosäurereste werden oftmals als "Import"-Reste bezeichnet, die typischerweise von einer variablen "Import"-Domäne stammen. Die Humanisierung kann im Wesentlichen dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern gemäß durchgeführt werden (Jones et al., *Nature* 321, 522–525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332, 323–327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534–1536 (1988)), und zwar durch Substituieren der entsprechenden Sequenzen eines menschlichen Antikörpers durch Nagetier-CDRs oder -CDR-Sequenzen. Dementsprechend sind solche "humanisierten" Antikörper chimäre Antikörper (US-Patent Nr. 4.816.567), worin im Wesentlichen weniger als eine intakte variable menschliche Domäne durch die entsprechende Sequenz einer nicht menschlichen Spezies ersetzt wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise menschliche Antikörper, in denen manche CDR-Reste und möglicherweise manche FR-Reste durch Reste analoger Stellen in Nagetier-Antikörpern ersetzt wurden.

[0138] Menschliche Antikörper können auch unter Anwendung verschiedener Verfahren, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, hergestellt werden, umfassend Phagen-Display-Bibliotheken (Hoogenboom und Winter, *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581 (1991)). Die Verfahren von Cole et al. und Boerner et al. sind ebenfalls zur Herstellung menschlicher monoklonaler Antikörper erhältlich (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 77, Alan R. Liss (1985), sowie Boerner et al., *J. Immunol.* 147 (1), 86–95 (1991)). Auf ähnliche Art und Weise können menschliche Antikörper durch Einführen menschlicher Immunglobulin-Loci in transgene Tiere hergestellt werden, z. B. Mäuse, in denen die endogenen Immunglobulin-Gene partiell oder vollständig deaktiviert wurden. Nach dem Immunitätstest wird die Produktion menschlicher Antikörper beobachtet, die stark jener ähnelt, die in allen Bereichen, unter anderem der Gen-Neuanordnung, -zusammensetzung und dem Antikörper-Repertoire, beim Menschen zu sehen ist. Dieser Ansatz wird z. B. im US-Patent Nr. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, sowie in den folgenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen beschrieben: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779–783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368, 856–859 (1994); Morrison, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845–51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg und Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65–93 (1995).

4. Eispezifische Antikörper

[0139] Eispezifische Antikörper sind monoklonale, vorzugsweise menschliche oder humanisierte, Antikörper, die Bindungsspezifitäten für zumindest zwei verschiedene Antigene aufweisen. Im vorliegenden Fall ist eine der Bindungsspezifitäten für das UCP4, die andere ist für ein beliebiges anderes Antigen, und vorzugsweise für ein Zelloberflächen-Protein oder einen Rezeptor oder eine Rezeptor-Untereinheit.

[0140] Verfahren zur Herstellung bispezifischer Antikörper sind nach dem Stand der Technik bekannt. Traditionellerweise basiert die rekombinante Produktion bispezifischer Antikörper auf der Co-Expression von zwei Immunglobulin-Schwerketten/Leichtketten-Paaren, wobei die zwei Schwerketten unterschiedliche Spezifitäten aufweisen (Milstein und Cuello, *Nature* 305, 537–539 (1983)). Aufgrund der Zufallsverteilung der Immunglobulin-Schwer- und -Leichtketten produzieren diese Hybridome (Quadrome) ein potentielles Gemisch aus zehn verschiedenen Antikörpermolekülen, von denen nur eines die korrekte bispezifische Struktur aufweist. Die Reinigung des korrekten Moleküls wird normalerweise durch Affinitätschromatographieschritte erreicht. Ähnliche Verfahren werden in WO 93/08829, veröffentlicht am 13. Mai 1993, und von Traunecker et al., *EMBO J.* 10, 3655–3659 (1991), offenbart.

[0141] Variable Antikörper-Domänen mit den gewünschten Bindungsspezifitäten (Antikörper-Antigen-Kombinationsstellen) können an konstante Immunglobulin-Domänen-Sequenzen fusioniert werden. Die Fusion erfolgt vorzugsweise mit einer konstanten Immunglobulin-Schwerketten-Domäne, umfassend zumindest einen Teil der Gelenks-, CH2- und CH3-Regionen. Es wird bevorzugt, dass die erste konstante Schwerketten-Region (CH1) die Stelle enthält, die für die Leichtketten-Bindung erforderlich ist, die in zumindest einer der Fusionen vorhanden ist. DNAs, die für die Immunglobulin-Schwerketten-Fusionen kodieren und, falls gewünscht, für die Immunglobulin-Leichtkette werden in getrennte Expressionsvektoren insertiert und in einen geeigneten Wirtsorganismus co-transfiziert. Für weitere Details der Erzeugung bispezifischer Antikörper siehe z. B. Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

5. Heterokonjugat-Antikörper

[0142] Heterokonjugat-Antikörper liegen auch im Umfang der vorliegenden Erfindung. Heterokonjugat-Anti-

körper bestehen aus zwei kovalent gebundenen Antikörpern. Von solchen Antikörpern wurde z. B. vorgeschlagen, dass sie Immunsystemzellen auf ungewollte Zellen richten (US-Patent Nr. 4.676.980), ebenso wurden sie zur Behandlung einer HIV-Infektion vorgeschlagen (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Es wird in Betracht gezogen, dass die Antikörper in vitro unter Verwendung bekannter Verfahren der synthetischen Proteinchemie hergestellt werden können, umfassend jene, die Vernetzungsmittel involvieren. Immuntoxine können z. B. unter Verwendung einer Disulfidaustauschreaktion oder durch Bildung einer Thioetherbindung konstruiert werden. Beispiele für diesen Zweck geeigneter Reagenzien umfassen Iminothiolat und Methyl-4-mercaptopbutyrimidat, sowie jene, die z. B. im US-Patent Nr. 4.676.980 offenbart sind.

G. Verwendungen für Anti-UCP4-Antikörper

[0143] Die Anti-UCP4-Antikörper der Erfindung können auf verschiedene Art und Weise verwendet werden. Anti-UCP4-Antikörper können z. B. in Diagnosetests für UCP4 verwendet werden, z. B. zur Detektion von dessen Expression in spezifischen Zellen oder Geweben. Verschiedene Diagnosetestverfahren, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, können verwendet werden, z. B. kompetitive Bindungstests, direkte oder indirekte Sandwichtests und Immunpräzipitationstests, die entweder in heterogenen oder homogenen Phasen durchgeführt werden (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147–158, CRC Press, Inc. (1987)). Die in den Diagnosetests verwendeten Antikörper können mit einer detektierbaren Gruppierung markiert werden. Die detektierbare Gruppierung sollte in der Lage sein, entweder direkt oder indirekt, ein detektierbares Signal zu produzieren. Die detektierbare Gruppierung kann z. B. ein Radioisotop sein, wie z. B. ^{3}H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S oder ^{125}I , eine fluoreszierende oder chemolumineszierende Verbindung, wie z. B. Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin oder Luciferin, oder ein Enzym, wie z. B. alkalische Phosphatase, β -Galactosidase oder Meerrettich-Peroxidase. Es kann ein beliebiges Verfahren, das nach dem Stand der Technik zum Konjugieren des Antikörpers an die detektierbare Gruppierung bekannt ist, verwendet werden, unter anderem jene Verfahren, die von Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962); David et al., *Biochemistry* 13, 1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40, 219 (1981); und Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982), beschrieben werden.

[0144] Anti-UCP4-Antikörper sind auch für die Affinitätsreinigung von UCP4 aus rekombinanter Zellkultur oder aus natürlichen Quellen von Nutzen. Bei diesem Verfahren werden die Antikörper gegen UCP4 auf einem geeigneten Träger, wie z. B. einem Sephadex-Harz oder einem Filterpapier, unter Verwendung von Verfahren, die nach dem Stand der Technik wohlbekannt sind, immobilisiert. Der immobilisierte Antikörper wird anschließend mit einer Probe in Kontakt gebracht, die das zu reinigende UCP4 enthält, danach wird der Träger mit einem geeigneten Lösungsmittel gewaschen, das im Wesentlichen alles Material in der Probe außer dem UCP4 entfernt, das an den immobilisierten Antikörper gebunden ist. Schließlich wird der Träger mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen, der das UCP4 aus dem Antikörper freisetzt.

Beispiele

[0145] Im Handel erhältliche Reagenzien, auf die in den Beispielen Bezug genommen wird, wurden den Angaben des Herstellers gemäß verwendet, sofern nicht anders angegeben. Die Quelle dieser Zellen, die in den folgenden Beispielen sowie in der gesamten Beschreibung durch die ATCC-Zugriffsnr. identifiziert werden, ist die American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Beispiel 1

Isolierung von cDNA-Klonen, die für menschliches UCP4 kodieren

[0146] EST-Datenbanken, die öffentliche EST-Datenbanken (z. B. GenBank), sowie eine geschützte EST-Datenbank (LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) umfassten, wurden nach Sequenzen mit Homologien zu menschlichem UCP3 abgesucht. Die Suche wurde unter Verwendung des Computer-Programms BLAST oder BLAST2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266, 460–480 (1996)) als Vergleich der UCP3-Proteinsequenzen mit einer 6-Raster-Translation der EST-Sequenzen durchgeführt. Jene Vergleiche, die zu einem BLAST-Score von 70 (oder in manchen Fällen 90) oder höher führten, die nicht für bekannte Proteine kodierten, wurden zu Clustern zusammengefasst und in Consensus-DNA-Sequenzen mit dem Programm AssemblyLIGN und MacVector (Oxford Molecular Group, Inc.) angeordnet.

[0147] Eine DNA-Sequenz ("fromDNA") wurde relativ zu anderen EST-Sequenzen unter Verwendung der AssemblyLIGN-Software angeordnet ([Fig. 7](#); Seq.-ID Nr. 5). ESTs aus der Incyte-Datenbank umfassten die Sequenzen mit den folgenden Zugriffsnr.: 3468504; 3369262; 4220747; 1254733; 5016160; 3770189; 2265329;

928717; 3715961; 3528102; 961523; 1863723; 382533; 918252; 918404; 4313009; 3801604; c-swh06; 3464955; c-lsh09; 090424; 1316891; 1342069; 1435593; 16014011; 1668098; 1668103; 222248; 243244; 246984; 272663; 305678; 305871; 3369262; 3464955; sowie 3715961. Zusätzlich dazu wurde die from-DNA-Sequenz unter Verwendung wiederholter BLAST- und AssemblyLIGN-Zyklen gestreckt, um die Sequenz unter Verwendung der Quellen der oben stehend beschriebenen EST-Sequenzen so weit wie möglich zu strecken.

[0148] Basierend auf dieser DNA-Sequenz wurden Oligonucleotide synthetisiert, um mittels PCR einen Klon der für UCP4 kodierenden Sequenzen voller Länge zu isolieren. Vorwärts- und Rückwärts-PCR-Primer reichen allgemein von 20 bis zu 30 Nucleotiden und werden oftmals erzeugt, um ein PCR-Produkt mit einer Länge von etwa 100–1000 bp zu ergeben. Die Sondensequenzen sind typischerweise 40–55 bp lang. In manchen Fällen werden zusätzliche Oligonucleotide synthetisiert, wenn die Consensus-Sequenz größer als etwa 1–1,5 kbp ist.

[0149] PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-) wurden synthetisiert:

Vorwärts-PCR-Primer CGCGGATCCCGTTATCGTCTGCGCTACTGC (U401) (Seq.-ID Nr. 3)

Rückwärts-PCR-Primer GCGGAATTCTTAAATGGACTGACTCCACTCATC (U406) (Seq.-ID Nr. 4)

[0150] UCP4 mit einer NH₂-terminalen Flag-Markierung wurde ebenfalls in pcDNA3 (pcDNA3-Flag-UCP4; Invitrogen) zwischen BamHI- und EcoRI-Restriktionsstellen kloniert. Die folgenden Vorwärts- und Rückwärts-PCR-Primer wurden synthetisiert.

Vorwärts-PCR-Primer CGCGGATCCGAAATGGACTACAAGGACGACGATG ACAAGTCCGTCCGGAG-GAGGAGG (U410) (Seq.-ID Nr. 6)

Rückwärts-PCR-Primer GCGGAATTCTTAAATGGACTGACTCCACTCATC (U406) (Seq.-ID Nr. 4)

[0151] RNA zur Konstruktion der cDNA-Bibliotheken wurde aus Gehirngewebe isoliert. Die cDNA-Bibliotheken, die zur Isolierung der cDNA-Klone verwendet wurden, wurden mittels Standardverfahren unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Reagenzien, wie z. B. jenen von Invitrogen, San Diego, CA, konstruiert. Die cDNA wurde mit Oligo-dT geprämt, enthaltend eine NotI-Stelle, stumpf an Sall-hämikinasierte Adaptoren gebunden, gespalten mit NotI, mittels Gelelektrophorese in die geeignete Größe gebracht und in einer definierten Ausrichtung in den einzigartigen Xhol- und NotI-Stellen in einen geeigneten Klonierungsvektor (wie z. B. pRK8 oder pRKD; pRK5B ist ein Vorläufer von pRK5D, der keine Sfil-Stelle enthält; siehe Holmes et al., Science 253, 1278–1280 (1991)) kloniert.

[0152] DNA-Sequenzierung des mittels PCR, wie oben stehend beschrieben, isolierten Klons ergab die DNA-Sequenz voller Länge für UCP4 (hierin als DNA 77568-1626 bezeichnet ([Fig. 2](#), Seq.-ID Nr. 2), sowie die abgeleitete Proteinsequenz für UCP4.

[0153] Die gesamte kodierende Sequenz von UCP4 ist in [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) dargestellt. Klon-DNA 77568-1626 enthält einen einzelnen offenen Leseraster mit einer scheinbaren Translationsinitiationsstelle an den Nucleotidpositionen 40–42, sowie ein scheinbares Stopp-Codon an den Nucleotidpositionen 1009–1011. (Siehe [Fig. 2](#), Seq.-ID Nr. 2). Der prognostizierte Polypeptid-Vorläufer ist 323 Aminosäuren lang. Es wird momentan angenommen, dass UCP4 ein membrangebundenes Protein ist und zumindest 6 Transmembranregionen enthält. Diese mutmaßlichen Transmembranregionen in der UCP4-Aminosäuresequenz werden in [Fig. 3](#) veranschaulicht. Klon-DNA 77568, als DNA 77568-1626 bezeichnet, enthalten im pcDNA3-Vektor (Invitrogen), wurde bei der ATCC hinterlegt und es wurde ihr die ATCC-Hinterlegungsnr. 203134 zugewiesen. Das UCP4-Polypeptid wird durch Exprimieren des Moleküls, das vom cDNA-Insert des hinterlegten 203134-Vektors kodiert wird, erhalten oder ist dadurch erhältbar. Verdau des hinterlegten 203134-Vektors mit BamHI- und EcoRI-Restriktionsenzym führt zu einem Insert von etwa 972 plus 34 bp. Das UCP4-Protein voller Länge, das in [Fig. 1](#) dargestellt ist, besitzt ein geschätztes Molekulargewicht von etwa 36.061 Dalton und einen pl von etwa 9,28.

[0154] Ein Abgleich der Aminosäuresequenz von UCP4 mit den UCPs 1, 2 und 3 wird in [Fig. 3](#) veranschaulicht. Es wurden manche merkbare Unterschiede zwischen UCP1 und UCP4 identifiziert. Fehlt UCP1 seine mutmaßliche Nucleotidbindungsstelle, so ist es resistent gegen Inhibierung durch Nucleotide, und wenn Phe-267 in UCP1 mit einem Tyr-Rest substituiert wird, so besitzt UCP1 eine verstärkte Entkopplungsaktivität (Gonzalez-Barroso et al., Eur. J. Biochem. 239, 445–450 (1996); Mayinger et al., Biochem. 31, 10536–10543 (1992)). Trotzdem besitzt UCP4, wie UCP2 und UCP3, einen Tyr-Rest an dieser Position. (Siehe [Fig. 3](#)). Zusätzlich dazu wurde der Carboxy-Terminus von UCP1 mit der Aktivierung seiner Entkopplungsaktivität durch freie Fettsäuren (FFA) in Verbindung gebracht. Die Substitution von Cys-305 durch den Ala- oder Ser-Rest führt entweder zu einer verringerten bzw. einer erhöhten Aktivierung durch FFA (Gonzalez-Barroso et al., s.

o.). Da UCP2 ein Ala-307 aufweist, UCP3 ein Ser-298 besitzt und UCP4 ein Ser-321 besitzt, ist die Entkoppelungsaktivität von UCP4 und der anderen UCPs wahrscheinlich auf eine andere Art und Weise durch Nucleotid und FFA reguliert.

[0155] Das menschliche UCP4-Gen wurde an die chromosomal Position 6 p11.2-q12 kartiert, die sich am nächsten zum genomischen Marker SHGC-34952 befindet.

Beispiel 2

Northern-Blot-Analyse

[0156] Die Expression von UCP4-mRNA in menschlichen Geweben wurde mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Menschliche RNA-Blots wurden an eine 1-Kilobase-³²P-markierte DNA-Sonde hybridisiert, basierend auf der UCP4-cDNA voller Länge; die Sonde wurde durch Verdau von pcDNA3UCP4 und Reinigung des UCP4-cDNA-Inserts erzeugt. Der menschliche Erwachsenen-RNA-Blot MTN-II (Clontech) ([Fig. 4A](#), [Fig. 4B](#), [Fig. 4D](#), [Fig. 4E](#) und [Fig. 4F](#)), der menschliche Fötalgewebe-Blot ([Fig. 4D](#) und [Fig. 4H](#)), PBLs ([Fig. 4B](#) und [Fig. 4D](#)), sowie Krebszellen ([Fig. 4C](#)) wurden mit den DNA-Sonden inkubiert. Wie in [Fig. 4C](#) gezeigt wird, umfassten die sondierten Krebszellen HL-60 (Promyelozytenleukämie), HeLa-Zellen, K562 (chronische myeloische Leukämie), MOLT-4 (Lymphoblasten-Leukämie), Raji (Burkitt-Lymphom), SW480 (kolorektales Adenokarzinom), A549 (Lungenkarzinom), sowie G361 (Melanom). Die Expression von UCP2 wurde auch durch Sondieren eines menschlichen multiplen Gehirngewebe-Blots mit menschlicher UCP2-cDNA untersucht. ([Fig. 4G](#)). Alle Blots wurden anschließend mit einer β-Actin-cDNA sondiert.

[0157] Northern-Analyse wurde den Anweisungen des Herstellers gemäß (Clontech) durchgeführt. Die Blots wurden nach Übernacht-Exposition gegenüber einem Röntgenfilm entwickelt.

[0158] Wie in den [Fig. 4A–Fig. 4H](#) dargestellt wurden UCP4-mRNA-Transkripte detektiert. Die Expression war in Gehirngeweben, im Rückenmark, in der Medulla, im Corpus callosum und in der Substantia nigra zu sehen, jedoch nicht in den anderen untersuchten menschlichen Geweben oder Krebszelllinien. Obwohl das UCP4-Transkript-Ausmaß in Gehirngeweben höher war als im Rückenmark, in der Medulla, im Corpus callosum und in der Substantia nigra ([Fig. 4A](#), [Fig. 4E](#) und [Fig. 4F](#)), waren die UCP2-Transkript-Level im Rückenmark und in der Medulla höher ([Fig. 4G](#)). Im menschlichen Fötalgewebe-Blot wurde das UCP4-Transkript nur im Gehirn detektiert ([Fig. 4H](#)).

Beispiel 3

Verwendung von UCP4 als Hybridisierungssonde

[0159] Das folgende Verfahren beschreibt die Verwendung einer Nucleotidsequenz, die für UCP4 kodiert, als Hybridisierungssonde.

[0160] DNA, welche die kodierende Sequenz von UCP4 voller Länge oder von reifem UCP4 umfasst (wie in [Fig. 2](#), Seq.-ID Nr. 2 dargestellt), wird als Sonde zum Screening auf homologe DNAs (wie z. B. jene, die für natürlich vorkommende Varianten von UCP4 kodieren) in menschlichen Gewebe-cDNA-Bibliotheken oder menschlichen genomischen Gewebe-Bibliotheken verwendet.

[0161] Die Hybridisierung sowie das Waschen der Filter, die beide Bibliotheks-DNAs enthalten, wird unter den folgenden Bedingungen hoher Stringenz durchgeführt. Die Hybridisierung der radiomarkierten, von UCP4 abstammenden Sonde an die Filter wird in einer Lösung von 50% Formamid, 5 × SSC, 0,1% SDS, 0,1% Natriumpyrophosphat, 50 mM Natriumphosphat, pH 6,8, 2 × Denhardt-Lösung und 10% Dextranulfat bei 42°C für eine Zeitspanne von 20 Stunden durchgeführt. Das Waschen der Filter wird in einer wässrigen Lösung von 0,1 × SSC und 0,1% SDS bei 42°C durchgeführt.

[0162] DNAs mit einer gewünschten Sequenzidentität mit der DNA, die für das Nativsequenz-UCP4 voller Länge kodiert, können anschließend unter Anwendung von Standardverfahren, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, identifiziert werden.

Beispiel 4

Expression von UCP4 in E. coli

[0163] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung von UCP4 durch rekombinante Expression in E. coli.

[0164] Die DNA-Sequenz, die für UCP4 kodiert (Seq.-ID Nr. 2), wird anfänglich unter Verwendung ausgewählter PCR-Primer amplifiziert. Die Primer sollten Restriktionsenzymstellen enthalten, die den Restriktionsenzymstellen auf dem ausgewählten Expressionsvektor entsprechen. Es kann eine Reihe von Expressionsvektoren verwendet werden. Ein Beispiel eines geeigneten Vektors ist pBR322 (stammt von E. coli ab; siehe Bolivar et al., Gene 2, 95 (1977)), das Gene für eine Ampicillin- und Tetrazyklin-Resistenz enthält. Der Vektor wird mit Restriktionsenzym verdaut und dephosphoryliert. Die PCR-amplifizierten Sequenzen werden anschließend in den Vektor ligiert. Der Vektor umfasst gegebenenfalls Sequenzen, die für ein Antibiotika-Resistenzgen kodieren, für einen trp-Promotor, einen Polyhis-Leader (umfassend die ersten sechs STII-Codons, die Polyhis-Sequenz und die Enterokinase-Spaltstelle), die für UCP4 kodierende Region, den λ -Transkriptionsterminator, sowie ein argU-Gen.

[0165] Das Ligationsgemisch wird anschließend verwendet, um einen ausgewählten E.-coli-Stamm unter Verwendung der in Sambrook et al., s. o., beschriebenen Verfahren zu transformieren. Transformanten werden durch ihre Fähigkeit, sich auf LB-Platten zu vermehren, identifiziert und anschließend werden antibiotikaresistente Kolonien selektiert. Plasmid-DNA kann isoliert und mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

[0166] Ausgewählte Klone können über Nacht in Flüssigkulturmischung, wie z. B. mit Antibiotika ergänzter LB-Brühe, gezüchtet werden. Die Übernacht-Kultur kann anschließend verwendet werden, um eine Kultur größerer Maßstabs zu beimpfen. Die Zellen werden anschließend auf eine gewünschte optische Dichte gezüchtet, während dessen der Expressionspromotor eingeschaltet wird.

[0167] Nach dem Züchten der Zellen für eine Zeitspanne von mehreren weiteren Stunden können die Zellen mittels Zentrifugation geerntet werden. Falls keine Signalsequenz vorhanden ist und das exprimierte UCP4 intrazellulär ist, so kann das durch die Zentrifugation erhaltene Zellpellet unter Verwendung verschiedener, nach dem Stand der Technik bekannter Mittel solubilisiert werden, und das solubilisierte UCP4-Protein kann anschließend unter Verwendung einer metallchelatisierenden Säule unter Bedingungen, die eine enge Bindung des Proteins ermöglichen, gereinigt werden. Falls eine Signalsequenz vorhanden ist, so kann das exprimierte UCP4 aus dem Periplasma der Zelle oder dem Kulturmischung erhalten werden. Die Extraktion und/oder Solubilisierung der UCP4-Polypeptide kann unter Verwendung von Mitteln oder Verfahren, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, durchgeführt werden (siehe z. B. US-Patent Nr. 5.663.304; 5.407.810).

Beispiel 5

Expression von UCP4 in Säugetierzellen

[0168] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung von UCP4 mittels rekombinanter Expression in Säugetierzellen.

[0169] Der Vektor pRK5 (siehe EP 307.247, veröffentlicht am 15. März 1989) wird als Expressionsvektor verwendet. Gegebenenfalls wird die UCP4-DNA mit ausgewählten Restriktionsenzymen in pRK5 ligiert, um die Insertion der UCP4-DNA unter Anwendung von Ligationsverfahren, wie von Sambrook et al., s. o., beschrieben, zu ermöglichen. Der resultierende Vektor wird pRK5-UCP4 genannt.

[0170] In einer Ausführungsform können die ausgewählten Wirtszellen 293-Zellen sein. Menschliche 293-Zellen (ATCC CRL 1573) werden bis zur Konfluenz in Gewebekulturmischungen in Medium, wie z. B. DMEM, ergänzt mit fötalem Kälberserum und gegebenenfalls Nährstoffkomponenten und/oder Antibiotika, gezüchtet. Etwa 10 μ g pRK5-UCP4-DNA werden mit etwa 1 μ g DNA, die für das VA-RNA-Gen kodiert, vermischt (Thimmappaya et al., Cell 31, 543 (1982)) und in 500 μ l 1-mM-Tris-HCl, 0,1-mM-EDTA, 0,227-M-CaCl₂ aufgelöst. Zu diesem Gemisch werden 500 μ l 50-mM-HEPES (pH 7,35), 280-mM-NaCl, 1,5-mM-NaPO₄ zugetropft, und es wird ein Niederschlag bei 25°C über eine Zeitspanne von 10 Minuten bilden gelassen. Der Niederschlag wird suspendiert, zu den 293-Zellen hinzugefügt und für etwa vier Stunden bei 37°C absetzen gelassen. Das Kulturmischung wird abgesaugt, und 2 ml von 20% Glycerin in PBS werden über eine Zeitspanne von 30 Sekunden hinweg hinzugefügt. Die 293-Zellen werden anschließend mit serumfreiem Medium gewaschen, frisches Medium wird

hinzugefügt, und die Zellen werden für etwa 5 Tage inkubiert.

[0171] Etwa 24 Stunden nach den Transfektionen wird das Kulturmedium entfernt und durch Kulturmedium (alleine) ersetzt oder mit Kulturmedium, das 200 μ Ci/ml 35 S-Cystein und 200 μ Ci/ml 35 S-Methionin enthält. Nach einer 12-Stunden-Inkubation wird das konditionierte Medium gesammelt, auf einem Spin-Filter konzentriert und auf ein 15% SDS-Gel geladen. Das verarbeitete Gel kann getrocknet werden und für eine ausgewählte Zeitspanne damit ein Film belichtet werden, um die Gegenwart von UCP4-Polypeptid aufzuzeigen. Die Kulturen, die transfizierte Zellen enthalten, können einer weiteren Inkubation (in serumfreiem Medium) unterzogen werden, und das Medium wird in ausgewählten Biotests getestet.

[0172] In einem Alternativverfahren kann UCP4 vorübergehend in 293-Zellen unter Verwendung des Dextransulfat-Verfahrens eingeführt werden, das von Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 12, 7575 (1981), beschrieben wurde. 293-Zellen werden in einer Spinner-Flasche bis zur maximalen Dichte vermehren gelassen, und es werden 700 μ g pRK5-UCP4-DNA hinzugefügt. Die Zellen werden zuerst aus der Spinner-Flasche mittels Zentrifugation konzentriert und mit PBS gewaschen. Das DNA-Dextran-Präzipitat wird auf dem Zellpellet vier Stunden lang inkubiert. Die Zellen werden mit 20% Glycerin 90 Sekunden lang behandelt, mit Gewebekultur-Medium gewaschen und erneut in die Spinner-Flasche, enthaltend Gewebekultur-Medium, 5 μ g/ml Rinderinsulin und 0,1 μ g/ml Rinder-Transferrin, gefüllt. Nach etwa vier Tagen wird das konditionierte Medium zentrifugiert und filtriert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die Probe, die exprimiertes UCP4 enthält, kann anschließend konzentriert werden und nach einem beliebigen, ausgewählten Verfahren, wie z. B. Dialyse und/oder Säulenchromatographie, gereinigt werden.

[0173] In einer anderen Ausführungsform kann UCP4 in CHO-Zellen exprimiert werden. Das pRK5-UCP4 kann in CHO-Zellen unter Verwendung bekannter Reagenzien, wie z. B. CaPO₄ oder DEAE-Dextran, transfiziert werden. Wie oben stehend beschrieben können die Zellkulturen inkubiert werden, und das Medium durch Kulturmedium (alleine) oder mit Medium, das eine Radiomarkierung, wie z. B. 35 S-Methionin, enthält, ersetzt werden. Nach der Bestimmung der Gegenwart von UCP4-Polypeptid kann das Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt werden. Die Kulturen werden vorzugsweise für etwa 6 Tage inkubiert, und anschließend wird das konditionierte Medium geerntet. Das Medium, welches das exprimierte UCP4 enthält, kann anschließend durch ein beliebiges ausgewähltes Verfahren konzentriert und gereinigt werden.

[0174] Epitopmarkiertes UCP4 kann auch in Wirts-CHO-Zellen exprimiert werden. Das UCP4 kann aus dem pRK5-Vektor subkloniert werden. Das Subklon-Insert kann einer PCR unterzogen werden, um es im Rahmen mit einer ausgewählten Epitopmarkierung, wie z. B. einer Poly-his-Markierung, in einen Baculovirus-Expressionsvektor zu fusionieren. Das poly-his-markierte UCP4-Insert kann anschließend in einen SV40-gesteuerten Vektor subkloniert werden, der einen Selektionsmarker, wie z. B. DHFR, zur Selektion stabiler Klone enthält. Schließlich können die CHO-Zellen (wie oben beschrieben) mit dem SV40-gesteuerten Vektor transfiziert werden. Die Markierung kann wie oben beschrieben durchgeführt werden, um die Expression zu verifizieren. Das Kulturmedium, welches das exprimierte poly-His-markierte UCP4 enthält, kann anschließend durch ein beliebiges ausgewähltes Verfahren konzentriert und gereinigt werden, wie z. B. durch Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie.

[0175] In einem Alternativverfahren kann das UCP4 intrazellulär exprimiert werden (wenn keine Signalsequenz verwendet wird). Diese intrazelluläre Expression und die darauf folgende Extraktion oder Solubilisierung und Reinigung kann unter Anwendung von Verfahren und Reagenzien, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, durchgeführt werden.

Beispiel 6

Expression von UCP4 in Hefe

[0176] Das folgende Verfahren beschreibt die rekombinante Expression von UCP4 in Hefe.

[0177] Zuerst werden Hefe-Expressionsvektoren zur intrazellulären Produktion oder Sekretion von UCP4 aus dem ADH2/GAPDH-Promotor konstruiert. DNA, die für UCP4 und den Promotor kodiert, wird in geeignete Restriktionsenzymstellen im ausgewählten Plasmid insertiert, um die intrazelluläre Expression von UCP4 zu steuern. Zur Sekretion kann für UCP4 kodierende DNA zusammen mit DNA, die für den ADH2/GAPDH-Promotor kodiert, einem nativen UCP4-Signalpeptid oder einem anderen Säugetier-Signalpeptid oder z. B. einem Hefe- α -Faktor oder einer Invertase-Sekretions-Signal/Leader-Sequenz und Linker-Sequenzen (falls benötigt) zur Expression von UCP4 in das selektierte Plasmid kloniert werden. Alternativ dazu wird die native Signalsequenz

von UCP4 verwendet.

[0178] Hefe-Zellen, wie z. B. der *S.-cerevisiae*-Hefe-Stamm AB110, kann anschließend mit den oben beschriebenen Expressionsplasmiden transformiert werden und in ausgewählten Fermentationsmedien, wie sie z. B. im US-Patent Nr. 4.775.662 und 5.010.00 dargelegt sind, gezüchtet werden. Die transformierten Hefe-Überstände können mittels Präzipitation mit 10% Trichloressigsäure und Trennung durch SDS-PAGE analysiert werden, gefolgt von einer Färbung der Gele mit Coomassie-Blau-Farbstoff.

[0179] Rekombinantes UCP4 kann anschließend durch Entfernen der Hefe-Zellen aus dem Fermentationsmedium mittels Zentrifugation und darauf folgenden Konzentrierens des Mediums unter Verwendung ausgewählter Kartuschenfilter isoliert und gereinigt werden. Das UCP4 enthaltende Konzentrat kann weiters unter Verwendung ausgewählter Säulenchromatographie-Harze gereinigt werden. In einem Alternativverfahren kann das UCP4 intrazellulär exprimiert werden (wenn keine Signalsequenz verwendet wird). Die intrazelluläre Expression und die darauf folgende Extraktion oder Solubilisierung sowie die Reinigung können unter Verwendung von Verfahren und Reagenzien, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, durchgeführt werden.

Beispiel 7

Expression von UCP4 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

[0180] Das folgende Verfahren beschreibt die rekombinante Expression von UCP4 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

[0181] Die Sequenz, die für UCP4 kodiert, wird stromauf einer Epitopmarkierung, die in einem Expressionsvektor enthalten ist, fusioniert. Solche Epitopmarkierungen umfassen Poly-his-Markierungen und Immunglobulin-Markierungen (wie Fc-Regionen von IgG). Es kann eine Reihe an Plasmiden verwendet werden, unter anderem Plasmide, die von im Handel erhältlichen Plasmiden, wie z. B. pVL1393 (Novagen), abstammen. Kurz gesagt, wird die für UCP4 kodierende Sequenz oder der gewünschte Abschnitt der kodierenden Sequenz von UCP4 mittels PCR mit Primern amplifiziert, die zu den 5'- und 3'-Regionen komplementär sind. Der 5'-Primer kann flankierende (ausgewählte) Restriktionsenzymstellen enthalten. Das Produkt wird anschließend mit jenen ausgewählten Restriktionsenzymen verdaut und in den Expressionsvektor subkloniert. Der Vektor kann die native Signalsequenz für UCP4 enthalten, falls die Sekretion gewünscht wird.

[0182] Rekombinantes Baculovirus wird durch Co-Transfektion des oben genannten Plasmids und sowie von BaculoGold™-Virus-DNA (Pharmingen) in *Spodoptera-frugiperda*-("Sf9")-Zellen (ATCC CRL 1711) unter Verwendung von Lipofectin (im Handel bei GIBCO-BRL erhältlich) erzeugt. Nach 4 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C werden die freigesetzten Viren geerntet und für weitere Amplifikationen verwendet. Virale Infektion und Protein-Expression werden wie von O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A Laborstory Manual*, Oxford University Press, Oxford (1994), beschrieben, durchgeführt.

[0183] Exprimiertes poly-his-markiertes UCP4 kann anschließend folgendermaßen z. B. durch Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Extrakte werden aus rekombinanten virusinfizierten Sf9-Zellen erzeugt, wie von Rupert et al., *Nature* 362, 175–179 (1993), beschrieben. Kurz gesagt, werden die Sf9-Zellen gewaschen, in Beschallungspuffer (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% NP-40; 0,4 M KCl) resuspendiert und zwei Mal für eine Zeitspanne von 20 Sekunden auf Eis beschallt. Die Sonikate werden mittels Zentrifugation geklärt und der Überstand wird 50fach in Ladepuffer (50 mM Phosphat, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 7,8) verdünnt und durch ein 0,45-Mikron-Filter filtriert. Eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule (im Handel bei Qiagen erhältlich) wird mit einem Bettvolumen von 5 ml hergestellt, mit 25 ml Wasser gewaschen und mit 25 ml Ladepuffer äquilibriert. Der filtrierte Zelleextrakt wird mit 0,5 ml pro Minute auf die Säule geladen. Die Säule wird bis zur Grundlinien-A₂₈₀ mit Ladepuffer gewaschen, jenem Zeitpunkt, zu dem mit der Fraktionsabnahme begonnen wird. Als nächstes wird die Säule mit einem sekundären Waschpuffer gewaschen (50 mM Phosphat; 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 6,0), der gebundenes Protein nicht spezifisch eluiert. Nach dem erneuten Erreichen der A₂₈₀-Grundlinie wird die Säule mit einem 0- auf 500-mM-Imidazol-Gradienten im sekundären Waschpuffer entwickelt. Ein-ml-Fraktionen werden abgenommen und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung oder Western-Blot analysiert, wobei Ni²⁺-NTA an alkalische Phosphatase (Qiagen) konjugiert ist. Fraktionen, die das eluierte His₁₀-markierte UCP4 enthalten, werden gepoolt und gegen Ladepuffer dialysiert.

[0184] Alternativ dazu kann die Reinigung des IgG-markierten (oder Fc-markierten) UCP4 unter Verwendung bekannter Chromatographieverfahren, umfassend z. B. Protein-A- oder Protein-G-Säulen-Chromatographie,

durchgeführt werden.

Beispiel 8

Messung der durch UCP4 induzierten Mitochondrienmembranpotential-Änderung

[0185] Es wurden Tests durchgeführt, um die Wirkungen der UCP4-Expression auf das Mitochondrienmembranpotential zu bestimmen.

[0186] Menschliche Embryo-Nieren-293-Zellen (ATCC CRL 1573) wurden in Kulturmedium (DMEM, 10% fötale Rinderserum, 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 Mikrogramm/ml Streptomycin) bis zu einer Konfluenz von 60% bis 80% in 6-Well-Platten gezüchtet und vorübergehend unter Verwendung von FuGene™-6-Transfektions-Reagens (Boehringer Mannheim; gemäß den Angaben des Herstellers) mit UCP-exprimierenden Konstrukten (pcDNA3UCP4 oder pcDNA3UCP3), UCP-exprimierenden Konstrukten mit einer NH₂-terminalen Flag-Markierung (pcDNA3-Flag-UCP4 oder pcDNA3Flag-UCP3) oder einer Vektorsteuerung (pcDNA3; erhältlich bei Invitrogen) transfiziert.

[0187] Die Expressionskonstrukte für cDNA, die für UCP4 mit oder ohne NH₂-terminale Flag-Markierung kodiert, wurden Beispiel 1 gemäß hergestellt. Die Expressionskonstrukte für cDNA, die für UCP3 kodiert, wurden mittels PCR zuerst durch Erhalten von cDNA, die für menschliches UCP3 kodiert, aus einer Melanom-cDNA-Bibliothek hergestellt. PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-) wurden synthetisiert:

Vorwärts-PCR-Primer GCGAAGCTTGCATGGTTGACTGAAGCCTCAGA (U301) (Seq.-ID Nr. 7)

Rückwärts-PCR-Primer CGCGAATTCTCAAAACGGTGATTCCCGTAACAT (U302) (Seq.-ID Nr. 8)

[0188] Das Expressionskonstrukt für cDNA, die für UCP3 mit einer NH₂-terminalen Flag-Markierung kodiert, wurde durch die folgenden PCR-Primer hergestellt.

Vorwärts-PCR-Primer GCGAAGCTTGCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAG GTTGGACTGAAG-CCTTCAGACG (U303) (Seq.-ID Nr. 9)

Rückwärts-PCR-Primer CGCGAATTCTCAAAACGGTGATTCCCGTAACAT (U302) (Seq.-ID Nr. 8)

[0189] UCP3 wurde mit oder ohne der NH₂-terminalen Flag-Markierung in pcDNA3 (pcDNA-3UCP3 und pcDNA3-Flag-UCP3) zwischen HindIII- und EcoRI-Stellen kloniert und durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Flag-markiertes UCP3 und UCP4, das in 293-Zellen exprimiert wurde, wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines monokonalen Anti-Flag-M2-Antikörpers (Kodak) sowie eines ECL-Detektionssets (Pierce) detektiert.

[0190] Das mitochondriale Membranpotential wurde nach Verfahren, die nach dem Stand der Technik bekannt sind, analysiert (Salvioli et al., FEBS Lett. 411, 77–82 (1997); Smiley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3671–3675 (1991)). Etwa 24–36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und $1,5 \times 10^6$ wurden mittels Zentrifugation pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 0,5 ml einer JC-1-Farblösung resuspendiert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 50 µm CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazone; Sigma) im Dunklen für eine Zeitspanne von 30 Minuten bei 37°C inkubiert. JC-1 (5,5',6,6'-Tetra-chlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid; Molecular Probes, Eugene, OR) ist ein membranpotentialempfindlicher fluoreszierender Farbstoff. Um die Farbstofflösung herzustellen, wurde JC-1 zuerst als Stammlösung in Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) in einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt. Die Stammlösung wurde auf 1 mg/ml mit DMSO verdünnt und anschließend weiter mit Kulturmedium, das auf 37°C vorwärmte, auf 10 µg/ml verdünnt und durch sowohl 45-µm- als auch durch, 2-µm-Filter filtriert, um aggregiertes JC-1 auszuschließen.

[0191] Die gefärbten Zellen wurden gewaschen und in 1,0 ml Kulturmedium resuspendiert. Die in Kulturmedium resuspendierten Zellen wurden mittels Spektralfluorometrie (RF5000U Spektralfluorophotometer; SHIMADZU, Japan) untersucht. Eine Untergruppe an Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (Coulter EPICS Elite ESP, Hialeah, FL). Bei spektralfluorometrischer Analyse erfolgte die Anregung bei 488 nm, und die Emission wurde bei 525 nm und 590 nm gemessen. Die Durchflusszytometrie-Analyse wurde mit einem Argon-Laser mit nur 488 nm zur Anregung durchgeführt, wobei ein Filter 525 ± 20 nm im FL1-Kanal überträgt und ein Filter über 590 nm im FL2-Kanal überträgt. Ein Minimum von 10.000 Zellen pro Probe wurde analysiert.

[0192] Es wurde auch eine statistische Analyse durchgeführt. Die durchschnittlichen Verhältnisse von roten (593 nm) gegenüber grünen (532 nm) Fluoreszenzintensitäts-Peakwerten der Spektralfluorometrie wurden

zwischen den Behandlungen verglichen. Es gab neun unabhängige Transfektionen pro Behandlung. Unterschiede wurden unter Verwendung des geschützten geringsten signifikanten Unterschieds nach Fisher analysiert.

[0193] Die Resultate werden in [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) veranschaulicht. Die Expression von UCP3 in den 293-Zellen reduzierte das Fluoreszenzpeak-Werteverhältnis (593λ/532λ) um etwa 15% (n = 3) im Vergleich zu jenem der kontrolltransfizierten Vektor-Zellen, was eine Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials zeigt ([Fig. 5A](#)). In den mit UCP4 transfizierten Zellen verringerte sich die Fluoreszenzintensität, die eine Reduktion des Membranpotentials anzeigt, um 19% (n = 6) im Vergleich zu jener der kontrolltransfizierten Vektor-Zellen ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Die NH₂-terminale Flag-Markierung zeigte keine Auswirkung auf die Aktivität von UCP3 oder UCP4.

[0194] Eine FACS-Analyse zeigte ebenfalls eine ähnliche Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials. In der FACS-Analyse fielen die integrierten Rot/grün-Intensitätsverhältnisse um 18% bei UCP3-transfizierten Zellen und um 24% bei UCP4-transfizierten Zellen. Zellen, die mit dem chemischen Entkoppler, CCCP, behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine Reduktion des Rotgrün-Intensitätsverhältnisses ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)).

[0195] Diese Daten zeigen, dass UCP4 wie UCP3 Entkopplungsaktivität besitzt.

Beispiel 9

Herstellung von Antikörpern, die UCP4 binden

[0196] Dieses Beispiel veranschaulicht die Herstellung monoklonaler Antikörper, die spezifisch UCP4 binden können.

[0197] Verfahren zur Produktion der monoklonalen Antikörper sind nach dem Stand der Technik bekannt und werden z. B. von Goding, s. o., beschrieben. Immunogene, die verwendet werden können, umfassen gereinigtes UCP4, Fusionsproteine, die UCP4 enthalten, sowie Zellen, die rekombinantes UCP4 auf der Zelloberfläche exprimieren.

[0198] Die Auswahl des Immunogens kann vom Fachmann ohne übermäßiges Experimentieren durchgeführt werden.

[0199] Mäuse, wie z. B. Balb/c, werden mit dem UCP4-Immunogen immunisiert, das in vollständigem Freund-Adjuvans emulgiert und subkutan oder intraperitoneal in einer Menge von 1–100 Mikrogramm injiziert wurde. Alternativ dazu wird das Immunogen in MPL-TDM-Adjuvans emulgiert (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) und in den Ballen der Hinterpfoten des Tiers injiziert. Die immunisierten Mäuse erhalten anschließend 10 bis 12 Tage später mit zusätzlichem Immunogen, das in ausgewähltem Adjuvans emulgiert wurde, eine Booster-Dosis. Danach können die Mäuse auch für eine Zeitspanne von mehreren Wochen mit zusätzlichen Immunisierungsinjektionen geboostet werden. Serumproben können periodisch durch retroorbitale Blutabnahme zum Testen in ELISA-Tests von den Mäusen erhalten werden, um Anti-UCP4-Antikörper zu detektieren.

[0200] Nachdem ein geeigneter Antikörper-Titer detektiert wurde, können jene Tiere, die "positiv" auf Antikörper getestet wurden, eine abschließende intravenöse Injektion von UCP4 erhalten. Drei bis vier Tage später werden die Mäuse getötet, und es werden die Milzzellen geerntet. Die Milzzellen werden anschließend (unter Verwendung von 35% Polyethylenglykol) an eine ausgewählte murine Myelom-Zelllinie, wie z. B. P3X63AgU.1, erhältlich unter der ATCC-Nr. CRL 1597, fusioniert. Die Fusionen erzeugen Hybridom-Zellen, die anschließend in 96-Well-Gewebekulturplatten, enthaltend HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin), ausplattiert werden können, um die Proliferation von nicht fusionierten Zellen, Myelom-Hybridnen und Milzzellen-Hybridnen zu inhibieren.

[0201] Die Hybridom-Zellen werden in einem ELISA-Test auf Reaktivität gegen UCP4 gescreent. Die Bestimmung "positiver" Hybridom-Zellen, welche die gewünschten monoklonalen Antikörper gegen UCP4 sekretieren, ist nach dem Stand der Technik möglich.

[0202] Die positiven Hybridom-Zellen können intraperitoneal in syngenetische Balb/c-Mäuse injiziert werden, um Ascites zu erzeugen, welche die monoklonalen Anti-UCP4-Antikörper produzieren. Alternativ dazu können die Hybridom-Zellen in Gewebekulturflaschen oder in Rollflaschen gezüchtet werden. Die Reinigung der in den

Ascites produzierten monoklonalen Antikörper kann unter Verwendung von Ammoniumsulfat-Präzipitation, gefolgt von Gelausschlusschromatographie erreicht werden. Alternativ dazu kann Affinitätschromatographie, basierend auf der Bindung des Antikörpers an Protein A oder Protein G verwendet werden.

Beispiel 10

Subzelluläre Lokalisierung

[0203] Um die subzelluläre Position von UCP4 zu untersuchen, wurden menschliche Brustkarzinom-MCF7-Zellen (ATCC HTB 22) entweder mit pcDNA3-Flag-UCP3 (hergestellt nach Beispiel 8) oder pcDNA3-Flag-UCP4 (hergestellt nach Beispiel 1) unter Verwendung von FuGene-Transfektionsreagens (Boehringer Mannheim) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in 3% Formaldehyd bei Raumtemperatur 15 Minuten lang fixiert und mit 1% TritonX-100 15 Minuten lang durchlässig gemacht. Die Zellen wurden mit monoklonalem Anti-Flag-Antikörper (10 µg/ml; Kodak) und Anti-Cytochrom-C-Oxidase-Antikörper (einem mitochondrialen Marker) (3 ng/ml) 20 Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit Cy3-konjugierten (Esel-Anti-Maus; Jackson Laborstories) und FITC-konjugierten (Esel-Anti-Kaninchen, Jackson Laborstories) Sekundärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

[0204] Die [Fig. 6A–Fig. 6F](#) zeigen, dass UCP3 und UCP4 mit dem mitochondrialen Marker colokalisiert wurden.

Beispiel 11

Expression von UCP4-mRNA in Mäusen, die Nahrungs- und Temperaturbelastung ausgesetzt waren

[0205] Um zu evaluieren, ob UCP4 in situ Entkopplungsaktivität besitzt, die für den Stoffwechsel von Bedeutung ist, wurde die Menge an UCP4-mRNA bestimmt, die in Geweben von Mäusen produziert wurde, die Nahrungs- und Temperaturbelastung, d. h. metabolischen Herausforderungen, ausgesetzt waren. In Abhängigkeit von der Rolle, die UCP4 im Stoffwechsel spielen kann, kann die Menge an UCP4-mRNA, die in einem Gewebe produziert wird, mit Belastungen gegenüber dem Stoffwechsel, wie z. B. Fäste, Fettkonsum, sowie dem Aussetzen gegenüber Temperaturen unterhalb von Raumtemperatur, variieren.

[0206] Die Mäuse in dieser Studie erhielten nach Belieben normales Nagetier-Futter (Purina Nagetier-Futter 5010; Purina, St. Louis, MO) und Wasser, falls nicht anders angegeben. Die Art der untersuchten Mäuse variierte in Abhängigkeit von dem für die Herausforderung des Stoffwechsels der untersuchten Maus verwendeten Zustand und wird unten beschrieben.

[0207] Allgemein wurden die untersuchten Mäuse 12 Stunden pro Tag von 6:00 morgens bis 6:00 abends gegenüber Licht ausgesetzt, jenem Zeitpunkt, zu dem sie für die folgenden 12 Stunden gegenüber Dunkelheit ausgesetzt wurden.

[0208] Die Mäuse wurden kurz vor der Gewebeernte, die am Morgen zwischen 8:00 und 12:00 morgens stattfand, durch CO₂ getötet, falls nicht anders angegeben wird. Die Gewebe wurden geerntet und es wurde vollständige Gewebe-RNA unter Verwendung von Reagenzien und Arbeitsvorschriften von Biotecx Lab, Houston, TX, hergestellt. Obwohl jeder Maus eine Reihe an Geweben entnommen wurde, befasste sich die Studie mit der Messung des Vorkommens von UCP4-mRNA im Gehirn (da das Gehirn eine hohe UCP4-Genexpression aufweist). Es wurden in den Studien zumindest 5 Mäuse/Behandlung verwendet.

[0209] Es wurde eine quantitative Reverse-transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet, um die Menge an UCP4-mRNA in den geernteten Geweben zu bestimmen. Die RT-PCR wurde unter Verwendung von mRNA-Proben durchgeführt. (Neid et al., Genome Research 6, 986–994 (1996); Gibson et al., Genome Research 6, 995–1001 (1996)). Allgemein wurden für die Durchführung der quantitativen RT-PCR für UCP4 spezifische Primer und Sonden verwendet (TaqMan Instrument, PE Biosciences, Foster City, Kalifornien). Die Werte wurden für die mRNA-Beladung unter Verwendung des β-Actin-mRNA-Vorkommens als Beladungskontrolle korrigiert. Es wurden die folgenden Primer und Sonden verwendet:

Für UCP4:

Vorwärts-Primer: 5'AAT GCC TAT CGC CGA GGA G3' (Seq.-ID Nr. 10);

Rückwärts-Primer: 5'GTA GGA ACT TGC TCG TCC GG3' (Seq.-ID Nr. 11);

Sonde: 5'(FAM) TGC TCG CGC TCA CGC AGA GAT G (Seq.-ID Nr. 12) (TAMARA)3'.

Für β -Actin:

Vorwärts-Primer: 5'GAA ATC GTG CGT GAC ATC AAA GAG3' (Seq.-ID Nr. 13);

Rückwärts-Primer: 5'CTC CTT CTG CAT CCT GTC AGC AA3' (Seq.-ID Nr. 14);

Sonde: 5'(FAM)CGG TTC CGA TGC CCT GAG GCT C (Seq.-ID Nr. 15) (TAMARA)3'

Wirkung von Nahrungsmittelaufnahme auf die UCP4-mRNA-Expression

[0210] In einer ersten Studie wurden sieben Wochen alte, männliche Mäuse (C57BL/6J; Bar Harbor, ME) untersucht, um die Wirkung von Fasten und Nahrungsaufnahme auf die UCP4-mRNA-Produktion bei den untersuchten Mäusen zu evaluieren. Die Mäuse wurden im Alter von sechs Wochen erworben und wurden im Alter von sieben Wochen nach dem Zufallsprinzip einer von drei Gruppen zugewiesen: Kontrollmäuse, die nach Belieben gefüttert wurden, Mäuse, die 24 Stunden lang keine Nahrung erhielten, sowie Mäuse, die 24 Stunden lang keine Nahrung erhielten und anschließend 24 Stunden lang nach Belieben gefüttert wurden.

[0211] Die Mäuse wurden wie oben beschrieben getötet, nachdem die erste Gruppe nach Belieben Futter erhalten hatte, nachdem die zweite Gruppe 24 Stunden lang keine Nahrung erhalten hatte und nachdem die dritte Gruppe 48 Stunden lang zuerst keine Nahrung und anschließend nach Belieben Futter erhalten hatte. Die Gewebe wurden gewonnen wie oben beschrieben.

[0212] Die quantitative RT-PCR wurde für das Gehirngewebe gemäß den oben angeführten Verfahren durchgeführt, und die Menge an UCP4-mRNA, die im Gehirn produziert wurde, wurde quantifiziert. Statistische Unterschiede in den Gruppen wurden unter Verwendung der geschützten Analyse der geringsten signifikanten Unterschiede nach Fisher bestimmt (L. Ott, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 3. Auflage, PWS-Kent Publishing Co., Boston (1988)). Die Daten, die in den **Fig. 8A bis 8C** dargestellt sind, stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

[0213] **Fig. 8A** zeigt das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von Mäusen, die 24 Stunden lang nach Belieben gefüttert wurden. **Fig. 8B** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von Mäusen, die keine Nahrung erhielten. **Fig. 8C** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von Mäusen, die 24 Stunden lang keine Nahrung erhielten und anschließend 24 Stunden lang nach Belieben gefüttert wurden.

[0214] Typischerweise verringern Fasten und eine Beschränkung der Nahrungsaufnahme den Stoffumsatz, was zeigt, dass sich die Expression von UCP4-mRNA bei Mäusen, die keine Nahrung erhielten, im Vergleich zu Mäusen, die nach Belieben gefüttert wurden, verringerte. Trotzdem zeigt **Fig. 8B** keine Verringerung der UCP4-mRNA-Expression im Gehirngewebe der Mäuse, die keine Nahrung erhielten im Vergleich zu den Mäusen, die nach Belieben gefüttert wurden, wie in **Fig. 8A** dargestellt.

Wirkung des Fettkonsums auf die UCP4-mRNA-Expression

[0215] In einer zweiten Studie wurden vier Wochen alte, männliche Mäuse (A/J oder C57BL/6J; Jackson Labs, Bar Harbor, ME) untersucht, um bei den untersuchten Mäusen die Wirkung einer Ernährung mit hohem und niedrigem Fettgehalt auf die UCP4-mRNA-Produktion zu untersuchen. Von A/J-Mäusen wurde gezeigt, dass sie bei einer Ernährung mit hohem Fettgehalt "gegen Fettleibigkeit resistent" waren im Vergleich zu "zu Fettleibigkeit neigenden" C57BL6/J (siehe Surwit et al., s. o.). Dies kann auf eine geringere metabolische Leistungsfähigkeit im A/J-Stamm zurückzuführen sein – d. h. sie nehmen scheinbar pro aufgenommener Kalorie weniger Kalorien zu.

[0216] Die Mäuse wurden im Alter von vier Wochen erhalten und wurden sofort entweder nach einem Ernährungsplan mit geringem Fettgehalt oder nach einem Ernährungsplan mit hohem Fettgehalt ernährt (Research Diets, Inc., New Brunswick, New Jersey), die jenen nachempfunden waren, die von Surwit et al., *Metabolism* 44 (5), 645–651 (1995), formuliert wurden, enthaltend 11% bzw. 58% Fett (% Kalorien). Die Tiere wurden für etwa 3 Wochen (22–23 Tage nach Ernährungsplan) nach Belieben gefüttert. Anschließend wurden sie getötet, und ihre Gewebe wurden wie oben beschrieben geerntet. Eine quantitative RT-PCR wurde für das Gehirngewebe gemäß den oben beschriebenen Verfahren durchgeführt, und die Menge an im Gehirngewebe produzierter UCP4-mRNA wurde quantifiziert. Statistische Unterschiede in den Gruppen wurden unter Verwendung der geschützten Analyse der geringsten signifikanten Unterschiede nach Fisher bestimmt (L. Ott, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 3. Auflage, PWS-Kent Publishing Co., Boston (1988)). Die Daten, die in den **Fig. 9A bis 9D** dargestellt sind, stellen Mittelwerte \pm SEM dar.

[0217] **Fig. 9A** zeigt das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von A/J-Mäusen, die nach einem Ernährungsplan mit niedrigem Fettgehalt gefüttert wurden, und **Fig. 9B** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von A/J-Mäusen, die nach einem Ernährungsplan mit hohem Fettgehalt gefüttert wurden. **Fig. 9C** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von C57BL6/J-Mäusen, die nach einem Ernährungsplan mit niedrigem Fettgehalt gefüttert wurden, und **Fig. 9D** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen im Gehirngewebe von C57BL6/J-Mäusen, die nach einem Ernährungsplan mit hohem Fettgehalt gefüttert wurden.

Wirkung von Temperaturbelastung auf UCP4

[0218] In einer dritten Studie wurden männliche Mäuse (FVB-N; Taconic, Germantown, New York) untersucht, um die Wirkung des Aussetzens der Mäuse gegenüber Temperaturbelastung zu evaluieren. Typischerweise führt ein Aussetzen gegenüber Kälte bei Nagetieren zu einer Erhöhung des Stoffumsatzes. Dieser metabolische Anstieg kann dazu dienen, den Erhalt einer stabilen Körpertemperatur zu unterstützen. Trotzdem verringert eine Wärme-Akklimation, die als chronische Exposition gegenüber Temperaturen innerhalb der murinen thermoneutralen Zone (etwa 30–35°C) definiert ist, den Stoffumsatz (Klaus et al., Am. J. Physiol. 274, R287–R293 (1998)).

[0219] Die Mäuse in dieser Studie waren zu zweit in einem Käfig untergebracht und wurden nach dem Zufallsprinzip den folgenden Gruppen zugewiesen: einer Kontrollgruppe (bei 22°C 3 Wochen lang untergebracht), einer an Wärme akklimatisierten Gruppe (bei 33°C 3 Wochen lang untergebracht), einer Gruppe mit verringertem Nahrungsangebot (bei 22°C 3 Wochen lang untergebracht, jedoch täglich Zugang zu der durchschnittlichen Menge an Nahrung, die von den an Wärme akklimatisierten Mäusen am Tag zuvor verzehrt worden war), und einer Kälte ausgesetzten Gruppe (bei 22°C 3 Wochen lang untergebracht, bevor mit dem Aussetzen gegenüber 4°C begonnen wurde). Bei den Kälte ausgesetzten Mäusen wurden die Mäuse, beginnend am Morgen, 4°C ausgesetzt, indem sie 1, 6, 24 oder 48 Stunden vor dem Töten der Mäuse und Gewinnung der Gewebe in einem Raum mit 4°C platziert wurden.

[0220] Im Alter von sechs Wochen wurden die Mäuse getötet und die Gewebe gewonnen. Es wurde gemäß den oben definierten Verfahren eine quantitative RT-PCR für das Gehirngewebe durchgeführt, und die Menge der im Gehirn produzierten UCP4-mRNA wurde quantifiziert. Statistische Unterschiede in den Gruppen wurden unter Verwendung der geschützten Analyse der geringsten signifikanten Unterschiede nach Fisher bestimmt (L. Ott, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, 3. Auflage, PWS-Kent Publishing Co., Boston (1988)). Die Daten, die in den **Fig. 10A** bis **10G** dargestellt sind, stellen Mittelwerte +/- SEM dar. Ein Sternchen zeigt einen statistischen Unterschied von zumindest $p < 0,05$ an.

[0221] **Fig. 10A** zeigt das UCP4-mRNA-Vorkommen in der Kontrollgruppe der Mäuse. Die **Fig. 10B** bis **10E** veranschaulichen das UCP4-mRNA-Vorkommen in der Gruppe von Mäusen, die für 1, 6, 24 bzw. 48 Stunden Kälte ausgesetzt waren. **Fig. 10F** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen bei der Gruppe von Mäusen mit verringertem Nahrungsangebot, und **Fig. 10G** veranschaulicht das UCP4-mRNA-Vorkommen bei einer an Wärme akklimatisierten Gruppe von Mäusen.

[0222] Die **Fig. 10B** bis **10E** zeigen alle eine Zunahme der UCP4-mRNA-Expression bei den Kälte ausgesetzten Mäusen im Vergleich zu der in **Fig. 10A** gezeigten Kontrollgruppe. Die **Fig. 10F** und **10G** zeigen keinen ähnlichen Anstieg der UCP4-mRNA-Expression bei den Mäusen mit verringertem Nahrungsangebot bzw. den an Wärme akklimatisierten Mäusen im Vergleich zu der in **Fig. 10A** gezeigten Kontrollgruppe.

Hinterlegung von Material

[0223] Die folgenden Materialien wurden bei der American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC), hinterlegt:

Material	ATCC-Hinterlegungsnr.	Hinterlegungsdatum
DNA77568-1626	203134	18. August 1998

[0224] Diese Hinterlegung erfolgte unter den Bestimmungen des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren sowie unter den darunter fallenden Regelungen (Budapester Vertrag). Dadurch wird der Erhalt einer lebensfähigen Hinterlegungskultur für eine Zeitspanne von 30 Jahren ab dem Hinterlegungsdatum sichergestellt. Die Hinterlegung wird von der ATCC unter den Bedingungen des Budapester Vertrags verfügbar gemacht und unterliegt einem Abkom-

men zwischen Genentech, Inc. und der ATCC, das die dauerhafte und uneingeschränkte Verfügbarkeit der Nachkommenschaft der Hinterlegungskultur für die Öffentlichkeit nach der Erteilung des einschlägigen US-Patents oder nach der Offenlegung einer beliebigen US- oder ausländischen Patentanmeldung für die Öffentlichkeit sicherstellt, welche auch immer zuerst vorliegt, sowie die Verfügbarkeit der Nachkommenschaft für jemanden, der vom Präsidenten des US-Patentamts nach 35 USC '122 und den entsprechenden Bestimmungen des Präsidenten gemäß (unter anderem 37 CFR '1.14 mit besonderem Verweis auf 886 OG 638) als dazu berechtigt bestimmt wurde, sicherstellt.

[0225] Der Zessionar der vorliegenden Anmeldung hat zugestimmt, dass, sollte eine Kultur der hinterlegten Materialien bei Zucht unter geeigneten Bedingungen absterben oder verloren gehen oder zerstört werden, die Materialien nach Benachrichtigung umgehend durch andere desselben Typs ersetzt werden. Die Verfügbarkeit des hinterlegten Materials ist nicht als Lizenz zur Durchführung der Erfindung entgegen den Rechten auszulegen, die unter der Autorität einer Regierung in Einklang mit ihren Patentgesetzen erteilt wurden.

Sequenzprotokoll

<110> Genentech, Inc.

<120> UCP4

<130> P1626R1PCT

<150> US 60/101.279

<151> 1998-09-22

<150> US 60/114.223

<151> 1998-12-30

<150> US 60/129.674

<151> 1999-04-16

<160> 18

<210> 1

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ser	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Pro	Leu	Thr	Gln
1				5					10				15	

Arg	Trp	Pro	Arg	Ala	Ser	Lys	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Cys	Ala	Ala
					20				25				30	

Thr	Val	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Phe	Pro	Leu	Asp	Leu	Thr	Lys	Thr
						35			40				45	

Arg	Leu	Gln	Met	Gln	Gly	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gly	Asp
					50				55				60	

Gly	Ala	Arg	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Arg	Gly	Met	Val	Arg	Thr	Ala
					65				70				75	

Leu	Gly	Ile	Ile	Glu	Glu	Gly	Phe	Leu	Lys	Leu	Trp	Gln	Gly
					80			85				90	

Val	Thr	Pro	Ala	Ile	Tyr	Arg	His	Val	Val	Tyr	Ser	Gly	Gly	Arg
					95				100				105	

Met	Val	Thr	Tyr	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Phe	Gly	Lys	Ser
					110				115				120	

Glu	Asp	Glu	His	Tyr	Pro	Leu	Trp	Lys	Ser	Val	Ile	Gly	Gly	Met
					125				130				135	

Met	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Gln	Phe	Leu	Ala	Asn	Pro	Thr	Asp	Leu
						140			145				150	

Val	Lys	Val	Gln	Met	Gln	Met	Glu	Gly	Lys	Arg	Lys	Leu	Glu	Gly
						155			160				165	

Lys	Pro	Leu	Arg	Phe	Arg	Gly	Val	His	His	Ala	Phe	Ala	Lys	Ile
					170				175				180	

Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Ile	Arg	Gly	Leu	Trp	Ala	Gly	Trp	Val	Pro
					185				190				195	

Asn Ile Gln Arg Ala Ala Leu Val Asn Met Gly Asp Leu Thr Thr		
200	205	210
Tyr Asp Thr Val Lys His Tyr Leu Val Leu Asn Thr Pro Leu Glu		
215	220	225
Asp Asn Ile Met Thr His Gly Leu Ser Ser Leu Cys Ser Gly Leu		
230	235	240
Val Ala Ser Ile Leu Gly Thr Pro Ala Asp Val Ile Lys Ser Arg		
245	250	255
Ile Met Asn Gln Pro Arg Asp Lys Gln Gly Arg Gly Leu Leu Tyr		
260	265	270
Lys Ser Ser Thr Asp Cys Leu Ile Gln Ala Val Gln Gly Glu Gly		
275	280	285
Phe Met Ser Leu Tyr Lys Gly Phe Leu Pro Ser Trp Leu Arg Met		
290	295	300
Thr Pro Trp Ser Met Val Phe Trp Leu Thr Tyr Glu Lys Ile Arg		
305	310	315
Glu Met Ser Gly Val Ser Pro Phe		
320	323	
<210> 2		
<211> 1039		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		

```

ccgagctcgg atcccggtat cgtcttgcgc tactgctgaa tgtccgtccc 50
ggaggaggag gagaggcttt tgccgctgac ccagagatgg ccccgagcga 100
gcaaattcct actgtccggc tgccggctt ccgtggccga gctagcaacc 150
tttccccctgg atctcacaaa aactcgactc caaatgcaag gagaaggcagc 200
tcttgctcgg ttgggagacg gtgcagaga atctgcccc tatagggaa 250
tggtgcgcac agccctaggg atcattgaag aggaaggctt tctaaagctt 300
tggcaaggag tgacacccgc catttacaga cacgtatgtt attctggagg 350
tcgaatggtc acatatgaac atctccgaga ggttgtgtt ggcaaaagtg 400
aagatgagca ttatccccctt tggaaatcag tcattggagg gatgatggct 450
ggtgttattt gccagttttt agccaatcca actgacccatg tgaaggttca 500
gatgcaaattt gaaggaaaaa ggaaactgga aggaaaacca ttgcgatttc 550
gtggtgtaca tcatgcattt gcaaaaatct tagctgaagg aggaatacga 600
gggtttggg caggctgggt acccaatata caaagagcag cactggtgaa 650
tatgggagat ttaaccactt atgatacagt gaaacactac ttggtattga 700
atacaccact tgaggacaat atcatgactc acggtttatac aagtttatgt 750

```

tctggactgg tagtttat tctggaaaca ccggccggatg tttttttttt 800
 cagaataatg aatcaaccac gagataaaca aggaagggga cttttgtata 850
 aatcatcgac tgactgctt attcaggctg ttcaaggtga aggattcatg 900
 agtctatata aaggctttt accatcttgg ctgagaatga ccccttggtc 950
 aatgggttcc tggcttactt atgaaaaaaat cagagagatg agtggagtca 1000
 gtccatattta agaattctgc agatatccat cacactggc 1039
 <210> 3
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> künstlich

 <220>
 <223> künstliche Sequenz 1-31

 <400> 3
 cgccggatcccc gttatcgct tgcgctactg c 31

 <210> 4
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> künstlich

 <220>
 <223> künstliche Sequenz 1-34

 <400> 4
 gcggaaattct taaaatggac tgactccact catc 34

 <210> 5
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> künstlich

 <220>
 <223> künstliche Sequenz 1-1248

 <220>
 <221> unbekannt
 <222> 1231
 <223> unbekannte Base

 <400> 5
 cgttatcgtc ttgcgctact gctgaatgtc cgtccggag gaggaggaga 50
 gggttttgcc gctgacccag agatggccccc gagcgagcaa attcctactg 100
 tccggctgct cggctaccgt ggccgagcta gcaaccttgc ccctggatct 150
 cacaaaaact cgactccaaa tgcaaggaga agcagcttt gtcgggttgg 200
 gagacgggtgc aagagaatct gccccctata gggaaatggt ggcacagcc 250
 ctagggatca ttgaagagga aggctttcta aagcttggc aaggagtgac 300
 acccgccatt tacagacacg tagttatttc tggaggtcga atggtcacat 350

atgaacatct ccgagagggtt gtgtttggca aaagtgaaga tgagcattat 400
 cccctttgga aatcagtcat tggagggatg atggctggtg ttattggcca 450
 gtttttagcc aatccaactg acctagtgaa ggttcagatg caaatggaag 500
 gaaaaaggaa actggaagga aaaccattgc gatttcgtgg tgtacatcat 550
 gcatttgcaa aaatcttagc tgaaggagga atacgaaggc tttgggcagg 600
 ctgggtaccc aatatacataa gaggcact ggtgaatatg ggagatttaa 650
 ccacttatga tacagtgaaa cactacttgg tattgaatac accacttgag 700
 gacaatatca tgactcacgg tttatcaagt ttatgttctg gactggtagc 750
 ttctattctg ggaacaccag ccgatgtcat caaaagcaga ataatgaatc 800
 aaccacgaga taaacaagga agggacttt tgtataaatc atcgactgac 850
 tgcttgattc aggctgttca aggtgaagga ttcatgagtc tatataaagg 900
 ctttttacca tcttggctga gaatgacccc ttggtcaatg gtgttctggc 950
 ttacttatga aaaaatcaga gagatgagtg gagtcagtc attttaaacc 1000
 cctaaagatg caacccttaa agatacagtg ttcagtatta ttgaaatatg 1050
 ggcatctgca acacatacc cctattatc ctacctttt aggaagacac 1100
 ctattccaca gagactgatt tatagggggc agcactttat tttttctgg 1150
 aaacccaagt tctctttgac tcctttttt gtccaaaagt gatctggtcg 1200
 gatctcacaa ggccatccaa tgagaccccg nacagcattt tctaaaga 1248

<210> 6
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> künstliche Sequenz 1-58

<400> 6
 cgcggatccg aaatggacta caaggacgac gatgacaagt ccgtcccgga 50

ggaggagg 58
 <210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> künstliche Sequenz 1-35

<400> 7
 gcgaagcttg ccatggttgg actgaagcct tcaga 35

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA

<213> künstlich
<220>
<223> künstliche Sequenz 1-33
<400> 8
cgcgaattct caaaaacggtg attcccgtaa cat 33

<210> 9
<211> 61
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> künstliche Sequenz 1-61
<400> 9
gcgaagcttg ccatggacta caaggacgac gatgacaagg ttggactgaa 50

gccttcagac g 61
<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> künstliche Sequenz 1-19
<400> 10
aatgcctatc gccgaggag 19

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> künstliche Sequenz 1-20
<400> 11
gttaggaactt gctcgccgg 20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> künstliche Sequenz 1-22
<400> 12
tgctcgcgct cacgcagaga tg 22

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> künstlich

<220>
<223> künstliche Sequenz 1-24

<400> 13
 gaaatcgatgc gtgacatcaa agag 24

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> künstliche Sequenz 1-23

<400> 14
 ctccttctgc atcctgtcag caa 23

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> künstlich

<220>
 <223> künstliche Sequenz 1-22

<400> 15
 cggttccgat gccctgaggg tc 22

<210> 16
 <211> 307
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Gly Gly Leu Thr Ala Ser Asp Val His Pro Thr Leu Gly Val
 1 5 10 15

Gln Leu Phe Ser Ala Pro Ile Ala Ala Cys Leu Ala Asp Val Ile
 20 25 30

Thr Phe Pro Leu Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln Val Gln Gly
 35 40 45

Glu Cys Pro Thr Ser Ser Val Ile Arg Tyr Lys Gly Val Leu Gly
 50 55 60

Thr Ile Thr Ala Val Val Lys Thr Glu Gly Arg Met Lys Leu Tyr
 65 70 75

Ser Gly Leu Pro Ala Gly Leu Gln Arg Gln Ile Ser Ser Ala Ser
 80 85 90

Leu Arg Ile Gly Leu Tyr Asp Thr Val Gln Glu Phe Leu Thr Ala
 95 100 105

Gly Lys Glu Thr Ala Pro Ser Leu Gly Ser Lys Ile Leu Ala Gly
 110 115 120

Leu Thr Thr Gly Gly Val Ala Val Phe Ile Gly Gln Pro Thr Glu
 125 130 135

Val Val Lys Val Arg Leu Gln Ala Gln Ser His Leu His Gly Ile
 140 145 150

Lys Pro Arg Tyr Thr Gly Thr Tyr Asn Ala Tyr Arg Ile Ile Ala
 155 160 165

Thr Thr Glu Gly Leu Thr Gly Leu Trp Lys Gly Thr Thr Pro Asn
 170 175 180
 Leu Met Arg Ser Val Ile Ile Asn Cys Thr Glu Leu Val Thr Tyr
 185 190 195
 Asp Leu Met Lys Glu Ala Phe Val Lys Asn Asn Ile Leu Ala Asp
 200 205 210
 Asp Val Pro Cys His Leu Val Ser Ala Leu Ile Ala Gly Phe Cys
 215 220 225
 Ala Thr Ala Met Ser Ser Pro Val Asp Val Val Lys Thr Arg Phe
 230 235 240
 Ile Asn Ser Pro Pro Gly Gln Tyr Lys Ser Val Pro Asn Cys Ala
 245 250 255
 Met Lys Val Phe Thr Asn Glu Gly Pro Thr Ala Phe Phe Lys Gly
 260 265 270
 Leu Val Pro Ser Phe Leu Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val Ile Met
 275 280 285
 Phe Val Cys Phe Glu Gln Leu Lys Arg Glu Leu Ser Lys Ser Arg
 290 295 300
 Gln Thr Met Asp Cys Ala Thr
 305 307

<210> 17
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

Pro Thr Asp Val Val Lys Val Arg Phe Gln Ala Gln' Ala Arg Ala
 140 145 150

Gly Gly Gly Arg Arg Tyr Gln Ser Thr Val Asn Ala Tyr Lys Thr
 155 160 165

Ile Ala Arg Glu Glu Gly Phe Arg Gly Leu Trp Lys Gly Thr Ser
 170 175 180

Pro Asn Val Ala Arg Asn Ala Ile Val Asn Cys Ala Glu Leu Val
 185 190 195

Thr Tyr Asp Leu Ile Lys Asp Ala Leu Leu Lys Ala Asn Leu Met
 200 205 210

Thr Asp Asp Leu Pro Cys His Phe Thr Ser Ala Phe Gly Ala Gly
 215 220 225

Phe Cys Thr Thr Val Ile Ala Ser Pro Val Asp Val Val Lys Thr
 230 235 240

Arg Tyr Met Asn Ser Ala Leu Gly Gln Tyr Ser Ser Ala Gly His
 245 250 255

Cys Ala Leu Thr Met Leu Gln Lys Glu Gly Pro Arg Ala Phe Tyr
 260 265 270

Lys Gly Phe Met Pro Ser Phe Leu Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val
 275 280 285

Val Met Phe Val Thr Tyr Glu Gln Leu Lys Arg Ala Leu Met Ala
 290 295 300

Ala Cys Thr Ser Arg Glu Ala Pro Phe
 305 309

<210> 18
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ala Val Lys Phe Leu Gly Ala Gly Thr Ala Ala Cys Phe Ala
 1 5 10 15

Asp Leu Val Thr Phe Pro Leu Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln
 20 25 30

Ile Gln Gly Glu Asn Gln Ala Val Gln Thr Ala Arg Leu Val Gln
 35 40 45

Tyr Arg Gly Val Leu Gly Thr Ile Leu Thr Met Val Arg Thr Glu
 50 55 60

Gly Pro Cys Ser Pro Tyr Asn Gly Leu Val Ala Gly Leu Gln Arg
 65 70 75

Gln Met Ser Phe Ala Ser Ile Arg Ile Gly Leu Tyr Asp Ser Val
 80 85 90

Lys Gln Val Tyr Thr Pro Lys Gly Ala Asp Asn Ser Ser Leu Thr
 95 100 105

Thr	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Cys	Thr	Thr	Gly	Ala	Met	Ala	Val	Thr
110							115				120			
Cys	Ala	Gln	Pro	Thr	Asp	Val	Val	Lys	Val	Arg	Phe	Gln	Ala	Ser
125							130				135			
Ile	His	Leu	Gly	Pro	Ser	Arg	Ser	Asp	Arg	Lys	Tyr	Ser	Gly	Thr
140							145				150			
Met	Asp	Ala	Tyr	Arg	Thr	Ile	Ala	Arg	Glu	Gly	Val	Arg	Gly	
155							160				165			
Leu	Trp	Lys	Gly	Thr	Leu	Pro	Asn	Ile	Met	Arg	Asn	Ala	Ile	Val
170							175				180			
Asn	Cys	Ala	Glu	Val	Val	Thr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu
185							190				195			
Leu	Asp	Tyr	His	Leu	Leu	Thr	Asp	Asn	Phe	Pro	Cys	His	Phe	Val
200							205				210			
Ser	Ala	Phe	Gly	Ala	Gly	Phe	Cys	Ala	Thr	Val	Val	Ala	Ser	Pro
215							220				225			
Val	Asp	Val	Val	Lys	Thr	Arg	Tyr	Met	Asn	Ser	Pro	Pro	Gly	Gln
230							235				240			
Tyr	Phe	Ser	Pro	Leu	Asp	Cys	Met	Ile	Lys	Met	Val	Ala	Gln	Glu
245							250				255			
Gly	Pro	Thr	Ala	Phe	Tyr	Lys	Gly	Phe	Thr	Pro	Ser	Phe	Leu	Arg
260							265				270			
Leu	Gly	Ser	Trp	Asn	Val	Val	Met	Phe	Val	Thr	Tyr	Glu	Gln	Leu
275							280				285			
Lys	Arg	Ala	Leu	Met	Lys	Val	Gln	Met	Leu	Arg	Glu	Ser	Pro	Phe
290							295				300			

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, umfassend:

- (a) für ein UCP4-Polypeptid kodierende DNA mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit einem Nucleinsäuremolekül, das für die Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) kodiert (Seq.-ID Nr. 1);
- (b) das Komplement des DNA-Moleküls aus (a);
- (c) für ein UCP4-Polypeptid mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit der Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) kodierende DNA; oder
- (d) das Komplement des DNA-Moleküls aus (c).

2. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend die Sequenz an Nucleotiden von 40 bis 1011 aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2).

3. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend die Nucleotidsequenz aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2).

4. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, worin das Nucleinsäuremolekül für ein UCP4-Polypeptid kodierende DNA umfasst und an das Komplement der Nucleinsäure, die Nucleotide von 40 bis 1011 aus [Fig. 2](#) (Seq.-ID Nr. 2) umfasst, unter Bedingungen hybridisiert, die 50% Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1% Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, beschallte Lachsspermien-DNA (50 g/ml) (richtig: 50 µg/ml), 0,1% SDS und 10% Dextranulfat bei 42°C umfassen, mit Waschschriften bei 42°C in 0,2 × SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50% Formamid bei 55°C, gefolgt von einem Waschschrift mit hoher Stringenz, bestehend aus 0,1 × SSC, enthaltend EDTA, bei 55°C.

5. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend DNA mit einer Sequenzidentität von zu-

mindest 80% mit (a) einem DNA-Molekül, das für dasselbe reife Polypeptid kodiert, das von der cDNA in der ATCC-Hinterlegungsnr. 203134 kodiert wird (DNA 77568-1626), oder (b) dem Komplement des DNA-Moleküls aus (a).

6. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, umfassend DNA, die für dasselbe reife Polypeptid kodiert, das von der cDNA in der ATCC-Hinterlegungsnr. 203134 kodiert wird (DNA 77568-162G) (richtig DNA 77568-1626).

7. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, umfassend (a) DNA, die für ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) umfasst, oder (b) das Komplement der DNA aus (a).

8. Vektor, umfassend die Nucleinsäure nach Anspruch 1.

9. Vektor nach Anspruch 8, operabel an Kontrollsequenzen gebunden, die von einer Wirtszelle erkannt werden, die mit dem Vektor transformiert wurde.

10. Wirtszelle, umfassend den Vektor nach Anspruch 9.

11. Wirtszelle nach Anspruch 10, wobei es sich bei der Zelle um eine CHO-Zelle handelt.

12. Wirtszelle nach Anspruch 10, wobei es sich bei der Zelle um eine E.-coli-Zelle handelt.

13. Wirtszelle nach Anspruch 10, wobei es sich bei der Zelle um eine Hefe-Zelle handelt.

14. Verfahren zur Herstellung eines UCP4-Polypeptids, umfassend das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 10 unter Bedingungen, die für die Expression des UCP4-Polypeptids geeignet sind, sowie das Gewinnen des UCP4-Polypeptids aus der Zellkultur.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Verfahren Folgendes umfasst: (i) das Hybridisieren eines Test-DNA-Moleküls unter Bedingungen, die 50% Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1% Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, beschallte Lachsspermien-DNA (50 g/ml) (richtig: 50 µg/ml), 0,1% SDS und 10% Dextranulfat bei 42°C umfassen, mit Waschschriften bei 42°C in 0,2 SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50% Formamid bei 55°C, gefolgt von einem Waschschritt bei hoher Stringenz, bestehend aus 0,1 × SSC, enthaltend EDTA, bei 55°C, an (a) ein DNA-Molekül, das für ein UCP4-Polypeptid, umfassend die Sequenz an Aminosäureresten von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1), kodiert, oder (b) das Komplement des DNA-Moleküls aus (a) und, falls das Test-DNA-Molekül eine Sequenzidentität von zumindest etwa 80% mit (a) oder (b) aufweist, (ii) das Züchten einer Wirtszelle, umfassend das Test-DNA-Molekül, unter Bedingungen, die für die Expression des Polypeptids geeignet sind, sowie (iii) das Gewinnen des Polypeptids aus der Zellkultur.

16. Isoliertes UCP4-Polypeptid, das von der DNA nach Anspruch 1 kodiert wird.

17. Isoliertes UCP4-Polypeptid, umfassend ein Polypeptid mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit der Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1).

18. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 17, umfassend Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1).

19. Isoliertes UCP4-Polypeptid nach Anspruch 17, worin das UCP4-Polypeptid vom cDNA-Insert des Vektors kodiert wird, das als ATCC-Hinterlegungsnr. 203134 (DNA 77568-1626) hinterlegt ist.

20. Isoliertes UCP4-Polypeptid nach Anspruch 17, bestehend im Wesentlichen aus den Aminosäureresten 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1).

21. Isoliertes UCP4-Polypeptid nach Anspruch 17, bestehend aus den Aminosäureresten 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1).

22. Chimäres Molekül, umfassend ein UCP4-Polypeptid nach Anspruch 16 und an eine heterologe Aminosäuresequenz fusioniert.

23. Chimäres Molekül nach Anspruch 22, wobei die heterologe Aminosäuresequenz eine Epitop-Markierungssequenz ist.
24. Chimäres Molekül nach Anspruch 22, wobei die heterologe Aminosäuresequenz eine Fc-Region eines Immunglobulins ist.
25. Antikörper, der spezifisch an ein UCP4-Polypeptid mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit der Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) bindet.
26. Antikörper nach Anspruch 25, wobei der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
27. Verfahren zur Modulation des Stoffumsatzes in einer Säugetierzelle in vitro, umfassend den Schritt des Hinaufregulierens oder des Hinabregulierens der UCP4-Polypeptidaktivität in der Säugetierzelle, wobei das UCP4-Polypeptid eine Sequenzidentität von zumindest 80% mit der Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) aufweist.
28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die Hinaufregulation der UCP4-Polypeptidaktivität eine Erhöhung des Stoffumsatzes bei einem fettleibigen Säugetier stimuliert.
29. Verfahren zur Durchführung eines In-vitro-Screening-Tests zur Identifikation eines Moleküls, das die Expression eines UCP4-Polypeptids mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit der Sequenz der Aminosäurereste von 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) verbessert oder hinaufreguliert oder verringert oder hinabreguliert, umfassend die Schritte des Aussetzens einer Säugetierzell- oder Säugetiergewebsprobe, von der angenommen wird, sie würde UCP4 umfassen, gegenüber einem Kandidatenmolekül und das anschließende Analysieren der Expression von UCP4 in der Probe.
30. Verfahren nach Anspruch 29, weiters umfassend den Schritt der Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in der Probe.
31. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das UCP4-Polypeptid die Aminosäurereste 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) umfasst.
32. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Probe menschliches Gehirngewebe umfasst.
33. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das Kandidatenmolekül ein kleines Molekül ist, das eine synthetische organische oder anorganische Verbindung umfasst.
34. Verfahren zur Detektion der In-vitro-Expression von UCP4-Polypeptid mit einer Sequenzidentität von zumindest 80% mit der Sequenz der Aminosäurereste 1 bis 323 aus [Fig. 1](#) (Seq.-ID Nr. 1) in einer Säugetierzell- oder Säugetiergewebsprobe, umfassend das Kontaktieren einer Säugetierzell- oder Säugetiergewebsprobe mit einer DNA-Sonde sowie das Analysieren der Expression von UCP4-mRNA-Transkript in der Probe.
35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei es sich bei der Probe um menschliches Gehirngewebe handelt.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

MSVPEEEERLLPLTQRWPRASKFLLSGCAATVAELATFPLDLTKTRLQMQGEAALARLG
DGARESAPYRGMVVRTALGIEEEGFLKLWQGVTPAIYRHVVYSGGRMVTYEHLRREVVFG
KSEDEHYPLWKSVIGGMMAGVIGQFLANPTDLVKVQMQMEGKRKLEGKPLRFRGVHAF
AKILAEGGIRGLWAGWVVPNIQRAALVNMGDLTTYDTVKHYLVLNTPLEDNIMTHGLSSL
CSGLVASICGTPADVIKSRMNQPRDKQGRGLLYKSSTDCLIQAVQGEGFMSLYKGFLP
SWLRMTPWSMVFWLTYEKIREMSGVSPF

FIG. 1

CCGAGCTCGGATC
 CGTTATCGTCCTGGCTACTGCTGA
 ATGTCGGTCCGGAGGGAGGAGGCTTGTGCCGGTACCCAGAGATGGCCCCGAGCG
 AGCAAATTCTACTGTCGGCTGGCTACCGTGGAGCTAGCAACCTTCCCTG
 GATCTCACAAACTCGACTCCAATGCAAGGAGAACGGCTCTGGCTCGGGAGAC
 GGTGCAAGAGAACTGCCCCCTATAGGGAAATGGGCAAGGCGACACGCTAGTG
 GAGGAAGGCTTCTAAAGCTTGGCAAGGAGTGCACACGGCCATTACAGACACGTAGTG
 TATTCTGGAGGTCGAATGGTCACATATGAACACATCTCCGAGAGGTTGTGTTGGCAAAGT
 GAAGATGAGCATTATCCCTTGGAAATCAGTCATTGGAGGATGATGGCTGGTGTATT
 GGGCAGTTAGCCAATCCAACCTGACCTAGTGAAGGTTCAAGATGCCAATGGAGGAAAG
 AGGAAACTGGAAAGAACCATGGGATTTCGTTGGGTACATCATGCATTGCAAAATC
 TTAGCTGAAGGGAAATACGAGGGCTTGGGGTACCCAAATAACAAGAGCA
 GCACTGGTAATGGGAGATTAACCACTTATGATAACGTGAAACACTACTGGTATTG
 AATACACCACTGGAGCAATCATGACTCACGGTTATCAAGTTATGTTCTGGACTG
 GTAGCTCTATCTGGGAACACCCAGGGGATGTCACTAAAGCAGAAATAATGAATCAACCA
 CGAGATAAACAGGAAGGGACTTGTATAAATCATCGACTGACTGCTGGCTGGCT
 GTTCAAGGTGAAGGGATTCAAGTCTATAAAGGCTTTACCATCTGGCTGAGAATG
 ACCCCTGGTCAATGGTGTGGCTTACTTATGAAAAAATCAGAGATGAGTGGAGTC
 AGTCCATTAAAGAATTCTGCAGATAATCCATCACACTGGC

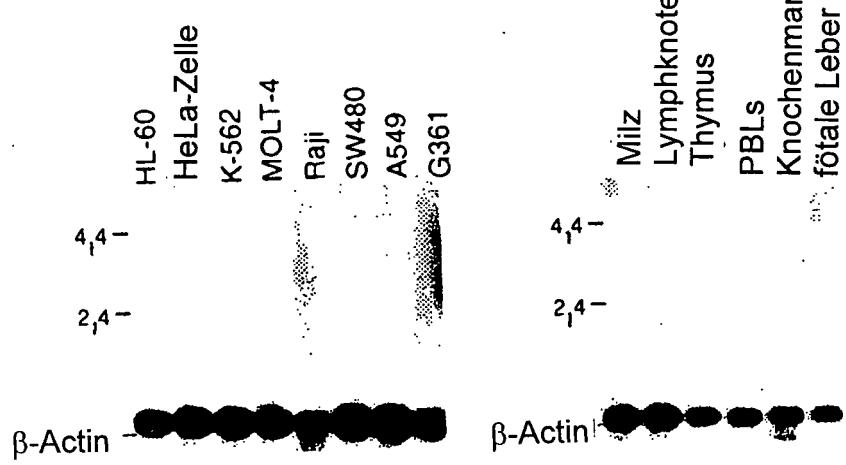
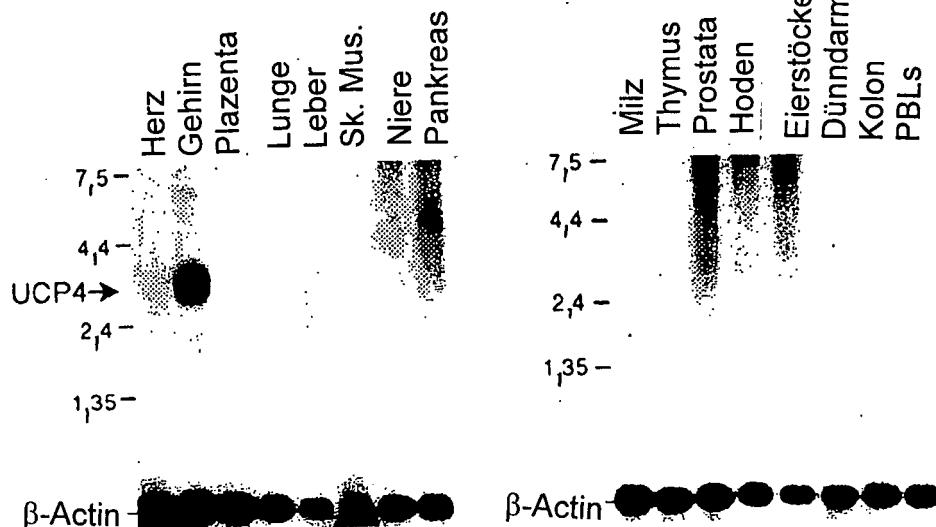
FIG. 2

UCP1	1	- - - - -	M[G]LT[A]SD[V]H[P]TLG[V]QOLF[S]APIAAC	LAD[V]ITFPLDTAKVRLQ[V]Q	
UCP2	1	- - - - -	M[V]G[F]KA[T]D[V]P[P]TA[V]KFLGAGTAAC	IADLITFPLDTAKVRLQ[I]Q	
UCP3	1	- - - - -	- - - - -	ADL[V]TFPLDTAKVRLQ[I]Q	
UCP4	1	MSVPEEEER	[L]PLTQ[R]W[P]RA[SK]FLLSG[CA]ATV[A]EL	ATFPLDLT[K]T[R]LQ[M]Q	
				I	
				** * * *	
UCP1	45	GEC P - - -	TSSVIRYKGVLGTTAVVKT	GRMKLYSGL[PAGL]Q[R]Q[IS]	
UCP2	45	GES[Q]G[P]V[R] - - -	[AT]VSAQYRGV[M]GT	ILTMVRTEGPRSLYNGL[VAGL]Q[R]Q[MS]	
UCP3	33	GEN[Q] - [AV]Q - - -	[T]ARLVQYRGVLGT	ILTMVRTEGPCSPYNGL[VAGL]Q[R]Q[MS]	
UCP4	51	GEAA[AL]ARLGDGA	[RESA]PYRGMVR[T]ALGIIEEE[G]F	[L]KLTWQ[G]VT[PAI]YRHVV	
				II	
				** * * *	
UCP1	88	SAS[L]RIGLYDT[V]Q[E]FL	TAGKET - A PSLGSKILLAGLTTGGVAVFIGQPT[E]V		
UCP2	92	FAS[V]RIGLYDSVKQFYTKGS[E] - - [H]ASIG[S]RILLAG	STTGALAVAV[A]QPTDV		
UCP3	79	FASI[RIGLYDSVKQVYTPKGAD	- NSSLTTRILAGCTTGAMAVTC[A]QPTDV		
UCP4	101	YSGGRMVT[Y]EHLRE[V]VFGKSEDE	[HYPLWKS[V]IGGMAGVIGQFLA[N]P[T]DL		
				III	
				** * * *	
UCP1	137	V[K]VRLQ[A]Q[SHL]HG - -	I[K]P[RY]T[G]T[Y]NAYR[IA]TTEGLT[G]LWKGTT	P[N]L[M]RS	
UCP2	140	V[K]VRFQ[A]Q[ARAG] - -	G[G]RRYQ[ST]V[NAY]KTIAREEGF[R]GLWKGTS	P[N]VARN	
UCP3	128	V[K]VRFQ[A]S[I]HLG	SGTM[DAY]RTIAREEGV[R]GLWKGTL	P[N]IMRN	
UCP4	151	V[K]VQ[OM]EGKRKLEGKPLR	[F]RGV[H]FA[K]ILAE[G]GIRGLWAGWV[PNI]QRA		
				** * * *	

FIG. 3A

UCP1 185	V T I N C T E L V T Y D L M K E A F V K N N I A D D V P C H L V S A L I A G F C A T A M S S P V D	**
UCP2 187	A I V N C A E L V T Y D L I K D A L L K A N L M T D D L P C H F T S A F G G C T T V I A S S P V D	
UCP3 178	A I V N C A E V V T Y D I L K E R L L D Y H L L T D N F P C H F V S A F G G C A T V V A S S P V D	
UCP4 201	A L V N M G D L T T Y D T V K H Y L V L N T P L E D N I M T H G L S S L C S G L V A S I L G T P A D	
	IV	V
UCP1 235	V V K T R F I N S P P G Q - - - - - Y K S V P N C A M K V F T N E G P T A F F K G L V P S F I R L	
UCP2 237	V V K T R Y M N S A L G Q - - - - - Y S S A G H C A L T M L Q K E G P R A F Y K G F M P S F L R L	
UCP3 228	V V K T R Y M N S P P G Q - - - - - Y F S S P L D C M I K M V A Q E G P T A F Y K G F T P S F L R L	
UCP4 251	V I K S R I M N Q P R D K Q G R G L L Y K S S T D C L I Q A V Q G E G F M S L Y K G F L P S W L R M	
	IV	V
UCP1 279	G S W N V I M F V C F E Q L K R E L S K S R Q T M D C A T	VI
UCP2 281	G S W N V V M F V T Y E Q L K R A L M A C T S R E A P F	
UCP3 272	G S W N V V M F V T Y E Q L K R A L M K V Q M L R E S P F	
UCP4 301	T P W S M V F W L T Y E K I R E M S G V S P F - - - - -	

FIG. 3B



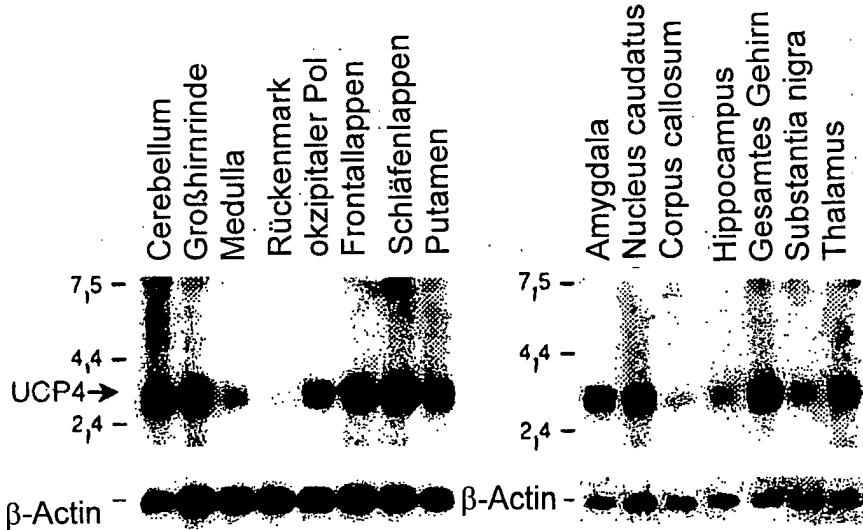


FIG. 4E

FIG. 4F

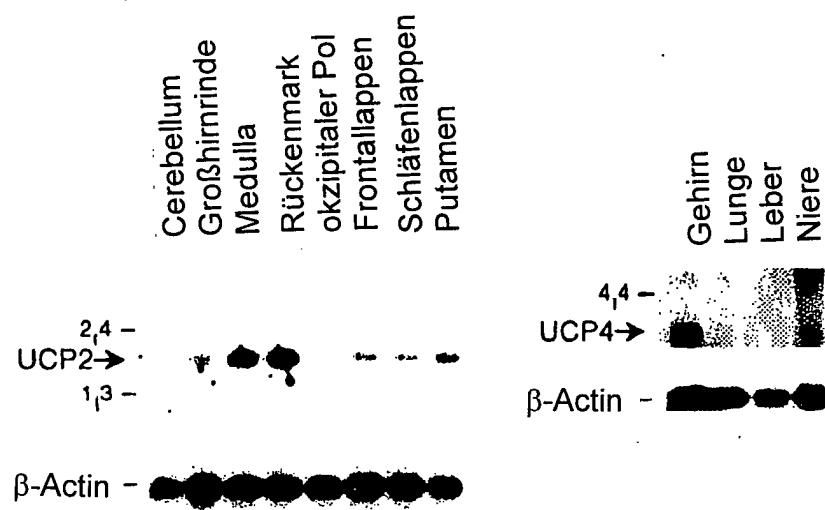


FIG. 4G

FIG. 4H

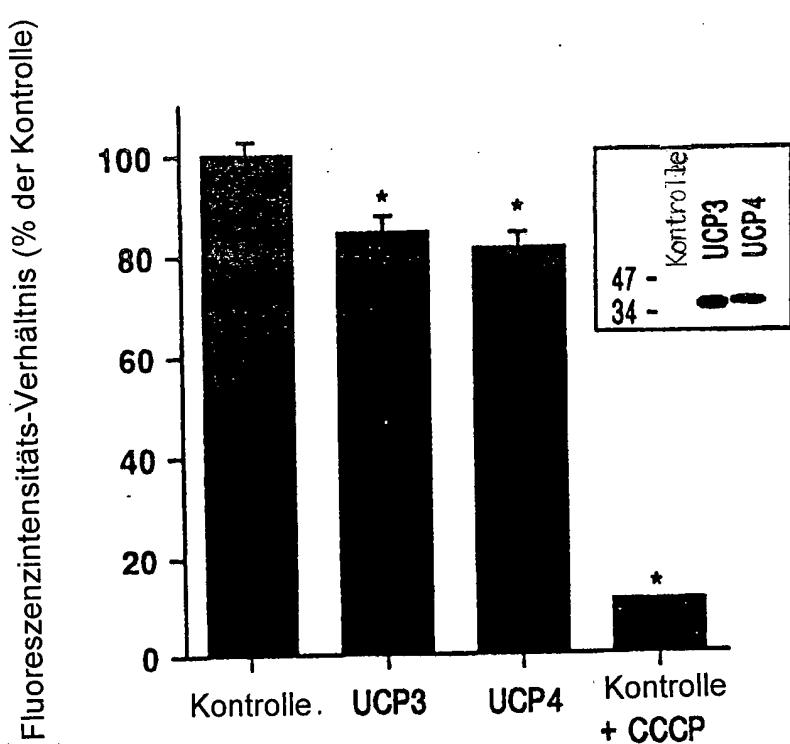


FIG. 5A

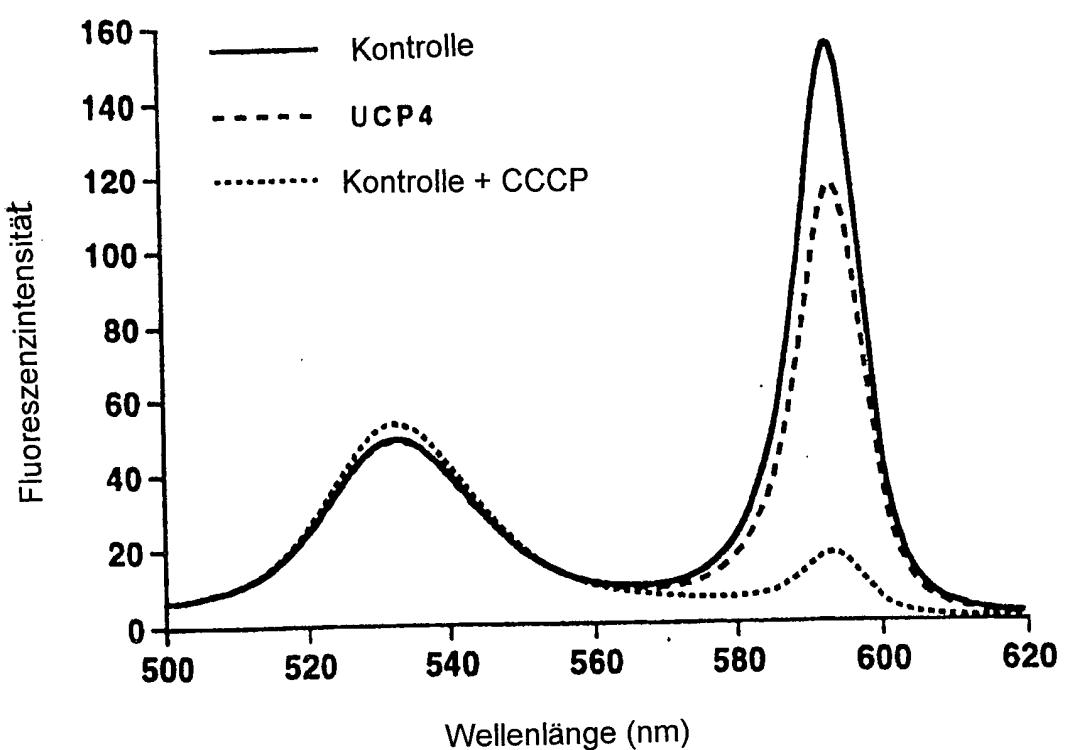


FIG. 5B

FIG. 6A



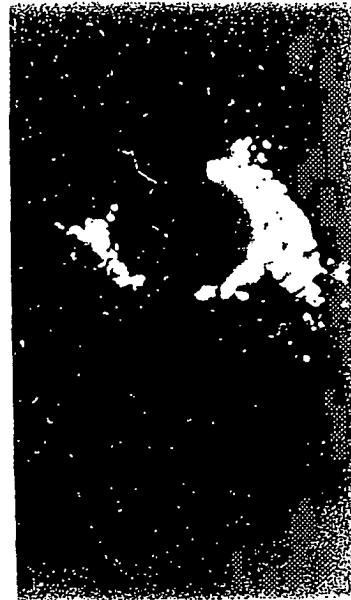
Anti-Cyto

FIG. 6B



Anti-Cyto Anti-Flag

FIG. 6C



Anti-Flag

FIG. 6D



Anti-Cyto

FIG. 6E



Anti-Cyto Anti-Flag

FIG. 6F



Anti-Flag

FIG. 7

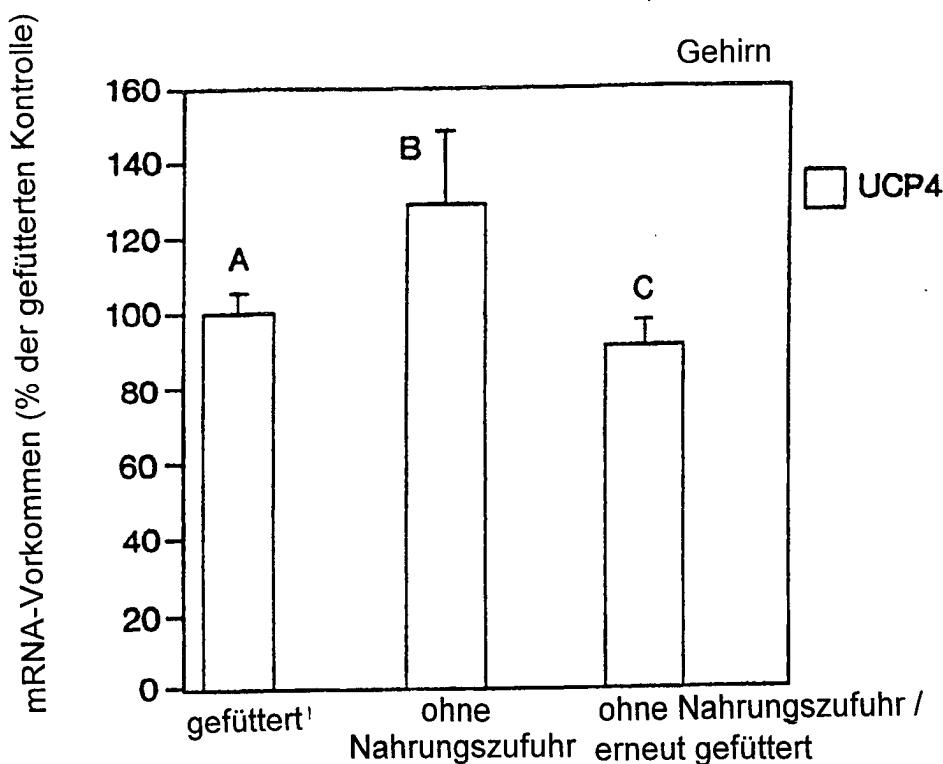


FIG. 8

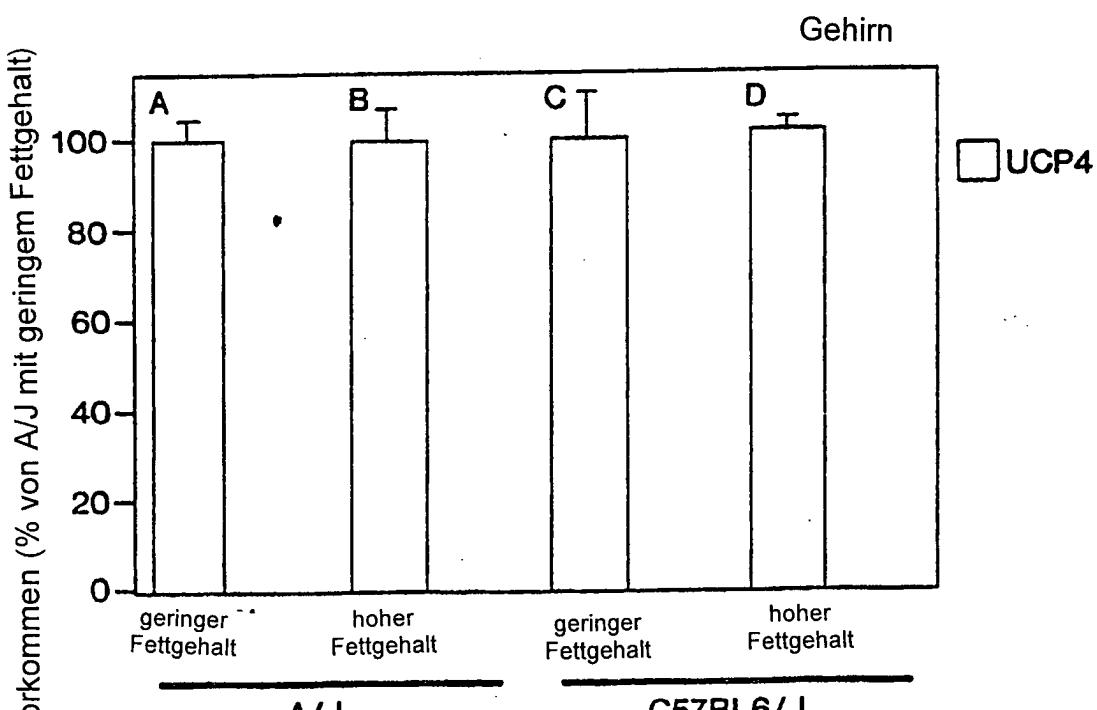


FIG. 9

